

## Le plaste des diatomées : centre énergétique et cible des interactions allélopathiques

Alexandra Peltekis

### ▶ To cite this version:

Alexandra Peltekis. Le plaste des diatomées : centre énergétique et cible des interactions allélopathiques. Interactions entre organismes. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS174 . tel-03329733

## HAL Id: tel-03329733 https://theses.hal.science/tel-03329733

Submitted on 31 Aug 2021  $\,$ 

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.







# Sorbonne Université

# Ecole doctorale : ED515 Complexité du vivant UMR7141 Biologie du chloroplaste et perception de la lumière chez les micro-algues

# Le plaste des diatomées : centre énergétique et cible des interactions allélopathiques

par Alexandra Peltekis

Pour l'obtention du grade de Docteur de Sorbonne Université

Encadrée par Benjamin Bailleul et dirigée par Francis-André Wollman

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 9 avril 2020 devant le jury composé de :

Annick Méjean – Rapportrice

Jean Alric – Rapporteur

Laure Guillou – Examinatrice

Thomas Lacour – Examinateur

Benjamin Bailleul – Encadrant de thèse

Francis-André Wollman – Directeur de thèse



CC (i) (i) Except where otherwise noted, this work is licensed under http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

A mon mari Giannis et ma fille Irène

A ma famille

Pour m'avoir toujours soutenue pendant mes études

A Benjamin Bailleul Pour cette belle expérience

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes encadrants de Thèse Francis-André Wollman et Benjamin Bailleul pour m'avoir donné la chance d'accomplir ce travail de thèse qui m'a tant passionné pendant ces quatre années au laboratoire « Biologie du chloroplaste et perception de la lumièr chez les micro-algues ».

Je les remercie pour leur soutien, leur confiance et leur patience qui mon permis d'arriver au bout de cette thèse. Je voudrais remercier tout particulièrement Benjamin Bailleul pour cette expérience enrichissante, pour son dévouement, sa présence, et surtout sa patience. Je remercie également Angela Falciatore pour son aide sur mon projet de thèse, son soutien moral et sa compréhension.

Je tiens tout particulièrement à remercier toutes les membranes de l'UMR 7141, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et enrichissants.

Je remercier egalement tous ceux qui ont contribué à mon travail de thèse. Marc Long, Hélène Hegaret, Eva Ternon, Yan Probert, Angelo Fontana, Laure Guillou, Annick Mejean, Rabia Marmouz et Anais Marconnet.

Je remercie les deux stagiaires que j'ai encadré Adèle et Pierre, ainsi qu'à Clara qui est venue tous les matins prélever avec nous du phytoplancton dans dans la baie de Penzé. Je remercie mon jury de Thèse et leur souhaite bon courage pour la lécture de ce long manuscrit.

J'aimerais remercier tout particulièrement Jean Pierre Bouly pour ses conseills précieux et sa disponibilité lors de la rédaction du manuscrit. Ainsi que tous ceux qui m'ont soutenu et aidé pendant toutes ces années, et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, Suzanne, Domitille, Steffania, Marina, Sandrine.

Mes amis Lea R'Bibo, Stamatia Gioftsidi, Eleonora Margaritopoulos, Mathieu qui m'ont gentiment aidée dans la mise en page de la thèse, ainsi que pour leur soutien.

Enfin j'aimerais remercier mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont encouragé dans mes études, ainsi que mon mari Giannis pour son soutien quotidien pendant ces quatre ans et ma fille Irène qui a bien voulu faire ses nuits, afin que je puisse finir d'écrire ces mots.

# Table des matières

| Table des matières   | 1   |
|--|-----|
| Table des figures  | 5   |
| Table des tableaux   | 11  |
| Liste des abréviations   | 12  |
| Introduction Générale  | 16  |
| Le phytoplancton et la photosynthèse marine  | 17  |
| I. Le phytoplancton et les autres groupes composant le plancton  | 17  |
| II. La photosynthèse oxygénique  | 26  |
| Ecologie du phytoplancton et rôle de l'allélopathie  | 68  |
| I. Le « paradoxe du plancton »   | 68  |
| II. Efflorescences phytoplanctoniques et HABs  | 70  |
| III. Distribution et dynamique des communautés phytoplanctoniques  | 72  |
| IV. HABs et allélopathie   | 75  |
| V. Les interactions allélopathiques  | 79  |
| Objectifs de la thèse 1  | 01  |
| Chapitre 1 : Interaction entre les alkyl-quinolones bactériennes et la photosynthèse                       | des |
| diatomées1   | 03  |
| Introduction : Rôle écologique des bactéries marines et leurs interactions avec les diatomées1             | 04  |
| I. Les bactéries, leur rôle écologique dans l'Océan et leurs interactions avec le phytoplancton            | 04  |
| II. Les interactions bactérie-diatomée1  | 08  |
| III. Molécules autoinductrices (Alkyl-quinolones) du <i>quorum sensing</i> affectant les diatomées marines | 12  |
| Objectifs du chapitre1   | 17  |
|  |     |

| Article: The multifaceted inhibitory effects of an alkyl-quinolone on the diatom   |
|--|
| Phaeodaciyium iricornuium. 118   |
| Discussion   |
| 1. Innibition de la respiration et pmi à l'obscurite   |
| II. Quel est le role ecologique des quinolones dans le milieu marin ?  |
| Chapitre 2 : Mécanisme d'inhibition de la photosynthèse de la diatomée <i>Chaetoceros muelleri</i>                         |
| par le dinoflagellé <i>Alexandrium minutum</i>   |
| Introduction : Toxicité et allélopathie chez le dinoflagellé Alexandrium minutum   |
| I. Classification : le genre <i>Alexandrium</i>  |
| II. Stratégie nutritionnelle et cycle de vie   |
| III. Toxines produites par le genre <i>Alexandrium</i>   |
| IV. Distribution et occurrence des efflorescences149   |
| V. Allélopathie au sein du genre <i>Alexandrium</i>  |
| Objectifs du chapitre  |
| Article à soumettre: Allelochemicals from Alexandrium minutum lead to membrane   |
| disruption and photosynthesis inhibition in a co-occurring diatom  |
| Discussion   |
| I. Comment les composés allélochimiques d' <i>A. minutum</i> diminuent-t-il la pmf à l'obscurité chez <i>C. muelleri</i> ? |
| II. Quelles sont les effets de ces composés allélochimiques sur la membrane cytoplasmique ?                                |
| III. Quelle est le lien entre l'effet sur les membranes cytoplasmiques et l'inhibition de la photosynthèse ?               |
| IV. Quelle est la nature du composé allélochimique libéré par Alexandrium minutum ?<br>193                                 |
| V. Quel rôle écologique pour l'effet allélopathique d' <i>Alexandrium minutum</i> sur les diatomées ?                      |
| Chapitre 3 : Mesurer la photosynthèse en mélange, révèle des interactions allélopathiques :                                |
| Amphidinium carterae inhibe la photosynthèse des diatomées   |
| Introduction : Amphidinium carterae, une « usine » à métabolites secondaires   |

| I.        | Classification du genre Amphidinium  | . 200          |
|-----------|--|----------------|
| II.       | Stratégie nutritionnelle et cycle de vie   | . 202          |
| III.      | Distribution et occurrence d'efflorescences  | . 204          |
| IV.       | Métabolites secondaires produits par le genre Amphidinium  | . 208          |
| V.        | Toxicité et allélopathie   | . 222          |
| Objec     | tifs de ce chapitre  | . 226          |
| Métho     | odes   | . 227          |
| I.        | Matériel et cultivation  | . 227          |
| II.       | Préparation des filtrats d'A. carterae   | . 227          |
| III.      | Spectroscopie de fluorescence et d'absorption  | . 228          |
| IV.       | Isolation des amphidinols  | . 228          |
| Résul     | tats   | . 229          |
| I.<br>ma  | <i>A. carterae</i> inhibe la photosynthèse de <i>T. pseudonana</i> et d'autres micro-algues rines                                      | . 229          |
| II.       | Allélopathie et co-cultures de <i>T. pseudonana</i> et <i>A. carterae</i>  | . 233          |
| III.      | <i>A. carterae</i> dissipe la pmf chez la diatomée <i>T. pseudonana</i>  | . 237          |
| IV.       | Identification des métabolites secondaires impliqués dans l'effet allélopathique   | e240           |
| V.        | Vers une compréhension plus fine du mécanisme allélopathique   | . 243          |
| Discu     | ssion  | . 247          |
| I.        | Mécanisme de l'interaction allélopathique entre A. carterae et T. pseudonana   | . 247          |
| II.       | Les Amphidinols, perturbateurs des membranes biologiques   | . 249          |
| III.      | Quels facteurs influencent l'allélopathie d' <i>A. carterae</i> ?  | . 256          |
| IV.       | Activité allélopathique d' <i>A. carterae</i> sur le terrain   | . 257          |
| Discussi  | ion Générale   | . 260          |
| I.        | L'allélopathie chez les dinoflagellés de marée rouge, une stratégie commune ?  | . 261          |
| II.       | Allélopathie au sein du phytoplancton : quelles méthodes ?   | . 266          |
| Annexe    |  | . 269          |
| I.<br>the | Article soumis: Allelochemistry in the dynamics of microalgal species: case stud<br>toxic benthic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata. | ly of<br>. 269 |

| Bibliographie |  |
|---------------|--|
| Résumé        |  |
| Abstract      |  |

# Table des figures

| Figure 1 : Représentation des organismes planctoniques  |
|---|
| Figure 2: Espèces protozoaires plactoniques et taille   |
| Figure 3 : Arbre phylogénétique des eucaryotes  |
| Figure 4: Histoire évolutive des plastes  |
| Figure 5: Structure d'un chloroplaste et représentation schématique des différentes structures        |
| de l'organite   |
| Figure 6 : Structures et spectres d'absorption des chlorophylles                                      |
| Figure 7 : Structures chimiques et spectres d'absorption des 7 principaux caroténoïdes de la          |
| lignée verte  |
| Figure 8 : Le cycle des xanthophylles   |
| Figure 9 : Représentation schématique de la structure du PSII dans la membrane du thylacoïde.         |
|   |
| Figure 10 : Représentation schématique du PSI, de la photochimie entre P700 et A0 et du transfert     |
| d'électrons au sein du centre réactionnel   |
| Figure 11: Représentation schématique du fonctionnement du cytochrome b <sub>6</sub> f et du Q cycle. |
|   |
| Figure 12 : Le schéma en Z  |
| Figure 13 : Représentation schématique de la structure de l'ATP synthase chloroplastique,             |
| insérée dans la membrane du thylacoïde41  |
| Figure 14 : Réactions et intermédiaires du cycle de Calvin-Benson-Bassham                             |
| Figure 15 : Représentation schématique de la voie de transfert d'électron linéaire et des             |
| différentes voies de transfert d'électron alternatives  |
| Figure 16 : Cellule entière de la diatomée Phaeodactylum tricornutum et contact physique entre        |
| chloroplaste et mitochondrie  |
| Figure 18 : Interaction énergétique entre le chloroplaste et la mitochondrie chez les diatomées.      |
|   |
| Figure 19 : Les trois voies de dé-excitation d'une chlorophylle excitée, à la suite de l'absorption   |
|   |

| Figure 20 : Courbe d'évolution de la fluorescence chlorophyllienne chez la diatomée T.          |
|---|
| pseudonana  |
| Figure 21: Dépendance des paramètres de fluorescence en fonction de l'intensité de la lumière   |
| actinique chez la diatomée, Phaeodactylum tricornutum   |
| Figure 22 : Spectre de différence d'absorption (P700 oxydé moins P700 réduit)61                 |
| Figure 23 : Principe du décalage électrochromique   |
| Figure 24 : Principe de l'ECS linéaire et quadratique chez les diatomées                        |
| Figure 25 : Spectre ECS de P. tricornutum comprenant deux composantes spectrales                |
| superposées, ECS linéaire et quadratique  |
| Figure 26 : Cinétique du signal ECS après un flash laser saturant et représentation schématique |
| d'un thylacoïde comprenant tous les complexes photosynthétiques impliqués dans la génération    |
| et la dissipation du champ électrique (PSI, PSII, cytochrome $b_6 f$ et ATP synthase)           |
| Figure 27 : Composition d'une goutte d'eau de mer au microscope grossissement x25 69            |
| Figure 28 : Représentation simplifiée du mandala de Margalef74                                  |
| Figure 29 : Fréquence d'occurrence d'HAB pendant le siècle dernier en Zone Economique           |
| Exclusive en Inde76   |
| Figure 30: Structure chimique de la fischerelline A et de la cyanobacterine                     |
| Figure 31: Deux phycotoxines connues présentant une activité allélopathique : l'acide           |
| okadaïque et la dinophysistoxine 190  |
| Figure 32 : Composés allélochimiques isolés chez les espèces phytoplanctoniques marines. 92     |
| Figure 33 : Stérols composant les membranes chez les microalgues97                              |
| Figure 34 : Facteurs abiotiques connus affectant l'activité allélopathique de l'haptophyte      |
| Prymnesium parvum   |
| Figure 35 : Transformation bactérienne de la matière organique dérivé du phytoplancton 105      |
| Figure 36: Zone d'interaction entre bactéries et phytoplancton, la « phycosphère » 107          |
| Figure 37: Principe du quorum sensing (QS)113   |
| Figure 38 : Structure de différentes 2-alkyl-quinolones   |
| Figure 39 : Organisation générale d'un dinoflagellé à thèque (ici Alexandrium)140               |
| Figure 40 : Cycle de vie d'Alexandrium minutum  |

| Figure 41 : Structure chimique de la saxitoxine (SXT) et de certains de ses dérivés             |
|---|
| (gonyautoxines, GTX) produits par les espèces du genre Alexandrium                              |
| Figure 42 : Structure de certaines imines cycliques   |
| Figure 43 : Structure de la goniodomine A et B  |
| Figure 44 : Concentration cellulaire des espèces d'Alexandrium sur le littoral français 151     |
| Figure 45 : Gradient électrochimique de proton généré dans le noir dans le chloroplaste grâce à |
| l'ATP mitochondrial   |
| Figure 46: Image représentant l'effet des composés allélochimiques d'Alexandrium tamarense      |
| sur les mitochonries et les membranes de Phaeodactylum tricornutum192                           |
| Figure 47 : Dessin d'Amphidinium carterae   |
| Figure 48 : Images obtenues par microscopie optique du genre Amphidinium                        |
| Figure 49 : Répartition mondiale des observations d'Amphidinium                                 |
| Figure 50 : Deux exemples de structure d'amphidinolides. Amphidinolide A et amphidinolide       |
| N   |
| Figure 51 : Structure des amphidinolactones A et B  |
| Figure 52 : Structure des iriomoteolides1a-c et 3a  |
| Figure 53 : Structure l'amphezonol A  |
| Figure 54 : Structure des colopsinols A-E   |
| Figure 55 : Structure centrale commune à toutes les amphidinols. Les différences structurales   |
| entre les différents AMs apparaissent au niveau des fragments R1 et R2                          |
| Figure 56 : Structure planaire de l'AM-A et AM-B  |
| Figure 57 : Structure des lutéophanols A, B, C, D   |
| Figure 58 : Structure du lingshuiol, du lingshuiol A et du lingshuiol B                         |
| Figure 59 : Structure des karatungiols A et B   |
| Figure 60 : Structure du Carteraol E  |
| Figure 61 : Courbes de croissance de Skeletonema costatum contrôle (CN) et en présence du       |
| filtrat d'A. carterae prélevé en phase exponentielle de croissance (A) et stationnaire (B) de   |
| croissance  |

| Figure 62 : Culture de Skeletonema costatum seul (A) ou en présence de l'extrait brut du filtrat               |
|--|
| d'A. carterae. Les quantités d'éxtrait brut ajoutées sont 1 µl (B), 3µL (C) et 5µL (D) et les                  |
| images ont été prises après 1 heure d'incubation (Ji et al., 2012)   |
| Figure 63 : Spectres de différence d'absorption, représentant la vitesse photochimique, de                     |
| différentes microalgues, seules ou en mélange  |
| Figure 64 : Courbes photosynthèse-intensité de la diatomée T. pseudonana (A) et du                             |
| prasinophyte Bathycoccus prasinos (B) seuls (cercles pleins) ou en mélange avec A. carterae                    |
| (cercles ouverts)  |
| Figure 65 : Co-cultures entre la diatomée <i>T. pseudonana</i> (A/C/D) et le dinoflagellé <i>A. carterae</i>   |
|  |
| Figure 66 : Tests allélopathiques sur les différentes mono- et co- cultures avec des diatomées et              |
| dinoflagellés « témoin »   |
| Figure 67 : Signal ECS induit par un flash laser saturant après chez la diatomée T. pseudonana                 |
| (A) et le prassinophyte Bathycoccus prasinos (B) dans des conditions d'anaérobiose, induites                   |
| par l'utilisation de glucose (20mM) et de glucose oxydase (280 U ml <sup>-1</sup> )                            |
| Figure 68 : Evolution de la demi-vie de l'ECS en présence du dinoflagellé A. carterae 239                      |
| Figure 69 : Inhibition de la photosynthèse de T. pseudonana par les fractions obtenues lors de                 |
| la purification des amphidinols  |
| Figure 70 : Effet de la fraction AFUS24A4 sur la croissance de la diatomée <i>T. pseudonana</i> .<br>242       |
| Figure 71 : Inhibition de vitesse photochimique de <i>T. pseudonana</i> par le filtrat d' <i>A. carterae</i> . |
| Figure 72 : Influence du filtrat d'A. carterae (panneaux A/B/C), du sous-produit de purification               |
| AFUS24A4 (panneaux D/E/F) et de l'AM-A purifié (panneaux G/H/I), sur les paramètres                            |
| photosynthétiques de T. pseudonana mesurée par la fluorescence   |
| Figure 73 : Schémas représentant les pores de type « douves de tonneaux » (à gauche) et «                      |
| Toroïdaux »  |
| Figure 74 : Interaction de l'AM3 avec les membranes biologiques  |

| Figure 75 : Formes de pores de type « douves de tonneaux » (Barrel-stave mod        | del, A) ou |
|---|------------|
| toroïdaux, ici canaux JUMBO (B)   |            |
| Figure 76 : Structure de l'amphotéricine B  |            |
| Figure 77 : Activité allélopathique d'A. carterae sur deux échantillons de diatomée | s prélevés |
| dans la baie de Penzé en juin 2017 (A), et juin 2018 (B)                            |            |
| Figure 78 : Structure plannaire de la karmitoxine                                   |            |

# Table des tableaux

| Tableau 1 : Classification des organismes planctoniques en fonction de la taille et de la stratégie |
|---|
| nutritionnelle  |
| Tableau 2 : Tableau répertoriant les cyanobactéries ayant une activité allélopathique, les          |
| microalgues cibles de l'allélopathie, les composés allélochimiques identifiés et leurs modes        |
| d'action  |
| Tableau 3 : Suite du tableau répertoriant les cyanobactéries ayant une activité allélopathique,     |
| les microalgues cibles de l'allélopathie, les composés allélochimiques identifiés et leurs modes    |
| d'action  |
| Tableau 4 : Principales efflorescences observées d'Amphidinium dans le monde                        |
| Tableau 5 : Structures développée des fragments R1 et R2 des 21 amphidinols216                      |

## Liste des abréviations

1,3-BPG : 1,3-bisphosphoglycéraldéhyde (1,3-BPG

- 2-PG: 2-phosphoglycolate
- 3-PGA : 3-phosphoglycérate
- A. catanella : Alexandrium catanella
- A. carterae : Amphidinium cartere
- A. minutum: Alexandrium minutum
- ADP/ATP: adénosine di/tri-phosphate
- AHL : homosérine lactones acylées (en anglais acyl homoserine lactone, AHLs)
- AI : auto-inducteurs
- AI-2 : auto-inducteurs furanosyl diester borate
- AM : amphidinol
- AOX : oxydase alternative mitochondriale (en anglais alternative oxidase)
- AQ : alkyl-quinolone
- AQNO : 2-alkyl-4-quinolones N-oxydée
- C. muelleri : Chaetoceros muelleri
- CBB : cycle de Calvin-Benson-Bassham
- CCCP : carbonyle cyanide m-chlorophenylhydrazone

CMC : échanges énergétiques entre le chloroplaste et la mitochondrie (en anglais Chloroplaste -Mitochondria Crosstalk)

- COD : carbone organique dissous
- DBMIB : dibromothymoquinone
- DCMU: 3-(3,4-dichlorophényl) -1,1-diméthyl-urée (diuron)
- DiBAC4(3) : Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)
- DTX : dinophysistoxine
- ECS : decalage électrochromique (en anglais, Electrochromic shift)
- ETR (PSI/PSII) : taux de transport des électrons à travers le PSI ou PSII (en anglais, electron transport rate)
- FCCP : carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone
- FCP : antennes collectrices de la lumière chez les diatomées (en anglais fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein)
- Fd : ferrédoxine
- Fm' : fluorescence maximale mesurée après un pulse de lumière sauturant, sur un échantillon acclimaté à la lumière
- F0 : fluorescence minimale sur un échantillon acclimaté à l'obscurité
- F0' : fluorescence minimale sur un échantillon acclimaté à la lumière

Fm : fluorescence maximale mesurée après un pulse de lumière sauturant, sur un échantillon acclimaté à l'obscurité

Fm' : fluorescence maximale mesurée après un pulse de lumière sauturant, sur un échantillon acclimaté à la lumière

Fst : fluorescence stationnaire, à la lumière

Fv : fluorescence variable

Fv/Fm : rendement quantique maximal du PSII

FNR : ferrédoxine-NADPH réductase

GAP : Glycéraldéhyde-3-phoshate

GYM : gymnodimines

HA : hydroxylamine

HAB : efflorescence algale nuisible (en anglais « Harmful Algal Bloom », HAB)

HHQ: 2-heptyl-4-quinolone

K. brevis: Karenia cf brevis

K. veneficum : Karlodinium cf veneficum

LHC : antennes colectrice de la lumière (en anglais Light Harvesting Complex, LHC)

LHCI/II : light-harvesting complex of PSI/PSII en anglais, antennes collectrices de la lumière.

MGDG : Monogalactosyldiacylglycérole.

Mn : Manganèse

MnSOD : superoxyde dismutase à manganèse

MOD : Matière organique dissoute

MOP : Matière organique particulaire.

MV : Methylviologène.

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate).

NPQ : dissipation non photochimique (en anglais non-photochemical quenching)

NQNO: 1-hydroxy-2-nonyle-4-quinolone.

O. ovata : Ostreopsis cf ovata.

OEC : Complexe de l'oxydation de l'eau (en anglais Oxygen envolving complexe).

P. parvum : Prymnesium parvum

P. tricornutum : Phaeodactylum tricornutum

P<sub>700</sub> : paire spéciale de chlorophylle *a* du PSI

P<sub>680</sub> : paire spéciale de chlorophylle *a* du PSII

PAM : peptide antimicrobien (en anglais antimicrobial peptides)

PC : Phosphatidylcholine

PC : plastocyanine

 $PheoD_1$  et  $PheoD_2$ : phéophytine  $D_1$  et  $D_2$  du PSII

#### PHQ : 2-pentyl-4-quinolone

Pmf : force proton motrice (en anglais proton motive force)

PQ : plastoquinone

PQS : 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (en anglais Pseudomonas quinolone signal)

PSI : photosystème I

PSII : photosystème II.

PSP : Intoxication paralysante par les fruits de mer (en anglais, Paralytic Shellfish Poisoning)

PST : toxine paralysante de coquillage (en anglais paralytic shellfish toxin)

PTOX : Plastoquinone terminal oxydase

PUA : aldéhyde polyinsaturé

Q<sub>B</sub> : Quinone B dans la poche Q<sub>B</sub> du PSII

qE: extinction énergétique de la fluorescence du PSII

qI: extinction de la fluorescence liée à la photoinhibition du PSII

QS : quorum sensing

REPHY : Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines

ROS : espèces réactives de l'oxygène (en anglais Reactive Oxygen Species)

RubisCO: Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygénase

RuBP: Ribulose-1,5-bisphosphate

SOD: superoxyde dismutase

SPX: spirolide

STX: saxitoxine

T. pseudonana : Thalassiosira pseudonana

TEC : transfert d'électron cyclique

Tyr<sub>Z :</sub> tyrosine Z

VDE : violaxanthine de-époxydase

WWC : cycle de l'eau vers l'eau (en anglais water to water cycle)

Y(NA) : Fraction du PSI limité du côté accepteur

Y(ND) : Fraction du PSI limité du côté donneur

ZEP : zéaxanthine époxydase

 $\Delta pH$ : composante osmotique du gradient électrochimique de proton

 $\Delta \mu_{H^+}$  : gradient électrochimique de protons

 $\Delta \Psi$ : composante électrique du gradient électrochimique de proton

 $\sigma_{PSII\,:}$  section efficace de capture des photons du PSII.

 $\Phi_{PSII}$  : rendement quantique du PSII à une intensité de lumière donnée.

 $\Phi_{PSI}$  : rendement quantique du PSII à une intensité de lumière donnée

## **Introduction Générale**



Figure 1 : Représentation des organismes planctoniques. D'après, Christiant et Noé Sardet/ Chroniques de Plancton. Aux origines du vivant, ULMER, 2013

### Le phytoplancton et la photosynthèse marine

### I. Le phytoplancton et les autres groupes composant le plancton

Le terme plancton trouve son origine dans l'Odyssée d'Homère, où il est employé pour désigner les animaux qui « errent » (planktós en grec ancien) à la surface des flots. En 1887, le zoologiste et océanographe Victor Hensen reprend ce terme pour qualifier l'ensemble des organismes vivants en suspension dans les eaux douces, saumâtres ou salées, inaptes à lutter contre les courants et qui présentent donc un transport passif (Figure 1). En ce sens, le plancton s'oppose au necton qui désigne l'ensemble des organismes aquatiques capables de s'émanciper de la dynamique de la masse d'eau (céphalopodes, poissons, cétacés). Défini de cette manière, le plancton regroupe une importante diversité d'organismes comme des virus (virio-plancton), des procaryotes (bactéries et archébactéries) et des eucaryotes (protistes et champignons). Le plancton est principalement localisé dans les premiers mètres sous la surface (zone euphotique, qui est la zone de pénétration de la lumière dans la colonne d'eau). Il appartient avec le necton au monde pélagique (du grec « pelagos » qui désigne la colonne d'eau) et s'oppose au monde benthique (du grec « benthos » désignant les fonds). Néanmoins, la définition du plancton présente des zones de flou. Ainsi, des déplacements actifs existent au sein du plancton, par modification de leur flottabilité ou grâce à la présence de flagelles (Hays et al., 2005). De même, on retrouve parfois au sein du plancton des espèces benthiques ponctuellement remises en suspension dans la colonne d'eau - on parle alors d'espèces tychoplanctoniques (Gárate-Lizárraga et al., 2019).

### 1. Classification du Plancton

Le plancton peut être classé selon la durée relative de la phase de vie planctonique, du biotope, en fonction de la taille ou encore de sa stratégie nutritionnelle.

Lorsque l'on considère la durée de la phase de vie planctonique, le plancton peut être divisé en deux groupes : l'holoplancton, constitué d'organismes qui appartiennent au plancton durant tout leur cycle de vie, et le méroplancton, dont les représentants dans le plancton n'apparaissent que durant une partie du cycle de vie, généralement sous la forme d'œufs ou de phases larvaires (ex : bivalves, crustacés, poissons). En ce qui concerne le biotope, le plancton peut, par

exemple, être divisé en plancton marin ou lagunaire, en association aux estuaires ou systèmes lagunaires côtiers, en plancton néritique ou côtier.



Figure 2: Espèces protozoaires plactoniques et taille. Echantillon de la variété d'espèces protozoaires, faisant partie du plancton, représentés à l'échelle à côté d'une tête d'épingle (Finlay et al., 2002).

L'importante diversité de taille du plancton a conduit très tôt les biologistes à entamer une classification des organismes par leur taille (Schütt, 1892). La classification élaborée par Sieburth et ses collaborateurs (Sieburth et al., 1978), encore largement utilisée, est basée sur la standardisation de la taille à travers une dimension unique des organismes (longueur ou équivalent du diamètre sphérique) et permet de les regrouper au sein de 7 ordres de grandeurs (Figure 2) : femtoplancton (inférieur à  $0,2 \mu m$ ), picoplancton (entre  $0,2 \text{ et } 2 \mu m$ ), nanoplancton (entre 2 et 20  $\mu m$ ), microplancton (entre 20 et 200  $\mu m$ ), mésoplancton (entre 0,2 mm et 2 cm), macroplancton (de 2 à 20 cm) (Finkel et al., 2010).

Quant à la stratégie nutritionnelle, elle permet de créer des groupes fonctionnels du plancton en fonction du rôle écologique dans l'écosystème, (Sieburth, 1978) :

- 1. le virioplancton, qui inclut les virus, aux dimensions entre 20 et 200 nm;
- le bactérioplancton, hétérotrophe, qui inclut les eubactéries et archéobactéries, procaryotes osmotrophes (organisme qui se nourrit par osmotrophie, par absorption de composés organiques dissous par osmose), aux dimensions entre 0,2 et 2 μm;
- le mycoplancton qui inclut les champignons (hyphomycètes et ascomycètes principalement) marins, formes unicellulaires eucaryotes osmotrophes; incorporant directement de la matière organique dissoute, aux dimensions généralement comprises entre 2 et 20 μm,;
- le phytoplancton, organismes unicellulaires photosynthétiques, principaux producteurs primaires; aux dimensions généralement comprises entre 0,5 μm et 200 μm (ex.: cyanobactéries, diatomées, coccolithophoridés, dinoflagellés);
- 5. le protozooplancton ou protistoplancton phagotrophe qui comprend les eucaryotes unicellulaires aux dimensions généralement comprises entre 2 et 200 μm;

|                       | nm                                   | μm                                |                                  | mm                                  |                                | cm |                                   |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----|-----------------------------------|
| PLANCTON              | Femto-<br>Plancton<br>(0,02 -0,2 μm) | Ριςο-<br>Plancton<br>(0,2 - 2 μm) | NANO-<br>PLANCTON<br>(2 - 20 μm) | MICRO-<br>PLANCTON<br>(20 - 200 μm) | MÉSO-PLANCTON<br>(0,2 - 20 mm) |    | MACRO-<br>PLANCTON<br>(2 - 20 cm) |
| VIRIO-<br>PLANCTON    | -                                    |                                   |                                  |                                     |                                |    |                                   |
| BACTÉRIO-<br>PLANCTON | _                                    |                                   | _                                |                                     |                                |    |                                   |
| Myco-<br>Plancton     |                                      |                                   |                                  |                                     |                                |    |                                   |
| Phyto-<br>plancton    |                                      |                                   |                                  |                                     |                                |    |                                   |
| PROTOZOO-<br>PLANCTON |                                      |                                   |                                  |                                     |                                |    | _                                 |

Tableau 1 : Classification des organismes planctoniques en fonction de la taille et de la stratégie nutritionnelle. D'après (Sieburth et al., 1978).

Les classifications par taille et par stratégie nutritionnelle se confondent en partie (Tableau 1) mais pas entièrement : le phytoplancton et le protozooplancton couvrant une large gamme de taille, de pico à macro-plancton. Dans cette thèse, nous nous intéresserons principalement au phytoplancton (même si le bactérioplancton sera évoqué dans le Chapitre I).

### 2. Le phytoplancton : origine, diversité et rôle écologique

Le phytoplancton (du grec *phyton* ou plante et *planktos* ou errant) ou plancton végétal est constitué de l'ensemble des organismes autotrophes, libres, passifs et en suspension dans la colonne d'eau. De la même façon que pour le plancton, il existe des zones de flou entourant la définition du phytoplancton qui, stricto sensu, devrait regrouper les organismes photosynthétiques non motiles. Dans les faits, on considère comme faisant partie du phytoplancton les cellules libres, en colonies ou en filaments qui (i) ne peuvent pas nager et dont les mouvements dépendent de ceux de l'environnement aquatique ou (ii) qui sont motiles

(flagellés ou ciliés) mais dont les déplacements sont restreints. Les dinoflagellés peuvent être autotrophes, mixotrophes ou hétérotrophes mais tous appartiennent par convention au phytoplancton. De même, les bactéries photosynthétiques ou cyanobactéries, qui devraient a priori faire partie du bactérioplancton, sont généralement classées avec le phytoplancton, de telle sorte que les organismes phytoplanctoniques s'étendent à travers les domaines des bactéries et des eucaryotes. Les cyanobactéries, considérées comme pionnières de l'activité photosynthétique oxygénique, sont apparues il y a environ 2,8 Ga (Hedges et al., 2001). Elles composent avec les pico-eucaryotes (Courties et al., 1994), la classe de taille phytoplanctonique la plus petite : le pico-phytoplancton (< 2  $\mu$ m) (Vaulot et al., 2004). Les organismes eucaryotes photosynthétiques dominent au sein des classes de tailles supérieures (nano- et micro-phytoplancton, donc de 2 à 200  $\mu$ m).

Le phytoplancton se situe le plus souvent dans la couche supérieure éclairée des masses d'eau, dite zone euphotique, dont la limite inférieure correspond à la profondeur recevant au moins 1% de la lumière incidente. Il a un rôle extrêmement important dans l'écologie mondiale et dans les cycles biogéochimiques du globe, étant à la base de toutes les chaînes trophiques aquatiques et effectuant de l'ordre de la moitié de la production primaire nette de la biosphère (Field et al., 1998). Il fixe annuellement 30 à 60% du carbone inorganique global (Sakshaug et al., 1997) ce qui en fait une véritable pompe à dioxyde de carbone (Tucker et al., 1986).

#### 3. Phylogénie du phytoplancton

Le phytoplancton procaryote est représenté exclusivement par le phyla des Cyanobacteria, appartenant au domaine des Bacteria. Les espèces phytoplanctoniques eucaryotes ont la capacité d'effectuer la photosynthèse oxygénique grâce à leur plaste (ou chloroplaste par abus de langage : le chloroplaste est un plaste à chlorophylle *a* et *b*) et sont retrouvées dans presque tous les supergroupes formant la classification la plus récente des eucaryotes (Figure 3) à l'exception des supergroupes des Amorphea et CRuMs (TSAR, Haptista, Cryptista, Archaeplastidia et Discoba, Adl et al., 2012 ; Cavalier-Smith, 2018 ; Adl et al., 2019; Burki et al., 2019). Dans les arbres phylogéniques les plus récents, tous les supergroupes des modèles précédents, sauf le supergroupe des Archaeplastidia, ont disparu ou ont été incorporés dans de

nouveaux taxons. Trois des phyla principaux de la diversité des eucaryotes phytoplanctoniques sont (i) les Bacillariophyta, retrouvés dans le superphylum des Stramenopiles et dominés par la classe des Bacillariophyceae (diatomées), ii) les Dinoflagellata, retrouvés dans la division des Alveolata et comprenant surtout la classe des Dinophyceae (dinoflagellés) et iii) les Haptophyta, dont le principal représentant est la classe de Coccolithophycaea (coccolithophores). Les clades phytoplanctoniques les plus abondants et présentant une importance écologique majeure sont les diatomées, les dinoflagellés et les coccolithophores (Not et al., 2012). D'autres phyla tels que les Cryptophyta ou les Chlorophyta sont aussi largement représentés (Guiry et al., 2012).

### 4. Origine des plastes et endosymbioses.

L'histoire évolutive du phytoplancton eucaryote (et plus généralement de tous les eucaryotes porteurs de plastes) a été façonnée par une série d'événements endosymbiotiques (Figure 4). L'endosymbiose primaire implique l'ingestion d'une cyanobactérie par un eucaryote hétérotrophe (De Clerck et al., 2012) alors que l'ingestion d'un eucaryote photosynthétique par un autre eucaryote donne naissance aux endosymbioses secondaire et tertiaire (Archibald, 2012).



Figure 3 : Arbre phylogénétique des eucaryotes. D'après la classification la plus récente des eucaryotes (Cavalier-Smith, 2018 ; Adl et al., 2019). Les groupements colorés correspondent aux « supergroupes » TSAR, Haptista, Cryptista, Archaeplastidia, Amorphae et CRuMs. Les lignes brisées reflètent des incertitudes moindres quant à la monophylie de certains groupes. Les étoiles noires désignent des taxons considérés comme des supergroupes dans les modèles phylogéniques précédents. Les cercles noirs montrent des lignées majeures pour lesquelles les données moléculaires sont récentes et les cercles verts cerclés de jaune représentent les lignées participant au phytoplancton photosynthétique. (Burki et al., 2019).



Figure 4: Histoire évolutive des plastes. Evènements d'endosymbiose primaire (A), secondaire (B) et tertiaire (C). Les flèches et les chromosomes colorés représentent les évènements de transfert de gène depuis l'endosymbionte vers le noyau de l'hôte. Le nucléomorphe est représenté après les endosymbioses secondaire et tertiaire, même si ce reste de noyau de l'endosymbionte n'a survécu que chez les cryptophytes et les chloroarachniophytes (\*). D'après (Battacharya, Yoon & Hackett, 2004).

Les évènements endosymbiotiques s'accompagnèrent de transferts massifs de gènes du génome des endosymbiontes vers le génome de l'hôte (Figure 4) dont les traces peuvent être détectées chez les producteurs primaires eucaryotes d'aujourd'hui (Battacharya, Yoon & Hackett, 2004 ; Bhattacharya et al., 2007, Gould et al., 2008 ; Moustafa et al., 2009). Même si un débat considérable persiste sur les mécanismes précis et la séquence des événements qui ont abouti à la première cellule eucaryote, à plaste, à la suite de l'endosymbiose primaire (De Clerck et al., 2012 ; de Duve, 2007 ; Poole & Neumann, 2011), il existe un consensus général selon lequel les eucaryotes photosynthétiques ont émergé de l'ingestion d'une cyanobactérie par un eucaryote hétérotrophe. La cyanobactérie a été progressivement intégrée dans la machinerie cellulaire comme un nouvel organite, le chloroplaste (Bhattacharya et al., 2007) chez les organismes du supergroupe des Archaeplastidia comprenant les algues vertes, les plantes, les glaucophytes et les algues rouges. Ces plastes primaires rouges et verts sont entourés de deux membranes, qui correspondent aux membranes interne et externe de leurs ancêtres cyanobactéries (Kim & Archibald, 2009).

Les plastes des haptophytes et des stramenopiles photosynthétique proviennent quant à eux d'une endosymbiose secondaire avec une algue rouge (Cavalier-Smith, 1982 ; Howe et al., 2008 ; Andersen, 2004 ; Moustafa et al, 2009), un évènement qui implique peut-être également une algue verte (Moustafa et al., 2009). Ces plastes sont entourés de quatre membranes et contiennent de la chlorophylle *a* et *c*. Dans le cas des dinoflagellés, les choses se compliquent du point de vue de la complexité et de la diversité de leurs plastes. A la suite de l'endosymbiose secondaire, le plaste est entouré de trois (parfois deux) membranes et contient de la chlorophylle *a* et *c* ainsi que de la péridinine (Kim & Archibald, 2009 ; Schnepf & Elbrächter, 1999) ; c'est le cas des espèces du genre *Amphidinium* (Bachvaroff et al., 2006). Les autres dinoflagellés possèdent des plastes acquis par endosymbiose tertiaire impliquant un autre eucaryote photosynthétique. Ainsi, les espèces des genres *Karenia* et *Karlodinium* possèdent des plastes dérivés d'haptophytes (Tengs et al., 2000), les espèces des genres *Kryptoperidinium* et *Durinskia* possèdent un plaste dérivé de diatomées (Inagaki et al., 2000), le dinoflagellé *Dinophysis acuminata* possède un plaste dérivé d'une cryptophyte (Hackett & Bhattacharya, 2003 ; Schnepf & Elbrächter, 1988) et les dinoflagellés du genre *Lepidodinium* abritent un

plaste à quatre membranes, provenant d'une algue verte de la lignée des chlorophytes (Hansen et al., 2007 ; Matsumoto et al., 2011). Au total, les dinoflagellés présentent une plasticité remarquable de leur appareil photosynthétique, semblant avoir « échangé » leurs plastes originaux par de nouvelles acquisitions, et ce à plusieurs reprises (Hackett et al., 2004 ; Shalchian-Tabrizi et al., 2006).

### II. La photosynthèse oxygénique

### 1. Les différents types de photosynthèse

La photosynthèse est un processus de conversion de l'énergie lumineuse (solaire) en énergie chimique de liaison, qui est stockée sous forme de composés organiques par les organismes photoautotrophes. On distingue la photosynthèse anoxygénique, qui ne libère pas de dioxygène, de la photosynthèse oxygénique. Les premiers organismes photoautotrophes sont des bactéries photosynthétiques réalisant la photosynthèse anoxygénique et qui sont apparues il y a environ 3 milliards d'années. Aujourd'hui ces organismes à photosynthèse anoxygénique sont regroupés en quatre groupes : les bactéries pourpres, vertes sulfureuses, vertes non sulfureuses et les héliobacteries (Cohen-Bazire & Sistrom, 1966 ; Blankenship, 1992). La photosynthèse oxygénique est propre aux cyanobactéries (un autre type de bactéries photosynthétiques), ainsi qu'à plusieurs espèces d'eucaryotes, représentées dans presque tous les supergroupes de la classification des eucaryotes (voir section I. 3).

La photosynthèse oxygénique se déroule dans le chloroplaste en deux phases ; la phase membranaire et la phase stromale. La phase membranaire est un ensemble de réactions dépendant de la lumière qui conduisent à oxyder l'eau pour produire de l'oxygène moléculaire, une molécule réduite (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADPH) et de l'adénosine triphosphate (ATP). La phase stromale utilise le NADPH et l'ATP, produits pendant la phase membranaire pour fixer du carbone inorganique via le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) et élaborer des composés organiques (Benson 1950). En considérant le glucose comme produit final, la photosynthèse oxygénique peut être écrite comme une réaction d'oxydoréduction d'équation bilan :
$$6H_20 + 6CO_2 \xrightarrow{lumière} C_6H_{12}0_6 + 6O_2$$

La photosynthèse oxygénique a été très étudiée dans le supergroupe des Archaeplastidia, surtout chez les Chloroplastida ou Viridiplantae (les plantes terrestres et les algues vertes) et beaucoup moins chez les autres organismes photosynthétiques eucaryotes. A la fin de ce chapitre, je présenterai les connaissances accumulées sur la photosynthèse chez les diatomées, puisque cette thèse s'intéresse en particulier à la fonction photosynthétique chez ces microalgues. Mais je vais d'abord présenter, dans les prochaines sections, le fonctionnement de la photosynthèse oxygénique dans la lignée verte.

Les deux phases de la photosynthèse oxygénique se déroulent dans le chloroplaste, qui, chez les Archaeplastidia, a été obtenu à la suite de l'endosymbiose primaire (Keeling, 2013 ; Cavalier-Smith 1982). La structure d'un chloroplaste de plante est représentée dans la Figure 5.



Figure 5: Structure d'un chloroplaste et représentation schématique des différentes structures de l'organite. <u>http://lepoumondelaplanete.e-monsite.com/pages/partie-1/1.html</u>

Le chloroplaste d'une plante est constitué :

- d'une membrane externe, qui est une membrane semi-poreuse perméable aux petites molécules et aux ions, qui peuvent diffuser facilement. Cette membrane n'est pas perméable aux plus grosses protéines.
- d'une membrane interne, qui forme une frontière avec le stroma. Elle régule le passage entre intérieur et extérieur du chloroplaste. En plus de l'activité de régulation, les acides gras, les lipides et les caroténoïdes sont synthétisés dans la membrane interne du chloroplaste.
- du stroma, un fluide aqueux alcalin riche en protéines qui est délimité par la membrane interne du chloroplaste. Il contient des ribosomes, l'ADN chloroplastique, des granules

d'amidon et de nombreuses protéines et est le siège de la phase stromale de la photosynthèse.

 des thylacoïdes, issus de la membrane interne, qui prennent dans le stroma la forme de longs sacs aplatis dont l'intérieur représente l'espace intrathylacoïdien (ou lumen).
Siège de la phase membranaire de la photosynthèse, les thylacoïdes présentent chez les plantes une structure complexe : ils peuvent être seuls (lamella) ou disposés en pile contenant jusqu'à une vingtaine de thylacoïdes, le granum.

### 2. La phase membranaire de la photosynthèse oxygénique.

La phase membranaire est un ensemble de réactions dépendant de la lumière, qui oxyde l'eau pour produire de l'O<sub>2</sub>, du NADPH et de l'ATP. Ces réactions d'oxydo-réduction sont catalysées par les complexes photosynthétiques protéines-pigments, PSI et PSII, et leurs antennes collectrices de l'énergie lumineuse associées, ainsi que du cytochrome  $b_6f$ , qui sont enchâssés dans les membranes thylacoïdiennes. Des transporteurs d'électrons participent aussi à ces réactions : un transporteur liposoluble, les plastoquinones (PQ), et solubles, la plastocyanine (PC) et la ferrédoxine (Fd). Ces partenaires permettent d'assurer le transport d'électrons de l'eau vers le NADP<sup>+</sup>, qui est couplé à la translocation de proton de part et d'autre de la membrane du thylacoïde. Le gradient électrochimique de proton, ainsi créé permet à l'ATPsynthase chloroplastique de synthétiser de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate.

## Les pigments photosynthétiques et les antennes collectrices.

L'énergie lumineuse est absorbée par des pigments, molécules capables d'interagir avec la lumière visible grâce à un vaste système de liaison doubles conjuguées (Van Amerongen & Van Grondelle, 2000), enchâssés dans des protéines transmembranaires, qui composent les photosystèmes PSI et PSII et les antennes collectrices de l'énergie lumineuse (en anglais Light Harvesting Complex, LHC).

Il existe deux principaux groupes de pigments photosynthétiques : les chlorophylles et les caroténoïdes (Green & Durnford, 1996). Les chlorophylles présentes chez les Viridiplantae sont la chlorophylle *a*, présente chez tous les organismes réalisant la photosynthèse oxygénique, et 29

la chlorophylle *b* (Green & Durnford, 1996). Ces deux chlorophylles partagent une structure commune (Figure 6), un noyau tétrapyrrole (Meinecke et al., 2010) mais diffèrent au niveau d'un groupement méthyle -CH<sub>3</sub> (pour la chlorophylle *a*) ou aldéhyde -CHO (pour la chlorophylle *b*) et une chaîne latérale, appelée « queue phytol » constituée de vingt atomes de carbone. Toutes deux présentent deux bandes majeures d'absorption : dans le bleu et bleu-vert (350-500 nm) et dans le rouge (600-700 nm) qui leur donne leur couleur caractéristique verte.



Figure 6 : Structures et spectres d'absorption des chlorophylles. A/B : Structures moléculaires de la chlorophylle a (A) et b (B). C : Spectres d'absorption des chlorophylles a et b dans un solvant organique.

Les caroténoïdes constituent la seconde famille de pigments photosynthétiques, qu'on retrouve également chez tous les organismes photosynthétiques et qui comprend plus de 700 membres (Green & Durnford, 1996 ; Eisenreich et al., 2001 ; Kuczynska et al., 2015). Ces pigments hydrophobes, liposolubles appartiennent à la famille des terpénoïdes en C40 et ont une gamme d'absorption entre 400 et 500 nm (Figure 7), ce qui leur confère une couleur jaune-orangée (Araki & Murai, 1952). Ces pigments, dits accessoires, permettent, avec la chlorophylle b, d'étendre la plage d'absorption de la lumière solaire.



Figure 7 : Structures chimiques et spectres d'absorption des 7 principaux caroténoïdes de la lignée verte. Deux carotènes ( $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -carotène) et 5 xanthophylles (lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, anthéraxanthine et néoxanthine). Certains spectres d'absorption sont présentés dans le panneau en bas à droite. D'après (Guaratini et al., 2009).

Deux familles de caroténoïdes existent : les carotènes, uniquement composés de carbone et d'hydrogène tels que les  $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -carotène) et les xanthophylles telles que la lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, anthéraxanthine, néoxanthine (Araki & Murai, 1952 ; Armstrong & Hearst 1996). Ces derniers sont synthétisés à partir des carotènes et possèdent des atomes d'oxygène sous forme de fonctions époxy, hydroxy, cétone, hydrate de carbone, carboxyle ou éther. Le  $\beta$ -carotène est principalement retrouvé dans les centres de réaction des photosystèmes, alors que les autres caroténoïdes sont associés aux complexes des antennes périphériques (LHC) (Yamamoto & Bassi, 1996). La violaxanthine, l'anthéraxanthine et la zéaxanthine jouent un rôle important dans la photoprotection car elles sont impliquées dans le cycle des xanthophylles (Figure 8) qui dissipent l'excès d'énergie reçu sous forme de chaleur (voir section photoprotection).



Figure 8 : Le cycle des xanthophylles. En conditions de forte lumière, la violaxanthine est convertie en zéaxanthine via l'intermédiaire de l'anthéraxanthine. Cette réaction est catalysée par la violaxanthine déépoxydase (VDE). A l'inverse, dans des conditions de faible lumière ou d'obscurité, deux étapes d'oxygénation catalysées par la zéaxanthine époxydase (ZEP) conduit à la conversion de la zéaxanthine en violaxanthine. D'après (Demmig-Adams & Adams, 1996) Un grand nombre -généralement plus d'une centaine- de ces pigments -chlorophylles et caroténoïdes- sont ancrés dans une matrice protéique hydrophobe autour des photosystèmes I et II, les LHCs (Green & Durnford, 1996 ; Dall'Osto et al., 2015). Chez les Viridiplantae, les antennes collectrices de photons associées au PSII et au PSI sont respectivement appelées LHCII et LHCI (Green & Durnford, 1996 ; Dall'Osto et al., 2015). Ces structures antennaires (apoprotéines et pigments) ont pour fonction de capturer l'énergie des photons, qui fait passer l'énergie d'un pigment d'un état fondamental à un état excité (Van Amerongen & Van Grondelle, 2000), et de transférer cette énergie -l'exciton- de proche en proche jusqu'au centre réactionnel du photosystème. Dans le centre réactionnel, au niveau de la « paire spéciale » de chlorophylle *a* (appelée P<sub>680</sub> pour le PSII et P<sub>700</sub> pour le PSI), l'énergie excitonique permet le transfert d'un électron depuis la paire spéciale vers un accepteur proche. Cet évènement, l'étape photochimique, génère une séparation de charge qui entame la suite de réactions d'oxydoréduction de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.

# La photochimie et l'oxydation de l'eau dans le photosystème II

Le PSII est un homodimère composé de protéines et de complexes protéiques-pigmentaires insérés dans la membrane des thylacoïdes (Figure 9). Il est constitué du centre réactionnel, du complexe d'oxydation de l'eau (en anglais "oxygen evolving *complex*", OEC) et des antennes internes ou proximales associées au "cœur" (centre réactionnel) du PSII. Ce complexe photosynthétique comporte plus de 20 sous-unités peptidiques et un grand nombre de cofacteurs (chlorophylles, caroténoïdes, phéophytines, un fer non-hémique, deux ions calcium, dont un contenu dans le cluster de manganèse, quatre ions manganèse (formant le cluster de Mn<sub>4</sub>Ca), deux ions chlorure, 2-3 quinones, et 25 lipides). Le centre réactionnel du PSII est constitué de l'hétérodimère  $D_1/D_2$  et du cytochrome  $b_{559}$  (Cyt  $b_{559}$ ) qui est entouré de deux protéines-pigmentaires composées de chlorophylle *a*, CP43 et CP47 qui forment l'antenne collectrice interne de l'énergie lumineuse. Les protéines  $D_1$  et  $D_2$  comportent tous les cofacteurs nécessaires pour la séparation de charge et sa stabilisation. En effet, cet ensemble lie du côté donneur le centre Mn<sub>4</sub>Ca impliqué dans l'oxydation de l'eau, la tyrosine Z (Tyrz), la paire spéciale de

chlorophylle *a* (P<sub>680</sub>), deux phéophytines (PheoD<sub>1</sub> et PheoD<sub>2</sub>), deux  $\beta$ - carotènes, et les plastoquinones Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>.



Figure 9 : Représentation schématique de la structure du PSII dans la membrane du thylacoïde. CP (Chlorophyll Protein) formant l'antenne proximale, Cyt  $b_{559}$  : cytochrome  $b_{559}$ , D1-D2 : sous unités du centre réactionnel,  $P_{680}$  : « paire spéciale » du PSII, dimère de chlorophylle *a*, Pheo : phéophytine,  $Q_A-Q_B$  : Plastoquinones, Tyr<sub>Z</sub> : Tyrosine Z, Mn : atome de manganèse. Schéma modifié d'après Falkowski, & Raven, 2013.

Lorsque que les antennes collectrices du PSII transfèrent l'énergie d'excitation (\*) à la paire spéciale  $P_{680}$ , celle-ci passe dans un état excité ( $P_{680}$ \*).  $P_{680}$ \* se désexcite par voie photochimique en cédant un électron à la phéophytine  $D_1$  (PheoD<sub>1</sub>). Du côté accepteur d'électrons, la séparation de charge primaire ( $P_{680}^+$  Pheo<sup>-</sup>) est suivie par un transfert d'électron depuis la phéophytine vers les deux quinones  $Q_A$  et  $Q_B$ , via un fer non-hémique localisé entre ces deux quinones. Les propriétés physicochimiques de ces deux quinones sont différentes.  $Q_A$  est fortement liée au PSII et ne peut accepter qu'un seul électron, alors que  $Q_B$  peut en accepter deux (et deux protons du stroma) pour former un plastoquinol (PQH<sub>2</sub>), qui peut se détacher de son site de fixation du PSII et diffuser dans la membrane du thylacoïde.

Du côté donneur d'électrons,  $P_{680}^+$  est réduit par le complexe d'oxydation de l'eau via un intermédiaire, la tyrosine Z (Tyrz). L'OEC est étroitement associé au PSII du côté luménal. Il contient quatre atomes de manganèse (Mn), un atome de calcium (Ca<sup>2+</sup>) et un ion chlorure (Cl<sup>-</sup>) au sein d'un centre Mn<sub>4</sub>Ca. Le complexe d'oxydation de l'eau est logé dans une cavité de D<sub>1</sub> faisant saillie dans le lumen (Holzenburg et al., 1993) et sa fonction consiste à réaliser la réaction d'oxydation de l'eau : 2 H<sub>2</sub>0 -> 4 e<sup>-</sup> + 4 H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub>. Quatre électrons sont extraits de deux molécules d'eau pour libérer un O<sub>2</sub> (Kok et al., 1970) alors qu'un seul électron est extrait par séparation de charge photoinduite. L'OEC est un dispositif de stockage de 4 charges positives, passant par autant d'états, de So à S4 (S pour State en anglais). Pendant l'oxydation de l'eau 4 protons sont libérés dans le lumen.

Au final, le PSII catalyse la réaction : 2 H<sub>2</sub>0 + 2 PQ + 4 H<sup>+ (stroma)</sup> ->  $O_2$  + 2PQH<sub>2</sub> + 4 H<sup>+ (lumen)</sup>

# La photochimie dans le photosystème I

Le photosystème I est une plastocyanine-ferrédoxine-oxydoréductase présentant une organisation semblable à celle du photosystème II, avec un centre réactionnel composé d'un hétérodimère des protéines PsaA et PsaB (Figure 10). Au cœur du complexe est logée la paire spéciale de chlorophylle a, P<sub>700</sub>, exposée au lumen. Le centre réactionnel du PSI contient plusieurs autres cofacteurs impliqués dans la séparation de charge primaire et le transport d'électrons : A<sub>0</sub>, l'accepteur primaire, est une molécule de chlorophylle a, A<sub>1</sub> est une phylloquinone tandis que F<sub>X</sub>, F<sub>A</sub> et F<sub>B</sub> sont des centres "fer-soufre" de type [4Fe-4S]. Les complexes protéines-pigments LHCI forment l'antenne collectrice de l'énergie lumineuse et renferme des molécules de chlorophylles a, b et des caroténoïdes. Le photosystème I contient d'autres protéines comme PsaI et PsaJ, qui remplissent des rôles structuraux.

Comme pour le PSII, lorsque l'énergie excitonique est transférée des antennes à la « paire spéciale »  $P_{700}$ , l'excitation de  $P_{700}^*$  permet la séparation de charge  $[P_{700}^+ A_0^-]$ . Du côté accepteur d'électrons, l'électron résultant de la séparation de charge est transféré vers  $A_1$ ,  $F_X$ ,  $F_A$  et  $F_B$  et aboutit à la réduction de la ferrédoxine (Fd) une protéine fer-soufre mobile (Figure 10). La ferrédoxine est amarrée au photosystème I au niveau des deux protéines de structure

PsaD et PsaE mais une fois réduite, elle sert de transporteur mobile d'électrons jusqu'à la Fd-NADP<sup>+</sup> réductase (ou FNR) qui procède à la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH. Le NADPH est par la suite utilisé pour le fonctionnement du cycle de CBB pendant la phase stromale de la photosynthèse. Du côté donneur d'électrons, il existe une autre protéine d'amarrage exposée du côté luménal, la protéine PsaF, qui permet l'ancrage de la plastocyanine (PC) ou du cytochrome  $c_6$ . Ces protéines solubles dans le lumen assurent la reréduction de P<sub>700</sub> après l'étape photochimique.



Figure 10 : Représentation schématique du PSI, de la photochimie entre  $P_{700}$  et  $A_0$  et du transfert d'électrons au sein du centre réactionnel. Les mouvements des électrons sont indiqués par des flèches noires.  $P_{700}$  : « paire spéciale » du PSI, dimère de chlorophylle *a*,  $A_0$  : accepteur primaire,  $A_1$  : phylloquinone,  $F_X$ ,  $F_A$  et  $F_B$  : centres "fer-soufre", PC : plastocyanine, Cyt  $c_6$  : cytochrome c6, Fd : ferrédoxine. Schéma modifié d'après (Falkowski, & Raven, 2013).

#### Le cytochrome $b_{6}f$ et le schéma en Z

Le fonctionnement en série des deux photosystèmes est permis par le cytochrome  $b_{6f}$  qui est une oxydoréductase qui catalyse le transfert d'électron de la plastoquinol à la plastocyanine, une protéine soluble contenant un atome de cuivre (ou au cytochrome  $c_6$  dans certain cas). Les plastocyanines (ou cytochromes  $c_6$ ) sont solubles dans le lumen et permettent le transfert d'électrons entre le cytochrome  $b_{6f}$  *et* le PSI tandis que les plastoquinones, liposolubles, diffusent dans la membrane du thylacoïde entre la poche Q<sub>B</sub> du PSII et le cytochrome  $b_{6f}$ . Ce complexe est composé de quatre sous-unité principales, le cytochrome  $b_6$  associé à deux hèmes de type b (bl et bh), la protéine de Rieske contenant un centre fer-soufre [2Fe-2S], le cytochrome *f* contenant un cytochrome de type c, et la sous-unité IV (Figure 11). Le cytochrome  $b_6 f$  présente deux sites de fixation pour les plastoquinones, la poche Q<sub>0</sub> (pour proton output en anglais) du côté luménal et la poche Q<sub>1</sub> (pour proton input en anglais) du côté stromal. Au niveau de la poche Q<sub>0</sub>, l'oxydation d'un plastoquinol libère deux protons dans le lumen, un électron vers la voie à haut potentiel (vers le PSI via la sous unité Rieske, le cytochrome *f* et les plastocyanines ou le cytochrome  $c_6$ ) tandis que le deuxième électron est stocké sur hèmes  $b_1$  et  $b_h$ .

Le stockage d'un électron sur les hèmes b participe à un mécanisme appelé Q cycle (Mitchell, 1975) qui recycle les électrons pour aboutir à la réduction d'une plastoquinone dans la poche Q<sub>i</sub> tous les deux plastoquinols oxydés au niveau du site Q<sub>o</sub> (Figure 11). Alors que les deux protons nécessaires à la réduction d'une plastoquinone dans le site Q<sub>i</sub> viennent du stroma, les plastoquinols oxydés au niveau du site Q<sub>o</sub> relâchent leurs protons dans le lumen (Selak & Whitmarsh, 1982). Grace au Q-cycle, qui est continuellement sollicité (chez les plantes : Sacksteder et al., 2000), le transfert d'un électron à travers le cytochrome  $b_6 f$  vers le PSI est couplé au mouvement de deux protons vers le lumen (Mitchell, 1975 ; Sacksteder et al., 2000).



Figure 11: Représentation schématique du fonctionnement du cytochrome  $b_6 f$  et du Q cycle. La flèche noire représente le transfert d'électrons et les flèches rouge indiquent le transfert de protons. D'après (Dumas et al., 2016).

Le cytochrome *b*<sub>6</sub>*f* complète le transfert d'électron -dit linaire- entre l'eau et le NADPH, qui est généralement représenté dans un schéma appelé schéma en Z (Hill & Bendall, 1960). Le schéma en Z (Figure 12) est une représentation de l'ensemble des transferts d'électrons, dans lequel les cofacteurs impliqués dans le transfert d'électrons sont organisés en ordonnée selon leur potentiel d'oxydo-réduction. Cela permet de visualiser facilement l'ensemble des réactions exergoniques (thermodynamiquement favorables, dans le sens des potentiels croissants) des deux seules réactions endergoniques (les étapes photochimiques, qui utilisent l'énergie d'un photon). En effet, un couple oxydant réducteur a une tendance d'autant plus grande à céder ses électrons que son potentiel redox est négatif, et un transfert d'électrons entre deux couples redox s'effectue spontanément s'il s'effectue dans le sens croissant des potentiels d'oxydo-réduction.



Figure 12 : Le schéma en Z. Représentation la chaine photosynthétique de transfert d'électrons en fonction des potentiels redox des cofacteurs impliqués. hv : énergie du photon transférée au centre réactionnel ;  $P_{680}$  et  $P_{700}$  : « paires spéciales » du PSII et du PSI, respectivement. Abréviations dans le texte. Modifié de (Papageorgiou, 2007).

## Le gradient électrochimique de protons et la synthèse d'ATP

La synthèse d'ATP dans le chloroplaste s'effectue au niveau de l'ATP synthase (ATP synthase chloroplastique de type F ou CF1-FO ATP synthase) qui est un complexe protéique inséré dans la membrane du thylacoïde (Figure 13). L'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP est fournie par le gradient électrochimique de protons. Ce gradient se met en place pendant le transfert des électrons de l'eau vers le NADP<sup>+</sup>, grâce à la photolyse de l'eau au niveau du PSII, et à l'oxydoréduction des plastoquinones au niveau du cytochrome  $b_6 f$ . La synthèse d'ATP dans le chloroplaste à la lumière est appelée photophosphorylation.

Le couplage entre les réactions d'oxydoréduction conduisant au transfert d'électrons et les mouvements de protons permettant la photophosphorylation, qui a été décrite sous le nom de théorie chimiosmotique de Mitchell (Mitchell, 1961). En terme énergétique, le gradient

électrochimique de protons ( $\Delta\mu$ H<sup>+</sup>) généré à travers le thylacoïde à la lumière est constitué de deux composantes : une composante électrique ( $\Delta\Psi$ , les protons sont chargés positivement) et une composante osmotique provenant de l'accumulation de protons en tant qu'espèce chimique ( $\Delta$ pH). On peut écrire l'expression :

$$\Delta \mu H^+ = F. \Delta \Psi - (RT). \Delta pH$$

 $\Delta \Psi$  correspond à la différence de potentiel électrique transmembranaire en Volts (V),  $\Delta pH$  à la différence de pH entre lumen et stroma, F est la constante de Faraday, R est la constante des gaz parfaits et T, la température en °K. La valeur de  $\Delta \mu H^+$  est alors exprimée en J.mol<sup>-1</sup>.

Le gradient de protons peut s'exprimer également en unité électrique. On parle alors de force protomotrice (pmf) qui s'exprime en V : pmf =  $\Delta\mu$ H<sup>+</sup>/F =  $\Delta\Psi$  – (RT/F).  $\Delta$ pH, expression qui devient (à 25°C et en mV) : **pmf** =  $\Delta\Psi$  – 59.  $\Delta$ pH.

L'ATP synthase chloroplastique est une enzyme fonctionnant comme une pompe à protons transmembranaire. Elle est composée de deux parties principales : une sous-unité  $F_0$  qui est un complexe polaire enchâssé dans la membrane et fonctionnant comme canal à protons, et une sous-unité  $F_1$  qui est un complexe globulaire faisant saillie dans le stroma du chloroplaste où s'effectue la synthèse d'ATP, (Hahn et al., 2018). Le complexe  $F_1$  est composé des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , disposées alternativement selon un anneau hexamérique, auxquelles s'ajoutent les sous-unités  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\varepsilon$  avec une stœchiométrie 3  $\alpha$ , 3  $\beta$ , 1  $\gamma$ , 1  $\delta$  et 1  $\varepsilon$ . Les 3 sous-unités  $\beta$  possèdent un site catalytique responsable de la synthèse d'ATP. Au centre de cet hexamère on retrouve la sous-unité  $\gamma$  mobile qui lie le complexe  $F_1$  au complexe  $F_0$  au niveau de l'anneau de sous-unités c, où l'on retrouve aussi la sous-unité mobile  $\varepsilon$ .

Le complexe  $F_0$  est constitué de de trois types de sous-unités principales a, b, c avec une stœchiométrie 1 a, 2b (1b+1b') et 14 c associés en une couronne, chez les chloroplastes d'épinards (Hahn et al., 2018).

L'ensemble des quatre sous-unités a, 2b et  $\delta$  constituent la « tige » maintenant F<sub>1</sub> lié à une partie de F<sub>0</sub>. La sous-unité c présente deux semi-canaux à protons (sous-unité a), un exposé du côté du lumen par lequel les protons entrent et l'autre exposé du côté du stroma par lequel les protons sortent. L'anneau mobile constitué des sous-unités c est hydrophobe et ancré dans la membrane



Figure 13 : Représentation schématique de la structure de l'ATP synthase chloroplastique, insérée dans la membrane du thylacoïde. L'ATP synthase est constitué du complexe  $F_0$  composé des sousunités a, b, c et du complexe  $F_1$  composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Hahn et al., 2018).

L'entrée de protons dans les sous-unités c, via le semi canal à proton, a, présent du côté du lumen, provoque la rotation de l'anneau, qui entraine avec lui la rotation de la sous-unité  $\gamma$ . La sous-unité  $\gamma$  vient visiter successivement les trois sites catalytiques, situées sur les trois sous-unités  $\beta$  et provoque leur changement de conformation et la synthèse d'ATP successivement (Boyer, 1997).

Si on prend en compte l'aspect dynamique du complexe, celui-ci peut être catégorisé en deux parties : une partie fixe appelée le « stator », qui regroupe les sous-unités a, b,  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\delta$  et une partie mobile le « rotor » constituée des sous-unités c,  $\gamma$  et  $\varepsilon$ . Le nombre de sous-unités c de la couronne définit le nombre de H<sup>+</sup> nécessaire à une rotation complète de 360 ° du rotor, ce qui

entraîne invariablement la synthèse de 3 ATP par les trois sites catalytiques de la sous-unité  $\beta$  (Boyer, 1997). Chez l'épinard, le rotor de l'ATP synthase est composé de 14 sous-unités c (Seelert et al., 2000 ; Hahn et al., 2018), 14 H<sup>+</sup> sont alors nécessaires, pour que  $\gamma$  puisse visiter les trois sites catalytiques des sous-unité  $\beta$  et libérer 3 ATP. Le nombre exact de sous-unités c pourrait varier en fonction de l'organisme, il serait de 13c chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (Meyer Zu Tittingdorf et al., 2004) où la synthèse d'une molécule d'ATP requiert le transfert de 13/3  $\approx$  4,33 H<sup>+</sup> (Alric, 2010).

## 3. La phase stromale de la photosynthèse

La fixation du  $CO_2$  ou phase sombre de la photosynthèse se déroule dans le stroma du chloroplaste et est catalysée par le cycle de CBB). Cette phase d'assimilation du carbone utilise le NADPH et l'ATP produits pendant la phase membranaire de la photosynthèse et régénère ainsi le NADP<sup>+</sup> et l'ADP. Elle a été décrite par Calvin, Bassham et Benson de 1946 à 1953 (ce qui a valu le prix Nobel à Calvin en 1961) et se décompose en trois étapes distinctes, une étape d'incorporation du  $CO_2$ , une étape dite de réduction, et enfin la régénération des intermédiaires (Figure 14) :

# Phase d'incorporation ou phase de carboxylation

Cette réaction est catalysée par la RubisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygénase) qui peut à la fois carboxyler et oxygéner – selon les concentrations locales de  $CO_2$  et  $O_2$  - un composé à 5 carbones, le Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). Dans sa fonction carboxylase, la RubisCO produit, à partir d'une molécule de  $CO_2$  et d'un RuBP, un intermédiaire instable à 6 carbones qui se décompose rapidement en deux molécules stables à 3 carbones : le 3-phosphoglycérate (3-PGA) ou acide phosphoglycérique.

## Phase de réduction

Par la suite l'enzyme phosphoglycérate kinase catalyse la phosphorylation du 3-PGA par l'ATP en 1,3-bisphosphoglycéraldéhyde (1,3-BPG). Ceci rend possible la réduction du 1,3-BPG par le NADPH en Glycéraldéhyde-3-phoshate (GAP) grâce à l'enzyme glycéraldéhyde 3phosphate déshydrogénase. Pendant ces deux réactions une molécule d'ATP et une molécule de NADPH sont consommées par triose-phosphate, soit 2 ATP et 2 NADPH par CO<sub>2</sub> assimilé. Pour trois CO<sub>2</sub> fixés, 6 GAP sont produits dont un sera redirigé vers la gluconéogenèse : à la fin de ces deux premières étapes, le contenu en carbone du cycle est conservé mais 3 phosphates sont perdus pour 3 CO<sub>2</sub>.

## Phase de régénération des intermédiaires

Afin de fixer à nouveau du CO<sub>2</sub>, cette étape du cycle doit régénérer les 3 RuBP (à 5 carbones) à partir des 5 GAP (à 3 carbones), tout en utilisant 3 molécules d'ATP pour compenser la perte de phosphates évoquée plus haut. Cela est catalysé par un ensemble de réactions impliquant plusieurs intermédiaires au nombre de carbones allant de 3 à 7. Ainsi pour résumer, pour trois CO<sub>2</sub> assimilés, 6 GAP sont produits dont 5 sont utilisés pour régénérer la RuBP et un sera disponible pour la conversion ultérieure en glucose et autres sucres. Ce cycle requiert 9 molécules d'ATP et 6 de NADPH pour trois CO<sub>2</sub>, ce qui donne 3 ATP et 2 NADPH par CO<sub>2</sub>.



Figure 14 : Réactions et intermédiaires du cycle de Calvin-Benson-Bassham. La représentation est faite sur la base de l'assimilation de trois molécules de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (Calvin et al., 1951). Description détaillée et abréviations dans le texte.

## **Photorespiration**

Une compétition entre l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> existe au niveau du site catalytique de la RuBisCO (Ogren & Bowes, 1971 ; Bowes et al., 1971 ; Bowes & Ogren, 1972). L'oxygénation du RuBP, est favorisée quand le rapport oxygène / CO<sub>2</sub> est élevé à proximité de la RuBisCO (Forrester et al., 1966), et forme du 2-phosphoglycolate (2-PG), un composé à 2 carbones et du 3-PGA, ce dernier rejoignant le cycle CBB (Bowes *et al.*, 1971). Le 2-PG est métabolisé pour régénérer du 3-PGA via un processus complexe faisant intervenir différents compartiments cellulaires, le chloroplaste, le péroxysome et la mitochondrie. Ce processus de régénération consomme de

l'ATP, du NADH et conduit à la conversion de 2 molécules de 2-PG en une molécule de 3-PGA en libérant une molécule de CO<sub>2</sub> lors de la condensation mitochondriale de deux glycines par la glycine décarboxylase (Wingler et al., 2000).

# 4. Régulations de la fonction photosynthétique dans la lignée verte

## Déséquilibre du ratio ATP/ NADPH.

L'assimilation d'une molécule de CO<sub>2</sub> au cours du cycle CBB nécessite 3 moles d'ATP et 2 moles de NADPH. Or, la génération de NADPH couplée à la production d'ATP pendant le transfert d'électron linéaire, produit un rapport d'ATP/ NADPH inférieur (Allen, 2003). En effet, pour 4 électrons déplacés et 2 NADPH produits, le flux linéaire d'électrons déplace 12  $H^+$  vers le lumen : 4 au niveau du PSII et 8 au niveau du cytochrome  $b_6f$ , en tenant compte du Q cycle constitutif (Sacksteder et al., 2000). Au niveau de l'ATP synthase chloroplastique chez l'épinard, un tour complet du « rotor » entraine la production de 3 ATP, et nécessite 14  $H^+$ , d'après le nombre de sous-unité c du rotor (Allen, 2003 ; Alric, 2010). Cela signifie que 2,67 ATP (12 \* 3/14) sont produits pour 2 NADPH, alors que le cycle de CBB nécessite 3 ATP pour 2 NAPH pour un CO<sub>2</sub> assimilé. Pour répondre à ce « manque » d'ATP, de nombreuses voies alternatives de transport d'électrons permettent d'augmenter la production d'ATP sans production nette de NADPH.

#### Transferts alternatifs d'électrons

Plusieurs voies alternatives de transport d'électron sont possibles (Figure 15), qui partagent un point commun : elles font intervenir le PSII et/ou le cytochrome  $b_6f$ , qui pompent des protons dans le lumen, sans toutefois produire de NADPH. Ce faisant, elles permettent d'augmenter le gradient électrochimique de proton dans le thylacoïde et donc la quantité d'ATP synthétisée.



Figure 15 : Représentation schématique de la voie de transfert d'électron linéaire et des différentes voies de transfert d'électron alternatives. Le transfert d'électron linéaire est représenté en bleu foncé, les transferts de l'eau vers l'eau sont représentés en jaune pour celles qui utilisent les deux photosystèmes), la voie alternative PSII-PTOX (anglais Plastoquinone terminal oxydase) est indiquée par une flèche verte et la voie de transfert d'électron cyclique autour du PSI est en rouge.

#### Le transfert d'électron cyclique autour du PSI

Un transfert d'électron cyclique (TEC) autour du PSI existe et implique la réinjection des électrons provenant du côté accepteur du PSI (NADPH) vers la chaîne photosynthétique dans le pool de PQ (Shikanai, 2007; Alric, 2010) ou directement au niveau du cytochrome  $b_6 f$  (Nawrocki et al., 2019).

### Les transferts d'électrons de l'eau vers l'eau

Un autre mode de fonctionnement de la chaîne photosynthétique consiste à dériver les électrons libérés par l'oxydation de l'eau, au niveau du PSII, vers la réduction de l'oxygène grâce à des oxydases. En régénérant de l'eau, ces transferts créent des cycles de l'eau vers l'eau (en anglais, water to water cycle, WWC) (Cardol et al., 2010; Curien et al., 2016). Parmi les oxydases impliquées dans de tels WWC, on peut citer : (i) l'enzyme PTOX (en anglais Plastoquinone terminal oxydase) qui redirige les électrons au niveau des plastoquinols vers l'oxygène et ne passe par conséquent ni par le PSI ni par le cytochrome  $b_{6f}$  (Wetzel *et al.*, 1994; Zehr & Kudela, 2009) (ii) la réaction de Mehler appelée aussi la voie de la super oxyde dismutase (Mehler, 1951 ; Asada et al., 2000) qui redirige les électrons de la Fd du côté accepteur PSI, pour réduire l'oxygène moléculaire en superoxyde (Mehler, 1951; Asada, 2000). Le superoxyde est ensuite réduit par la superoxyde dismutase (SOD) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Asada, 1999), qui est encore piégé par l'ascorbate peroxydase, pour former de l'eau et de l'ascorbate oxydé (Asada, 2000), (iii) les flavodiirons protéines qui redirigent également les électrons en aval du PSI vers l'O2 (Chaux et al., 2017), et enfin (iv) le détournement des électrons depuis les accepteurs PSI vers la chaîne de transfert d'électron mitochondriale, qui permet de synthétiser de l'ATP supplémentaire en consommant le pouvoir réducteur du chloroplaste (Lemaire, Wollman & Bennoun, 1988; Scheibe, 2004; Cardol et al., 2010, Cardol et al., 2009).

## Energie lumineuse en excès et dissipation non photochimique de l'excitation

Les transferts d'électrons alternatifs créent de l'ATP supplémentaire en augmentant la pmf dans le thylacoïde. Mais l'augmentation du pmf (l'acidification du lumen) a un deuxième effet régulateur. En effet en forte lumière, lorsque la capacité de la chaîne photosynthétique et du cycle CBB est insuffisante pour utiliser l'énergie apportée par l'absorption de photons, la surréduction de la chaîne de transfert d'électron photosynthétique peut entrainer la photoinhibition des centres PSII (Nixon et al., 2010) et/ou PSI (Sonoike, 2011). Parmi les mécanismes permettant de protéger la chaîne photosynthétique, la dissipation non photochimique de l'excitation (qE) dans le PSII est régulée par le  $\Delta$ pH. En effet, ce phénomène est fortement lié à la conversion de pigments, le cycle des xanthophylles présenté plus haut, qui est dépendant du pH luménal, et de sous-unités du PSII dont la protonation, en conditions de lumen acide, participe au mécanisme de dissipation (Kramer et al, 2003). Ce phénomène est visualisé par une diminution de la fluorescence de la chlorophylle et porte parfois par abus de langage le nom de NPQ (pour « non-photochemical quenching », voir section suivante et Méthodes).

# 5. Les particularités de la photosynthèse chez les diatomées

Les diatomées, ou Bacillariophyta, participe à ~40% de la production primaire totale dans l'océan (Uitz et al., 2010). Elles partagent avec les autres organismes effectuant la photosynthèse oxygénique les mêmes partenaires dans la chaîne de transfert d'électrons (schéma en Z), les complexes photosynthétiques présentant la même relation structure-fonction. Leurs particularités par rapport à la lignée verte se retrouvent dans la structure du plaste et des thylacoïdes, dans le système de capture de la lumière et dans les mécanismes de régulation photosynthétique qui offrent aux diatomées une grande flexibilité pour répondre aux fortes dynamiques des paramètres environnementaux dans le monde marin.

### Plaste et thylacoïdes

Contrairement aux Viridiplantae, dont le chloroplaste est entouré de deux membranes, le plaste des diatomées provient d'une endosymbiose secondaire (Keeling et al., 2010) et est entouré de quatre membranes (Cavalier-Smith, 1982; Howe et al., 2008). La série d'événements endosymbiotiques avant donné naissance au plaste de diatomée met en jeu une algue rouge mais aussi probablement une algue verte (Moustafa et al., 2009). Cela a fourni aux diatomées un ensemble de gènes complexe et de plusieurs origines (Frommolt et al., 2008 ; Bowler et al., 2008). De plus, l'organisation structurelle de leur plaste présente certaines spécificités, les membranes thylacoïdiennes ne sont pas organisés en grana et en thylacoïde inter-granaire ou lamellae, mais sont empilées en couches de trois membranes, c'est-à-dire que deux thylacoïdes sont accolés sur toute la longueur du plaste (Figure 16) (Berkaloff et al., 1990; Flori et al., 2018). Chez les diatomées, la plastocyanine (liant un atome de cuivre), le transporteur d'électron soluble entre le cytochrome  $b_6 f$  et le PSI, est remplacé par un cytochrome  $c_6$  (liant uin atome de fer) (Böhme & Kunert, 1980 ; Grouneva et al., 2011). La diatomée Thalassiosira oceanica est une exception à cet égard puisqu'elle utilise la plastocyanine, probablement en raison de son adaptation aux environnements pauvres en fer (Strzepek & Harrison, 2004 ; Peers & Price, 2006). Chez les diatomées, le PSI se trouve principalement dans les thylacoïdes au niveau de la face externe face au stroma, tandis que les PSII sont intégrés à la jonction de deux thylacoïdes (Pyszniak & Gibbs, 1992; Flori et al., 2017).



Figure 16 : Cellule entière de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* et contact physique entre chloroplaste et mitochondrie. Reconstruction de cellules entières d'une cellule de *Phaeodactylum tricornutum*, intacte basée sur des images obtenues par tomographie, en microscopie électronique FIB-SEM. Cette image révèle les contacts physiques entre le chloroplaste (vert), la mitochondrie (rouge) et le noyau (bleu). B : Interaction entre plaste et mitochondrie. Les flèches jaunes mettent en évidence les contacts entre les organites et les flèches vertes indiquent le chloroplaste. D'après (Flori et al., 2018)

La proximité du PSII et du PSI, ainsi que certaines connexions entre les thylacoïdes, assurent une diffusion rapide des transporteurs d'électron entre les deux photosystèmes (Flori et al., 2017) alors que leur diffusion peut limiter le taux global du transfert d'électron linéaire chez les plantes (Kirchhoff et al., 2011 ; Kirchhoff et al., 2004). Les transitions d'états, qui sont liées à la structure grana / thylacoïde inter-granaire dans la lignée verte, ne sont pas retrouvées chez les diatomées (Owens, 1986). Enfin elles semblent posséder significativement plus de PSII que de PSI, contrairement aux plantes, aux algues vertes (où elle est proche de 1) et aux cyanobactéries (où la stœchiométrie est plutôt en faveur du PSI) (Strzepek & Harrison, 2004 ; Thamatrakoln et al., 2013).

## Pigments photosynthétiques et antennes collectrices de photons

Les diatomées utilisent comme pigments principaux la chlorophylle a et c, et les principaux caroténoïdes sont le  $\beta$ -carotène et la fucoxanthine alors que le cycle de xanthophylles principal utilise la diadinoxanthine et la diatoxanthine (Olaizola et al., 1984). Les principales antennes collectrices de la lumière sont les FCP (pour « fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein ») qui lient sept chlorophylles a, deux chlorophylles c, sept fucoxanthines et probablement une diadinoxanthine dans l'échafaudage protéique (Wang *et al.*, 2019). Les FCP sont divisés en trois groupes (Gundermann & Büchel, 2014) : Lhcf (la principale antenne collectrice de lumière), Lhcr (spécifique au PSI) et Lhcxs (impliqués dans la photoprotection). Le PSII-FCP forme un homodimère, chaque monomère possédant deux homotétramères FCP et trois monomères FCP, formant un réseau complexe de protéines et de pigments, différent de son homologue de la lignée verte (Pi et al., 2019 ; Nagao et al., 2019).

#### **Photoprotection chez les diatomées**

Les diatomées doivent gérer un environnement lumineux très variable, du fait des mouvements dans la colonne d'eau, qui peuvent entrainer facilement une photoinhibition du PSII sous une lumière excessive. Les diatomées ajustent l'absorption de l'énergie lumineuse au niveau du PSII en dissipant l'énergie des photons en excès sous forme de chaleur, le NPQ/qE qui est en général plus efficace chez les diatomées que chez les plantes (voir sections 1.6 et 1.7) (Lavaud et al., 2002 ; Wilhelm et al., 2006 ; Lepetit et al., 2002 ; Ruban et al., 2004). Le fonctionnement du NPQ chez les diatomées dépend du cycle des xanthophylles, qui est un cycle réversible convertissant la diadinoxanthine en diatoxanthine en une seule étape de dé-époxidation (Figure 17), contrairement au cycle des xanthophylles à deux étapes chez les plantes (Hager & Stransky, 1970).



Figure 17 : Le cycle de la diadinoxanthine chez les diatomées. Par forte lumière, la diadinoxanthine (qui possède un groupe époxy-) est convertie en diatoxanthine par la violaxanthine de-époxydase (VDE) ; la réaction inverse est observée dans des conditions d'obscurité ou de faible lumière et est catalysée par la zéaxanthine époxydase (ZEP), (Kuczynska et al., 2015).

L'activité de la violaxanthine de-époxydase (VDE), est modulée par le gradient de proton (Caron et al., 1987). De ce fait, le NPQ est régulé par l'acidification du lumen lorsque l'activité photosynthétique accélère le pompage de protons dans le lumen, comme chez les plantes. De plus, une famille d'antennes collectrices de lumière appartenant aux LHCs, les protéines LHCX, sont nécessaires pour le NPQ (Bailleul et al., 2010, Lepetit et al., 2017, Buck et al., 2019). Ainsi la protéine LHCX1, exprimée de façon constitutive, est essentielle pour les réponses aux fortes intensités lumineuses (Bailleul et al., 2010, Buck et al., 2019). LHCX1 agit comme un modulateur du NPQ et contribue à la plasticité phénotypique (Bailleul et al., 2010). En plus de LHCX1, les diatomées possèdent d'autres isoformes de la famille LHCX induites en forte lumière ou en conditions de stress qui participent au NPQ (Zhou & Green, 2009 ; Buck et al., 2019).

### ATP/NADPH et transferts d'électron alternatifs.

Chez les diatomées, le rapport entre ATP et NADPH produits par le transfert d'électron linéaire dépend de plusieurs facteurs encore inconnus. Le nombre de sous-unités c constituant le « rotor » de l'ATPsynthase chloroplastique n'est pas connu car aucune structure cristallographique ou basée sur la microscopie électronique n'a encore été obtenue. Le mouvement de 2 charges positives par électron transféré vers le cytochrome  $c_6$  semble indiquer que le Q cycle opère au niveau du cytochrome  $b_6f$  des diatomées comme chez les plantes (Bailleul et al, 2015 ; Sacksteder, et al., 2000). Malgré ces incertitudes, la forte demande d'ATP du mécanisme de concentration du carbone (Hopkinson et al., 2011), suggère la présence de mécanismes permettant d'augmenter le gradient électrochimique de proton, via des transferts d'électron alternatifs.

Dans des conditions d'inhibition du PSII (par ajout de 3-(3,4-dichlorophényl) -1,1diméthylurée, DCMU), un transfert d'électron cyclique autour du PSI (TEC) a été mesuré à travers la réduction de P<sub>700</sub> (Maxwell & Biggins 1976) ou la vitesse photochimique (Bailleul et al., 2015). Mais les vitesses du TEC sont faibles, de 5 à 10 électrons par seconde par PSI, ce qui suggère que le TEC n'a probablement pas chez les diatomées le rôle constitutif qui lui est prêté chez les plantes. Cependant, il semble devenir un acteur important dans certaines espèces et conditions : chez des diatomées polaires (environ 25 électrons par PSI par seconde, Goldman *et al.*, 2015), ou dans des conditions de stress en fer (plus de 55 électrons par PSI par seconde, Thamatrakoln et al., 2013).

Du point de vue des cycles de l'eau vers l'eau, les Flvs (« flavodiiron proteins ») ne sont pas retrouvées dans le génome des diatomées (Zhang et al., 2009 ; Chaux et al., 2017). Deux copies du gène codant pour PTOX sont présentes, en revanche (Burki et al., 2012), ces gènes sont exprimés au moins dans des conditions de carence en fer et une activité de réoxydation des PQ à l'obscurité, dépendant de l'oxygène moléculaire, a été mise en évidence (McDonald *et al.,* 2011). Il n'existe cependant pas de données indiquant que la voie PSII-PTOX puisse jouer un rôle majeur à la lumière, comme chez les cyanobactéries et prasinophycées marins (Bailey et al., 2008 ; Cardol et al., 2008). La voie de la superoxyde dismutase ou réaction de Mehler (Asada et al., 2000) est présente chez les diatomées : une MnSOD (superoxyde dismutase à

manganèse) a été détectée dans le plaste de *Thalasiossira pseudonana (T. pseudonana)*, alors que cette enzyme est généralement présente dans les mitochondries chez d'autres espèces (Wolfe-Simon, 2006). Cette particularité pourrait participer au succès écologique des diatomées dans les régions à faible teneur en fer dans l'océan (Wolfe-Simon, 2006). Une photoréduction de l'oxygène indiquant un transfert de l'eau vers l'eau, a été mesurée chez *Nitszchia epithemioides* et *T. pseudonana* et a été attribuée à la réaction de Mehler (Waring et al., 2010). Mais il semble que le transfert d'électron alternatif principal chez les diatomées soit le reroutage du pouvoir réducteur en aval du PSI vers la chaîne de transfert d'électron mitochondriale (Figure 18). Il a été proposé que l'oxydase alternative (AOX) soit une valve permettant de dissiper l'excès d'électrons photosynthétiques sous une carence de fer (Allen et al., 2008) et des lignes de knock-down AOX ont montré une hypersensibilité au stress (Murik et al., 2018). Ce couplage énergétique entre les plastes et les mitochondries semble constitutif avec environ 10% des électrons issus de l'oxydation de l'eau au niveau du PSII déviés *in fine* vers la mitochondrie, quelles que soient les conditions d'éclairement (Bailleul et al., 2015).



Figure 18 : Interaction énergétique entre le chloroplaste et la mitochondrie chez les diatomées. Le couplage énergétique (en anglais Chloroplaste -Mitochondria Crosstalk, CMC) permet de dissiper le pouvoir réducteur du chloroplaste tout en produisant de l'ATP dans la mitochondrie (Bailleul et al., 2015). Schéma modifié d'après (Bowler & Falciatore, 2019)

Dans le sens inverse, l'ATP produit par la voie de transfert d'électron respiratoire, dans la mitochondrie, peut être importé dans le plaste et hydrolysé par l'ATPase. Cela se traduit par l'existence d'un pmf à travers le thylacoïde à l'obscurité (Bailleul et al., 2015), comme dans la lignée verte (Takizawa et al., 2007 ; Finazzi & Rappaport, 1998).

Comme dans la lignée verte (Peltier et al., 2010 ; Kramer et al., 2003), l'ensemble de ces transferts d'électrons alternatifs, a un double rôle : ils sont importants pour la photoprotection des deux photosystèmes en modulant la composante osmotique de la pmf, et ils jouent un rôle primordial dans l'ajustement du rapport ATP/ NADPH. Il est raisonnable de penser que ce rôle de régulateur de la photosynthèse est particulièrement crucial lorsque de changements rapides de la disponibilité en CO<sub>2</sub>, de l'intensité lumineuse et/ou quand la demande métabolique varie.

## 6. Méthodes spectroscopiques pour étudier l'activité photosynthétique

Un certain nombre de méthodes spectroscopiques sont utilisées pour étudier le processus photosynthétique *in vivo*. Je vais présenter ici quelques méthodes relativement classiques ; ce n'est pas une revue exhaustive des approches disponibles. Il s'agit simplement ici de présenter rapidement les méthodes utilisées au cours de ma thèse (les détails méthodologiques utilisées dans chaque chapitre seront rappelés dans les méthodes de chaque article/manuscrit ou en début de chapitre). Si ces méthodes ont été principalement développées dans la lignée verte et les cyanobactéries, elles sont désormais éprouvées également chez les diatomées en particulier chez l'espèce modèle *Phaeodactylum tricornutum (P. tricornutum)*. Il s'agit de :

La spectroscopie de fluorescence du PSII, qui met à profit la fluorescence chlorophyllienne (issue principalement du PSII) pour obtenir l'activité intrinsèque du PSII, ainsi que l'efficacité du transfert d'électron dans la chaîne photosynthétique.

La spectroscopie de différence d'absorption photo-induite, qui utilise les changements d'absorption de partenaires de la machinerie photosynthétique dont l'absorption change en fonction de l'état de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique. Certains transporteurs d'électrons (P<sub>700</sub>, Cytochrome *f* et c<sub>6</sub>, PC) n'ont pas le même spectre d'absorption quand ils sont dans un état réduit ou oxydé ; mesurer ces changements d'absorption permet en retour d'étudier les changements redox de ces molécules. D'autre part, l'absorption de certains pigments photosynthétiques est sensible au champ électrique transmembranaire (le  $\Delta \Psi$ ) ; l'expérimentateur peut ainsi remonter au  $\Delta \Psi$  en sondant ces changements d'absorption.

## Spectroscopie de fluorescence

La fluorescence chlorophyllienne pour étudier l'activité du PSII

La fluorescence de la chlorophylle est largement utilisée pour les études de physiologie de la photosynthèse et d'écophysiologie. Le principe est basé sur un modèle de photochimie en PSII où toutes les voies de relaxation de la chlorophylle excitée sont en compétition (Butler, 1978).

Après avoir absorbé un photon, une chlorophylle excitée peut relaxer vers son niveau d'énergie fondamental via 3 voies (voir Figure 19):

(1) la photochimie, qui correspond au transfert d'un électron de la paire spéciale de chlorophylle  $P_{680}$  à son accepteur primaire, la phéophytine,

(2) la relaxation non radiative, qui consiste en la dissipation d'énergie sous forme de chaleur,

(3) la relaxation radiative ou réémission d'un photon d'énergie inférieure (c'est-à-dire à une longueur d'onde plus longue). C'est la fluorescence.



Figure 19 : Les trois voies de dé-excitation d'une chlorophylle excitée, à la suite de l'absorption d'un photon.

Ces trois voies de désexcitation étant en concurrence, la photochimie et la dissipation sous forme de chaleur ont tous deux un effet sur la quantité de fluorescence émise par un centre PSII. La photochimie participe à diminuer la fluorescence (extinction photochimique), tout comme la relaxation non radiative (extinction non photochimique). Deux cas extrêmes servent de référence (Figure 20) : à l'obscurité, Q<sub>A</sub> est complètement oxydé et les centres PSII sont « ouverts » : le rendement photochimique est maximal et le rendement de fluorescence est donc minimal (appelé F0 par convention). Au contraire, lors de l'application sur un échantillon adapté à l'obscurité, d'une brève impulsion de lumière à une intensité saturante pour le transfert photosynthétique d'électrons, l'accepteur primaire Q<sub>A</sub> sera complètement réduit, le rendement photochimique tombera à zéro et le rendement de fluorescence sera donc maximal (Fm). Un échantillon photosynthétique exposé à un éclairage actinique d'intensité non saturante pour le transfert d'électrons aura un rendement de fluorescence (Fst), qui est intermédiaire entre ces deux valeurs. A partir de ces valeurs de fluorescence, le rendement quantique du PSII (qui représente le taux de conversion d'exciton en séparation de charge) peut être simplement calculé (Genty, 1989 ; Lazar, 2015) :

Le rendement maximal du PSII à l'obscurité est calculé comme Fv/Fm = (Fm - F0)/Fm.

Le rendement du PSII sous une lumière actinique donnée est notée  $\Phi_{PSII} = (Fm - Fst) / Fm$ .

La vitesse de transport des électrons à travers le PSII (en anglais Electron transport rate, ETR) est calculée selon l'équation :  $ETR_{PSII} = \Phi_{PSII} * \sigma_{PSII} * I$  où  $\sigma_{PSII}$  est la section efficace de capture des photons du PSII.



Figure 20 : Courbe d'évolution de la fluorescence chlorophyllienne chez la diatomée *T. pseudonana*. La fluorescence est minimale ( $F_0$ ) quand l'échantillon est pré-adapté à l'obscurité (les centres PSII sont ouverts, barre noire), la fluorescence augmente jusqu'atteindre une valeur stationnaire ( $F_{st}$ ) lorsque l'échantillon est soumis à une lumière actinique (barre jaune) et atteint sa valeur maximale ( $F_m$ ) pendant un bref pulse de lumière saturant (les centres PSII sont fermés, barre rouge).

Si l'illumination actinique est forte, le rendement de fluorescence de cet échantillon illuminé après une brève impulsion saturante de lumière (quand les centres sont fermés, Fm') peut être différent de Fm. La Figure 21 montre la dépendance lumineuse des paramètres photosynthétiques F0/F0', F' et Fm/Fm'. Sous un éclairement continu de forte intensité, la fluorescence maximale (Fm', après application du pulse de lumière saturante, c'est-à-dire lorsque la contribution de la photochimie est presque nulle) diminue. Cela traduit l'activation de processus de dissipation de chaleur induits par la lumière (Figure 21) activés. L'efficacité de ces derniers peut être calculé via un paramètre appelé NPQ (Bilger & Björkman, 1990) : NPQ = (Fm - Fm') / Fm'.

Cependant, le NPQ doit être utilisé avec prudence car il est la somme de trois phénomènes différents : (i) le quenching énergétique (qE) qui implique des mécanismes de dissipation sous

forme de chaleur de l'excitation des pigments du PSII, (ii) les transitions d'état (qt) qui permettent de répartir l'énergie d'excitation entre le PSII et le PSI (Wollman, 2001), et (iii) la photoinhibition (qI) qui est une inactivation des centres PSII. Les processus qE et qT sont réversibles dans l'échelle de temps des minutes alors que le processus de photoinhibition qI relaxe très lentement, dans l'échelle de temps des dizaines de minutes ou des heures. Les différents processus peuvent donc être distingués en fonction de leurs différentes caractéristiques de relaxation.



Figure 21: Dépendance des paramètres de fluorescence en fonction de l'intensité de la lumière actinique chez la diatomée, *Phaeodactylum tricornutum*. Guide di MiniFire, Max Gorbunov (DMC, Rutgers University, NJ, USA).

#### Spectroscopie de différence d'absorption

La spectroscopie de différence d'absorption permet de mesurer la variation d'état rédox de certains cofacteurs photosynthétiques ( $P_{700}$ , Cytochrome *f* et c<sub>6</sub>, PC) ou de sonder le champ électrique à travers le thylacoïde pendant le processus photosynthétique.

Comme nous l'avons vu, la paire spéciale du PSI, P<sub>700</sub>, est oxydée suite à l'étape photochimique dans le PSI. Suite au transfert d'électron depuis le cytochrome  $b_6f$  via la plastocyanine ou le cytochrome c<sub>6</sub>, P<sub>700</sub> sera ensuite réduit de nouveau. Ainsi les changements d'absorption de P<sub>700</sub> en fonction de son état redox peuvent été utilisés comme observable pour mesurer l'efficacité du PSI et le flux d'électron vers le PSI. Le spectre de différence d'absorption de P<sub>700</sub> (P<sub>700</sub><sup>+</sup> moins P<sub>700</sub>), obtenu chez l'épinard, est présenté sur la (Figure 22). Ainsi, à 705 nm, la différence d'absorption mesurée est majoritairement due à l'état redox de P<sub>700</sub> et est utilisée pour la mesurer l'état du PSI chez les organismes à photosynthèse oxygénique. Les changements d'absorption de P<sub>700</sub> permettent également de mesurer son rendement,  $\Phi_{PSI}$ , via une méthode proposée en 1994 par Klughammer et Ulrich Schreiber. Par analogie avec le PSII sondé par fluorescence, on peut calculer la vitesse de transport des électrons à travers le PSI (en anglais Electron transport rate, ETR selon l'équation : ETR<sub>PSI</sub> =  $\Phi_{PSI}^* \sigma PSI * I$ , où  $\sigma PSI$  est la section efficace de capture de photons du PSI et I l'intensité lumineuse.



Figure 22 : Spectre de différence d'absorption (P<sub>700</sub> oxydé moins P<sub>700</sub> réduit). Un flash (20µs de durée) a été appliqué sur des fractions de chloroplastes d'épinard lysée enrichies en PSI. D'après (Hiyama & Ke, 1972).

### L'effet Stark sur les pigments photosynthétiques : un « voltmètre interne »

Lorsque la photosynthèse est activée en présence de lumière, les deux photosystèmes vont instantanément effectuer une séparation de charge et transférer un électron du stroma vers le lumen, ce qui va générer un champ électrique à travers la membrane du thylacoïde. Il faut ajouter également la translocation de proton via le cytochrome  $b_6 f$ . Ainsi sonder le champ électrique généré à travers la membrane du thylacoïde permet de sonder l'activité des complexes photosynthétique, car chaque complexe participe à la génération du champ électrique, ainsi qu'à sa consommation (c'est le rôle de l'ATP synthase chloroplastique). Plus exactement, le transfert d'électrons au sein de la chaîne photosynthétique à la lumière est couplé à un transfert de proton, du stroma vers le lumen, ce qui va générer un gradient électrochimique de proton transmembranaire. Le gradient électrochimique de proton,  $\Delta\mu H^+$ , est constitué de deux composantes, une composante de champ électrique provenant de l'accumulation des protons en tant qu'espèce chimique ( $\Delta pH$ ). La mesure du champ électrique généré à travers les membranes du thylacoïde est possible et est basée sur un phénomène

physique, l'effet Stark, qui dans le domaine de la photosynthèse a été rebaptisée effet électrochromique (en anglais, Electrochromic-shift, ECS). Le principe est le suivant : certains pigments présents dans la membrane du thylacoïde sont sensibles au champ électrique (Figure 23) et vont ainsi nous permettre de sonder l'activité photosynthétique.



Figure 23 : Principe du décalage électrochromique : A : Modification du niveau d'énergie d'un pigment en présence d'un champ électrique. B : Décalage du spectre d'absorption (du spectre vert au spectre orange) d'un pigment soumis à un champ électrique et son spectre de différence d'absorption (cercle ouvert noir, différence entre les spectres orange et vert). D'après (Bailleul et al., 2010).

Les niveaux énergétiques (de l'état fondamental et de l'état excité) d'un pigment peuvent être modifiés en présence d'un champ électrique. En conséquence l'énergie du photon qui peut être absorbée par le pigment (dont l'énergie est égale à la différence entre le niveau énergétique de l'état excité et fondamental du pigment) va être modifiée, ce qui va entrainer un léger décalage de son spectre d'absorption. Ainsi la différence entre le spectre d'absorption d'un pigment en absence et en présence d'un champ électrique nous donne un spectre de différence d'absorption, qui est spécifique à ce pigment. Ce spectre de différence d'absorption présente un spectre
typique de l'ECS, avec la forme d'une double vague (Figure 23,B). De tels changements d'absorption liés au champ électrique ont été pour la première fois reportés chez les organismes photosynthétiques par Junge et Witt (Junge & Witt, 1968) et nous informe sur le champ électrique généré à travers les membranes du thylacoïde. L'ECS peut dépendre du champ électrique de deux manières différentes (Figure 24) : il peut augmenter linéairement avec le champ électrique (c'est le cas pour un pigment avec un moment dipolaire permanant), ou quadratiquement (c'est le cas pour un pigment qui ne présente pas de moment dipolaire mais qui est polarisable : son moment dipolaire est induit par le champ électrique). Un tel champ électrique « quadratique » a été décrit chez des mutants de microalgues vertes (Joliot & Joliot, 1989), chez les diatomées (Bailleul et al., 2015), ainsi que chez d'autres espèces appartenant aux straménopiles (Berne et al., 2018).



Figure 24 : Principe de l'ECS linéaire et quadratique chez les diatomées. Représentation schématique des pigments polaires (bleu) et polarisables (rouge) et leur réponse ECS linéaire (en bleu) et quadratique (en rouge) en fonction du champ électrique. La bicouche lipidique du thylacoïde est représentée en noir. Les symboles verts (+) et (-) figurent le  $\Delta\Psi$ . Les flèches rouges représentent la polarisation pigmentaire induit par le  $\Delta\Psi$ . (Bailleul *et al.*, 2015)

Ainsi chez les diatomées étudiées au sein de cette thèse, toutes (*P. tricornutum*; *Chaetoceros muelleri (C. muelleri)*; *T. pseudonana*) présentent ces deux composantes de l'ECS (linéaire et quadratique). La présence de ces deux sondes chez les diatomées permet la quantification absolue du champ électrique généré à travers la membrane du thylacoïde et présente un outil précieux pour analyser la force proton motrice *in vivo* (Bailleul *et al.*, 2015), cette méthode va être expliquer dans les chapitres suivants.

Il est par ailleurs intéressant de noter que les spectres ECS obtenues pour les différents groupes d'eucaryotes photosynthétiques sont différents (Bailleul *et al.*, 2010). *Le* spectre ECS des diatomées présente la même forme générale avec parfois quelque petite variation, la forme représente ainsi une signature des espèces appartenant à la classe des Bacillariophyceae. Le spectre ECS de *P. tricornutum* (Bailleul et al., 2010) est présenté sur la Figure 25 et comprend deux composantes spectrales : une composante linéaire et une quadratique. Une fois ces spectres connus, on peut choisir deux longueurs d'onde pratiques, nous permettant de mesurer directement le signal ECS linéaire, ici à 520 nm, car à cette longueur d'onde l'ECS quadratique est nul. De même à 566 nm on peut mesurer directement le signal ECS quadratique chez *P. tricornutum*.



Figure 25 : Spectre ECS de *P. tricornutum* comprenant deux composantes spectrales superposées, ECS linéaire et quadratique. La composante spectrale linéaire (spectre avec les cercles bleus), et la composante spectrale quadratique (spectre avec les cercles rouges) obtenue après déconvolution. (Bailleul *et al.*, 2015)

Il est important de noter que les signaux ECS ne sont pas les seules composantes contribuant aux changements d'absorptions dans la région du spectre ECS. D'autres cofacteurs photosynthétiques peuvent présenter des changements d'absorption, lors de leur oxydoréduction pendant le transfert d'électron dans la chaîne photosynthétique, comme par exemple les cytochromes de type c (f et c<sub>6</sub>). Ainsi pour obtenir un signale ECS « propre » il est important de déconvoluer ces signaux. Ces calculs seront explicités dans les chapitres suivants.

L'ECS peut ainsi servir de « voltmètre interne » et est une observable très utile pour l'étude de la physiologie photosynthétique. Il permet d'étudier tous les complexes photosynthétiques impliqués dans la génération du champ électrique (Photosystèmes I et II, cytochrome  $b_6f$ ) à travers les membranes du thylacoïde ainsi qu'à sa consommation par ATP synthase (Figure 26).



Figure 26 : Cinétique du signal ECS après un flash laser saturant et représentation schématique d'un thylacoïde comprenant tous les complexes photosynthétiques impliqués dans la génération et la dissipation du champ électrique (PSI, PSII, cytochrome  $b_6 f$  et ATP synthase). Voir le texte.

La cinétique du signal ECS généré après un flash laser saturant, à une longueur d'onde donnée, présente trois phases :

- Les photosystèmes (PSI et PSII) ayant des centres ouverts, vont effectuer une séparation de charge juste après le flash de lumière saturante, ce qui va provoquer l'augmentation rapide du signal ECS appelée phase a (représentée en bleu sur la Figure 26)
- 2) A la fin de la phase a, un donneur PSI a été oxydé et un électron, a été transfert vers le pool de plastoquinones par le PSII. Il s'en suit un transfert d'électron d'un plastoquinol à un donneur PSI, via le cytochrome  $b_6f$  qui va parallèlement transférer des protons du stroma vers le lumen. Cette contribution du cytochrome  $b_6f$  dans la génération du champ électrique va induire une seconde augmentation du signal ECS appelée « phase b » (représentée en rouge Figure 26)

3) Enfin le gradient électrochimique de proton est consommé par l'ATP synthase, pour la synthèse d'ATP, ce qui va entrainer le déclin du champ électrique donc du signal ECS jusqu'à ce que l'échantillon revienne dans son état adapté à l'obscurité. Cette phase est appelée phase c (représentée en vert sur la Figure 26)

Ainsi, si un métabolite secondaire (composé allélochimique) inhibe ou affecte l'activité d'un complexe photosynthétique, ceci se reflètera sur le signal ECS, en diminuant par exemple l'amplitude du signal de la phase a, si un des deux photosystèmes est inhibé, ou en ralentissant la phase c, si l'activité de l'ATPsynthase est affectée.

L'ECS permet aussi de mesurer la vitesse photochimique en régime stationnaire à la lumière (Bailleul et al., 2010), c'est-à-dire la vitesse à laquelle les deux photosystèmes effectuent des séparations de charge. Le principe est le suivant : après un temps d'éclairement la photosynthèse atteint un état stationnaire, le signal ECS (le champ électrique) reste constant. La vitesse d'entrée des charges dans le lumen, qui est la somme des vitesses du PSII, du PSI et du cytochrome  $b_{df}$  est alors égale à la vitesse de sortie des charges à travers l'ATP synthase (V(ATPsynthase)). A la coupure de la lumière actinique, seules les étapes photochimiques (qui utilisent les photons) s'arrêtent instantanément et le changement de pente du signal ECS pendant les premières millisecondes après la coupure de la lumière reflète l'activité qu'avaient les photosystèmes avant la coupure de la lumière.

## Ecologie du phytoplancton et rôle de l'allélopathie

## I. Le « paradoxe du plancton »

Dans une goutte d'eau de mer, on trouve une importante diversité des microorganismes, aussi bien des procaryotes que des eucaryotes, des larves et des crustacés (Figure 27). Ces espèces utilisent différentes ressources pour se développer, qui sont parfois limitantes dans le milieu marin. Or, en écologie, le principe de l'exclusion compétitive (Hardi, 1960), connu aussi sous le nom de principe de Gause (Gause et al., 1934), énonce que deux espèces ayant les mêmes exigences écologiques ne peuvent coexister (en Anglais « two species with similar ecology cannot live together in the same place ») c'est-à-dire qu'il ne peut y avoir plus d'une espèce par niche écologique. Autrement dit, l'espèce dont les caractéristiques physiologiques sont les mieux adaptées aux conditions environnementales d'une niche écologique emporte la compétition trophique et tend à devenir l'espèce dominante de cette niche. Lorsque plusieurs espèces utilisent les mêmes ressources, ce principe peut être reformulé de la sorte : il ne peut y avoir plus d'espèces que de ressources limitantes. En 1961, Hutchinson remarque que plusieurs espèces phytoplanctoniques (de l'ordre de plusieurs milliers) semblent coexister dans un même écosystème pourtant parfois fortement limité en ressources. Il introduit le concept de « paradoxe du plancton » qui s'applique en fait particulièrement au phytoplancton, car ce groupe de microorganismes n'obéit pas au principe de l'exclusion compétitive de Hardi, 1960.



Figure 27 : Composition d'une goutte d'eau de mer au microscope grossissement x25. https://www.boredpanda.com/magnified-drop-of-seawater-photo-davidliittschwager/?utm\_source=google&utm\_medium=organic&utm\_campaign=organic

D'après Hutchinson, ce paradoxe s'explique de deux façons. Une première explication prend en compte les fluctuations rapides de la concentration en nutriments dans le milieu (Hutchinson ,1961). Autrement dit, les concentrations en nutriments dans le milieu pélagique ne seraient pas stables sur une période suffisamment longue pour qu'une espèce se trouve dans des conditions de croissance optimale, même avec des taux de croissance rapide. Les espèces coexistant dans un écosystème se trouveraient pendant la majeure partie de leur temps dans des conditions suboptimales. Ainsi, l'avantage éventuel d'une espèce donnée est éphémère, ce qui ne lui permet pas d'éliminer les autres espèces avant que les conditions de ressource ne changent. Ce phénomène entraîne une lente dérive saisonnière de l'écosystème pélagique connue sous le terme de « succession d'espèces ».

Une seconde explication considérée par Hutchinson fait intervenir la notion d'hétérogénéité spatiale du milieu pélagique (Hutchinson ,1961). Dans un milieu hétérogène, les concentrations en nutriments sont variables dans l'espace, y compris à l'échelle microscopique, et une espèce dominante localement sera moins compétitive à peu de distance. D'autres travaux ont montré qu'en considérant la compétition pour au moins trois ressources, des comportements

complexes, voir chaotiques se mettent en place, ce qui permet à un très grand nombre d'espèces de coexister (Huisman & Weissing, 1999).

### II. Efflorescences phytoplanctoniques et HABs

Dans l'environnement aquatique, lorsque les conditions sont favorables (température de l'eau, eutrophisation du milieu, stratification de la masse d'eau), on assiste parfois à une prolifération du phytoplancton appelée « efflorescence algale » (ou en anglais « algal bloom ») (Richardson, 1997). Il se produit alors une augmentation rapide de la population des microalgues, jusqu'à atteindre plusieurs millions de cellules par millilitre, et se traduisant généralement par une coloration de l'eau dépendante de la pigmentation des espèces présentes (Hallegraeff, 2003). Ces efflorescences sont souvent dominées par un seul taxon de microalgues, même si une étude récente a montré l'importance de la dynamique de succession des espèces de microalgues durant une même efflorescence, chacune étant dominante sur un court laps de temps (Needham & Fuhrman, 2016). Parmi les espèces capables de former des efflorescences, environ la moitié sont des dinoflagellés, les autres sont des diatomées, ainsi que des haptophytes (Anderson, 1994).

Dans le cas des dinoflagellés, l'eau devient brunâtre/rouge, formant ce qui est communément appelé des « marées rouges » (en anglais, « red tides ») (Anderson, 1994). Le phénomène des marées rouges existe depuis l'Antiquité. On retrouverait sa trace dans la Bible dans le septième chapitre de l'exode qui mentionne la marée rouge lorsque le Nil se transforme en « rivière de sang », avec la mort de plusieurs espèces de poissons. On trouve également des références à la marée rouge dans l'Iliade d'Homère, les œuvres de Tacite et dans les journaux de bord des capitaines et des navigateurs remontant au XVIe siècle.

Certaines espèces formant des efflorescences phytoplanctoniques, surtout celles formant les marées rouges, produisent des métabolites secondaires appelés phycotoxines (Quilliam, 1999) qui peuvent s'accumuler dans les mollusques et bivalves principalement, mais également dans les gastéropodes, les crustacés, ainsi que certains poissons. Ces organismes jouent le rôle de vecteurs sains : ils ne sont pas affectés par ces phycotoxines, mais sont toxiques pour les consommateurs secondaires dont l'Homme, causant un réel problème de santé publique

(Anderson, 1989). De même, ces proliférations massives de microalgues peuvent entrainer une diminution du dioxygène dissous dans l'eau au moment de leur décomposition, provoquant l'anoxie et la diminution de la biodiversité dans la zone de l'efflorescence. On parle alors dans les deux cas d'efflorescence algale nuisible (en anglais « Harmful Algal Bloom », HAB). Les différents types d'intoxications associées à des efflorescences algales toxiques sont les

suivants :

- Intoxications amnésiantes par les fruits de mer (en anglais, Amnesic Shellfish Poisoning). Les phycotoxines amnésiantes ont été identifiées en 1987 (Bates et al., 1989). Les symptômes sont de types gastro-intestinaux et neurologiques (avec des pertes de mémoire), ces toxines pouvant entraîner la mort (Teitelbaum et al., 1990). La toxine responsable de ces intoxications est une neurotoxine, l'acide domoïque (Wright et al., 1989) et est libérée principalement par certaines diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*.
- Intoxications paralysantes par les fruits de mer (en anglais, Paralytic Shellfish Poisoning, PSP). Ces intoxications entraînent une paralysie musculaire et peuvent être mortelles lorsque le système respiratoire est atteint. Elles sont provoquées par la saxitoxine (SXT) et ses dérivés (dont la néosaxitoxine et les gonyautoxines), qui sont des phycotoxines produites par les dinoflagellés du genre *Alexandrium* (Amzil & Motteau, 2000 ; Lilly et al., 2005).
- Intoxications neurologiques par les fruits de mer (en anglais, Neurotoxic Shellfish Poisoning). Les intoxications neurologiques sont principalement associées au dinoflagellé, *Karenia brevis* (*K. brevis*). Elles sont caractérisées par des symptômes neurologiques, provoquées par un groupe de toxines, les brevétoxines (Poli et al., 2000). Ces toxines sont également responsables de la mortalité de mammifères marins (Anderson & White, 1992).
- Intoxications diarrhéiques par les fruits de mer (en anglais Diarrhetic Shellfish Poisoning). Les intoxications diarrhéiques provoquent des symptômes gastrointestinaux (douleurs abdominales, diarrhées, nausées et vomissements). Les toxines responsables sont l'acide okadaïque et ses dérivés dinophysistoxines, (DTXs), produits

principalement par des dinoflagellés appartenant aux genres *Dinophysis* et *Prorocentrum* (Lassus et al., 1988, Amzil, 1993, Ben-Gharbia et al., 2016).

• Intoxications de type "ciguatériques" (en anglais, Ciguatera Fish Poisoning). Ces toxines sont produites par certaines espèces de dinoflagellés benthiques, comme *Gambierdiscus toxicus*, qui est à l'origine de ces intoxications connues depuis longtemps dans les zones tropicales. Les toxines responsables de ces intoxications sont la maïtotoxine et les ciguatoxines, qui sont en général transmises à l'homme via la consommation de poisson (Coleman, 1990 ; Lewis & Sellin, 1992 ; Naar et al., 2007 ; Dickey, 2008 ; Wardiatno, et al., 2013).

Ces phénomènes de HAB ont un impact important sur la santé humaine ainsi que sur l'écosystème des milieux aquatiques, et ils participent à la dynamique des populations phytoplanctoniques et à la répartition des espèces dans l'environnement marin, comme nous allons le voir dans la section suivante.

## III. Distribution et dynamique des communautés phytoplanctoniques

Les organismes phytoplanctoniques vivant dans les conditions toujours changeantes de l'environnement aquatique sont d'une grande plasticité écologique. Ils constituent la base des réseaux trophiques et leur composition ainsi que leur abondance affectent le fonctionnement de l'écosystème et des cycles biogéochimiques (Falkowski, 1994). Encore aujourd'hui nous avons du mal à comprendre la structure et la dynamique des communautés phytoplanctoniques (Glibert, 2016), mais il semblerait que la fluctuation de certaines propriétés physiques de l'environnement aquatique joue un rôle majeur. La turbulence dans la colonne d'eau, dû au vent, aux phénomènes de marées ou à d'autres forces, a un rôle important dans la redistribution des nutriments et dans la sélection des espèces dominantes. La turbulence de l'eau peut transporter les organismes dans la colonne d'eau, modifier les taux de croissance, entrainer la formation d'agrégats (afin de faciliter dans des conditions de grandes turbulence la cohésion de la colonie), influencer le taux de rencontre entre les gamètes et la rencontre entre les prédateurs

et leurs proies (Glibert, 2016). Le taux de croissance de certains dinoflagellés diminue par exemple en conditions de forte turbulence (Berdalet & Estrada, 1993).

Un modèle empirique (basé sur des observations effectuées sur le terrain) visant à expliquer la distribution des communautés phytoplanctoniques dans l'environnement a été développé par Ramon Margalef en 1978 dans son fameux Mandala (Margalef, 1978). Un Mandala est une carte ou un modèle de perception cosmologique, où le cosmos dans ce cas comprend le phytoplancton et son environnement le phycocosme (Margalef, 1978). Le Mandala fournit une carte d'itinéraire à travers les variations de la composition du phytoplancton (forme de vie) dans un espace écologique défini, ainsi que les causes de ces variations. Il n'y a que deux variables formelles (la turbulence et la concentration en nutriments). Plusieurs caractéristiques de l'environnement ne sont pas prises en compte, comme la lumière, la température, la structure de la colonne d'eau ou encore les interactions interspécifiques. En général, la concentration en nutriments et l'intensité de la turbulence sont ici des variables dépendantes l'une de l'autre. Dans des conditions de faible turbulence, une stratification de la colonne d'eau entrainera une faible concentration en nutriments, alors que le mélange de la colonne d'eau par une forte turbulence, fera remonter les nutriments dans la zone euphotique. Cette représentation illustre la domination des diatomées dans les zones turbulentes et riches en nutriments, alors que les dinoflagellés sont majoritairement retrouvés dans les eaux calmes et pauvres en nutriments (Figure 28).



Figure 28 : Représentation simplifiée du mandala de Margalef. Distribution des espèces phytoplanctoniques en fonction de deux variables formelles, la turbulence et la concentration en nutriments. Deux voies de succession écologiques possibles sont représentées : une voie de succession allant de diatomées à dinoflagellés (trait noir) par épuisement des nutriments et dissipation de la turbulence, et une autre voie (flèche rouge) correspondant à l'apparition d'efflorescences d'algues nuisibles (souvent les marées rouges de dinoflagellés) lors d'un apport de nutriments dans une zone de faible turbulence. D'après (Margalef, 1978).

Du point de vue dynamique, à mesure que les nutriments s'épuisent et que la turbulence se dissipe, des changements dans la composition des espèces se produisent (trait noir dans la Figure 28), conduisant à la succession de communautés phytoplanctoniques, de diatomées à coccolithophores puis à dinoflagellés. Cependant, une autre voie de succession est possible (flèche rouge dans la Figure 28) lors d'un apport de nutriments dans une colonne d'eau stratifiée, caractérisée par peu de turbulence. Dans ces conditions, certaines espèces, en particulier parmi les dinoflagellés, sont capables de proliférer, entrainant l'apparition des marées rouges évoquées précédemment. Ces efflorescences algales nuisibles sont pour la

plupart des efflorescences monospécifiques. Ces deux principales voies de succession font partie d'un réseau complexe d'évolutions des communautés phytoplanctoniques en fonction de la turbulence et de la concentration en nutriments.

#### IV. HABs et allélopathie

Les efflorescences phytoplanctoniques toxiques (HAB) ont toujours existé et sont décrites comme un phénomène saisonnier, mais la fréquence de leur apparition, la durée et l'ampleur de ces efflorescences a fortement augmenté pendant le siècle dernier (Anderson et al., 2012 ; Padmakumar et al., 2012 ; Glibert et al., 2018 ; Xu et al., 2019). Par exemple, l'augmentation de la fréquence d'occurrence d'HAB dans la Zone Economique Exclusive en Inde (Figure 29), est passée d'une tous les dix ans au début du siècle dernier à plus de soixante entre 1995 et 2005 (Padmakumar et al., 2012). Dans les eaux côtières du Nord du Golfe de Beibu (Chine), la fréquence d'apparition des HAB est passée de six efflorescences décrites pendant la période 1985-2000, à vingt durant 2011-2017, et l'ampleur de ces efflorescences est passée d'une dizaine de km<sup>2</sup> à des centaines de km<sup>2</sup> (Xu et al., 2019).



Figure 29 : Fréquence d'occurrence d'HAB pendant le siècle dernier en Zone Economique Exclusive en Inde. D'après Padmakumar et al, 2012.

L'augmentation de la fréquence d'apparition des HABs pourrait être la conséquence du transport des différentes espèces phytoplanctoniques envahissantes - potentiellement nocives pour l'homme et capables de survivre sous forme de cystes pendant une longue période - par le déversement des eaux de ballast (Bolch & Salas, 2007) ou le transfert de stock de coquillages pour l'aquaculture (Anderson et al., 2012). De plus, l'augmentation des microplastiques dans les océans représente une nouvelle niche écologique potentielle (la « plastisphère ») et un nouveau vecteur de dispersion de ces espèces (Zettler et al., 2013 ; Amaral-Zettler et al., 2020). Ce phénomène de dispersion des espèces toxiques est particulièrement visible en mer Méditerranée. Par exemple, le dinoflagellé *Alexandrium catanella (A. catanella)* a été signalé pour la première fois dans les îles Baléares et en Catalogne en 1983 (Margalef et Estrada, 1987), puis semble depuis s'être répandu rapidement dans la région de la mer méditerranée occidentale le long des côtes françaises, espagnoles, italiennes, grecques et maghrébines (Abadie et al., 1999 ; Vila et al., 2001 ; Lugliè et al., 2003 ; Frehi et al., 2007 ; Turki et al., 2007).

L'augmentation de l'activité humaine au niveau des zones côtières (activité agricole, touristique ou industrielle) augmente significativement l'apport en engrais, en déchets industriels comme les métaux lourds ou en eaux urbaines non traitées et favorise ainsi l'eutrophisation de ces zones (Dorgham, 2014; Smith et al., 1999). L'apport excessif de nutriments dans les zones côtières joue un rôle important dans l'apparition des HAB (Anderson et al., 2012; Glibert et al., 2018). Enfin, l'augmentation des températures dans le monde à cause du réchauffement climatique participerait également à l'intensification de ces phénomènes néfastes (Paerl & Scott, 2010).

La nature souvent monospécifique des marées rouges est a priori en contradiction avec le « paradoxe du planton » évoqué plus haut. Les efflorescences monospécifiques seraient « le cas nul du paradoxe de Hutchinson » : toute masse d'eau qui répond à des critères relativement constants et à un faible taux de mélange tendrait vers une prolifération en monoculture (Slobodkin 1989). Une autre explication a été proposée qui prend en compte les interactions interspécifiques. En effet, certaines espèces (souvent les espèces responsables d'efflorescence nuisibles) sont capables de libérer des métabolites secondaires affectant directement la physiologie des espèces phytoplanctoniques avec lesquelles elles sont en compétition pour les nutriments et ainsi leur permettraient de proliférer librement. Cette stratégie de compétition s'appelle l'allélopathie (voir section V) et les agents médiateurs de ces interactions, des composés allélochimiques. A ce jour, le rôle de l'allélopathie dans la dynamique des populations phytoplanctoniques est encore mal estimé (Granéli et al., 2008), mais elle pourrait expliquer l'apparition et le maintien de certaines efflorescences monospécifiques comme les marées rouges illustrées dans le Mandala de Margalef.

Il est important de revenir sur une source de confusion entre toxicité (qui affecte l'Homme) et allélopathie, ou entre phycotoxines (métabolites cellulaires affectant l'Homme) et composés allélopathiques. Cette confusion vient du fait que certaines phycotoxines peuvent aussi présenter une activité allélopathique et que les espèces à activité allélopathique produisent souvent en parallèle également des phycotoxines. Au cours de cette thèse, je me suis intéressée aux interactions allélopathiques entre plusieurs dinoflagellés responsables de marées rouges (*Amphidinium carterae*, *Alexandrium cf minutum* (*A. minutum*) et dans une moindre mesure

*Ostreopsis cf ovata (O. ovata)* et *Karlodinium cf veneficum (K. veneficum)* et des diatomées. Le prochain chapitre traite des interactions allélopathiques entre microalgues, un domaine encore mal connu pour ce qui est du milieu marin.

## V. Les interactions allélopathiques

#### 1. Histoire et Définition de l'allélopathie

L'allélopathie est un processus connu de longue date, qui a surtout été étudié chez les plantes. Des interactions entre plantes étaient déjà observées dans l'Antiquité (Willis, 2007) : dès le premier siècle avant J.C., Pline l'Ancien signalait dans son "Histoire Naturelle" l'absence systématique de végétation sous le couvert des noyers. L'auteur de cette vaste compilation scientifique avait prêté au noyer une influence inhibitrice sur les plantes environnantes. Olivier de Serres, dans son "Théâtre d'agriculture et de ménage des champs" déconseille fortement de planter quoi que ce soit à l'ombre des noyers. Tous les agronomes reprendront plus tard ces recommandations, surtout à propos de la pomme de terre, particulièrement sensible (Willis, 2007). La définition et les limites du concept d'allélopathie sont relativement floues et ont évolué à travers 3 périodes clé :

• La définition de l'allélopathie et le terme lui-même remontent aux travaux de Molisch consacrés aux interactions chimiques entre plantes (Molisch, 2001). Molisch y démontre l'effet négatif de l'éthylène libéré par les pommes sur la croissance de différents végétaux et propose d'utiliser le terme "allélopathie" pour décrire les interactions négatives ou positives entre plantes, s'exerçant par le biais de composés biochimiques. Le mot provient de la racine grecque allelon signifiant "mutuelle" ou "entre eux", et pathos, signifiant "souffrance" ou "sentiment", et désigne simplement l'effet d'une plante sur une autre, dans la définition première de Molisch. A l'origine, Molisch aurait préféré le terme « allopathie », incorporant allo, signifiant « autre », mais ce mot était déjà utilisé en médecine, et donc allélopathie est devenu son deuxième choix. Il n'est en effet pas idéal ; le mot « allélopathie » cause de nombreuses confusions, les interactions étant rarement réciproques, comme suggéré par le terme allelon, et ne sont pas nécessairement nuisibles, comme le suggère le mot pathos. Bien que Molisch soit souvent considéré comme le fondateur de la science de l'allélopathie, cette idée est erronée car la majeure partie du texte de Molisch est en réalité centré sur les effets de l'éthylène, maintenant davantage considéré comme une hormone végétale. D'après Molisch, toutes les substances inhibant à une concentration donnée une fonction physiologique d'une plante seront probablement stimulantes à une concentration moindre, et le terme allélopathie couvrait donc pour lui à la fois les interactions inhibitrices et stimulantes, médiées par des substances chimiques entre les plantes. Cette dualité, parfois appelée hormesis (Duke et al., 2006), a été reconnu au XVIe siècle par Paracelse : "*Tout est poison et rien n'est sans poison ; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison.*" La grande majorité des études allélopathiques s'est concentrée sur les aspects inhibiteurs ; cependant les effets stimulants sont probablement aussi courants mais négligés car de nature plus subtile. Par conséquent, l'allélopathie est généralement considérée comme un phénomène nuisible, et une grande partie des dictionnaires et des textes botaniques ont défini l'allélopathie comme « guerre chimique entre plantes ».

L'allélopathie a ensuite été étendue aux microorganismes par Rice, le doyen de l'allélopathie américaine, qui l'a définit comme [tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante (microorganismes inclus) sur une autre par la production de composés chimiques libérés dans l'environnement] (en anglais: « any direct or indirect harmful or beneficial effect by one plant (including microorganisms) on another through the release of chemicals that escape into the environment », Rice, 1984). Depuis 1996, la Société Internationale de l'allélopathie donne la définition suivante : [l'allélopathie fait référence à l'impact des plantes sur les plantes voisines et/ou la microflore et/ou le macrofaune associées par la production de composés allélochimiques ; ces substances allélochimiques interfèrent généralement avec la croissance des plantes, mais elles peuvent également entraîner une stimulation de la croissance. Le domaine de l'allélopathie concerne la recherche sur les composés allélochimiques régulant ces interactions, ainsi que sur les organismes (y compris les microbes et les plantes) produisant ces composés chimiques, ou ceux directement ou indirectement concernés par ces associations] (en anglais : "Allelopathy refers to the impact of plants upon neighboring plants and/or their associated microflora and/or macrofauna by the production of allelochemicals; often these allelochemicals typically interfere with plant growth but they may also result in stimulation of growth. The field of allelopathy addresses research on the allelochemicals regulating these interactions, as well as the organisms (including microbes and plants) producing these chemicals, or those directly or indirectly impacted by these associations.").

Le domaine de l'allélopathie s'est élargi au fil des années aux écosystèmes terrestres • (naturels et agricoles) et aquatiques (marins et d'eau douce). Il est difficile de définir les limites de son application sur les organismes aquatiques puisque les microorganismes aquatiques peuvent être phototrophes, hétérotrophes ou les deux (mixotrophes). Par conséquent, si l'allélopathie en milieu aquatique est définie par certains comme des interactions entre espèces photosynthétiques (Chan et al., 1980; Gross et al., 2012; Legrand et al., 2003), d'autres chercheurs élargissent les interactions aux espèces phytoplanctoniques et à tout organisme en compétition avec le phytoplancton pour les nutriments, comme les bactéries (Fistarol et al., 2004 ; Granéli et al., 2006 ; Poulin et al., 2018). Ajoutant à la confusion, certains auteurs incluent des effets positifs et négatifs (Cembella, 2003; Eick, 2017; Møgelhøj et al., 2006) tandis que d'autres n'incluent que les effets négatifs dans leur définition (Granéli et al., 2006 ; Legrand et al., 2003 ; Prince et al., 2008 ; Ternon et al., 2018). De plus, le terme « interactions allélochimiques » (Gross et al., 2012; Tillmann et al., 2008) est parfois préféré à celui d'« interactions allélopathiques » (Kubanek et al., 2005 ; Legrand et al., 2003 ; Poulin et al., 2018 ; Roy, 2009; Schmidt & Hansen, 2001; Ternon et al., 2018; Vardi et al., 2002).

Dans ce projet et dans le cadre du phytoplancton, nous définissons les interactions allélopathiques comme des <u>interactions chimiques inhibitrices entre et parmi les espèces</u> <u>phytoplanctoniques et les bactéries, médiées par la libération de substances chimiques</u> (composés allélochimiques) dans leur environnement.

#### 2. Allélopathie chez les microalgues : approches méthodologiques

Plusieurs approches existent afin de montrer une interaction allélopathique entre deux microalgues ; l'une d'entre elles consiste à évaluer l'activité d'extraits cellulaires ou de

métabolites secondaires isolées chez une microalgue sur la croissance d'une autre (Ribalet et al., 2007). Une autre approche classique est la méthode dite de culture croisée dans laquelle une microalgue est cultivée dans le milieu réenrichi d'une autre microalgue, c'est-à-dire un milieu préconditionné par une autre espèce (Sugg et al., 1999). Les effets des substances excrétées initialement dans le milieu par la première espèce sont ensuite observés sur la croissance de la deuxième.

Toutefois, l'approche la plus utilisée consiste simplement à tester le filtrat provenant de la culture d'une espèce, sur la physiologie d'une autre (Flores & Wolk, 1986 ; Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018a). La physiologie de la microalgue cible est alors étudiée à travers son taux de croissance, son activité photosynthétique, le plus souvent grâce à la fluorescence du PSII (Gleason & Paulson, 1984 ; Hagmann & Jüttner, 1996 ; Bagchi et al., 1993 ; Srivastava et al., 1998 ; Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018a), ou en mesurant sa respiration (Lelong et al., 2011). Cependant, plusieurs biais méthodologiques existent dans ces approches : i) le choix du filtre est important, car certains composés allélochimiques restent collés sur les filtres utilisés, « cachant » une interaction allélopathique. ii) certains composés allélochimiques sont instables dans le temps, photodégradables (Graneli & Salmon, 2010), ou peuvent être dégradés par des bactéries. iii) certaines interactions allélopathiques nécessitent pour la libération des composés allélochimiques le contact de cellule à cellule (Uchida et al., 1995).

C'est pour ces raisons que plusieurs études mesurent la croissance de deux espèces directement dans une co-culture (Cermeño et al., 2011). Cependant, dans ce dernier cas, il est très difficile d'obtenir des informations sur la physiologie des deux microalgues directement dans le mélange. Enfin, toutes ces approches ne sont pas utilisables sur le terrain. Il est donc à ce jour très difficile de montrer l'existence d'interactions allélopathiques dans le milieu naturel.

#### 3. Nature des composés allélopathiques dans le milieu aquatique

En comparaison avec les systèmes terrestres, dans lesquels les composés allélochimiques peuvent être transportés via l'air (aérosols), dans d'autres composants aéroportés ou le long de substrats solides, les propriétés chimiques et physiques de l'environnement sont plus complexes. Dans les biofilms, certains composés allélochimiques exclusivement hydrophobes peuvent diffuser de cellule à cellule jusqu'à leur cible finale (Gross, 1999 ; Macías et al., 2008), mais la situation est différente quand la diffusion des métabolites secondaires est requise. En effet, l'eau possède une certaine polarité, viscosité, salinité et un certain pH, et les composés doivent combiner une hydrophilie et une hydrophobicité appropriées pour diffuser et atteindre le site actif visé. C'est pour cette raison que les composés amphiphiles sont les candidats idéaux pour être les médiateurs d'interactions allélopathiques dans le milieu aquatique (Gros et al., 1991). La production simultanée de composés hydrophiles et hydrophobes est une autre stratégie efficace (Gross, 2003). La diffusion des composés libérés par les microalgues dans le milieu aquatique étant une limite majeure, les composés allélochimiques seraient plus concentrés autour des microalgues dans leurs exsudats (Tillmann & John 2002 ; Ternon et al., 2018) ou dans ce qui est appelé la phycosphère. La phycosphère est la zone entourant les microalgues, distincte de l'eau de mer, riche en nutriments, où des interactions avec d'autres microorganismes peuvent avoir lieu (Bell & Mitchell, 1972). Enfin dans certain cas, les métabolites secondaires restent stockés dans les cellules et leur libération nécessiterait le contact cellulaire (Uchida, 2001).

Dans les systèmes aquatiques, les composés allélochimiques connus, sont généralement divisés en sept catégories selon leur nature chimique : 1) les acides gras saturés et insaturés ; 2) les composés phénoliques ; 3) les terpénoïdes ; 4) les oligopeptides ; 5) les polyéthers ; 6) les polysaccharides ; et 7) les composés divers (Macías et al., 2008). La plupart des composés allélochimiques isolés et caractérisés à ce jour sont ceux libérés par les cyanobactéries d'eau douce (Macías et al., 2008).

#### 4. Allélopathie au sein du phytoplancton d'eau douce

Les interactions allélopathiques entre les différentes espèces du phytoplancton ont surtout été étudiées chez les espèces d'eau douce (Leao et al., 2009), en particulier chez les cyanobactéries formant des HABs. Ces études se sont concentrées sur le rôle écologique des cyanotoxines, des phycotoxines libérées pendant les HABs (Backet et al., 2015) : anatoxine-a (Rzodkiewicz, 2017), cylindrospermopsine (Rzymski & Poniedziałek, 2014; Pinheiro et al., 2013) ou microcystine (Pflugmacher, 2002). La cylindrospermidine et la microcystine affectent

directement l'Homme (composés hépatotoxiques et neurotoxiques) via la consommation d'eau potable (Carmichael, 1992; Hunter, 1998; Pietsch et al., 2002) mais peuvent aussi avoir une activité allélopathique envers d'autres microalgues en inhibant leur croissance (Rzymski & Poniedziałek, 2014; Pinheiro et al., 2013; Pflugmacher, 2002). Les cyanobactéries d'eau douce sont en compétition avec d'autres cyanobactéries ou microalgues pour les nutriments, la lumière et l'espace. Certaines cyanobactéries ont développé des mécanismes de compétition comme la production de métabolites secondaires à activité allélopathique (Gross, 1999, Leao et al., 2009) et forment dans les milieux benthiques des tapis cyanobactériens, souvent monospécifiques (Fong et al., 1993). Le contact de cellule à cellule entre ces espèces concurrentes est très probable dans ces environnements benthiques, surtout au niveau des tapis cyanobactériens. Cela s'explique par le fait que certaines espèces pourraient coloniser la surface de ces tapis, facilitant ainsi le transfert direct des composés allélochimiques (Gross, 1999). De plus, les milieux d'eau douce comme les lacs sont des environnements fermés et plus restreints en taille, eutrophiques, avec une colonne d'eau stratifiée et présentent des phénomènes de remise en suspension saisonnières favorisant l'apparition de HABs monospécifiques (Cohen & Rosenberg, 1989). Les interactions allélopathiques pourraient permettre d'expliquer dans certain cas la dominance des espèces des HABs (Figueredo et al., 2007 ; Cohen & Rosenberg, 1989; Rengefors & Legrand, 2001), mais aussi la succession des communautés phytoplanctoniques dans certaines conditions (Gantar et al., 2008). Il y aurait ainsi environ 10 % des espèces de cyanobactéries présentant une activité allélopathique envers d'autres microalgues, procaryotes comme eucaryotes (Schlegel et al., 1998; Srivastava et al., 1999). Plusieurs genres de cyanobactéries produisent des composées allélochimiques ou potentiellement allélochimiques comme Anabaena, Calothrix, Gomphosphaeria, Aphanizomenon, Hapalosiphon, Fischerella, Microcystis, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Scytonema, Trichormus, Cylindrospermopsis et Leptolyngbya (Gross, 2003; Legrand et al., 2003). Les organismes cibles de ces composés allélochimiques incluent des cyanobactéries, des microalgues et des macroalgues (Flores & Wolk, 1986; Srivastava et al., 1999; Camacho, 2008).

Sur environ 800 métabolites secondaires bioactifs isolés chez les cyanobactéries, une petite portion seulement peut être classée comme composés allélochimiques (Leao et al., 2010). Ces composées allélochimiques incluent des peptides cycliques et non-cycliques, des polyéthers, des alcaloïdes, des phénols et des composés aromatiques chlorés (Leao et al., 2009). Ces composées allélochimiques inhibent la croissance des espèces cibles (Mason et al., 1982; Flores & Wolk, 1986; Todorova et al., 1995; Hirata et al., 1996; Todorova & Jüttner, 1996; Kaya et al., 2002 ; Volk & Furkert, 2006 ; Babica et al., 2007 ; Gantar et al., 2008 ; El-Sheekh et al., 2010). Si le mode d'action et la cible moléculaire induisant l'inhibition de la croissance des espèces cibles reste souvent inconnue, une proportion importante des composés allélochimiques isolés et caractérisés à ce jour semblent inhiber spécifiquement l'activité du Photosystème II (PSII) des espèces cibles (Gleason & Paulson 1984; Gleason et al., 1986; Hagmann & Jüttner, 1996; Gross Wolk & Jüttner, 1991; Bagchi et al., 1993; Srivastava et al., 1998; Singh et al., 2001; Hu et al., 2004, 2005, 2008; Blom et al., 2006). Par exemple, la cyanobactérie filamenteuse benthique Fischerela muscicola produit la fischerellin A (Figure 30), un alcaloïde à activité allélopathique puissante, qui inhibe directement l'activité du PSII et donc la photosynthèse et la croissance de l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii et de nombreuses autres microalgues (Srivastava et al., 1998). Une autre cyanobactérie benthique filamenteuse, Scytomena hofmanii, produit la cyanobacterine (Figure 30), un composé allélochimique inhibant l'activité du PSII de certaines cyanobactéries (Gleason and Paulson, 1984; Gleason et al., 1996) et eucaryotes (Gleason & Case, 1986).



Figure 30: Structure chimique de la fischerelline A et de la cyanobacterine. Composés allélochimique inhibant l'activité du PSII de plusieurs microalgues cible (Srivastava et al, 1998 ; Gleason et al., 1996 ; Gleason & Case, 1986).

La photosynthèse est le centre énergétique des cellules, que ce soit pour les cyanobactéries ou pour les microalgues eucaryotes. Elle constitue donc une cible idéale pour les composés bioactifs libérés par un organisme en compétition avec d'autres organismes phototrophes. Ainsi, la plupart des composés allélochimiques sont dirigés contre la photosynthèse et sont donc des herbicides naturels (biopesticides) (Dahms et al., 2006). La plupart des composés allélochimiques isolés et caractérisés à ce jour chez les cyanobactéries, ainsi que leurs modes d'action sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2 ; Tableau 3). Il est à noter que la forte proportion d'herbicides ciblant le PSII pourrait être due à un biais méthodologique. En effet, bien souvent seule la fluorescence du PSII, plus précisément le rendement quantique maximal (Fv/Fm) du PSII, des espèces cibles est mesurée pour des raisons historiques ou pratiques. Or, la baisse du Fv/Fm peut parfois être mal interprétée (voir section II.4).

| Cyanobactéries  | Espèces cibles                                       | Composé                                   | Mode d'action  | Réferences                    |
|---|--|---|--|-------------------------------|
| (espèces)   |  | allélochimique                            |  |                               |
| Microcystis sp.   | Chroococcus minutus                                  | Microcystin-RR                            | Inhibition<br>croissance en<br>lumière forte                             | Sedmak &<br>Kosi,1998         |
| M. aeruginosa<br>(Microcystis<br>aeruginosa)            | Anabaena BT1<br>Nostoc muscorum                      | Microcystin-LR                            | Inhibition du PSII et<br>de l'activité de la<br>nitrogenase              | Singh et al.,<br>2001         |
| M. aeruginosa   | Synechocystis PCC6803                                | Microcystin-RR                            | Stresse oxidant<br>(ROS)   | Li <i>et al.</i> , 2009       |
| M. aeruginosa   | M. aeruginosa PCC7806                                | Microcystin-RR                            | Inhib. de la<br>croissance à la<br>concentration de<br>MCs la plus forte | Babica <i>et al.,</i><br>2007 |
| M. aeruginosa   | Oscillatoria angustissima,<br>Anabaena PCC7120       | (Microcystin-LR?)                         | Inhib. de la croissance  | El-Sheekh et<br>al., 2010     |
| Scytonema hofmanni                                      | Synechococcus sp. / algues vertes                    | Cyanobacterine                            | Inhib. de la<br>croissance   | Mason et al.,<br>1982         |
|   | Synechococcus sp. ATCC 27146                         | Cyanobacterine                            | Inhib. du PSII   | Gleason &<br>Paulson 1984     |
|   | Anacystis nidulans R2                                | Cyanobacterine                            | Inhib. du PSII   | Gleason et al.,<br>1986       |
| Oscillatoria late-virens                                | Microcystis PCC7820                                  | Antibiotique                              | Inhib. du PSII   | Bagchi et al.,<br>1993        |
| Fischerella JAVA<br>94/20                               | Anabaena doliolum                                    | 12-epi-hapalindole<br>E<br>Isonitrile     | Non identifié  | Doan et al.,<br>2000          |
| Fischerella CENA 19                                     | Microcystis spp., Synechococcus<br>PCC7942           | fischerellin A, 12-<br>epi- hapalindole F | Non identifié  | Etchegaray et al., 2004       |
| F. muscicola UTEX<br>1829<br>(Fischerella<br>muscicola) | Anabaena PCC7120 et P-9,<br>Synechococcus<br>PCC6911 | Fischerellin A                            | Inhib. du PSII   | Hagmann &<br>Jüttner, 1996    |
| F. muscicola UTEX<br>1829                               | Cyanobactéries                                       | Fischerellin                              | Inhib. du PSII   | Gross Wolk &<br>Jüttner,1991  |
| F. muscicola UTEX<br>1829                               | Anabaena sp P9 /<br>Chlamydomonas reinhardtii        | Fischerellin A                            | Inhib. du PSII   | Srivastava et<br>al., 1998    |
| Hapalosiphon<br>intricatus                              | Anabaena sp.   | Hapalindole                               | Non identifié  | Srivastava,<br>1972           |
| Hapalosiphon<br>fontinalis                              | Cyanobactériens                                      | Hapalindole A                             | Non identifié  | Moore et<br>al.,1984          |

Tableau 2 : Tableau répertoriant les cyanobactéries ayant une activité allélopathique, les microalgues cibles de l'allélopathie, les composés allélochimiques identifiés et leurs modes d'action.

| Cyanobactéries                    | Espèces cibles   | Composé                    | Mode d'action                                   | Réferences  |
|-----------------------------------|--|----------------------------|---|---|
| (espèces)                         |  | allélochimique             |   |   |
| Anabaena constricta               | Arthrospira laxissima, Nostoc<br>carneum, Chroococcus minutus,<br>Synechocystis aquatilis<br>Synechococcus sp. | Bromoanaindolone           | Non identifié                                   | Volk et al.,<br>2009                                      |
| Anabaena spiroides                | Microcystis aeruginosa   | Spiroidesin                | Non identifié                                   | Kaya et al.,<br>2002                                      |
| Nodularia harveyana               | Plusieurs cyanobactéries   | Norhamalane                | Non identifié                                   | Volk, 2005;<br>Volk, 2006                                 |
| Nodularia harveyana               | N. carneun, N. insulare, Arthrospira<br>laxissima, Chroococcus minutus,<br>Synechocystis aquatilis             | Norharmane                 | Non identifié                                   | Volk & Furkert,<br>2006                                   |
| Nostoc sp.31                      | Cyanobactéries et microalgues  | Nostocyclamide             | Non identifié                                   | Todorova &<br>Jüttner, 1996 ;<br>Todorova et al.,<br>1995 |
|                                   | Anabaena sp.   | Nostocyclamide M           | Non identifié                                   | Jüttner et al.,<br>2001                                   |
| Nostoc 78-12A                     | <i>M. aeruginosa</i> PCC7806,<br><i>Synechococcus</i> PCC6911  | Nostocarboline             | Inhibition du PSII                              | Blom et al.,<br>2006                                      |
| Nostoc insulare                   | N. carneun, Arthrospira laxissima,<br>Chroococcus<br>minutus, Synechocystis aquatilis                          | 4,4'-<br>dihydroxybiphenyl | Non identifié                                   | Volk, 2005;<br>Volk & Furkert,<br>2006                    |
| Nostoc linckia CALU<br>892        | Cyanobacteriaes et microalgues   | Cyanobacterin LU-1         | Inhibition division cellulaire                  | Gromov et al.,<br>1992                                    |
| Nostoc spongiaeforme<br>TISTR8169 | Anabaena variabilis, A. cylindrica,<br>Nostoc commune  | Nostocine A                | Formation de ROS                                | Hirata et al.,<br>2003                                    |
|                                   | Calothrix169   | Nostocine A                | Non identifié                                   | Hirata et al.,<br>1996                                    |
| Microcystis sp.                   | Synechococcus elongates  | Microcystin-RR             | Inhibition du PSII                              | Hu et al., 2004,<br>2005                                  |
| <i>Microcystis</i> sp.            | Aphanizomenon sp.  | Microcystin-RR             | Inhibition du PSII,<br>dommages<br>membranaires | Hu et al., 2008   |

Tableau 3 : Suite du tableau répertoriant les cyanobactéries ayant une activité allélopathique, les microalgues cibles de l'allélopathie, les composés allélochimiques identifiés et leurs modes d'action.

#### 5. Allélopathie au sein du phytoplancton marin

En comparaison avec le phytoplancton d'eau douce, peu de choses sont connues sur les interactions allélopathiques entre espèces phytoplanctoniques dans le milieu marin, qui sont le sujet de cette thèse. La plupart des espèces présentant une activité allélopathique sont retrouvées parmi les dinoflagellés, les haptophytes et les diatomées. Mais très peu de composés allélochimiques ont été caractérisés et isolés, et leurs modes d'action ainsi que leurs cibles moléculaires restent inconnus.

#### Composés allélochimiques impliqués dans les interactions phytoplanctonique marines

Les espèces marines à activité allélopathique sont souvent des espèces produisant une grande variété de métabolites secondaires, dont certains catégorisés également comme phycotoxines (métabolites secondaires affectant indirectement l'homme). C'est pour cette raison que les études cherchant à caractériser la nature des composés allélochimiques se sont d'abord tournées vers les phycotoxines connues, afin d'essayer de définir leur rôle écologique. Toutefois, il semblerait que dans la plupart des cas, les phycotoxines ne présentent pas d'activité allélopathique sur le phytoplancton. C'est le cas pour les phycotoxines présentées dans la section « Efflorescences phytoplanctoniques et HABs ». En particulier, même si Pseudonitzschia présente une forte activité allélopathique (Lundholm et al., 2005), celle-ci n'est pas médiée par les phycotoxines amnésiantes qu'elle produit, comme l'acide domoïque (Lundholm et al., 2005). De même, les neurotoxines, brevétoxines, isolées à partir du dinoflagellé K. brevis, ne sont pas responsables de l'activité allélopathique de ce dinoflagellé sur la diatomée Skeletonema costatum (Kubanek et al., 2005; Prince et al., 2010). Enfin, l'activité allélopathique des dinoflagellés du genre Alexandrium dépend de molécules inconnues libérées dans le milieu extracellulaire, et non de la production de phytotoxines paralysantes comme la SXT concentrées dans les cellules (Long et al., 2018a ; Tillmann & John, 2002 ; Emura et al., 2004). Au final, seuls deux métabolites secondaires catégorisés en tant que phycotoxines (l'acide okadaïque et la dinophysistoxine-1) ont montré également une activité allélopathique (Figure 31), en inhibant efficacement la croissance de plusieurs espèces phytoplanctoniques (Windust et al., 1996; Windust et al., 1997).



Acide okadaïque

Dinophysistoxine-1

Figure 31: Deux phycotoxines connues présentant une activité allélopathique : l'acide okadaïque et la dinophysistoxine 1.

En général, ce sont d'autres métabolites secondaires, encore inconnus et présentant la plupart du temps des activités hémolytiques et ichtyotoxiques, qui semblent médier les interactions allélopathiques entre les espèces phytoplanctoniques marines (Granéli et al., 2008). Au-delà de l'acide okadaïque et de la dinophysistoxine-1, les rares métabolites secondaires allélopathiques produits par le phytoplancton à avoir été isolés et caractérisés sont (Figure 32) :

- les karlotoxines, des polyéthers linéaires à activité hémolytique et ichtyotoxique, qui ont été isolées chez le dinoflagellé *K. veneficum*, et qui inhibent la croissance de plusieurs espèces phytoplanctoniques, y compris celle des raphidophytes *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica* et *Chattonella subsalsa* (Adolf et al., 2006).
- les amphidinols qui sont des polyéthers linéaires à activité hémolytique et ichtyotoxique, isolés chez les dinoflagellés *Amphidinium carterae* (Houdai et al., 2001) et *Amphidinium klebsii* (Paul et al., 1997) qui peut inhiber la croissance de la diatomée *Nitzschia sp.* (Paul et al., 1995a ; 1995b ; 1996).

- les aldéhydes polyinsaturés (PUAs, appelés collectivement oxylipines), produits par plusieurs diatomées marines par oxydation des acides gras. Ces PUAs se sont révélés toxiques pour une grande variété d'organismes modèles, allant des bactéries aux invertébrés (Xu et al., 2015). Les PUAs auraient aussi une forte activité allélopathique, inhibant la croissance de certaines microalgues comme le prymnesiophyte *Isochrysis galbana* (Ribalet et al., 2007).
- les prymnésines 1 et 2, polyoxy-polyenepolyéther libérés par l'haptophyte *Prymnesium parvum (P. parvum)* (Igarashi et al., 1998), qui sont des composés à forte activité hémolytique et ichtyotoxique. Cependant, si leur implication dans la puissante activité allélopathique (inhibition de la croissance de plusieurs espèces phytoplanctonique) de *P. parvum* a été proposée, elle reste à démontrer.



Figure 32 : Composés allélochimiques isolés chez les espèces phytoplanctoniques marines.

#### Mode d'action des composés allélochimiques du milieu marin

Même quand les molécules impliquées dans les phénomènes d'allélopathie sont isolées et caractérisées, le mode d'action de ces composés sur les microalgues cibles est encore mal compris. Parmi les effets des filtrats des espèces allélopathiques sur les espèces cibles, on peut lister l'inhibition de la croissance (Uchida et al., 1995 ; Tillmann & Hansen, 2009 ; Yin et al., 2010 ; Weissbach et al., 2010 ; Lyczkowski, & Karp-Boss, 2014 ; Zheng et al., 2016 ; et al., 2008 ; Ternon et al., 2018 ; Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018a), l'inhibition de la photosynthèse (Ternon et al., 2018 ; Long et al., 2018a ; Lelong et al., 2011 ; Prince et al., 2008), le blanchiment des cellules (Lelong et al., 2011, Lyczkowski, & Karp-Boss, 2014, Fistarol et al., 2004), l'inhibition de la motilité (Lim et al., 2014 ; Fernandez-Herrera et al., 2016 ; Uchida et al., 1995), l'enkystement (Fistarol et al., 2004) et la lyse cellulaire (Tillmann et al., 2007 ; 2008 ; Ma et al., 2011 ; Fistarol et al., 2004 ; Tillmann & John 2002 ; Weissbach et al., 2010 ; Hansen, 1989). Mais la plupart de ces effets sont probablement des conséquences indirectes de ces composés allélochimiques et la cible initiale de ces composés n'est pas encore définie.

Cela dit, les différentes espèces à activité allélopathique semblent affecter préférentiellement la photosynthèse ainsi que la membrane plasmique des espèces cible, et c'est à ces niveaux-là que réside probablement la cible première des composés allélochimiques. Les deux prochaines sections traitent des effets allélopathiques ciblant l'activité photosynthétique et les membranes plasmiques.

## Activité allélopathique affectant la photosynthèse

En général, les composés allélochimiques responsables de l'activité allélopathique et leurs cibles sur l'appareil photosynthétique ne sont pas encore identifiés. Dans la plupart des études concluant à une interaction allélopathique ciblant la photosynthèse, l'évaluation de l'activité photosynthétique d'une microalgue est bien souvent limitée à la seule mesure du rendement quantique maximal du PSII, le Fv/Fm. C'est une habitude surprenante, qui peut éventuellement conduire à de mauvaises interprétations. En effet, une baisse du Fv/Fm peut être due à une inhibition directe du PSII ou à l'inhibition d'une autre étape photosynthétique, qui entraine

indirectement la photoinhibition des PSII. Il est donc difficile, à travers la seule mesure du Fv/Fm, de conclure sur la cible exacte d'un composé allélochimique sur l'appareil photosynthétique de l'espèce cible. En gardant ce bémol en tête, quelques interactions de ce type ont été décrites dans la littérature :

- Le filtrat de plusieurs souches du dinoflagellé *Alexandrium minutum (A. minutum)* affecte le Fv/Fm de la diatomée *Chaetoceros muelleri (C. muelleri)*, à la suite d'une incubation de plusieurs dizaines de minutes, le degré et la cinétique d'inhibition variant d'une souche à l'autre (Long et al., 2018a ; Lelong et al., 2011). La lenteur relative de cette cinétique d'inhibition par rapport à celle des herbicides connus (comme le DCMU, un inhibiteur spécifique du PSII) suggère un effet indirect du composé allélochimique sur le PSII. C'est ce qui nous a conduit à approfondir l'étude de l'interaction allélopathique entre *A. minutum* et la photosynthèse de *C. muelleri* (Chapitre II de cette Thèse).
- L'exométabolome du dinoflagellé Ostreopsis ovata contient aussi des composés allélochimiques (encore inconnus) capables d'inhiber fortement le Fv/Fm chez la diatomée Licmophora paradoxa après 24h d'incubation (Ternon et al., 2018). Ces composés, qui ne semblent pas diffuser librement dans le milieu mais être concentrés dans un mucus libéré par le dinoflagellé, pourraient être des ovatoxines (Ternon et al., 2018). Nous avons collaboré aux travaux d'Eva Ternon en démontrant une inhibition de l'activité photosynthétique par les ovatoxines en aval du PSII. Cette partie de ma thèse ne fait pas l'objet d'un chapitre dédié, mais l'article soumis est en annexe de cette thèse.
- Un autre dinoflagellé responsable de marées rouges, *K. brevis*, produit la brevétoxine, une neurotoxine responsable des intoxications neurologiques par fruit de mer chez l'Homme (Richardson, 1997). Elle est également étudiée pour son activité allélopathique : elle inhibe la croissance et la photosynthèse de plusieurs microalgues (Prince *et al.*, 2008), via un métabolite secondaire encore inconnu (Kubanek et al., 2005). Ici aussi, les extraits cellulaires de *K. brevis* provenant soit de cultures en laboratoire, soit échantillonnés en mer lors d'une efflorescence affectent le Fv/Fm de

plusieurs microalgues, en particulier la diatomée *Skeletonema costatum* (Prince et al., 2008).

L'effet allélopathique de K. brevis sur la photosynthèse d'une autre diatomée, Thalassiosira pseudonana (T. pseudonana) (Poulson-Ellestad et al., 2014; Poulin et al., 2017) a bénéficié d'autres méthodes d'investigation, y compris la métabolomique, la lipidomique et la protéomique. En utilisant des systèmes à deux chambres séparées par une membrane de dialyse, les auteurs ont cultivé T. pseudonana et étudié l'effet de son exposition à K. brevis (Poulson-Ellestad et al., 2014). Par protéomique, une diminution de l'abondance de 12 protéines photosynthétiques, y compris des sous-unités du PSII et du PSI, a été mesurée (Poulson-Ellestad al., 2014). L'abondance de certains lipides associés et aux thylacoïdes, les monogalactosyldiacylgklycerides et les digalactocylglycerides, qui constituent ainsi plus de 80% des lipides totaux du chloroplaste chez la plante Arabidopsis thaliana (Devaiah et al., 2016) diminue en présence de K. brevis (Poulin et al., 2017). Cette diminution, ainsi que les sulfoquinovosyldiacylglycerides, pourraient entraîner une déstabilisation des thylacoïdes à l'origine de l'inhibition de la photosynthèse.

En plus des dinoflagellés déjà cités, plusieurs espèces de diatomées produisent des aldéhydes polyinsaturés (PUA) responsables de plusieurs interactions allélochimiques dans le plancton : i) la défense chimique, en réduisant le succès de reproduction de certains brouteurs (Taylor et al., 2007), ii) les interactions allélopathiques en interférant avec la croissance du phytoplancton concurrent (Ribalet et al., 2007), ainsi que iii) la signalisation de cellule à cellule (Leflaive et al., 2009). Dans une étude récente, une sonde moléculaire dérivée de PUA, basée sur le 2,4-décadiénal connu pour son activité allélopathique, a été utilisée pour déterminer les cibles des PUAs et leurs modes d'action sur la diatomée modèle *Phaeodactylum tricornutum*. L'analyse des protéines marquées a permis d'identifier le complexe CF1 de l'ATP synthase chloroplastique et les enzymes du cycle de CBB comme cibles principales des PUAs (Wolfram et al., 2015).

#### Activité allélopathique affectant les membranes plasmiques

Les dinoflagellés *Alexandrium tamarense* (Ma et al., 2011), *Gymnodinium mikimotoi* (Uchida et al., 1995), *Peridinium Bipes* (Wu et al., 1998), *K. veneficum* (Deeds & Place, 2006) et *K. brevis* (Prince et al., 2008; Poulson-Ellestad et al., 2014; Poulin et al., 2017), ainsi que les haptophytes *P. parvum* (Ulitzur, 1973) et *Chrysochromulina polylepis* (Yasumoto et al., 1990) libèrent des composés allélochimiques, souvent lytiques, qui semblent endommager les membranes cytoplasmiques des espèces cibles. En général, ces composés allélochimiques perméabilisent et dépolarisent les membranes cytoplasmiques des espèces cibles. En général, ces composés allélochimiques perméabilisent et dépolarisent les membranes cytoplasmiques des espèces cibles et habituellement initié par la perte des composants de la paroi cellulaire (et de la thèque, des flagelles, le cas échéant), suivie de la lyse et enfin de la mort cellulaire (Place et al., 2011) La rapidité de cet effet sur les membranes (Skovgaard et al., 2003, Tillmann et al., 2007, Imai et al., 1974), *Alexandrium tamarense* (Ma et al., 2011), et *K. brevis* (Prince et al., 2008).

Dans une des rares activités allélopathiques bien caractérisée, le dinoflagellé *K. veneficum* libère des karlotoxines, qui s'insèreraient dans les membranes biologiques en interagissent avec certains stérols membranaires, formant des pores sur les membranes. Ces pores provoqueraient la perméabilisation et la dépolarisation des membranes des espèces cibles, induisant la lyse cellulaire. Ce mode d'action dépend, en grande partie, de la composition en stérols des cellules cibles. En effet, il a été montré que les karlotoxines se lient préférentiellement -dans l'ordre-aux brassicastérols (4-desméthyl-stérols) > cholestérols (4-desméthyl-stérols) > ergostérols (4-desméthyl-stérols) > gymnodinostérols (4 $\alpha$  -méthyl-stérols) (Deeds & Place, 2006). Ce serait donc la composition en stérols des membranes des espèces cibles qui déterminerait la sensibilité aux karlotoxines. *K. veneficum* se protégerait de ses propres composés allélochimiques en enrichissant ses membranes en gymnodinostérols qui son des 4 $\alpha$  -méthyl-stérols, des stérols présentant un groupement méthyl supplementaire en position C-4 contraiment aux autres stérols présentés ci-dessus (Figure 33) (Deeds & Place, 2006).



Figure 33 : Stérols composant les membranes chez les microalgues. Les 4-desméthyl-stérols, stérols dépourvus de groupement méthyl en position C4 : choléstérol, ergostérol, brassicastérol et le  $4\alpha$  -méthyl-stérols, présentant un groupement stérol en C4 : gymnodinostèrol.

# Facteurs abiotiques et biotiques affectants la production et l'accumulation de composés allélochimiques

L'allélopathie peut être stimulée ou atténuée par différents facteurs abiotiques et biotiques. La plupart de nos connaissances sur le sujet proviennent essentiellement d'études effectuées sur deux haptophytes, *Prymnesium parvum (P. parvum)* (Graneli & Salomon, 2010) et *Chrysochromulina polylepis* (Schmidt et al., 2001) et sur certains dinoflagellés du genre *Alexandrium* (Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2019).

Parmi les facteurs abiotiques jouant un rôle important dans la stimulation de la production de composés allélochimiques, on peut citer l'intensité lumineuse, la température, le pH et la concentration en nutriments (azote et phosphore principalement) ou les métaux lourds comme le cuivre (Figure 34). Chez *P. parvum*, la carence en nutriments, une intensité de lumière faible, des températures basses et un pH légèrement basique seraient des conditions favorables pour l'allélopathie (Graneli & Salmon, 2010). La présence de métaux lourds comme le cuivre accroît l'activité allélopathique du dinoflagellé *A. minutum* sur la diatomée *C. muelleri* (Long et al., 2019). Au contraire, des intensités lumineuses ou des températures élevées, des eaux riches en nutriments et les pH acides semblent réprimer l'action allélopathique (Graneli & Salmon, 2010).



Figure 34 : Facteurs abiotiques connus affectant l'activité allélopathique de l'haptophyte *Prymnesium parvum*, (Granéli & Hansen, 2006 ; Graneli & Salmon 2010).

Nous connaissons encore moins les facteurs biotiques influençant l'activité allélopathique dans le phytoplancton. On sait que la variabilité génétique entre différentes souches d'une même espèce influence la quantité de composés allélopathiques libérés, comme pour les trois souches d'*Alexandrium minutum* CCMI1002, AM89BM et Da1257. L'efficacité allélopathique, mesurée comme le degré d'inhibition du Fv/Fm de la diatomée *C. muelleri*, est très différente pour les filtrats de ces 3 souches (Long et al., 2018a). La phase de croissance semble jouer aussi un rôle important (Schmidt & Hansen, 2001 ; Graneli & Salmon 2010 ; Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018a). Certaines espèces présentent une activité allélopathique plus puissante en phase exponentielle de croissance alors que chez d'autres, c'est en phase stationnaire que l'activité allélopathique est la plus forte (Lelong et al., 2011 ; Graneli & Salmon, 2010). A
l'inverse, il y a une spécificité de ces composés allélochimiques pour certaines espèces ou pour certains genres (Fistarol et al., 2004 ; Tillmann et al., 2007).

La taille des espèces cibles semble jouer un rôle important, les plus petites cellules étant affectées plus rapidement que les autres (Lyczkowski & Karp-Boss, 2014). Enfin, l'activité des composés allélopathiques libérés contre les espèces cibles dépend évidemment de la concentration relative des espèces à activité allélopathique et des espèces cibles (Graneli & Salmon, 2010 ; Lelong et al., 2011). Ainsi, dans une expérience utilisant des cultures discontinues, le nombre croissant de cellules de l'haptophyte *P. parvum* entraine une plus grande proportion de cellules lysées chez la cryptophyte *Rhodomonas baltica* (Skovgaard *et al.,* 2003).

# Importance écologique de l'allélopathie

Dans l'environnement, les espèces phytoplanctoniques sont en compétition pour les nutriments, la lumière, il est donc tentant d'imaginer que l'allélopathie joue un rôle important dans la dynamique des populations. Plusieurs phénomènes pourraient être expliqués grâce à l'allélopathie comme par exemple la succession des espèces de microalgues dans l'environnement ou l'apparition d'efflorescence phytoplanctoniques dominées par une seule espèce.

Dans des conditions pauvres en nutriments, il est raisonnable de penser que l'espèce avec la meilleure capacité d'assimilation des nutriments a le plus de chance de persister (Graneli & Hansen, 2006). Toutefois, une carence en nutriments ou une modification des ratios entre azote et phosphore (N/P) peuvent stimuler la production de composés allélochimiques chez certaines espèces. Cette stratégie permet à des espèces phytoplanctoniques de concurrencer les autres microalgues dans des eaux pauvres en nutriments, comme c'est le cas pour l'haptophyte *P. parvum* (Graneli et al., 2008 ; Granéli et al., 2012). D'autres stratégies comme la production de composés allélochimiques ayant des activités antibiotiques et anti-brouteurs, pourraient permettre aux microalgues en question de proliférer librement sans la pression exercée par leurs prédateurs (Hansen, 1989 ; Tillmann & John, 2002 ; Tillmann, 2003 ; Tillmann, 2004 ; Place et al., 2011). Enfin, les espèces phytoplanctoniques ne sont pas toutes phototrophes. Certaines

appartenant aux espèces formant des HAB sont mixotrophes. La production de composés allélochimiques seraient un avantage pour ces espèces, car l'immobilisation et la mort des cellules cibles peut favoriser la phagotrophie (Blossom et al., 2012), comme cela a été démontré pour l'haptophyte mixotrophe *P. parvum* (Granéli et al., 2012), et stimuler ainsi la croissance (Lee et al., 2016).

Les informations parcellaires sur l'allélopathie en milieu marin ne permettent pas de répondre avec certitude à la question du rôle écologique de l'allélopathie au sein du phytoplancton. Estce que l'allélopathie ne joue un rôle majeur que pendant les efflorescences intenses, lorsque la concentration du phytoplancton est la plus grande ? Si oui, quel est le seuil de concentration pour que ces effets deviennent prépondérants en mer ? Au contraire, existe-t-il des interactions allélopathiques moins épisodiques ?

# **Objectifs de la thèse**

En dépit du rôle central du phytoplancton dans la photosynthèse mondiale et dans les cycles biogéochimiques, notre compréhension des mécanismes sous-jacents à la dynamique et la structuration des communautés phytoplanctoniques reste limitée. En particulier, l'apparition et le maintien d'efflorescences de dinoflagellés toxiques, les marées rouges, pourraient être liés à des mécanismes d'allélopathie. En effet, si peu de choses sont connues sur l'activité allélopathique des dinoflagellés dans le milieu marin, on sait en revanche qu'ils libèrent une grande variété de métabolites secondaires dont des phycotoxines aux importantes conséquences écologiques et sanitaires. Il semblerait qu'ils libèrent également des métabolites secondaires co-occurentes.

L'étude des interactions allélopathiques requiert de longs processus de co-cultivation ou de cultivation croisée, avec un fort risque de « faux négatifs ». L'objectif de ma thèse était de mettre au point une méthode permettant d'étudier la photosynthèse des microalgues en mélanges, afin de pouvoir détecter et décortiquer, rapidement et *in vivo*, toute interaction allélopathique ciblant l'appareil photosynthétique. Il y avait dans cette approche une forme de pari basé sur l'hypothèse suivante : comme dans l'allélopathie d'eau douce, la photosynthèse est une sonde idéale pour étudier les interactions allélopathiques entre microalgues marines, parce qu'elle en est une des cibles principales.

Cette approche m'a permis de mettre en évidence une interaction allélopathique dans laquelle le dinoflagellé *Amphidinium carterae* inhibe la photosynthèse de la diatomée *Thalassiosira pseudonana*. J'ai aussi travaillé avec cette approche sur un couple allélopathique d'eau douce présenté dans cette introduction générale, dans lequel la cyanobactérie *Fischerella muscicola* inhibe la photosynthèse de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Enfin, j'ai participé à trois collaborations visant à déterminer l'effet sur la photosynthèse des diatomées de métabolites secondaires libérés par des bactéries ou par des dinoflagellés de marée rouge. A chaque fois, nous avons utilisé des couples de microalgues dont la co-occurrence sur le terrain est avérée. Dans ce manuscrit, j'ai décidé pour des raisons de cohérence de présenter mes résultats en mettant « le plaste » des diatomées au centre du sujet. Pour cette raison, je ne présente pas la partie sur l'allélopathie d'eau douce, ni une des trois collaborations pour laquelle les mesures de photosynthèse chez la diatomée impliquée –et ma contribution- étaient mineures (l'article soumis est en annexe). Par ailleurs, je présente le chapitre principal de ma thèse à la fin, afin d'articuler les trois chapitres dans un ordre de difficulté/d'ambition croissants :

- Le Chapitre 1 traite de l'étude d'une molécule pure, une alkyl-quinolone, libérée par des bactéries, sur l'appareil photosynthétique d'une diatomée modèle *Phaeodactylum tricornutum*,
- Dans le Chapitre 2, nous avons utilisé le filtrat du dinoflagellé toxique Alexandrium minutum afin d'étudier le mode d'action du (ou des) composé(s) allélochimique(s) libéré(s) sur le plaste de la diatomée Chaetoceros muelleri,
- Le Chapitre 3 présente la nouvelle méthode permettant d'étudier les interactions allélopathiques directement dans un assemblage phytoplanctonique. Cette approche nous a permis d'étudier l'interaction allélopathique entre le dinoflagellé *Amphidinium carterae* et la diatomée *Thalassiosira pseudonana*.

# Chapitre 1 : Interaction entre les alkyl-quinolones bactériennes et la photosynthèse des diatomées

Les relations entre le phytoplancton et les bactéries dans les environnements marins représentent sans doute une des relations inter-organismes les plus importantes. Ces interactions influencent fortement le cycle du carbone et des nutriments, régulent la productivité et la stabilité des réseaux trophiques aquatiques et affectent les flux gazeux entre l'Océan et l'atmosphère. L'histoire évolutive commune de ces organismes a sans aucun doute joué un rôle important dans le façonnement de l'écosystème aquatique et de la biogéochimie dans l'Océan. Ces interactions sont complexes et peuvent être bénéfiques ou néfastes.

Certaines bactéries communiquent entre elles en libérant des molécules de signalisation, comme les alkyl-quinolones. Dans certains cas, il semblerait que ces molécules de signalisation entre bactéries affectent la croissance d'espèces phytoplanctoniques, dont les diatomées. Les alkyl-quinolones étant des analogues structurels des quinones, elles sont connues pour leur inhibition compétitrice au niveau des sites de fixation des quinones, dont elles sont des analogues structurels, au niveau des complexes respiratoires et photosynthétiques. Cependant, chez les diatomées, le mode d'action et la cible moléculaire des alkyl-quinolones n'a pas encore été identifié et c'est l'objectif de ce chapitre de répondre à cette question. Ce chapitre a donné lieu à un article publié dans ChemBioChem, intitulé « The multifaceted inhibitory effects of an alkyl quinolone on the diatom *Phaeodactylum tricornutum* », pour lequel nous sommes trois co-premiers auteurs.

# Introduction : Rôle écologique des bactéries marines et leurs interactions avec les diatomées

# I. Les bactéries, leur rôle écologique dans l'Océan et leurs interactions avec le phytoplancton

# 1. Bactéries, phytoplancton et boucle microbienne

Dans l'écosystème marin le phytoplancton est un producteur primaire important qui représente en moyenne 50% de la production primaire mondiale photosynthétique (Field et al., 1998). D'autres microorganismes ont un rôle central dans la chaîne trophique en milieu aquatique comme le zooplancton entant que consommateur primaire, les virus, et les bactéries (via la boucle microbienne) en recyclant une grande partie de la matière organique (Azam et al., 1983 ; Azam & Malfatti, 2007). L'abondance et le métabolisme des bactéries hétérotrophes marines, qui représentent environ un quart de la biomasse dans la zone euphotique de l'environnement marin (Pomeroy et al., 2007), est étroitement liée à la biomasse phytoplanctonique (Cole et al., 1988). En effet la décomposition du phytoplancton et les composés carbonés libérés par celuici représentent pour ces bactéries hétérotrophes une source importante de nutriments (Azam et al., 1983). Ainsi une fraction importante de la matière organique synthétisée par les producteurs primaires se transforme en matière organique dissoutes (MOD) qui est consommée presque exclusivement par les bactéries hétérotrophes (Azam et al., 1983). La majorité de cette MOD est convertie en CO<sub>2</sub> via la respiration, une autre fraction est assimilée et réintroduite dans la chaine alimentaire classique (phytoplancton -zooplancton -animaux marins). Enfin, une faible proportion de la matière organique produite par les producteurs primaires sédimente en profondeur. Les bactéries ont ainsi un rôle fondamental dans le cycle du carbone via le recyclage de la MOD (Azam & Malfatti, 2007). Cette boucle microbienne influence le stockage du carbone dans les fonds marins ainsi que le transfert du carbone jusqu'aux animaux (Azam et al., 1983 ; Azam & Malfatti 2007) (Figure 35).



Figure 35 : Transformation bactérienne de la matière organique dérivé du phytoplancton. Le cycle du carbone marin comprend un certain nombre de processus, dont plusieurs sont médiés par les micro-organismes. Les processus clés du cycle du carbone marin comprennent la conversion du carbone inorganique (comme le CO<sub>2</sub>) en carbone organique par les espèces phytoplanctoniques via la photosynthèse (étape 1) ; la libération des deux matières organiques dissoutes (MOD) et de la matière organique particulaire (POM) du phytoplancton (étape 2); la consommation de la biomasse phytoplanctonique par les brouteurs appartenant au zooplancton (étape 3) et la minéralisation (c'est-à-dire la libération de CO<sub>2</sub> via la respiration lors du catabolisme de la matière organique) et le recyclage de la matière organique par diverses bactéries hétérotrophes, (qui est connu comme la boucle microbienne; étape 4). Une fraction de ces bactéries hétérotrophes est consommée par le zooplancton, et le carbone est en outre transféré dans le réseau trophique supérieur. Les bactéries hétérotrophes contribuent également à la reminéralisation de la MOD, qui est ensuite disponible pour une utilisation par le phytoplancton. La pompe à carbone microbienne (étape 5) fait référence à la transformation du carbone organique en MOD carboné, récalcitrante, qui résiste davantage à la dégradation et est séquestré dans l'océan pendant des milliers d'années. La pompe biologique (étape 6) fait référence à l'exportation de MOP dérivé du phytoplancton vers les profondeurs par sédimentation. Enfin, le shunt viral (étape 7) décrit les contributions des virus à la lyse des cellules qui libèrent ainsi les matières dissoutes et particulaires du phytoplancton et des bactériens (Buchan et al., 2014).

A l'inverse, les bactéries peuvent fournir au phytoplancton des macronutriments limitant dans leur environnement via leur reminéralisation (Fuhrman et al., 1980; Legendre & Rassoulzadegan, 1995), mais elles peuvent aussi être en compétition pour des nutriments inorganiques avec celui-ci (Joint et al., 2002). Lorsque l'apport en nutriments depuis l'extérieur est faible, la croissance du phytoplancton bénéficie particulièrement de l'apport d'azote et de phosphore régénérés par les bactéries (Cole, 1982). Les bactéries peuvent aussi améliorer la biodisponibilité des micronutriments comme le fer (Amin et al., 2009). De nombreux exemples d'interactions spécifiques phytoplancton-bactérie mettent en évidence la nature complexe des liens écologiques entre ces groupes de micro-organismes aquatiques.

D'autres preuves de cette association intime et sélective entre le phytoplancton et les bactéries sont, elles, basées sur la présence d'espèces bactériennes particulières dans les cultures d'espèces phytoplanctoniques en laboratoire (Amin et al., 2009 ; Guannel et al., 2011; Amin et al., 2015 ; Green et al., 2015) et pendant les efflorescence phytoplanctoniques (Rooney-Varga et al., 2005 ), ce qui a conduit à la proposition qu'il existe des « taxons bactériens archétypes » associés au phytoplancton (Buchan et al., 2014). En effet, il semblerait que les communautés bactériennes associées au phytoplancton soient souvent limitées à une poignée de groupes (Goecke et al 2013), comme des membres spécifiques de la famille des Rhodobacteraceae, Flavobacteraceae et Alteromonadaceae (Amin et al., 2012 ; Teeling et al., 2012 ; Green et al., 2015 ; Guannel et al., 2011 ; Van Tol et al., 2017 ; Goecke et al., 2013).

# 2. La « phycosphère », zone clé des interactions bactérie-phytoplancton

L'étude des interactions bactérie-phytoplancton s'est longtemps concentrée sur la dynamique du phytoplancton et des bactéries à grande échelle spatiale (des centaines de mètres à des milliers de kilomètres, Milici et al., 2016) et temporelle (saisonnière à annuelle, Bork et al., 2015). Mais il est désormais reconnu que les interactions bactérie-phytoplancton les plus importantes se jouent à l'échelle microscopique (Bell & Mitchell, 1972), dans des espaces restreints qui permettent l'échange de métabolites et des associations symbiotiques potentielles. L'interface physique des interactions spatiales étroites entre bactéries et phytoplancton est une

région qui entoure immédiatement la microalgue. Dans cette région, appelée la « phycosphère » (Figure 36), les métabolites sont plus facilement échangés malgré la diffusion et la turbulence (Bell & Mitchell, 1972). La phycosphère n'occupe qu'une infime fraction de la colonne d'eau, mais représente un lieu de rencontre clé, un « champ de bataille » pour de nombreuses interactions bactérie-phytoplancton.



Figure 36: Zone d'interaction entre bactéries et phytoplancton, la « phycosphère ».

La phycosphère est chimiquement distincte de l'eau de mer environnante et représente une zone semi-protégée à haute teneur en nutriments et en molécules organiques exsudées par la microalgue. La composition des exsudats phytoplanctoniques varie entre les espèces phytoplanctoniques et entre les phases de croissances de ces espèces, mettant au défi la capacité d'adaptation des bactéries (Bell et al., 1974 ; Weber et al., 2013). Cette région dynamique est une interface d'échanges de nombreux métabolites entre ces deux microorganismes, avec la présence de signaux chimiques de communication ou allélochimiques (Bell & Mitchell, 1972 ; Van Donk et al., 2007). Les microalgues peuvent également secréter des composés lytiques pour les bactéries dans des conditions de compétition pour les nutriments, et qui peuvent favoriser certaines bactéries par rapport à d'autres (Legrand et al., 2003 ; Naviner et al., 1999).

Dans les interactions bactérie-phytoplancton, la proximité des cellules et la densité jouent évidemment un rôle crucial. La colonisation bactérienne de la phycosphère peut se produire de deux façons. Certaines bactéries peuvent se retrouver associées au phytoplancton en le rencontrant de façon aléatoire (Seymuer et al., 2017). D'autres bactéries, comportant un ou plusieurs flagelles, le font grâce à leur motilité et à leur sensibilité accrue pour des gradients chimiques spécifiques dans la colonne d'eau, le chimiotactisme (Lovejoy et al., 1998 ; Stocker & Seymour, 2012). Les biofilms, qui se forment sur certaines surfaces comme les microplastiques (Oberbeckmann et al., 2015; Oberbeckmann, et al, 2018; Harrison et al., 2018), les macroalgues (Radwan et al., 2002; Skerratt et al., 2002) ou l'association des bactéries sur la neige marine (Gram et al., 2002) qui créent un microenvironnement avec une forte concentration de cellules et de métabolites, qui facilitent les interactions entre bactéries et phytoplancton dans le milieu marin. Certaines microalgues telles que les dinoflagellés et les diatomées présentent de fortes interactions avec les bactéries : elles hébergent des bactéries (épibiontes) à leur surface (Crenn et al., 2018) ou des bactéries (endosymbiontes) à l'intérieur de la cellule (Lewis et al., 2011). Enfin les bactéries hétérotrophes peuvent avoir une action algicide pouvant conduire à une lyse des cellules phytoplanctoniques (Guan et al., 2014; Lei et al., 2015; Su et al., 2007). Dans le cadre de ce chapitre, nous allons nous intéresser plus précisément aux interactions entre les bactéries et les diatomées dans le milieu marin.

# II. Les interactions bactérie-diatomée

# 1. Interaction entre bactéries et diatomées : une histoire vielle de 200 millions d'années.

Les diatomées et les bactéries coexistent dans des habitats communs depuis plus de 200 millions d'années, favorisant l'apparition d'interactions (néfastes où bénéfiques) (Bowler et al., 2008 ; Armbrust et al., 2004). De nombreux gènes présents dans le génome des diatomées semblent avoir été acquis par transfert latéral de gènes depuis les bactéries. Ces acquisitions ont probablement joué un rôle majeur dans la diversité et le succès des diatomées (Armbrust et al., 2004, Bowler et al., 2008). On considère par exemple qu'environ 784 gènes d'origine bactérienne chez la diatomée *P. tricornutum* sont impliqués dans l'utilisation de l'azote et du 108 carbone organique, l'assemblage de la paroi cellulaire, la recombinaison de l'ADN et le cycle ornithine-urée (Allen et al., 2011 ; Bowler et al., 2008).

Comprendre les interactions entre bactéries et diatomées est d'une grande importance pour suivre les flux de nutriments océaniques et les cycles biogéochimiques. Dans l'environnement marin, les diatomées et les bactéries peuvent se retrouver associées sous forme de biofilm, attachées sur les même surfaces (neige marine, microplastique, surface des macroalgues, etc...) ou en grande concentration lors d'efflorescences phytoplanctoniques (Agogué et al., 2014 ; Khandeparker et al., 2014 ; Orvain et al., 2003 ; Salta et al., 2013). Les bactéries sont souvent les premières colonisatrices des surfaces immergées vierges, suivies par les diatomées (Patil & Anil, 2005 ; Salta et al., 2013). Les interactions entre les diatomées et les bactéries jouent un rôle important dans la colonisation de ces surfaces par les microorganismes (le « microfouling ») et la progression du biofilm, qui deviendra le point d'ancrage et de développement de divers bivalves, algues, etc... (Patil & Anil, 2005 ; Salta et al., 2013). En laboratoire, plusieurs études se sont intéressées aux communautés bactériennes présentes dans les cultures de diatomées et ont démontré que les bactéries provenant des phyla Proteobacteria et Bacteroidetes, et plus précisément des genres Sulfitobacter, Roseobater, Alteromonas et Flavobacterium, sont les plus fréquemment associées aux diatomées (Schäfer et al., 2002 ; Grossart et al., 2005 ; Hunken et al., 2008 ; Kaczmarska et al., 2005 ; Sapp et al., 2007 a, b, c). Le biais vers certains genres de bactéries a été confirmé sur le terrain. En effet, deux espèces de Pseudo-nitzschia multiseries échantillonnées dans deux sites géographiquement éloignés partagent des bactéries appartenant aux mêmes classes tels que les Aphaproteobacteria (genres Sulfitobacter, Roseobater), les Gammaproteobacteria (genre Alteromonas et Neptunomonas) et les Flavobacteria (genres Persicivirga et Winogradsjyella), même si les genres bactériens semblaient spécifiques à chaque microalgue (Guannel et al., 2011). De même, un suivi de la dynamique des communautés de bactéries et de diatomées in situ a montré que les genre Roseobacter et Sulfitobacter étaient parmi les genres bactériens dont la présence était la plus fortement corrélée à celle des diatomées (Rooney-Varga et al., 2005).

# 2. Interactions synergiques entre bactéries et diatomées.

Une interaction très étudiée entre bactéries et diatomées est la production par les bactéries de vitamines indispensables aux microalgues (Ohwada & Taga, 1972; Ohwada, 1973; Ellis et al., 2017). En effet, il existe parfois une forte corrélation entre l'épuisement des vitamines dans la mer et l'effondrement des efflorescences de diatomées (Ohwada & Taga, 1972 ; Ohwada, 1973). La vitamine B12 ou cobalamine est de loin la vitamine la plus étudiée par rapport aux besoins des diatomées (Carlucci et al., 1969; Droop, 1970; Ryther & Guillard, 1962). Les diatomées peuvent acquérir la vitamine B12 dissoute libérée par excrétion ou lyse de bactéries, ou par des interactions symbiotiques directes avec les bactéries (Bonnet et al., 2010 ; Droop, 2007 ; Kazamia et al., 2012 ; Koch et al., 2012). L'importance biologique de la vitamine B12 réside principalement dans son rôle de cofacteur pour l'enzyme méthionine synthase qui catalyse la synthèse de l'acide aminé méthionine (Banerjee & Matthews, 1990 ; Helliwell et al., 2011). Prélever cette vitamine depuis l'extérieur est nécessaire chez les microalgues dépourvues de méthionine synthase indépendante de la cobalamine, comme la diatomée Pseudo-nitzschia granii (Ellis et al., 2017). La présence de bactéries marines hétérotrophes produisant de la vitamine B12 améliore la croissance de cultures axéniques de diatomées, et remplace au moins en partie l'ajout de vitamine B12 dans le milieu (Haines & Guillard, 1974). Une méta-analyse menée sur 326 microalgues a montré qu'environ 50% des hétérokontes ne sont pas capables de se développer sans ajout de vitamine B12 dans le milieu, indiquant l'importance de cette vitamine pour les diatomées (Hodson et al., 2007).

De leur côté, les diatomées fournissent aux bactéries hétérotrophes des composés de carbone organique dissous (COD) que ces dernières assimilent et décomposent (Cho et al., 1988). La variété de COD produite par les diatomées semble déterminer la diversité des bactéries associées aux diatomées. Certains polymères comme les substances polymériques extracellulaires produits par les diatomées favorisent la croissance de bactéries spécifiques dans des biofilms (Haynes et al., 2007). Le glycolate, un sous-produit de la photorespiration produit par des photoautotrophes, semble également façonner la structure de la communauté bactérienne autour des diatomées (Lau & Armbrust, 2006). Seules certaines bactéries possèdent

le gène glcD, codant pour la glycolate oxydase dont le glycolate est le substrat, et bénéficieraient d'une association avec des diatomées libérant du glycolate (Lau & Armbrust, 2006).

# 3. Activité algicide des bactéries sur les diatomées.

Certaines bactéries sont connues pour leur effet algicide sur différentes espèces du phytoplancton, y compris les diatomées. Ceci est particulièrement vrai pour les bactéries formant des biofilms, que l'on retrouve attachées sur les macroalgues, la neige marine ou les microplastiques, du fait de la pression des autres bactéries ou du phytoplancton voulant coloniser ces mêmes surfaces (Amin et al., 2012). A ce jour, plusieurs molécules algicides produites par des microorganismes marins ont été identifiées mais peu d'entre elles s'avèrent être des substances actives libérées dans le milieu extracellulaire (Amin et al., 2012). On peut citer :

- l'activité algicide d'une souche de *Pseudoalteromonas sp.* sur la diatomée *Skeletonema costatum* due à la sécrétion d'une protéase sérine extracellulaire (Lee et al., 2000).
- celle de la bactérie Kordia algicida sur les diatomées Skeletonema costatum, Thalassiosira weissflogii et Phaeodactylum tricornutum impliquant une protéase extracellulaire également (Paul & Pohnert, 2011; 2013).
- l'activité algicide de la bactérie *Chitinimonas prasina* LY03 sur *T. pseudonana* liée à l'action d'une chitinase bactérienne (Li et al., 2016), qui dégrade la chitine dont est composée la paroi cellulaire de nombreuses diatomées et provoque la lyse cellulaire (Durkin et al., 2009 ; Hernández-Becerril et al., 2009).
- la forte activité algicide de l'isatine 2,3-indolinedione, libérée dans le surnageant de *Pseudomonas* C55a-2, sur la diatomée *Chaetoceros ceratosporum* (Sakata et al., 2011).

Enfin d'autres molécules produites par les bactéries et jouant un rôle dans la signalisation intraspécifique (Figure 37) ont également un effet algicide sur les diatomées. C'est le cas de certaines Homosérine Lactones acylées (en anglais acyl homoserine lactone, AHLs) (Ziesche

et al., 2015) ou certains alcaloïdes, les 2-alkyl-4quinolones (Del Castillo et al., 2007 ; 2008). Ces molécules auraient donc un double rôle : elles serviraient de molécules de communication entre cellules bactériennes mais auraient aussi un effet néfaste sur les diatomées. C'est l'objet de la troisième partie de cette introduction.

# III. Molécules autoinductrices (Alkyl-quinolones) du *quorum sensing* affectant les diatomées marines

# 1. Définition du quorum sensing

Le QS est un mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il se fonde sur la production de petites molécules, les auto-inducteurs (AI) (Nealson & Hastings, 1979 ; Kaplan & Greenberg, 1985), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule (Figure 37). Les AIs, dont la concentration est sensiblement proportionnelle au nombre de bactéries, servent d'indicateur moléculaire de la densité bactérienne. À partir d'une certaine concentration de ces molécules, l'activation et la répression de gènes enclenchent une réponse cellulaire comme la formation de biofilm, la virulence, la production d'antibiotiques, d'exopolysaccharides, d'exoprotéases ou de sidérophores. Ces circuits de communications sont utilisés à la fois par les bactéries à Gram négatif qui utilisent AHLs, et par les bactéries à Gram positif qui sécrètent des oligo-peptides traités (Waters & Bassler, 2005). Un troisième signal de communication inter-bactérien implique le furanosyl diester borate (AI-2) et est considéré comme le signal universel de la communication inter-bactérienne car il est retrouvé aussi bien chez les bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif (Chen et al., 2002 ; Waters & Bassler, 2005). Il a été décrit pour la première fois chez *Vibrio harveyi*, une bactérie marine, et contrôle la bioluminescence de cette bactérie (Bassler et al., 1994).



Figure 37: Principe du *quorum sensing* (QS) : les molécules de communication auto-inductrices servent d'indicateur moléculaire de la densité bactérienne. Une concentration seuil de ces molécules induit (flèche orange) une réponse cellulaire (formation de biofilm, virulence, production d'antibiotiques, d'exopolysaccharides, d'exoprotéases ou de sidérophores).

# 2. Les alkyl-quinolones : molécules autoinductrices du quorum sensing bactérien et inhibitrices des centres énergétiques des cellules cibles

D'autres types de signalisation, entrant dans le système QS ont été identifiés qui mettent en jeu des alcaloïdes, appelés alkyl-quinolones (AQ), produits par une variété de bactéries à Gram négatif et qui auraient aussi des activités antibiotiques et anti-diatomées (Figure 38) (Vial et al., 2008 ; Cornforth & James, 1956 ; Dubern et al., 2008). Ils ont été pour la première fois identifiées en 1956 chez Pseudomonas aeruginosa, un pathogène opportuniste, connu pour sa résistance aux antibiotiques (Cornforth & James, 1956). Pseudomonas aeruginosa produit une diversité d'AQs avec différentes longueurs de chaînes alkyles et de degrés de saturation. Plus de 50 de ces quinolones ont été isolées à ce jour (Pesci et al., 1999, Lépine et al., 2004 ; Dubern et al., 2008) et caractérisées pour leurs activités antibiotiques (Wratten et al., 1977 ; Leisinger & Margraff, 1979 ; Lépine et al., 2004). Parmi ces molécules, le 2-heptyl-3-hydroxy-4quinolone (Pseudomonas quinolone signal, PQS) et son précurseur le 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) (Pesci et al., 1999; McKnight et al., 2000; Diggle et al., 2003; Deziel et al., 2004) agissent aussi bien comme antibiotiques que comme molécules de signalisation (molécules autoinductrices du quorum sensing, cf Figure 37). Ces deux molécules sont impliquées dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes liés à la formation de biofilm, la production de métabolites secondaires, la virulence, la motilité (Diggle et al., 2003 ; Diggle et al., 2007 ; Dubern & Diggle, 2008; Mashburn-Warren et al., 2009).

Parmi les alkyl-quinolones, le sous-groupe des 2-alkyl-4-quinolones N-oxydées (AQNO) ne serait pas impliqué dans le quorum sensing, mais est connu pour son activité antibiotique (Szamosvári & Böttcher, 2018). Ces différentes alkyl-quinolones affectent la respiration bactérienne (Reil et al., 1997), la respiration de cellules de cœur bovin (Reil et al., 1997), et la photosynthèse des plantes supérieures (Reil et al., 2001). En accord avec la forte analogie structurelle de ces molécules avec les quinones impliquées dans le transfert d'électron des chaînes photosynthétique et respiratoire, leurs cibles moléculaires sont le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) et la poche  $Q_P$  du complexe III (complexe cytochrome  $b/c_1$ ) de la bactérie photosynthétique *Rhodospirillum rubrum* (Reil et al., 1997), la poche  $Q_B$  du PSII et le

cytochrome  $b_6 f$  de thylacoïdes d'épinard (Reil et al., 2001). Il semblerait que le degré d'inhibition de ces différents complexes par les différentes quinolones varie fortement en fonction de la longueur de leur chaîne alkyle et de leurs groupes fonctionnels (Avron, 1960 ; Reil et al., 1997 ; Reil et al., 2001). Toutes les AQs ne diffusent pas de la même manière, le PQS est peu soluble en solution aqueuse et se déplace de cellule à cellule par l'intermédiaire de vésicules (Mashburn-Warren et al., 2009), alors que le HHQ diffuse passivement dans le milieu extracellulaire (Deziel et al 2004). Le spectre d'action des AQs a été largement étudié ces dernières années (Heeb et al., 2011 ; Harvey et al., 2016 ; Szamosvári & Böttcher, 2018).



R = chaîne alkyle à nombre de carbone variable

Figure 38 : Structure de différentes 2-alkyl-quinolones. PHQ : 2-pentyl-4-quinolones, HHQ : 2heptyl-4-quinolone, PQS (Pseudomonas quinolone signal) : 2-heptyl-3-hydroxyl-4-quinolone, AQNO : 1-hydroxy-2-alkyl-4-quinolone

# 3. Activité délétère des autoinducteurs bactériens sur les diatomées.

Peu d'études ont montré la production des AQs chez les bactéries provenant de l'environnement marin. La 2-pentyl-4 quinolone (PHQ) est la première AQ à avoir été isolée chez une bactérie marine, *Pseudomonas bromoutilis* (Wratten et al., 1977). De nouveau, la PHQ a une fonction de molécule signal intraspécifique jouant un rôle dans le QS, ainsi que des propriétés antibiotiques (Wratten et al., 1977). La PHQ, isolée chez la souche SWAT5 d'*Alteromonas,* 

présente à la fois un effet bactériostatique (inhibition réversible de la croissance) et une activité inhibitrice de la croissance de certaines diatomées comme *Chaetoceros simplex*, *Cylindotheca fusiformis* et *Thalassiosira weissflogii* (Long et al., 2003). La dose létale de PHQ causant la mort de 50% de la population de ces diatomées varie entre 1 et 10  $\mu$ M, alors qu'une inhibition de la croissance de celles-ci est visible dès 10 nM (Long et al.,2003). La PHQ n'affecte pas seulement la croissance des diatomées mais aussi leur motilité et leur capacité à adhérer sur des surfaces solides et à former des biofilms. En effet, la croissance de deux diatomées connues pour leurs aptitudes à former des biofilms (*Amphora sp* et *Navicula sp*), ainsi que leurs motilités, sont inhibées en présence de 100  $\mu$ M de PHQ (Wigglesworth-Cooksey et al., 2007). Les auteurs proposent un effet de la PHQ sur la respiration des diatomées, car la motilité est un procédé dépendant de l'énergie produite par la respiration (Wigglesworth-Cooksey et al., 2007). La PHQ isolée chez une souche de *Pseudoalteromonas*, une autre bactérie marine de la classe des Gammaproteobacteria présente des effets algicides sur la diatomée *Chaetoceros ceratosporum* (del Castillo et al., 2007 ; del Castillo et al., 2008).

# **Objectifs du chapitre**

Si plusieurs bactéries présentes dans le milieu marin produisent des alkyl-quinolones et ont une capacité d'inhibition de la croissance de certaines diatomées, le mode d'action de ces alkyl-quinolones et leurs cibles moléculaires ne sont pas connues à ce jour chez les diatomées. Deux questions se posent en particulier : les alkyl-quinolones de structures différentes sont-elles toutes capables d'inhiber la croissance des diatomées ? Est-ce que les alkyl-quinolones affectent l'activité photosynthétique des diatomées et leur respiration comme il a été montré chez les bactéries et les plantes ? Si oui, par quel mécanisme ?

Au cours de ma deuxième année de thèse, les laboratoires de Peter Kroth (Université de Constance, Allemagne) et de Wim Vyverman (Université de Gand, Belgique) nous ont contacté pour participer à la détermination des cibles moléculaires d'une alkyl-quinolone, la HHQ, au niveau de la photosynthèse des diatomées. Nos collaborateurs avaient déjà mis en évidence une inhibition de la croissance de trois diatomées par cinq alkyl-quinolones de structures différentes (avec différents groupes fonctionnels ou des longueurs de chaînes alkyles variables). Ils avaient également pu montrer que la photosynthèse de la diatomée *P. tricornutum* était inhibée par ces alkyl-quinolones. Mon objectif ici était de déterminer le(s) complexe(s) photosynthétique(s) ciblé(s) par une de ces alkyl-quinolones, la HHQ, en utilisant des approches spectroscopiques (spectroscopie d'absorption et de fluorescence). Plus précisément, ma contribution dans cette étude correspond aux figures 4, 6, 7 et figure supplémentaire 3.

Article: The multifaceted inhibitory effects of an alkyl-quinolone on the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.

10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

# The multifaceted inhibitory effects of an alkyl quinolone on the diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Lachlan Dow,•<sup>[a]</sup> Frederike Stock,•<sup>[b]</sup> Alexandra Peltekis,•<sup>[c]</sup> Dávid Szamosvári,<sup>[d]</sup> Michaela Prothiwa,<sup>[d]</sup> Adrien Lapointe,<sup>[a]</sup> Thomas Böttcher,<sup>[d]</sup> Benjamin Bailleul,<sup>[c]</sup> Wim Vyverman,\*<sup>[b]</sup> Peter G. Kroth,\*<sup>[a]</sup> Bernard Lepetit,\*<sup>[a]</sup>

· Shared first authors

\* Shared senior authors

Abstract: The mechanisms underlying interactions between diatoms and bacteria are crucial to understand diatom behaviour and proliferation, and can result in far-reaching ecological consequences. Recently, 2-alkyl-4-quinolones have been isolated from marine bacteria, both of which (the bacterium and isolated chemical) inhibited growth of microalgae, suggesting these compounds could mediate diatom - bacteria interactions. We investigated the effects of several quinolones on three diatom species. The growth of all three was inhibited, with half-maximal inhibitory concentrations reaching the sub-micromolar range. Using multiple techniques, dual inhibition mechanisms were uncovered for 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) in Phaeodactylum tricornutum. Firstly, photosynthetic electron transport was obstructed, primarily via inhibition of the cytochrome bef complex Secondly, respiration was inhibited, leading to repression of ATP supply to plastids from mitochondria via organelle energy coupling. These data clearly show how HHQ could modulate diatom proliferation in marine environments.

### Introduction

Diatoms are a class of unicellular algae found worldwide in aquatic environments, in which they are one of the chief primary producers.<sup>[1]</sup> They persist in both benthic and pelagic habitats, surrounded by a diverse array of other microbes, in particular bacteria.<sup>[2]</sup> While a wide range of diatom – bacteria interactions

| [a] | L. Dow, A. Lapointe, Prof. P. G. Kroth*, Dr. B. Lepetit* | _ |
|-----|--|---|
|     | Department of Biology                                    |   |
|     | University of Konstanz                                   |   |
|     | 78467 Konstanz, Germany                                  |   |
|     | E-mail: Lachlan.Dow@uni-konstanz.de                      |   |
| [b] | Dr. F. Stock, Prof. W. Vyverman*                         |   |
|     | Department of Biology                                    |   |
|     | Ghent University   |   |
|     | Email: Frederike.Stock@ugent.be                          |   |
|     | Krijgslaan 281/S8, 9000 Ghent, Belgium                   |   |
| [c] | A. Peltekis, Dr. Benjamin Bailleul                       |   |
|     | Institut de Biologie Physico-Chimique                    |   |
|     | CNRS-Sorbonne Université                                 |   |
|     | 13 rue P. et M. Curie, 75005 Paris, France               |   |
| [d] | D. Szamosvári, Dr. M. Prothiwa, Dr. T. Böttcher          |   |
|     | Department of Chemistry                                  |   |
|     | University of Konstanz                                   |   |
|     | 78467 Konstanz, Germany                                  |   |

have been identified, characterization of the molecules and the corresponding modes of action driving these interactions remains scarce. However, a class of bacterial secondary metabolites, 2-alkyl-4-quinolones, some of which are utilized by bacteria as quorum sensing (QS) signals,<sup>[3]</sup> have been identified as possessing algicidal effects on a variety of microalgae.<sup>[4]</sup> Although not as ubiquitous as other QS compounds such as *N*-acyl homoserine lactones, previous studies have reported that marine bacteria, particularly *Pseudoalteromonas* and *Alteromonas* species,<sup>[5]</sup> but also freshwater and soil bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* produce quinolones.<sup>[6]</sup>

Quinolones reported most frequently from marine bacteria are 2-pentyl-4-guinolone (PHQ)[5c] and the closely related 2-heptyl-4quinolone (HHQ).<sup>[4-5, 7]</sup> A recent study by Harvey et al. demonstrated that the marine bacterium Pseudoalteromonas piscicida was toxic to the microalga Emiliania huxleyi, due to the excretion of HHQ, with a half-maximal growth inhibitory concentration (IC50) in the nanomolar range.[5a] In addition, two quinolones (2-undecen-1'-yl-4-quinolone and 2-undecyl-4quinolone) were detected in extracts of another Alteromonas strain (KNS-16), both of which inhibited the growth of a range of microalgae, with IC<sub>50</sub> values varying between 1.6  $\mu$ M and 200  $\mu$ M, depending on the alga.<sup>[8]</sup> Remarkably, the growth of algae in both of these studies was not only inhibited by living P. piscicida or Alteromonas KNS-16 cells, but also when treated with the respective isolated quinolone. Furthermore, Alteromonas KNS-16 was isolated directly from an algal bloom.[8] This information suggests that 2-alkyl-4-quinolones mediate bacteria-algae interactions through growth inhibition, and indeed may accumulate in the diffusion boundary which surrounds microalgae and the associated bacteria, reaching locally high concentrations.

Our understanding of the physiological effects of quinolones on diatoms remains scarce. In recent works treating diatoms with quinolones, it was shown that PHQ inhibits growth in *Cylindrotheca fusiformis*, *Thalassiosira weissflogii* and natural phytoplankton assemblages.<sup>[5c]</sup> The same compound was also found to inhibit growth and/or motility of the benthic diatoms *Amphora coffeaeformis*, *Navicula* sp. and *Auricula* sp.<sup>[10]</sup> However, very few other alkyl-quinolones have been tested on diatoms, despite the diversity of alkyl quinolones produced by marine bacteria. Furthermore, it is still not clear what causes quinolones to inhibit the growth of microalgae at all.

For internal use, please do not delete. Submitted\_Manuscript

# 10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

Nevertheless, the effects of alkyl-quinolones have been studied on other organisms before.[11] For instance, studies by Reil et al. found that synthetic quinolones, including 2-alkyl-4quinolones, were inhibitors of complex I (NADH:ubiquinoneoxidoreductase) and complex III (Cytochrome bc1 complex) in mitochondria.[11b] In addition, the same authors tested synthetic quinolones on isolated spinach thylakoids and reported that 2alkyl-4-quinolone N-oxides were strong inhibitors of photosystem II. while 2-alkyl-4-quinolones (such as HHQ or PHQ) were only weak inhibitors, suggesting that 2-alkyl-4-guinolone N-oxides are more potent inhibitors of photosynthesis than the corresponding 4(1H)-quinolones in vascular plants.<sup>[11c]</sup> In addition, both compound groups were only weak inhibitors of the cytochrome bsf complex.<sup>[11c]</sup> Furthermore, the alkyl-quinolones HHQ and PQS have been tested on a range of bacteria and yeasts where they had distinct effects on cell proliferation, motility and biofilm formation, indicating that their effects are species specific.[11a]

The observations that quinolones produced by marine bacteria can inhibit growth in certain microalgae prompted us to investigate their effects on diatoms in detail. We aimed to study how structural analogs would affect diatom growth, and whether a mode of action could be observed with diatoms in vivo. In this publication, we present work regarding a number of native bacterial quinolones, namely 2-heptyl-4-quinolone N-oxide (HQNO) as well as the Pseudomonas quorum sensing signals HHQ and 2-heptyl-3-hydroxy-4-guinolone (PQS), and the 2-nonyl congeners 2-nonvl-4-quinolone (NHQ) and 2-nonvl-4-quinolone N-oxide (NQNO). To account for the different environments where quinolones have been detected, we selected three diatoms from different aquatic ecosystems for our initial screening: Cylindrotheca closterium is a marine biofilm forming diatom often found in the benthos of the intertidal zone. In contrast, Phaeodactylum tricornutum is a planktonic diatom which was originally isolated in coastal water and is commonly used as a model organism.<sup>[12]</sup> Additionally, Achnanthidium minutissimum represents a biofilm forming freshwater diatom. As Reil et al. [11c] identified an inhibition of photosynthesis by certain quinolones in isolated spinach thylakoids as well as an inhibition of respiration in isolated mitochondria of non-photosynthetic organisms, we used a variety of experiments to probe not only photosynthesis but also respiration. In doing so, we demonstrate in vivo how the reported growth impairment of diatoms by quinolones is achieved via a simultaneous specific inhibition of both photosynthesis and respiration.

### Results

### Quinolones inhibit diatom growth

Intrigued by the reported bioactivity of quinolones on microalgae, we tracked growth of three diatoms treated with quinolones at a range of concentrations ( $0.125-100 \ \mu$ M). The quinolones used varied with regard to their N-oxidation, 2-alkyl chain length, and 3-hydroxyl group (Figure 1). Five quinolones, HHQ, NHQ, PQS, HQNO, and NQNO were applied to cultures of *P. tricomutum, C. clostenium* and *A. minutissimum*. Of the three quinolones tested with a heptyl side chain (HHQ, PQS and HQNO), all diatoms were

For internal use, please do not delete. Submitted\_Manuscript

most sensitive towards HHQ, with IC<sub>50</sub> values between 1 and 5  $\mu$ M for each respective species (Figure 2 a, d, g). HHQ completely inhibited growth at concentrations as low as 3  $\mu$ M in *C. closterium* (Figure 2 a) and *A. minutissimum* (Figure 2 d), and at 10  $\mu$ M in *P. tricomutum* (Figure 2 g). Compared to HHQ, the IC<sub>50</sub> values of PQS were found to be 3- to 16-fold higher (Figure 2 b, e, h). *A. minutissimum* and *P. tricomutum* were less sensitive to the *N*-oxide HQNO compared to PQS (Figure 2 f and i), whereas *C. closterium* was more sensitive (Figure 2 c).

Diatoms were more sensitive to both NHQ and NQNO (SI 1) compared to their 2-heptyl counterparts (HHQ and HQNO), indicating that a longer alkyl side chain length increased the toxic effect of these compounds. This observation substantiates a quantitative structure activity relationship study testing quinolones on spinach thylakoids, which found that quinolones reached their maximum photosynthetic inhibitory potential at an alkyl chain length of eleven carbon atoms.<sup>[11c]</sup> However, unlike experiments using spinach thylakoids, diatoms displayed decreased sensitivity towards *N*-oxide quinolones: just as HHQ was more potent compared to its *N*-oxide counterpart, so too was NHQ more potent than NQNO.

Taken together, these observations showed that structural features of quinolones influence the respective growth response of diatoms, with *N*-oxide or hydroxyl functionalized quinolones being less potent compared to non-functionalized quinolones. This trend was consistent among all diatoms tested, although sensitivity varied between species, with *C. closterium* being the most sensitive, followed by *A. minutissimum* and *P. tricornutum*.



Figure 1. Structures of 2-alkyl-4-quinolones relevant to this study



# 10.1002/cbic.201900612

WILEY-VCH

Manusa

# **FULL PAPER**



Figure 2. Growth curves of *C. closterium* (**a**, **b**, *c*), *A. minutissimum* (**d**, **e**, **f**) and *P. tricornutum* (**g**, **h**, **i**) exposed to a range of concentrations of HHQ (1st column), PQS (2nd column) and HQNO (3rd column) over six days, with day 0 depicting the day compounds were added to the culture. Tested concentrations varied between diatoms and compounds. Growth was followed by measuring chlorophyll fluorescence, defined as arbitrary "relative fluorescence units" (RFU). Each data point represents the mean of three replicates with error bars showing the standard deviation. ICs<sub>0</sub> values are shown on top of each graph.

### HHQ blocks electron flow between PSII and PSI

The strong inhibitory effect of HHQ on all three diatom species, and its relevance towards other interactions between microalgae and bacteria, prompted us to investigate the mode of action of HHQ in P. tricomutum in detail. To this end, we first investigated the effect of HHQ on photosystem II and photosystem I (PSII and PSI) activities by measuring fluorescence induction of PSII and absorbance changes of  $P_{700}$  (the special pair of chlorophyll in the reaction centre of PSI) simultaneously, using dual pulse amplitude modulated (Dual-PAM) fluorometry. The fluorescence comes mainly from PSII, and its intensity depends on the redox state of  $\mathsf{Q}_{\mathsf{A}},$  the primary quinone electron acceptor of PSII, which takes up electrons originating from the water splitting reaction at the oxygen evolving complex. Meanwhile, changes in absorbance (875 nm minus 830 nm) provide information about the redox state of P700 within PSI.[13] Using these parameters, the PSII and PSI kinetics were measured in dark-adapted and low light-adapted

cells. HHQ was tested at a range of concentrations; as an example Dual-PAM data of 5 µM (its IC50 value for P. tricornutum) are shown in Figure 3 (the quantum yield, Y(II), from the other concentration tested are shown in SI 2). DMSO and DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, a potent PSII inhibitor), served as respective negative and positive controls (Figure 3). Typically, the change in absorbance of P700 (Figure 3, grey line) consists of three phases during the saturating pulse, both in dark and light adapted control cells: a fast increase in absorbance in the first 30 ms, indicative of photo-oxidation of PSI, followed by a partial decrease in absorbance between 30 and 200 ms. indicating reduction of PSI, which is again followed by an increase in absorbance showing the re-oxidation of PSI (> 200 ms). In the presence of HHQ, the transient reduction of P700 between 30 and 200 ms was still present in dark-adapted cells but was suppressed in light-adapted cells. This reduction transient has been previously assigned to the electron flow from PSII in P.

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

### 10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

*tricomutum*,<sup>[14]</sup> in agreement with its suppression in the presence of DCMU in our data (Figure 3). In this regard, the absence of a  $P_{700}$  reduction transient in light adapted cells treated with HHQ suggests that those molecules inhibit an electron transfer step between PSII and PSI. However, in the DCMU treatment the transient reduction of PSI was also abolished in dark-adapted cells suggesting that HHQ had a different mode of action to DCMU. This observation was supported by the maximum quantum yield of PSII which was not significantly affected in dark adapted cells by HHQ treatment (SI 2), whereas DCMU treatment induced a clear decrease in PSII quantum yield.



Figure 3. Simultaneously measured fast fluorescence kinetics of PSII (black) and absorbance of  $P_{700}$  (grey, indicative of P700 redox state) of *P. tricornutum*. Cells were treated with DMSO (control), 40 µM DCMU (positive control) or 5, µM HHQ. Activity of both photosystems was measured with a Dual-PAM during a multi-turnover pulse (800 ms) with dark adapted cells (Dark, left column) and the same cells adapted to low actinic light (Light, right column, 70 µmol photons m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). Data from one representative sample of each treatment is shown. Data is plotted on a logarithmic X-axis, with dotted lines indicating crucial time points of the fast fluorescence curve at 2, 30 ms and 200 ms. Graphs of the same treatments share the same Y-axis range, with the left Y-axis indicating PSII fluorescence, and right Y-axis indicating Prov

To confirm this, and to identify the molecular target of HHQ in the electron transfer chain of *P. tricomutum*, we used a Joliot type spectrometer (JTS) and saturating concentrations of HHQ (50  $\mu$ M, see SI 2). We first measured the light dependency of the quantum yields of PSII and PSI (Y(II) and Y(I) respectively), in the presence and absence of HHQ (Figure 4). Again, the maximal yields of the two photosystems were not significantly inhibited by HHQ in the dark (Figure 4 a & b). However, at all light irradiances, the quantum yields of both photosystems were significantly lower in the presence of HHQ compared to the control (Figure 4 a & b). This translates into a lower electron transfer rate through both PSII and PSI in the presence of HHQ, regardless of the irradiance (shown in SI 3). In the same conditions, we also measured the acceptor and donor side limitation of PSI (see Methods). The data clearly show that the decrease of Y(I) is paralleled by an increase of the donor side limitation (Y(ND)), i.e. P700 is more oxidized in HHQ treated samples (Figure 4 c). In addition, PSI is not acceptor side limited, because the proportion of non-photo-oxidizable P700 (Y(NA)) is almost non-existent regardless of light irradiance (Figure 4 d). These data rule out the possibility that HHQ inhibits the PSI acceptor site or beyond (e.g. the Ferredoxin NADP reductase or the Calvin-Benson-Bassham cycle). The higher fraction of oxidized P700 reveals a limitation of the electron flow 'uphill' of PSI, confirming that the site of inhibition of the photosynthetic electron transfer chain takes place between PSII and PSI.



Figure 4. Light dependency of the quantum yields of PSII (Y(II), a) and PSI (Y(I), b) as well as PSI donor site limitation (c) and acceptor site limitation (d) under steady state illumination in *P. tricomutum (I* = Light Irradiance). Black squares: control samples (DMSO); Red circles: HHQ treated (50  $\mu$ M). Error bars represent standard deviation (n = 3).

### HHQ affects the activity of cytochrome b<sub>6</sub>f

To probe the exact target of HHQ in the photosynthetic apparatus of *P. tricornutum*, three complementary approaches were utilized: fast fluorescence transients, c-type cytochrome redox state and electrochromic shift (ECS) measurements. Together, these techniques allowed a detailed understanding of how HHQ affects the photosynthetic electron transport chain of diatoms.

Fast fluorescence transients are finely time-resolved measurements of chlorophyll fluorescence during a saturating multi turnover pulse, providing specific information about processes in PSII but also beyond.<sup>115]</sup> Information is derived from stepwise transitions in fluorescence levels, referred to as the J- and I-step at 2 and 30 ms, and the P-step, which describes the time point when maximum fluorescence (F<sub>m</sub>) is reached (Figure 5). While DMSO treated control cells showed the typical shoulders at the J- and I-step of the fluorescence transient, DCMU treated cells reached F<sub>m</sub> at the J-step, a typical indicator for PSII inhibition (Figure 5). However, treatment with 5  $\mu$ M HHQ, the half-inhibitory concentration of HHQ, only induced a small increase at the J-step (2 ms) of the fluorescence transient. This indicated that the primary target of HHQ was not PSII, leading to the hypothesis that

For internal use, please do not delete. Submitted\_Manuscript

10.1002/cbic.201900612

WILEY-VCH

# ChemBioChem

(a)

2.5

2.0

ECSIn (r.u)

0.5

0.0

0 5

t/ms

10 15

# **FULL PAPER**

the target of HHQ was likely downhill of the plastoquinone pool.  $\ensuremath{^{16-}}\xspace{16}$ 

In parallel, we analysed the ECS of photosynthetic pigments,<sup>[17]</sup> which is the change in the absorption spectra of some photosynthetic pigments due to the electric field generated across the thylakoid by the photosynthetic process. The ECS, which can be seen as an in vivo voltmeter, is a powerful and widespread technique to investigate photosynthetic physiology. In P. tricornutum, like in other diatoms and stramenopiles,[18] the ECS is the sum of a linear electric field strength (proportional to the electric field across the thylakoid) and a quadratic component (proportional to the square of the electric field strength). The kinetics of the linear ECS following a saturating laser flash can be used to evaluate the activity of each photosynthetic complex (PSI, PSII, cytochrome b<sub>6</sub>f, ATPase). In theory, these kinetics possess three distinct phases: (1) a fast rise of the electric field representing charge separation due to PSI and PSII activity (<0.1 ms),[19] (2) a second rise, corresponding to the turnover of cytochrome b<sub>6</sub>f (~10 ms) which pumps additional protons into the lumen and finally (3) a relaxation of the electric field as ATPase consumes protons from the lumen to the stroma and converts ADP into ATP (>10 ms).<sup>[19]</sup> We also measured the redox state of c-type cytochromes, comprising the cytochrome f in the cytochrome b<sub>6</sub>f, and the cytochrome c<sub>6</sub>, which shuttles electrons between cytochrome b<sub>6</sub>f and PSI (see Methods).

As mentioned above, the first phase of ECS kinetics represents charge separation by photosystems, immediately after the absorption of a photon. In our measurements, this charge separation effect was decreased by 30% in the presence of HHQ (represented by the first data point after illumination (= 0) in Figure 6 a). The charge separations in PSII and PSI lead to electron transfers from water to plastoquinones, and from c-type cytochromes to ferredoxins, respectively. Accordingly, this fast rise of ECS is concomitant with the oxidation of c-type cytochromes by PSI (Figure 6 b) which is similar with and without HHQ, indicating that PSI photochemistry and electron transfer from cytochromes to  $P_{700}$  is unaffected. The 30% decrease of the ECS fast rise could reflect a slight decrease of PSII activity in the

presence of HHQ; however, this cannot explain the almost complete inhibition of photosynthetic activity in the light.

After this fast phase generating reduced quinols and oxidized c-type cytochromes, the turnover of the cytochrome  $b_6 f$  complex catalyses the transfer of electrons from the reduced quinols to the oxidized c-type cytochromes. This process is coupled to proton pumping across the thylakoid. The outcome is a phase of reduction of the c-type cytochromes (Figure 6 b) and a second rise in the trans-thylakoid electric field and ECS (Figure 6 a). However, in the presence of HHQ, only a small increase of the electric field in this time frame was observed, and the reduction of c-type cytochromes  $b_6 f$  as the main target of HHQ, explaining the overall inhibition of the photosynthetic electron transfer rate.

(b) (c) 2. (r.u) DMSO
HHQ DMSO
HHQ 0.0 2.0 c-type cytochromes oxidation -0,5 n. 1,5 -1,0 ECSquad ( -1.5-0,5 -2.0 0.0 -2.5 100 200 300 400 -5 0 5 10 15 20 25 100 200 300 400 0 10 15 100 200 300 -5 5 400 t/ms t/ms

Figure 6. (a) Linear ECS, (b) c-type cytochrome oxidation states, and (c) quadratic ECS calculated from absorption changes at 520, 554, 564 nm (see Methods), following a saturating laser flash, given at t= 0. Black squares: control samples (DMSO); Red circles: HHQ treated (50  $\mu$ M). Error bars represent standard deviation (n = 5).

For internal use, please do not delete. Submitted\_Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Accepted Manuscript

# **FULL PAPER**

HHQ suppresses thylakoid proton motive force in dark adapted cells, identifying mitochondrial respiration as a second site of inhibition

The last phase of ECS measurements (> 10 ms, Figure 6) shows the decay of the electric field and corresponds to the movement of protons from lumen to stroma, catalysed by the ATP synthase. This decay was retarded by HHQ (Figure 6 a). HHQ treatment also decreased the amplitude of the quadratic ECS contribution by ~90 % (i.e. electrochromic shift proportional to the square of electric field strength, shown in Figure 6 c). Those two observations hinted at a second effect of HHQ; the suppression of the pre-existing electric field in the dark ( $\Delta \Psi_d$ ), as observed in Bailleul et al.[18a] To quantify the possible effect of HHQ on the electric field across the thylakoids in dark-adapted diatoms, we measured the kinetics of the relaxation of the linear and quadratic ECS generated after a saturating pulse of light in untreated P. tricornutum, as well as when treated with HHQ (50  $\mu M$ ). We also used the membrane potential uncoupler carbonyl cyanide mchlorophenyl hydrazone (CCCP) as a control to artificially suppress  $\Delta \Psi_d$ .<sup>[18a]</sup> The amplitude of the quadratic versus linear

10.1002/cbic.201900612

## WILEY-VCH

ECS signals were plotted (Figure 7 a-c), giving the same characteristic parabolic function for all treatments, with the vertex indicating the electric field strength in the dark, preceding the light perturbation (expressed in number of charge separations per photosystem, Figure 7 d). The data indicated that a proton motive force (PMF) was maintained across the thylakoid membrane of untreated *P. tricornutum* cells in the dark, with a  $\Delta \Psi_d$  corresponding to  $5.0 \pm 0.6$  charge separations per photosystem, similar to previously measured values.<sup>[16a]</sup> However, the electric field in the dark was clearly suppressed in the presence of HHQ ( $\Delta \Psi_d = 1.4 \pm 0.3$  charge separations / photosystem), almost as much as with the uncoupler CCCP ( $\Delta \Psi_d = 0.8 \pm 0.2$  charge separations / photosystem).

In the presence of cellular ATP in the plastid in the dark (which comes from mitochondrial respiration activity), the plastidic ATPase is able to hydrolyse ATP to ADP, which generates a PMF across the thylakoid membrane.<sup>[20]</sup> It is well-known in plants, green algae and diatoms that the inhibition of respiratory activity (with uncouplers, mitochondrial inhibitors or under anaerobic



Figure 7. (a-c) Kinetics of linear (blue) and quadratic (red) ECS changes and c-type cytochrome redox state (black) obtained after deconvolution from the kinetics of absorption changes ( $\Delta I/I$ ) at 520, 554 and 566 nm, during a 10 ms pulse of saturating red light (before time 0, 4,500 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and the subsequent dark relaxation (after time 0) (see Methods). (a) DMSO control, (b) treatment with HHQ (50 µM) and (c) treatment with membrane potential uncoupler CCCP (15 µM). (d) Relationship between quadratic (Y-axis) and linear ECS (X-axis) in control (black squares) and in cells treated with uncoupler (15 µM CCCP, orange triangles), and with HHQ (50 µM). Error bars represent standard deviation (n = 5).

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Accepted Manuscript

## 10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

conditions) leads to a decrease of the PMF across the thylakoid.<sup>115.</sup> <sup>20]</sup> Thus, HHQ could suppress the PMF by two means: through an uncoupler effect, or through an inhibition of respiration. For that reason, we measured the effect of HHQ on the respiratory activity of *P. tricornutum*.

Respiration rates of *P. tricornutum* were measured in the dark and derived before and after addition of HHQ using a Clark electrode. Respiration rates were more than halved after HHQ addition compared to respiration rates before addition of the compound (Figure 8). Accordingly, the observed decrease in electric field strength in the dark was attributed to an inhibition of respiration, rather than via uncoupling of thylakoid charge separation.



Figure 8. HHQ inhibits respiration in *P. tricomutum*. Oxygen concentration of a diatom culture was tracked over time in a Clark electrode in the dark, and the rate of oxygen consumption was derived from oxygen concentrations one minute before and after addition of 50 µM HHQ. Data was normalized to the average untreated respiration rate (r.u. = relative units). Box plots display the median (bar), and 95% confidence interval. Whiskers indicate maximum and minimum. Asterisk indicates outcome of paired 1-test (P < 0.005, n = 8).

## Discussion

A diverse array of interactions between diatoms and bacteria have been documented, however, the physiological mechanisms underlying these interactions are rarely characterized. This study demonstrated the growth inhibitory effects of five different 2-alkyl-4-quinolones on three diatom species, and identified a mode of action for HHQ in *P. tricornutum*. Out of all five tested quinolones (Figure 2), HHQ and NHQ had lower IC<sub>50</sub> concentrations than their functionalized homologs (HHQ = 1.2 - 4.9  $\mu$ M; NHQ = 0.16 – 1.38  $\mu$ M) illustrating that in diatoms non-functionalized quinolones are more potent than their functionalized analogs. While previous studies have shown the toxic effects of HHQ on the coccolithophore *Emiliania huxley*<sup>[5e]</sup> and of PHQ on other

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

diatoms,<sup>15c, 10]</sup> this study builds on previous findings by testing a broader range of quinolones with structural variations. These experiments not only showed that diatom growth is inhibited by a wide range of quinolones, but also that some appear to be considerably more potent than PHQ. Interestingly, alkyl-quinolones were more active than their corresponding *N*-oxide derivatives by approximately an order of magnitude, while in bacteria-bacteria interactions, the *N*-oxides were much more potent than the corresponding non-functionalized quinolones.<sup>[21]</sup>

The effects of HHQ were characterized exhaustively using a wide variety of spectroscopic techniques. These experiments indicate that HHQ inhibits both cytochrome b<sub>6</sub>f and to a lesser extent PSII in plastids, and oxygen consumption and ATP production in mitochondria. Under actinic light, Y(II) values (SI 2) were decreased and the transient reduction of P700 was absent (Figure 3), providing evidence that electron transport in thylakoids is inhibited. This phenotype was clearly visible with 5  $\mu$ M treatments of HHQ, which was also the IC<sub>50</sub> value derived from growth experiments, suggesting the inhibition of photosynthesis is the chief mode of growth inhibition. These results were confirmed at all light irradiances under steady state illumination (Figure 4), showing that the quantum yield and relative electron transport rates of both photosystems were impaired by HHQ. The observed inhibition of PSI activity was due to a higher oxidation of P700 and not acceptor-side limitations, which indicated that electron transfer was hampered in-between the two photosystems.

Subsequently, the binding site of HHQ was identified as the cytochrome  $b_6 f$  complex, whose activity was slowed down 20-fold (Figure 6). These experiments also showed that charge separation due to the activity of PSII was slightly decreased. These observations are supported by the fluorescence transients (shown in Figure 5), which show a slightly higher amplitude of the O-J phase, indicating an inhibition of the electron transfer towards the plastoquinone pool. These data give conclusive evidence that HHQ hinders photosynthesis primarily via the inhibition of cytochrome  $b_6 f$ , and to a lesser extent PSII (most likely at the Q<sub>B</sub> site). Such a result is reinforced by the structural similarities between HHQ and plastoquinone/plastoquinol (the mobile electron carrier between PSII and cytochrome  $b_6 f$ , along with other structurally related molecules with similar inhibitory effects, such as stigmatellin and aurachines.<sup>[22]</sup>.

HHQ also inhibited mitochondrial respiration, as demonstrated by oxygen consumption experiments (Figure 8). The inhibition of respiration leads to a supplementary phenotype. That is, the ATP produced by mitochondrial respiration in the dark can be hydrolysed by the chloroplastic ATPase, working "in reverse", pumping protons into the lumen. Because of this, diatoms, like other photosynthetic organisms generate a PMF across the thylakoid in the dark.<sup>[18a, 20]</sup> Here, the inhibition of mitochondrial respiration by HHQ, and in turn the dark PMF (Figure 7), can be visualized by the slower ATPase activity and the lower quadratic ECS following a saturating laser flash (Figure 6 C). Complete inhibition identified. It is nevertheless plausible that HHQ inhibits respiration via hindering electron transport at complex I or III, between which ubiquinone shuttles electrons,

### 10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

similar to the PSII – plastoquinone – cytochrome b<sub>6</sub>f system in plastids. Indeed, quinolones have been identified as inhibitors of these complexes in other organisms.<sup>[11b, 23]</sup> While previous studies have shown the effect of 2-alkyl-4-quinolones on respiration in prokaryotes and non-photosynthetic eukaryotes, this study provides evidence of their inhibition in photosynthetic eukaryotes, and shows that these compounds can simultaneously hinder the function of both photosynthesis and respiration.

Previous works, mostly using vascular plants, have demonstrated the inhibition of photosynthesis by NQNO, which is known to bind to cytochrome be $f^{[24]}$  In comparison, much less is known regarding other quinolones. This work suggests that HHQ is a more potent inhibitor of photosynthesis in diatoms than NQNO and may be a more favourable molecule for future diatom photophysiology studies. For example, a screening of quinolones by Reil et al. using spinach thylakoids showed that nonfunctionalized alkyl quinolones (like HHQ and NHQ) had only very weak effects on PSII and cytochrome bef activity.<sup>[11t]</sup> In contrast, this study demonstrates HHQ has a strong inhibition of oxygen evolution (SI 5 and SI 6), mainly due to the inhibition of cytochrome bef. However, it should be noted that many previous studies utilised thylakoid preparations in testing quinolones. This

whole cells, in which diffusion across membranes and accumulation within cell compartments may influence the effect of quinolones. This is particularly important when considering the unique plastid, thylakoid and cell wall architectures of diatoms<sup>[25]</sup>. Nevertheless, physiological differences between diatoms and other photosynthetic organisms appear to define the activity of 2alkyl-4-quinolones. Such a hypothesis is supported by fluorescence transients from two other microalgae treated with HHQ, shown in SI 4. In the coccolithophore E. huxleyi, for example, treatment with 25 µM HHQ led to an increase of the fluorescence transient at the J- and I-step which could point towards inhibition at PSII and the cytochrome  $b_6 f$  complex. In contrast, HHQ treatment of the green alga Dunaliella tertiolecta only induced an increase of the fluorescence transient at the Jstep suggesting the effect was primarily PSII related. Indeed, the effect in D. tertiolecta was nearly identical to the effect induced by non-saturating treatments of DCMU. Taken together, these results illustrate how different photosynthetic organisms respond to HHQ in diverse manners, and suggests that the potent effect of HHQ on E. huxleyi observed by Harvey et al. is due to the inhibition of photosynthesis.[5a]





ADP ATF

ATP

Figure 9. Schematic overview of the electron transport chain in chloroplasts and ATPase activity in mitochondria, and their respective functions in dark (A, C) and light (B, D) adapted cells. The proposed blockage sites of HHQ are indicated in red (in panels C & D). PSII = photosystem II; PSI = photosystem I; orange circles = plastoquinone; purple circles = cytochrome c<sub>8</sub>; Cyt *b6I* = Cytochrome *b6I* complex. Green arrows indicate electron transport and dotted arrows highlight transport of either protons or ATP. The repression of ATP/ADP transformations is indicated with grey arrows. Made in @BioRender – biorender.com.

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

### 10.1002/cbic.201900612

## WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

### Conclusions

This study adds detailed physiological data underlying the strong growth inhibitory effect of 2-alkyl-4-quinolones on diatoms, expanding the diverse repertoire of their bioactivity. Furthermore, this study builds on the increasing evidence that 2-alkylquinolones from bacteria have major roles beyond quorum sensing as important mediators of interspecies and even interkingdom interactions. This work parallels those on N-acvl homoserine lactones (AHL), which have also been shown to mediate interkingdom interactions in marine environments. For example, AHLs mediate the settling of zoospores in the green macroalga Ulva,[26] while tetramic acids, spontaneously generated from certain AHLs, have also been shown to impair photosynthesis in diatoms.<sup>[27]</sup> All tested quinolones inhibited photosynthesis, while detailed physiological experiments identified cytochrome b<sub>6</sub>f as the chief binding site of HHQ, along with the less severe inhibition of PSII (Figure 9). With the isolation of quinolone producing bacteria from marine sources in prior studies,<sup>[5a, 5c, 7-8]</sup> this study highlights how HHQ could modulate respiratory and photosynthetic activity (Figure 9), and subsequently the proliferation of diatoms in marine environments.

### **Experimental Section**

### Diatom strains and culture conditions

Phaeodactylum tricornutum ("wild type 8", NEPCC 640) was obtained from the Canadian Centre for the Culture of Microorganisms (CCCM, http://cccm.botany.ubc.ca). Another strain of P. tricornutum ("wild type 1" Pt 1.8.6) was used for the identification of the site of inhibition of HHQ because the deconvolution of the ECS and c-type cytochromes signals (see below) were previously made on this strain and we could not rule out that this deconvolution procedure would be as correct in WT 8. Achnanthidium minutissimum (Kützing) Czarnecki was isolated from epilithic biofilms of Lake Constance, Germany. Cylindrotheca closterium strain WS3\_7 (DCG 0623) was obtained from the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM, http://bccm.belspo.be). Prior to the experiments, P. tricornutum and C. closterium cultures were made axenic by treating them with an antibiotic mix (500  $\mu g$  mL-1 penicillin, 500  $\mu g/ml$ ampicillin, 100  $\mu g$  mL  $^{-1}$  streptomycin and 50  $\mu g$  mL  $^{-1}$  gentamicin) for a week and replacing the antibiotic supplemented medium every second day. A. minutissimum was axenified according to Windler et al.[28] and was cultured in a modified Bacillariophycean Medium,[29] which instead of soil extract contained F/2 multivitamins, trace metal and silicon/selenium nutrients. P. tricornutum and C. closterium were cultured in Artificial Seawater Medium (ASW) (34.5 g L<sup>-1</sup> Tropic Marin, 0.08 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>) supplemented with Guillard's F/2 (Sigma-Aldrich).<sup>[30]</sup> Due to different culture facilities, diatoms were incubated at 18 °C in a 12:12 h light:dark regime at 25 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for growth experiments, and at 20 °C with a 16:8 h light:dark regime with a light intensity of 70 µmol photons m<sup>-</sup> <sup>2</sup> s<sup>-1</sup> for PAM fluorometry and Clark electrode experiments. For JTS-10 experiments, P. tricornutum was incubated at 20°C with a 12:12 h light:dark regime with a light intensity of 70 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

Cell counts were conducted using a Multisizer 4e Coulter Counter (Beckmann Coulter). Samples collected for chlorophyll content determination (3 mL of culture) were centrifuged (4500 g, 5 min) and the pellet was extracted with 100  $\mu$ L of methanol and vortexed, followed by an additional 900  $\mu$ L of acetone. The resulting suspension was vortexed and

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

centrifuged once more (18000 g, 2 min). The chlorophyll content of the resulting supernatant was determined according to Jeffrey and Humphrey,<sup>[31]</sup> in quartz cuvettes using an Ultrospec 2100 pro UV-Vis spectrophotometer (Biochrom).

Preparation of quinolone solutions

The 2-alkyl-4-quinolones (HHQ and NHQ) and 2-alkyl-4-quinolone-*N*oxides (HQNO and NQNO) were synthesized as described before.<sup>[21]</sup> Briefly, corresponding 3-oxoalkanoic acid methyl esters generated from acyl chlorides with Meldrum's acid were used in condensation reactions with aniline to lead to methyl-3-phenylamino-2-enoates that were subsequently subjected to Conrad-Limpach cyclization giving the 2-alkyl-4-quinolones. For the preparation of HQNO and NQNO, HHQ and NHQ were converted into their hydroxyquinoline tautomers as ethyl carbonates that were used in the subsequent *N*-oxidations.<sup>[32]</sup> The resulting ethyl carbonate *N*-oxides were deprotected to yield the corresponding HQNO and NQNO. PQS was prepared after Hradii et al. using anthranilic acid that was converted to 2-oxononyl 2'-aminobenzoate and consequently cyclized in NMP at 250°C to PQS.<sup>[33]</sup>

2-Heptyl-4-quinolone (HHQ), 2-nonyl-4-quinolone (NHQ), 2-heptyl-3hydroxy-4-quinolone (PQS), 2-heptyl-4-quinolone *N*-oxide (HQNO) and 2nonyl-4-quinolone *N*-oxide (NQNO) were prepared in DMSO (Sigma-Aldrich) such that the final volume of DMSO added to the cultures or samples was always 0.5 % (v/v).

### Growth assays

At the start of the experiment, axenic cultures of A. minutissimum and P. tricornutum were adjusted to an appropriate cell density using a Multisizer Coulter Counter. In the case of C. closterium a fixed minimum fluorescence was used using a PAM fluorometer (Walz, Germany), due to the cells rapid sinking rate. Growth assays were conducted in 48-well plates (Greiner Cellstar, Sigma-Aldrich) and tracked for six days following compound addition. Growth was measured by recording chlorophyll autofluorescence, which was normalized to a blank well (filled with ASW), using a Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (425 nm excitation /685 nm emission, Biotek). The treatments were randomized among well positions, with three replicates per treatment. The entire growth assay was repeated once more with similar trends. Growth rates were calculated as the logarithmic ratio of cell densities divided by the time interval. The exponential growth phase was thus identified, from which IC<sub>50</sub> values were derived using the online AAT Bioquest tool.<sup>1941</sup>

### Dual PAM experiments

Dual PAM experiments were carried out using a Walz Dual PAM 100 fluorometer in dual channel mode, equipped with a Dual-E and a Dual-DB detector and a cuvette holder with stirrer. Cultures of P. tricornutum in the exponential phase were concentrated to a chlorophyll a concentration of 40 µg mL-1, supplemented with sodium bicarbonate to prevent carbon limitation (16 mM), and adjusted to pH 8.0. For each test, 2 mL of this prepared suspension was treated with a quinolone stock solution or DMSO control (for a final DMSO concentration of 0.5 % (v/v)) and incubated in very low light (resting in the cuvette holder, equivalent to no higher than 10 µmol photons m-2 s-1 at the surface) for two minutes with stirring, after which the holder was closed. After 10 seconds in the dark, each sample was exposed to one saturating multi turnover pulse (intensity 8000 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, width 800 ms), then low actinic red light was swite (68 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) followed by a saturating pulse after 30 s. Stirring was switched off immediately before each pulse and restarted immediately afterwards. PSII fluorescence and P700 absorbance (875 nm minus 830

Accepted Manuscr

# **FULL PAPER**

nm) were recorded in such a manner for each quinolone for each concentration in at least two biological replicates. The initial  $P_{700}$  absorbance values were set to equal zero. The PSII quantum yield was also calculated from each of these measurements, using the same method as in JTS fluorescence experiments (see below).

#### JTS-10 experiments

Photosynthetic parameters of *P. tricomutum* were measured with a Joliottype spectrophotometer (JTS-10, Biologic, Grenoble, France) equipped with a white probing LED (Luxeon; Lumileds) and a set of interference filters (3–8 nm bandwidth) and cut-off filters. The device combines absorbance and fluorescence spectroscopy measurements, allowing the activities of both photosystems to be studied in the exact same conditions, and on the same sample. The actinic light was provided by a crown of red LEDs (639 nm, intensities used in this study: 56, 135, 340, 800 and 1500 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). For photosynthesis measurements, cultures of *P. tricomutum* in exponential growth phase were concentrated 10-fold by centrifugation (4500 rpm, 4 min) and resuspended in its own supernatant to reach a final concentration in the range of 5-10 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>. The centifuged samples were then left ~30 minutes under low light to allow the cells to recover from centrifugation.

#### Fluorescence spectroscopy

In the fluorescence spectroscopy mode, the JTS-10 was equipped with a white probing LED (Luxeon; Lumileds) and a blue filter for detecting pulses. PSII parameters were calculated as in Genty et al.<sup>159</sup> In brief, maximum quantum yield of PSII and quantum yields in light-adapted samples were calculated as Fv/Fm = (Fm – F<sub>0</sub>)/Fm and Y(II)= (Fm'–F)/Fm', respectively, where F<sub>0</sub> is the fluorescence of the dark-adapted sample, Fm the fluorescence when a saturating pulse is applied on dark-adapted sample. The relative electron transport rate through PSII (rETR<sub>PSII</sub>) was calculated as rETR<sub>PSII</sub> = Y(II) × I, where I is the actinic light radiance and then values were all normalized to the value at 1500 µmol photons m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.

### Absorption spectroscopy

P700 measurements. The redox state of the PSI primary donor (P<sub>700</sub>) was calculated as the difference between the kinetic absorption changes at 705 nm and 735 nm, to eliminate spectrally flat contributions due to diffusion. Quantum yields of PSI were calculated from the measurements of the absorption changes at 700 nm – 735 nm, in the dark (P<sub>0</sub>), in the light-adapted condition (Pstat) and after a saturating pulse (Psp). Pmax, corresponding to 100% oxidized P<sub>700</sub>, was measured as the light-minus-dark absorption difference in the presence of the PSII inhibitor DCMU (10 mM in ethanol, final concentration of 10  $\mu$ M). Once normalized to Pmax, this allowed the percentage of oxidized P<sub>700</sub> to be calculated in each light condition.

The quantum yield of PSI (Y(I)), the donor side (Y<sub>ND</sub>) and acceptor side (Y<sub>NA</sub>) limitations were calculated according to Klughammer & Schreiber,<sup>[13a]</sup> as Y(I) = (Psp – Pstat) / (Pmax – P0), Y<sub>ND</sub> = (Pstat – P0) / (Pmax – P0) and Y<sub>NA</sub> = (Pmax – Psp) / (Pmax – P0). The relative electron transport rate through PSI (rETRPSI) was calculated as rETRPSI = Y(I) × I, where I is the actinic light irradiance and then values were all normalized to the value at 1500 µmol photons m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.

10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

Electrochromic shift and c-type cytochromes measurements

Based on previous *P. tricomutum* Electro-Chromic Shift (ECS) spectra,<sup>[18a]</sup> we measured the absorption changes (A/I), the relative difference of intensity between sample and reference photodiodes) at three wavelengths (520, 554, 566 nm). To separate ECS and c-type cytochromes (cytochrome *f* and cytochrome c<sub>e</sub>) contributions, and to eliminate flat contributions due to diffusion, we used the following calculations: Cytochrome c = [554] - 0.4× [520] - 0.4× [566], ECSlin = [520] - 0.25× Cytochrome c, and ECSquad = [554] + 0.15× Cytochrome c.

To follow the kinetics of those signals following a saturating laser flash, we used laser dye (LDS 698) pumped by a frequency doubled Nd-YAG laser (Quantel). Before the saturating laser flash was applied, cells were dark adapted for 1 min. For a better comparison, all data in Figure 6 were normalized to the linear ECS value measured right after the flash in the control. The photochemical event ("a phase" of ECS kinetics) is finished well before 100  $\mu s^{[10]}$  and the first experimental point was measured 150  $\mu s$  after the laser flash.

The dark adapted electric field ( $\Delta\Psi_d$ ) measurements were attained from the dark relaxation of the linear and quadratic ECS after a 10 ms pulse of saturating red light (4500 µmol photons m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). ECS data were normalized to the increase of the linear ECS generated after a saturating laser flash (that is, one charge separation per photosystem). We plotted the amplitude of the quadratic versus linear ECS signals during the relaxation of a light-induced PMF and obtained the parabolic function which allowed the calculation of the dark electric field,  $\Delta\Psi_d$ . This experiment was then conducted with cells treated with CCCP (10 mM in ethanol, final concentration 15 µM) and HHQ (10 mM in DMSO, final concentration 50 µM)

Fast fluorescence transients

To obtain OJIP fluorescence transients, an axenic *P. tricornutum* culture was adjusted to 2 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup> and supplemented with 40 µM sodium bicarbonate. Quinolone stocks were added to 1 mL of diatom culture in 1.5 mL cuvettes to a final volume of 0.5 % (v/v). After compound addition, the treated cultures were incubated for two minutes in very low light (resting in the cuvette holder). Finally, the OJIP fluorescence transients of the cultures were measured with an Aqua Pen (AP-C 100, Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic) during a saturating multi turnover blue light flash. OJIP fluorescence transients were normalized according to Strasser et al:<sup>1081</sup> V<sub>1</sub> = (F - F<sub>0</sub>)(F<sub>m</sub> - F<sub>0</sub>), where V<sub>1</sub> is the fluorescence at time t, F<sub>0</sub> the initial fluorescence, and F<sub>m</sub> the maximum fluorescence reached.

Oxygen electrode measurements

Oxygen measurements were performed using a Clark-type electrode (Hansatech Instruments Ltd.) at 20 °C, with stirring, DMSO and quinolone stocks were added such that the final DMSO concentration never exceeded 0.5 % (v/v). All experiments began with a two-minute period of complete darkness, followed by addition of HHQ. In the case of photosynthesis measurements, this was then followed by red-light illumination of 200 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for the remainder of the test. Measurements were normalized based on the oxygen evolution observed in the dark period. Respiration rate (= oxygen consumption) of intact diatom cells was measured in the dark by calculating the rate of oxygen consumption over time (in 60 seconds), before and after adding HHQ (n = 8). Subsequently, the values were divided by the average value before HHQ addition to obtain a ratio where the average respiration rate of untreated cells = 1.

Accepted Manuscrip

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

# **FULL PAPER**

For oxygen measurements using intact diatom cells, exponentially growing P. tricornutum (Wt 8) cultures were concentrated via centrifugation (4500 g, 5 min) to a final concentration of 5 µg chlorophyll a mL-1 and supplemented with 16 mM NaHCO3. For oxygen measurements using thylakoids, thylakoids at a final chlorophyll a concentration of 5  $\mu g\ m L^{-1}$ were dissolved in 1 mL of 50 mM tricine pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM ATP. In addition, ADP (0.24 mM) and potassium ferricyanide (1.5 mM) were applied. Thylakoid membranes were isolated from exponentially growing *P. tricornutum* Wt8 cultures, following the procedure outlined in Lepetit et al.<sup>[37]</sup> with the following modifications: cells were broken at 13,000 psi, and thylakoid fragments were pelleted via centrifugation at 4 °C for only ten minutes at 30,000 g (Sorvall) in order to harvest only larger thylakoid fragments and in order to reduce the time thylakoids are exposed to the centrifugation forces

### Acknowledgements

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Sklodowska-Curie grant agreement No. 642575 (The Algal Microbiome: Friends and Foes ("ALFF" to L.D., F.S., W.V. & P.G.K)). A. P. and B.B. acknowledge funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (PhotoPHYTOMICS, grant agreement 715579). T.B. received funding from the Emmy Noether program (DFG) and D. S. was supported by a KoRS-CB PhD fellowship, B.L. was supported by the DFG (grant LE 3358/3-1) and the Baden-Württemberg Stiftung (Elite program). This work benefitted from facilities provided by W.V. as part of the Belgian contribution to EMBRC-ERIC

Keywords: cytochromes • diatom-bacteria interactions photosynthesis • quinolone • respiration

- [1] D. M. Nelson, P. Tréquer, M. A. Brzezinski, A. Levnaert, B. Quéquiner, Global Biogeochem. Cycles 1995, 9, 359-372.
- a)S. A. Amin, M. S. Parker, E. V. Armbrust, Microbiol. Mol. Biol. Rev. [2] 2012, 76, 667-684; b)H. P. Grossart, F. Levold, M. Allgaier, M. Simon, T. Brinkhoff, Environ, Microbiol, 2005, 7, 860-873.
- J.-F. Dubern, S. P. Diggle, Mol. BioSyst. 2008, 4, 882-888 [3] N. Meyer, A. Bigalke, A. Kaulfuß, G. Pohnert, FEMS Microbiol. Rev. 2017, [4] 41.880-899.
- a)E. L. Harvey, R. W. Deering, D. C. Rowley, A. El Gamal, M. Schorn, B. [5] S. Moore, M. D. Johnson, T. J. Mincer, K. E. Whalen, Front. Microbiol. 2016, 7; b)T. Sakata, C. S. Del Castillo, T. Yoshikawa, M. Hashimoto, Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 2008, 57, 29-35; c)R. A. Long, A. Qureshi, D. J. Faulkner, F. Azam, Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 568-576.
- a)P. M. L. Coulon, M.-C. Groleau, E. Déziel, Front, Cell. Infect. Microbiol. [6] 2019, 9, 33-33; b)S. P. Diggle, P. Lumjiaktase, F. Dipilato, K. Winzer, M. Kunakorn, D. A. Barrett, S. R. Chhabra, M. Cámara, P. Williams, Chem. Biol. 2006, 13, 701-710. K. E. Whalen, K. L. Poulson-Ellestad, R. W. Deering, D. C. Rowley, T. J.
- [7] Mincer, J. Nat. Prod. 2015, 78, 402-412.
- J. Y. Cho, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012, 76, 1452-1458 [9] J. R. Seymour, S. A. Amin, J.-B. Raina, R. Stocker, Nat. Microbiol. 2017,
- 17065. [10] B. Wigglesworth-Cooksey, K. E. Cooksey, R. Long, Environ. Toxicol.
- 2007. 22. 275-280

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

### 10.1002/cbic.201900612

## WILEY-VCH

- a)F. J. Reen, M. J. Mooij, L. J. Holcombe, C. M. McSweeney, G. P. [11] McGlacken, J. P. Morrissey, F. O'Gara, FEMS Microbiol. Ecol. 2011, 77, 413-428; b)E. Reil, G. Hofle, W. Draber, W. Oettmeier, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1997, 1318, 291-298; c)E. Reil, G. Höfle, W. Draber, W. Oettmeier, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2001, 1506, 127-132.
- A. D. Martino, A. Meichenin, J. Shi, K. Pan, C. Bowler, J. Phycol. 2007, [12] 43, 992-1009.
- [13] a)C. Klughammer, U. Schreiber, Planta 1994, 192, 261-268; b)C. Klughammer, U. Schreiber, Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I, Vol. 1, 2008.
- [14] I. Grouneva, T. Jakob, C. Wilhelm, R. Goss, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2009, 1787, 929-938.
- [15] A. Stirbet, Govindiee, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2011, 104, 236-257
- a)G. Schansker, S. Z. Tóth, L. Kovács, A. R. Holzwarth, G. Garab, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2011, 1807, 1032-1043; b)B. Lepetit, [16] L. Dietzel, Environ. Exp. Bot. 2015, 114, 30-47.
- H. T. Witt, Biochim. Biophys. Acta 1979, 505, 355-427 [17]
- a)B. Bailleul, N. Berne, O. Murik, D. Petroutsos, J. Prihoda, A. Tanaka, [18] V. Villanova, R. Bligny, S. Flori, D. Falconet, A. Krieger-Liszkay, S. Santabarbara, F. Rappaport, P. Joliot, L. Tirichine, P. G. Falkowski, P. Cardol, C. Bowler, G. Finazzi, Nature 2015, 524, 366; b)N. Berne, T. Fabryova, B. Istaz, P. Cardol, B. Bailleul, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2018, 1859, 491-500.
- P. Joliot, R. Delosme, A. Joliot, Biochim. Biophys. Acta 1977, 459, 47-57.
- P. Joliot, A. Joliot, Biochim. Biophys. Acta 2008, 1777, 676-683. [20] D. Szamosvári, T. Böttcher, Angew. Chem., Int. Ed 2017, 56, 7271-7275. [21]
- W. Oettmeier, R. Dostatni, C. Majewski, G. Höfle, T. Fecker, B. Kunze, [22]
- H. Reichenbach, Z. Naturforsch. Sect. C 1990, 45, 322-328. [23] Y. Wu, M. R. Sevedsayamdost, Cell Chem. Biol. 2017, 24, 1437-
- 1444.e1433. a)M. A. Selak, J. Whitmarsh, FEBS Lett. 1982, 150, 286-292; b)E. [24]
- Yamashita, H. Zhang, W. A. Cramer, J. Mol. Biol. 2007, 370, 39-52; c)P. R. Rich, S. A. Madgwick, D. A. Moss, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 1991, 1058, 312-328.
- [25] a)B. Lepetit, R. Goss, T. Jakob, C. Wilhelm, Photosynth. Res. 2012, 111, 245-257; b)E. V. Armbrust, Nature 2009, 459, 185.
- [26] I. Joint, K. Tait, G. Wheeler, Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci. 2007, 362, 1223-1233
- F. Stock, M. Syrpas, S. Graff van Creveld, S. Backx, L. Blommaert, L. [27] Dow, W. Stock, E. Ruysbergh, B. Lepetit, B. Bailleul, K. Sabbe, N. De Kimpe, A. Willems, P. G. Kroth, A. Vardi, W. Vyverman, S. Mangelinckx, ACS Chem. Biol. 2019
- [28] M. Windler, A. Gruber, P. G. Kroth, Endocvtobiosis Cell Res. 2012, 22. 62-65.
- U. G. Schlösser, Bot. Acta 1994, 107, 113-186.
- R. R. L. Guillard, in Culture of marine invertebrate animals: Proceedings [30] - 1st conference on culture of marine invertebrate animals greenport (Eds.: W. L. Smith, M. H. Chanley), Springer US, Boston, MA, 1975, pp. 29-60
- S. Jeffrey, G. Humphrey, Biochem. Physiol. Pflanz. 1975, 167, 191-194. [31] A. Woschek, M. Mahout, K. Mereiter, F. Hammerschmidt, Synthesis [32]
- 2007, 1517-1522.
- P. Hradil, J. Hlaváč, K. Lemr, J. Heterocycl. Chem. 1999, 36, 141-144. [33] [34] A. B. Inc., Vol. 2019.
- B. Genty, J.-M. Briantais, N. R. Baker, Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. [35] 1989, 990, 87-92.
- R. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, in Probing [36] photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation, 2000, pp. 445 -
- B. Lepetit, D. Volke, M. Szabó, R. Hoffmann, G. Garab, C. Wilhelm, R. [37] Goss, Biochemistry 2007, 46, 9813-9822.

# 10.1002/cbic.201900612

# WILEY-VCH

# **FULL PAPER**

Entry for the Table of Contents (Please choose one layout)

Layout 1:



For internal use, please do not delete. Submitted\_Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Supplementary information



SI 1. Growth of all three diatoms exposed to a range of concentrations of NHQ (left column) and NQNO (right column). The corresponding  $IC_{50}$  values are shown in boxes



**SI 2.** PSII quantum efficiency, Y(II), of *P. tricornutum* treated with 40 μM DCMU and concentrations of HHQ, PQS and HQNO measured under dark (blue) and actinic light (red) conditions with a Dual PAM. Y(II) was hardly affected by quinolone treatments under dark conditions while quantum efficiency dropped under actinic light conditions, most severely when HHQ was applied. Each data point is shown with a dot, while the connecting line connects the average of each treatment. Zero μM values are the DMSO control values.



**SI 3.** Relative electron transfer rate through PSII (A, rETRP<sub>PSII</sub>) and PSI (B, rETR<sub>PSI</sub>) in *P. tricornutum.* control samples (black squares) and samples treated with 50  $\mu$ M HHQ (red circles). Error bars represent standard deviation (n = 3).



**SI 4**. Fast fluorescence transients of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* and the green alga *Dunaliella tertiolecta*, treated with HHQ (red) or DMSO control (grey). Fluorescence transients of *D. tertiolecta* were also conducted upon treatment with two DCMU concentrations (blue) showing that 0.25  $\mu$ M DCMU shifts the curve in such a way that Fm is already reached at the J-step of the curve at 2 ms.



**SI 5.** Effect of HHQ on Oxygen evolution measurements in *P. tricornutum* cell cultures. Cultures were concentrated to 5 mg chl *a* mL<sup>-1</sup> and treated with either DMSO (black) or 100  $\mu$ M HHQ (red). Circles show photosynthetic rate ( $\mu$ mol O<sub>2</sub> mg chlorophyll *a*<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) for each minute post illumination (200  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for each replicate, horizontal bars show the mean of the three replicates. Values corresponding to t=0 illustrate the respiration rate (measured as oxygen consumption).



**SI 6.** Oxygen evolution measurements of thylakoid membrane extracted from *P. tricornutum.* Thylakoid extracts were photosynthetically active during illumination (150 seconds and onwards), however, when treated with 100  $\mu$ M HHQ (t = 430s), oxygenic photosynthesis halted immediately.

# Discussion

Un large éventail d'interactions entre les diatomées et les bactéries a été mis en évidence, mais les mécanismes physiologiques sous-jacents à ces interactions sont rarement caractérisés. Dans le travail présenté dans l'article, cinq quinolones de structures différentes (Figure 38), HHQ (2heptyl-4-quinolone), NHQ (2-nonyl-4-quinolone), PQS (2-heptyl-3-hydroxyle-4-quinolon), HQNO (1-hydroxy-2-heptyle-4-quinolone) et NQNO (1-hydroxy-2-nonyle-4-quinolone), ont été testées sur la croissance de trois diatomées (A. minutissimum, C. closterium et P. tricornutum). On peut classer les cinq quinolones testées en deux groupes : les alkyl-quinolones (HHQ, NHQ, PQS) et leurs dérivés N- oxydés (HQNO et NQNO) ; ces cinq quinolones varient au niveau de leur longueur de chaîne latérale alkyle en 2C, du groupe hydroxyle en 3C et du Noxydé (Fig). Les résultats indiquent que les quinolones comportant des groupes fonctionnels additionnels (groupe hydroxyl en 3C ou un N-oxydé) sont moins puissantes que les quinolones dépourvues de groupe fonctionnel pour inhiber la croissance des diatomées. Pour la PQS, on peut formuler l'hypothèse que l'affinité et la diffusion dans la phase lipidique est entravée par le grand nombre de liaisons hydrogène. De plus, les diatomées étaient plus sensibles aux alkylquinolones comportant une chaîne alkyl de 9 atomes de carbone qu'à leurs homologues comportant une chaîne alkyl de 7 atomes de carbone. Cela indique qu'une plus grande longueur de chaîne latérale alkyle augmente l'effet toxique de ces composés sur la croissance des différentes diatomées testées, probablement parce que la longueur de la chaîne alkyl augmente l'affinité pour la phase lipidique.

Nous avons pu montrer qu'une concentration saturante de HHQ inhibait le transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique de la diatomée *P. tricornutum*, entre le PSII et le PSI. L'inhibition du transfert d'électron dans la chaîne photosynthétique s'effectue au niveau du cytochrome  $b_6f$ . L'activité du PSII de la diatomée serait aussi affectée par le HHQ, de façon moins nette. De plus, une forte inhibition de la respiration de *P. tricornutum* a été mesuré *in vivo*, que nous avons pu rapprocher à la baisse du gradient électrochimique de protons (pmf, proton motive force) à travers le thylacoïde à l'obscurité. Les mécanismes de l'inhibition ne sont pas surprenants – l'inhibition du cytochrome  $b_6f$  par le NQNO est par exemple connu
depuis longtemps (Selak & Whitmarsh, 1982 ; Yamashita et al., 2007) - mais il s'agit de la première démonstration que ces composés inhibent les processus bioénergétiques chez les diatomées. Ces molécules pourraient ainsi jouer un rôle dans la dynamique des populations de phytoplancton. Certains points méritent des éclaircissements et les résultats obtenus font apparaître plusieurs questions. La discussion s'articulera autour de 2 points : Quel est le lien entre la diminution du pmf généré à travers les membranes du thylacoïde dans le noir et la respiration ? Quel est le rôle écologique des quinolones dans le milieu marin ?

### I. Inhibition de la respiration et pmf à l'obscurité

Chez les diatomées, un gradient électrochimique de protons à travers les membranes des thylacoïdes est présent à l'obscurité. Ce gradient est généré par l'ATPase chloroplastique via l'hydrolyse d'ATP produit par l'activité mitochondriale (Bailleul et al., 2015 et Figure 45 panneau A). La présence d'une pmf dans le noir dépendant de l'activité mitochondriale est décrit également chez les algues vertes et les plantes et semble être un phénomène présent chez tous les organismes photosynthétiques (Finazzi & Rappaport, 1998; Takizawa et al., 2007; Joliot & Joliot, 2008). La pmf généré à travers les membranes thylacoïdiennes comprend un champ électrique ( $\Delta \Psi$ ) et un gradient de protons ( $\Delta pH$ ). Le  $\Delta \Psi$  peut être sondé *in vivo* en mesurant l'ECS qui comprend chez les diatomées deux composantes (linéaire et quadratique) (voire la section « Méthodes spectroscopiques pour étudier l'activité photosynthétique » dans l'Introduction générale). La présence de ces deux différentes sondes ECS chez les diatomées permet une quantification absolue du champ électrique, fournissant un outil pratique pour analyser la pmf in vivo (Bailleul et al., 2015). Il existe ainsi une approche pour mesurer la contribution électrique de la pmf générée à travers les membranes des thylacoïdes dans le noir (Bailleul et al., 2015) : il s'agit de mesurer sur une diatomée adaptée à l'obscurité la cinétique de la relaxation des ECS linéaire et quadratique après un pulse de lumière saturante. L'amplitude du signal ECS quadratique est ensuite tracée en fonction du signal ECS linéaire, ce qui donne une fonction parabolique (Fig 7d de l'article). Le minimum de la parabole nous indique l'intensité du champ électrique présent à l'obscurité avant application du pulse de lumière. Moyennant une calibration adéquate (normalisation par le signal ECS linéaire induit 135 par un flash laser saturant, correspondant à une séparation de charge par PS), le  $\Delta \Psi$  est exprimé en nombre de séparation de charge par PS (Bailleul et al., 2015 ; Berne et al., 2018 ; Stock et al., 2019). Il faut noter qu'une deuxième approche est possible : le rapport des signaux ECS linéaire et ECS quadratique induits par un flash laser saturant donne a priori la même information (Bailleul et al., 2010).

C'est via ces deux approches que nous avons quantifié la pmf (plus exactement sa composante électrique, le  $\Delta \Psi$ ) à travers les membranes du thylacoïde de *P. tricornutum* dans le noir en présence ou en absence de HHQ. Nous avons montré que l'ajout de HHQ conduisait à une diminution de l'ordre de 90% du  $\Delta \Psi$  chez la diatomée *P. tricornutum* dans le noir, cela se traduit par un décalage par rapport à l'origine des axes de la parabole (ECS quadratique vs linéaire, Fig 7 D de l'article) et par une diminution des signaux quadratique-sur-linéaire après un flash laser saturant (Fig 6 A/C de l'article). On sait par ailleurs qu'en absence de la pmf dans le noir, l'ATP synthase chloroplastique passe dans un état « désactivé » chez les plantes comme chez les diatomées, c'est-à-dire un état dans lequel l'ATPsynthase consomme la pmf plus lentement (Joliot & Joliot, 2008; Bailleul et al., 2015). C'est en effet le cas ici : l'activité de l'ATPsynthase dans nos expériences est obtenue grâce à l'ECS linéaire, en mesurant la relaxation du champ électrique après un flash laser saturant. Cette phase, appelée phase « c », correspond à la vitesse de consommation de la pmf générée par le flash laser saturant par l'ATPsynthase chloroplastique. Dans notre étude, cette relaxation mesurée grâce à l'ECS linéaire est fortement ralentie en présence de 50 µm de HHQ.

La forte diminution de la pmf indique une inhibition de l'import dans le plaste de la diatomée d'ATP produit dans la mitochondrie. Nous avons mesuré la respiration de *P. tricornutum* et montré que cette activité était fortement inhibée dans le noir, en présence de HHQ. Ce résultat va dans le sens d'une inhibition du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire conduisant à une diminution de la production d'ATP d'origine mitochondriale. L'hypothèse la plus parcimonieuse et en accord avec la littérature serait qu'HHQ affecte un complexe au niveau de la chaîne respiratoire comme il a été montré pour les AQs chez les bactéries (Reil et al., 1997) et les mitochondries du cœur de bœuf (Reil et al., 1997). Le complexe affecté (complexe I ou complexe III) dépendait dans ces études de la structure de l'alkyl-quinolone testée et en

particulier de la longueur de la chaîne alkyle (Reil et al., 1997). Il est donc probable que ces deux complexes respiratoires soient également la cible du HHQ chez la diatomée *P. tricornutum*. Il serait intéressant de tester cela grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des complexes I et II que sont la roténone et le myxothiazol, respectivement. Mais malheureusement, je n'ai pas pu réaliser cette expérience faute de temps.

### II. Quel est le rôle écologique des quinolones dans le milieu marin ?

Les quinolones sont des molécules connues pour être des molécules autoinductrices du quorum sensing bactérien. Leur effet antibiotique sur d'autres bactéries sont connues depuis longtemps (Lightbown et al., 1956). Les résultats présentés dans l'article confirment les résultats obtenus précédemment : ces molécules peuvent inhiber la respiration en se liant préférentiellement sur les complexes I et III (Reil et al., 1997) et la photosynthèse en inhibant l'activité du cytochrome  $b_6 f$  et/ou du PSII (Reil et al., 2001). Notre étude n'est pas la première à montrer l'effet des AQs sur la croissance de diatomées (Long et al., 2003 ; Wigglesworth-Cooksey et al., 2007 ; Del Castillo et al., 2007 ; 2008), mais c'est la première à caractériser le mode d'action de HHQ sur ces microalgues. Ceci est d'autant plus intéressant que plusieurs bactéries marines productrices de quinolones ont déjà était isolées (Wratten et al., 1977 ; Long et al 2003 ; del Castillo et al., 2007 ; 2008).

Cela pose la question de l'importance écologique de ces molécules algicides, mais aussi plus généralement le rôle allélopathique des molécules impliquées dans le *quorum sensing* et leurs dérivés. Les acyl homosérine lactones sont également des médiateurs d'interactions interdomaine dans les environnements marins. Par exemple, les AHL facilitent la sédimentation des zoospores dans la macroalgue verte Ulva (Wheeler et al., 2006), tandis que les acides tétramiques, générés spontanément par dégradation de certaines AHLs, altèrent également la photosynthèse des diatomées (Stock et al., 2019). Enfin les AQs n'ont pas encore été isolées dans le milieu marin contrairement aux AHLs qui ont été détectées à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans des biofilms (Wheeler et al., 2006). Leur présence dans des biofilms ou lors d'efflorescence phytoplanctonique pourrait jouer un rôle important dans la distribution des espèces de microalgues mais ceci reste à être démontrer.

Une étude récente s'est intéressée au rôle écologique de HHQ, en testant son effet sur une efflorescence phytoplanctonique (Kristen et al., 2019) stimulée dans un mésocosme, un contenant fermé permettant d'isoler une population phytoplanctonique naturelle (Odum, 1984). Au début de l'efflorescence, la communauté phytoplanctonique était dominée par des dinoflagellés puis par des haptophytes. L'exposition à une concentration de 410 µM de HHQ diminue l'abondance du nanoplancton ainsi que celle des bactéries (libres ou associées à de la matière organique), favorisant les gamma-protéobactéries et les alpha-protéobactéries et diminuant l'abondance des Bacteriodites (Kristen et al., 2019). Il serait intéressant de tester l'effet du HHQ sur une efflorescence dominée par des diatomées, afin de tester sur le terrain nos résultats obtenus au laboratoire. De même, tester au laboratoire l'activité des différents AQs sur plusieurs espèces de phytoplancton autres que les diatomées serait utile, car il semblerait que l'activité des différentes AQs dépende de leur groupe fonctionnel et de la longueur de leur chaîne alkyl mais aussi de l'espèce phytoplanctonique étudiée (Harvey et al., 2016). Une étude récente a montré l'inhibition de la croissance du cocolithophore Emiliania huxlevi en présence du filtrat de Pseudoalteromonas puscida qui contient l'alkyl-quinolone HHQ (Harvey et al., 2016). La concentration inhibitrice médiane de HHQ sur E. huxleyi est de l'ordre du µM, en accord avec nos résultats montrant l'inhibition de la photosynthèse d'*Emiliania huxleyi* (Fig Sup 4 de l'article). Les bactéries produisant des AQs pourraient ainsi favoriser certaines espèces phytoplanctoniques par rapport à d'autres pendant les efflorescences.

# Chapitre 2 : Mécanisme d'inhibition de la photosynthèse de la diatomée *Chaetoceros muelleri* par le dinoflagellé *Alexandrium minutum*

Le chapitre précédent nous a permis d'identifier les cibles de composés allélochimiques, les quinolones, et de mettre en évidence leur mode d'action sur les processus bioénergétiques des diatomées. C'est plutôt rare et la plupart du temps nous manquons de connaissance sur les modes d'action des composés allélochimiques. Cela entrave largement notre compréhension du rôle écologique des interactions allélopathiques dans le milieu marin et de la manière dont ces interactions façonnent la dynamique des communautés phytoplanctoniques. Plusieurs espèces de dinoflagellés responsables de marées rouges semblent produire des composés allélochimiques. C'est le cas d'Alexandrium minutum qui libère des métabolites secondaires affectant plusieurs espèces planctoniques, dont les diatomées. Ces molécules sécrétées par A. minutum semblent en particulier perturber la photosynthèse, inhiber la croissance et affecter l'intégrité des membranes chez la diatomée Chaetoceros muelleri. Cependant, les composés allélochimiques impliqués, le mode d'action, ainsi que la ou les cible(s) moléculaire(s) restent inconnus. Ce chapitre présente les travaux que j'ai effectués, visant à décortiquer in vivo les mécanismes d'inhibition de la photosynthèse de la diatomée C. muelleri par les composés allélochimiques sécrétés par A. minutum. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit, soumis, intitulé « Allelochemicals of Alexandrium minutum : kinetics of membrane disruption and photosynthesis inhibition in a diatom » pour lequel nous sommes deux co-premiers auteurs.

# Introduction : Toxicité et allélopathie chez le dinoflagellé Alexandrium minutum

### I. Classification : le genre Alexandrium

Dans la classe des dinoflagellés (Dinophyceae ou Dinophytes), le genre *Alexandrium* appartient à la famille des Goniodomataceae, ordre des Gonyaulacales, qui compte 34 espèces décrites à ce jour (Lilly et al., 2005 ; Anderson et al., 2012). Les dinoflagellés possèdent deux flagelles (un transversal et un longitudinal) qui assurent leur motilité. Les espèces du genre *Alexandrium* font parties des dinoflagellés « cuirassés » ou à thèque, car leur cellule est protégée par une thèque constituée de plaques rigides de cellulose. Ces plaques sont contenues dans des alvéoles sous-corticales propres aux alvéolés (*Alveolata*). Le sillon du flagelle transversal, appelé cingulum, sépare la cellule en deux parties : une supérieure (l'épithèque) et une inférieure (l'hypothèque) (Figure 39). La description de la morphologie des plaques constituant la thèque sert à l'identification des espèces.



Figure 39 : Organisation générale d'un dinoflagellé à thèque (ici *Alexandrium*).

### II. Stratégie nutritionnelle et cycle de vie

Les dinoflagellés ont différentes stratégies nutritionnelles, ils peuvent être exclusivement autotrophes (photosynthétiques), hétérotrophes ou mixotrophes (auto et hétérotrophes). On retrouve ces trois stratégies nutritionnelles au sein du genre *Alexandrium*. Sur les 34 espèces d'*Alexandrium* décrites, sept (*Alexandrium catenella*, *A. minutum*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium pohangense*, *Alexandrium pseudogonyaulax*, *Alexandrium andersonii* et *Alexandrium tamarense*) se sont révélées être mixotrophes (Lee et al., 2016; Blossom et al., 2012). Ces différentes stratégies joueraient un rôle important dans l'apparition et le maintien d'efflorescences phytoplanctoniques chez ces espèces (Lee et al., 2016; Blossom et al., 2012; Legrand & Carlson, 1998; Jeong et al., 2010). En effet, il a été montré que les taux de croissance d'une espèce d'*Alexandrium*, mixotrophe (*Alexandrium andersonii*) étaient deux fois plus élevées en présence de proies dans la culture que lorsque cette espèce se trouvait en croissance autotrophe (Lee et al., 2016).

Le cycle de vie des dinoflagellés, incluant les espèces du genre *Alexandrium*, comporte deux types de reproduction (Figure 40) : une division végétative par fission binaire qui est une reproduction asexuée (division par mitose des cellules) et une reproduction dite sexuée qui est issue de la fusion de deux gamètes de type sexué (+) et (-) (Stoch, 1973 ; Probert et al., 2002 ; Figueroa et al., 2007).

Au printemps ou en été, les espèces d'*Alexandrium* se multiplient dans l'eau, c'est la phase de croissance végétative (Figure 40). Les cellules d'*Alexandrium* sont à ce stade sous forme haploïde (n chromosomes) et sont biflagellés. C'est à ce moment du cycle que peuvent apparaître des efflorescences phytoplanctoniques. L'initiation, l'accroissement et le déclin des efflorescences vont dépendre de différents facteurs biotiques et abiotiques comme la température de l'eau, l'oxygène, la turbulence, la lumière, les nutriments, la présence de brouteurs et de parasites (Anderson et al., 2012 ; Chambouvet, et al., 2008). Certains facteurs semblent être récurrents et avoir un rôle important dans l'apparition et le maintien des efflorescences d'*Alexandrium* comme la stratification de la masse d'eau (Garneau et al., 2011 ; Lee et al., 2003 ; Anderson et al., 2005), l'apport local d'eau douce riche en nutriments

(Garneau et al., 2011 ; Guallar et al, 2017) et une température de l'eau supérieure à  $15^{\circ}$ C (Chapelle et al., 2015 ; Bouchouicha et al., 2012 ; Guallar et al., 2017 ; Vila et al., 2005). Lorsque toutes ces conditions sont réunies, la concentration cellulaire pendant les efflorescences peut atteindre jusqu'à  $10^7$ - $10^8$  cellules/L (Chapelle et al., 2015 ; Pitcher et al., 2007).

Dans le cadre de la reproduction sexuée (Figure 40), certaines cellules se transforment en gamètes et fusionnent pour former un planozygote (2n chromosomes) quadriflagellé. Ce planozygote se différentie en kyste de résistance (ou hypnozygote) qui perd ses flagelles et sédimente. Ces cellules benthiques sont entourées d'une paroi dense et résistante (Anderson & Wall, 1978), qui leur permet de passer l'hiver (voire plusieurs années) enfouis dans le sédiment. L'accumulation des kystes dormants dans le sédiment constitue une banque de kystes qui ont impérativement besoin de cette période de dormance (maturation) pour germer à nouveau (Anderson, 1980 ; Figueroa et al., 2005). Ils forment alors un planoméiocyte (2n chromosomes) quadriflagellé au printemps, quand les conditions redeviennent adéquates. Le planoméiocyte se divise ensuite et donne des cellules mobiles à n chromosomes.

Il existe une autre forme de résistance à court terme, les kystes pelliculés (temporaires) (n chromosomes) qui se forment pendant la phase de multiplication végétative (Dale, 1977 ; Bravo et al., 2010 ; Taylor, 1980 ; Fistarol et al., 2004). Ces kystes peuvent rester dans la colonne d'eau ou sédimenter. Cette forme de résistance n'a pas besoin de période de dormance pour germer à nouveau et redonner des cellules végétatives (Bravo et al., 2010). Ces kystes peuvent apparaître (en quelques minutes) pendant les efflorescences phytoplanctoniques en réponse à un stress soudain comme un choc thermique (Anderson & Wall, 1978 ; Grzebyk & Berland, 1996 ; Herzi et al., 2013), une carence en nutriments (Anderson & Wall, 1978), un stress chimique (Doucette et al., 1989), la présence de parasites (Toth et al., 2004) ou même à cause d'interactions allélopathiques (Fistarol et al., 2004).



Figure 40 : Cycle de vie d'*Alexandrium minutum*. *Alexandrium minutum* (violet) : planoméiocyte à 2n chromosomes quadriflagellé. *Alexandrium minutum* (vert) : forme haploïde asexuée biflagellé. *Alexandrium minutum* bleu foncé et clair : gamètes des deux types sexués. *Alexandrium minutum* (rouge) : planozygote à 2n chromosomes quadriflagellé. L'hypnozygote ou kyste de résistance à 2n chromosomes et le kyste pelliculé/temporaire sont représentés par un rond vert entouré d'un cercle rouge épais et fin, respectivement. L'ovale bleu, fond rose représente la phase de division végétative formant l'efflorescence. Adapté de (Figueora et al., 2007 ; Figueora et al., 2008 ; Figueora et al., 2010).

### III. Toxines produites par le genre Alexandrium

Différentes phycotoxines sont produites par les dinoflagellés comme les alcaloïdes puriques, les imines macrocycliques ou les polyéthers linéaires, cycliques et macrocycliques (les macrolides) (Rasmussen et al., 2016). Parmi les microalgues responsables d'efflorescences phytoplanctoniques toxiques, le genre Alexandrium est certainement l'un des plus nocifs et peut se révéler toxique pour l'Homme (Caruana & Amzil, 2018). Sur les 34 espèces qui composent ce genre, environ la moitié produisent des phycotoxines comme Alexandrium catanella (Faust & Gulledge, 2002), Alexandrium andersinii (Criminiello et al., 2000), Alexandrium australiense (John et al., 2014), Alexandrium cohorticula (Kodama et al., 1988), A. fundvense (Roncalli et al., 2016), Alexandrium tamarense (John et al., 2014), Alexandrium hiranoi (Murakami et al., 1998), Alexandrium pseudogonvaulax (Murakami et al., 1988), Alexandrium leei (Tang et al., 2007), A. minutum (Pistocchi et al., 2012), Alexandrium monilatum (Faust & Gulledge, 2002), Alexandrium ostenfeldii (Gribble et al., 2005), Alexandrium pacificum (Han et al., 2016), Alexandrium peruvianum (Lim et al., 2005), Alexandrium tamiyavanichii (Lim et al., 2006), Alexandrium taylori (Lim et al., 2005), Alexandrium monilatum (Faust & Gulledge, 2002). Chez les espèces du genre Alexandrium les alcaloïdes puriques (les saxitoxines et leurs dérivés) sont les phycotoxines les plus répandues, et certaines espèces produisent des imines macrocycliques (les spirolides et les gymnodimines) ainsi que des macrolides (goniodomines).

### 1. Alcaloïdes puriques : les saxitoxines et leurs dérivés.

Les saxitoxines (STX) sont des alcaloïdes composés de trois cycles comprenant une structure centrale tétrahydropurine à deux guanidines et portant quatre chaînes latérales. Les variations des chaînes latérales (R1 à R4 dans la Figure 41) conduisent à la diversité des analogues de STX. Les STX et leurs dérivés sont des neurotoxines paralysantes (en anglais, Paralytic Shellfish Toxine, PST) connues pour être les agents responsables de l'intoxication paralysante via la consommation de fruits de mer (en anglais, Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) (Lilly et al., 2002). A cause de leur impact néfaste sur l'Homme et les organismes marins, ces 144

phycotoxines sont les plus étudiées et également les plus surveillées en France par le réseau de surveillance REPHY (Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines, Ifremer, <u>https://envlit.ifremer.fr/surveillance/phytoplancton\_phycotoxines</u>). Ce sont des molécules hydrophiles et thermostables qui perturbent la transmission neuromusculaire chez l'Homme. Leur principal mode d'action connu est le blocage des canaux sodium des cellules nerveuses, empêchant la dépolarisation et donc la transmission de l'influx nerveux (Llewellyn, 2006). Après ingestion par l'Homme via des bivalves contaminés, elles provoquent rapidement (en 5 à 30 minutes) un trouble de la sensibilité, un fourmillement brutal des lèvres, du visage, des bras puis des jambes. Des cas graves ont été signalés avec une perte de la coordination motrice, de l'incohérence et un risque de décès par paralysie respiratoire (Wiese et al., 2010). La norme européenne retenue pour la consommation humaine est de 80 µg équivalent de saxitoxine pour 100 g de chair de coquillage. Les toxines, présentes dans les coquillages, sont extraites et injectées à des souris mâles de 20 g. Le temps de survie constaté permet de déterminer la teneur équivalente en saxitoxine totale (d'après l'arrêté du 2 juillet 1996, JORF du 19 juillet 1996).



| Division        | Acronyme     | Nom                              | R1 | R2    | R3    | R4                     |
|-----------------|--------------|----------------------------------|----|-------|-------|------------------------|
| Carbamate       | SXT          | saxitoxine                       | н  | н     | н     | OCONH <sub>2</sub>     |
|                 | NeoSTX       | neosaxitoxine                    | ОН | н     | н     |                        |
|                 | GTX1         | Gonyautoxine 1                   | ОН | н     | OSO3- |                        |
|                 | GTX2         |                                  | н  | н     | OSO3- |                        |
|                 | GTX3         |                                  | н  | OSO3- | н     |                        |
|                 | GTX4         |                                  | ОН | OSO3  | н     |                        |
| Decarbamyl      | dcSTX        | Decarbamyl saxitoxine            | н  | н     | н     | ОН                     |
|                 | dcGTX2       |                                  | н  | н     | OSO3- |                        |
|                 | dcGTX3       |                                  | н  | OSO3- | н     |                        |
| N-sulfocarbamyl | B1 (GTX5)    | Carbamyl-N-<br>sulfosaxitoxine   | н  | н     | н     | OCONHSO <sub>3</sub> - |
|                 | B2(GTX6)     |                                  | ОН | н     | н     |                        |
|                 | C1 (EpiGTX8) |                                  | ОН | Н     | OSO3- |                        |
|                 | C2 (GTX8)    |                                  | н  | OSO3- | н     |                        |
|                 | C3           | Carbamyl-N-<br>sulfosaxitoxine-1 | н  | н     | OSO3- |                        |
|                 | C4           | Carbamyl-N-<br>sulfosaxitoxine-4 | ОН | OSO3- | н     |                        |

Figure 41 : Structure chimique de la saxitoxine (SXT) et de certains de ses dérivés (gonyautoxines, GTX) produits par les espèces du genre *Alexandrium*. Figure reprise de (Caruana & Amzil, 2018).

### 2. Les imines cycliques : les spirolides et les gymnodimines



Figure 42 : Structure de certaines imines cycliques.

Les imines cycliques, (Figure 42), sont des neurotoxines à action dite « rapide » (Molgo et al., 2007 ; Munday, 2008). Elles engendrent des symptômes neurologiques et peuvent provoquer la mort des souris de laboratoire (en quelques minutes) après leur administration par voie intrapéritonéale (Hu et al., 2001, Gribble et al., 2005). Ces phycotoxines partagent une structure macrocyclique et sont composées d'un fragment imine cyclique (possédant un groupement fonctionnel composé d'une liaison carbone-azote) typique de ce groupe. Il a été constaté que l'activité biologique de ces phycotoxines peut être perdue après ouverture de ce cycle imine (Hu et al., 1996). Chez les espèces d'*Alexandrium*, certaines imines cycliques comme les spirolides (SPX) et les gymnodimines (GYM) ont été isolées chez *Alexandrium ostenfeldii* (Jeffrey, 1995) et *Alexandrium peruvianum* (Lim et al., 2005). Les SPXs et les GYMs présentent une grande affinité pour les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (un neurotransmetteur du système nerveux central), ce qui expliquerait leur neurotoxicité chez la

souris (Kharrat et al., 2008). Il a été suggéré que les SPXs et les GYMs possèdent une voie de synthèse commune, car elles présentent de grandes similitudes structurelles et peuvent toutes deux être produites par la même espèce d'*Alexandrium ostenfeldii* (Van de Waal et al., 2015 ; Van Waggoner et al., 2011). Chez *Alexandrium ostenfeldii*, 26 SPXs ont été isolées (Ciminiello et al., 2007, 2010 ; MacKinnon et al., 2006 ; Roach et al., 2009 ; Tillmann et al., 2014). On a observé des accumulations de SPXs dans des fruits de mer en Nouvelle-Zélande en 1990, au Canada en 1990, en Norvège en 2002 (Torgersen et al., 2005) et en France en 2005 dans des huîtres provenant du bassin d'Arcachon. L'accumulation de ces neurotoxines a été détecté dans des huîtres en présence d'*Alexandrium ostenfeldii* (Amzil et al., 2007), mais, malgré leur toxicité, ces toxines ne sont pas recherchées en routine dans le cadre des programmes de contrôle et de surveillance des mollusques bivalves vivants (Gribble et al., 2005 ; Krys et al., 2007).

Chez *Alexandrium ostenfeldii*, certaines gymnodimines ont été isolées et caractérisées comme la gymnodimine A (GA) et ses 8 dérivés, dont le 12-methyl GA, la gymnodimine B, C, D, et le 12-methylgymnodimine (Harju et al., 2016). En 1993, des extraits d'huîtres de Nouvelle-Zélande testés lors d'inspection de santé et de sécurité ont montré une toxicité élevée due à la gymnodimine, avec des symptômes neurologiques chez des souris mais heureusement sans aucune intoxication humaine (Seki et al., 1995). Ce composé a aussi été retrouvé en Tunisie (Bire et al, 2002).

3. Les polyéthers macrocycliques : les goniodomines



Figure 43 : Structure de la goniodomine A et B.

Les goniodomines sont des polyéthers macrocycliques ou macrolides (Figure 43) qui ont été isolés chez les dinoflagellés *Alexandrium hiranoi* (Murakami et al., 1998), *Alexandrium monilatum* (Hsia et al., 2006) et *Alexandrium pseudogonyaulax* (Triki et al., 2016). Deux isomères ont été isolés à ce jour chez cette espèce : la goniodomine A et B. La goniodomine A est une molécule antifongique qui est aussi connue pour générer des altérations histologiques et des nécroses du foie chez le rat (Terao et al., 1989). Plus récemment il a été montré que les goniodomines peuvent avoir un effet cytotoxique sur des cellules excitables humaines et les hépatocytes du rat. Les goniodomines A et B affectent également la viabilité cellulaire d'une lignée cellulaire du neuroblastome humain en augmentant le calcium intracellulaire et en dépolarisant les cellules. Ces deux molécules semblent avoir des effets biologiques similaires, mais la goniodomine A présente une plus grande toxicité (Espina et al., 2016).

### IV. Distribution et occurrence des efflorescences

Les espèces d'*Alexandrium* sont répandues dans le monde entier surtout dans les eaux côtières (estuaires, baies...). On les retrouve dans les régions subarctiques, tempérées et tropicales des hémisphères Nord et Sud (Anderson et al., 2012). Ces efflorescences toxiques sont aussi appelées « marées rouge » et ont également été observées sur des zones côtières du Chili et d'Argentine (Cuellar Martinez et al., 2018 ; Benavides, 1995), d'Australie (Hallegraeff, 1992), d'Espagne (Vila et al., 2001 ; Garcés et al., 2004), aux USA (Anderson, 1997) et sur le littoral français (Chapelle et al., 2015). La diversité de ces dinoflagellés semble être plus élevée en Méditerranée, où *A. minutum* a été identifié pour la première fois en Egypte (Halim, 1960), que dans les autres régions du monde (Anderson et al, 2012). Elles apparaissent généralement dans des environnements côtiers confinés qui subissent une forte eutrophisation liée à l'activité humaine sur les côtes du littoral, dans les ports (Garneau et al., 2011. Pitcher et al., 2007), les estuaires (Hallegraeff et al., 1988) et les lagons (Bouchouicha et al., 2012).

L'augmentation de l'occurrence et de la durée de ces marées rouge (Chapelle et al., 2015), a engendré (pour des raisons sanitaires) une surveillance accrue de ces phénomènes sur le littoral français par le réseau REPHY depuis 1992. Certaines espèces comme : A. catanella, A. minutum, Alexandrium tamarense sont récurrentes sur les côtes françaises et sont donc les plus surveillées (voir Figure 44). Pour mieux anticiper ces efflorescences, un seuil d'alerte a été établi pour certaines espèces d'Alexandrium, dont l'abondance ne doit pas dépasser les 10 000 cellules par litre. Si ce seuil est atteint, le REPHY procède à des mesures de toxines de type PST dans les coquillages. Ce seuil sanitaire a été dépassé dans la Baie de Brest en Bretagne pour A. minutum, entre mi-mai et août pour les années 2010, 2012, 2013, 2014 et 2015. Ces années ont été considérées comme à risque toxique avec pour 2012 des abondances d'A. minutum record de l'ordre de 41 millions cellules/L (voir Figure 44) et plus de 800 µg équivalent de saxitoxine pour 100 g de chair total sur les moules de Kersanton, 10 fois la limite autorisée (voir section III) (Chapelle et al., 2015). Le seuil sanitaire défini pour Alexandrium tamarense est plus bas que celui d'A. minutum (1000 cellules/L). En 1998, les concentrations cellulaires d'Alexandrium tamarense ont atteint des concentrations record de 90 000 cellules/L dans la lagune de Thau, dans le sud de la France avec 85 000 µg équivalent de saxitoxine pour 100 g de chair de coquillage (Abadie et al., 1998).



Figure 44 : Concentration cellulaire des espèces d'*Alexandrium* sur le littoral français. Communiqué par le Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines, Ifremer (REPHY) en 2012. http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/phytoplancton/index.html

### V. Allélopathie au sein du genre Alexandrium

Les espèces du genre Alexandrium font partie des dinoflagellés marins les plus étudiés pour leur activité allélopathique. Huit espèces ont montré une activité allélopathique envers d'autres protistes (autotrophes et hétérotrophes): A. minutum (Tillmann & John, 2002 ; Arzul et al., 1999), Alexandrium tamarense (Hansen, 1989; Tillmann & John, 2002; Ma et al., 2009), Alexandrium ostenfeldii (Tillmann et al., 2007), Alexandrium catanella (Tillmann & John, 2002), Alexandrium fundyense (Hattenrath-Lehmann & Gobler, 2011), Alexandrium pseudogonyaulax (Blossom et al., 2012), Alexandrium lucitanicum (Tillmann & John, 2002; Tillmann et al., 2008), Alexandrium taylori (Tillmann et al., 2008). La nature des molécules allélochimiques responsables de l'activité allélopathique des espèces d'Alexandrium n'a pas encore été identifiée. Les phycotoxines déjà connues comme les saxitoxines (Flores et al., 2012 ; Tillmann & John, 2002) ou les spirolides (Tillmann et al., 2007) ne sont pas les agents responsables de l'activité allélopathique des espèces d'Alexandrium (Emura et al., 2004). En effet les saxitoxines et leurs dérivés ne sont pas libérées dans le milieu extracellulaire comme les composées allélochimiques mais sont retrouvés concentrés dans les cellules (Emura et al., 2004). Et certaines souches d'Alexandrium ne produisent pas de phycotoxines de type PST mais présentent quand même une forte activité allélopathique (Long et al., 2018a), démontrant de nouveau que phycotoxines et allélopathie ne sont pas forcément liées.

Les composés allélochimiques libérés par *Alexandrium* affectent une variété importante de protistes autotrophes et hétérotrophes: des diatomées, des chlorophycées, d'autres dinoflagellés, des haptophytes et des ciliés (Lyczkowski & Karp-Boss, 2014 ; Yin et al., 2010 ; Tillmann & Hansen, 2009 ; Weissbach et al., 2010 ; Hansen, 1989 ; Tillmann & John, 2002 ; Fistarol et al., 2004 ; Tillmann et al., 2007a, Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018 ; Zheng et al., 2016 ; Hattenrath-Lehmann et al., 2011). Mais toutes les espèces ne sont pas affectées avec la même intensité et ne réagissent pas de la même manière aux composés allélochimiques (Long et al., 2018a ; Tillmann et al., 2007). Certaines sont inhibées en croissance alors que d'autres ont des moyens efficaces de protection, en formant des kystes temporaires comme le

dinoflagellé *Scrippsiella trochoidea* (Tillmann et al., 2007 ; Tillmann & Hansen, 2009 ; Fistarol et al., 2004).

Ces composés allélochimiques d'*Alexandrium* peuvent inhiber la croissance (Lyczkowski, & Karp-Boss, 2014 ; Yin et al., 2010 ; Tillmann & Hansen, 2009 ; Weissbach et al., 2010 ; Zheng et al., 2016 ; Fistarol et al., 2004 ; Arzul et al., 1999 ; Hattenrath-Lehmann & Gobler, 2011), affecter la photosynthèse (Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018), provoquer la lyse des cellules (Tillmann et al., 2007 ; Tillmann et al., 2008 ; Ma et al., 2011 ; Fistarol et al., 2004 ; Tillmann & John, 2002 ; Weissbach et al., 2010 ; Hansen, 1989), ou les immobiliser (Tillman & John, 2002 ; Tillmann et al., 2007 ; Tillmann et al., 2008). Elles peuvent aussi provoquer l'enkystement (Tillmann et al., 2007 ; Tillmann & Hansen, 2009 ; Fistarol et al., 2004), le blanchiment (Lelong et al., 2011, Lyczkowski, & Karp-Boss et al., 2014, Fistarol et al., 2004), le changement de la forme des cellules et l'endommagement des membranes chloroplastiques (Zheng et al., 2016 ; Long et al., 2018b) et mitochondriales (Zheng et al., 2016). Mais le mode d'action et la cible moléculaire de ces composés reste encore à être identifié.

L'activité allélopathique des espèces d'*Alexandrium* a été prouvée en testant le filtrat obtenu à partir de leur culture sur la croissance de différents protistes où lors de co-culture (Zheng et al., 2016 ; Lelong et al., 2011 ; Ma et al., 2009 ; Hattenrath-Lehmann & Gobler, 2011 ; Lelong et al., 2011 ; Tillmann & John, 2002). Les cellules d'*A. minutum* resuspendues dans un nouveau milieu sont capables de libérer, de nouveau, après quelques heures des composés allélochimiques et d'inhiber la croissance de la diatomée *C. muelleri* (Lelong et al., 2011). Une forte densité cellulaire (Lelong et al., 2011) ou une phase pré- stationnaire ou stationnaire de croissance (Hansen, 1989 ; Arzul et al., 1999 ; Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018a) renforcent leur activité allélopatique. Toutes les espèces d'*Alexandrium* ne produisent pas la même quantité de composés allélochimiques et leur activité peut être différente en fonction de la sensibilité des espèces cibles étudiées (Long et al., 2018a ; Tillmann et al., 2007). Enfin l'utilisation de métaux lourds (comme le cuivre) dans les cultures d'*A. minutum* augmente son activité allélopathique sur la diatomée *C. muelleri* (Long et al, 2019). La variation de l'activité allélopathique d'*A. minutum* par le cuivre peut avoir des implications écologiques en rendant

*A. minutum* plus compétitif dans des environnements contaminés par le cuivre (Long et al, 2018).

De plus, la production de composés allélochimiques semble être impliquée dans une stratégie nutritionnelle comme la capture de proies mobiles en les immobilisant. Chez l'haptophyte *P. parvum,* les molécules allélochimiques libérées dans le milieu entrainent l'immobilisation des proies potentielles permettant à cet haptophyte de se nourrir de proies mobiles (Skovgaard & Hansen, 2003 ; Stoecker et al., 2003). Dans le genre *Alexandrium*, on retrouve ce type de comportement chez l'espèce *Alexandrium pseudogonyaulax*, mixotrophe, qui produit un mucus contenant des composées allélochimiques capables d'immobiliser ses proies (Blossom et al., 2012).

La quantité de composés allélochimiques libérés et l'activité allélopathique sur un même protiste peut varier entre les espèces du genre *Alexandrium* mais aussi entre différentes souches appartenant à la même espèce. Par exemple, une souche d'*Alexandrium tamarense* immobilise 50 % d'une culture du dinoflagellé *Oxyrrhis marina* après 1h d'incubation, dès une concentration de 600 cellules /mL. Mais trois autres souches testées s'avérent bien moins efficaces (Tillmann & John, 2002). De même la concentration effective pour trois souches d'A.minutum inhibant 50% du Fv/Fm *de Chaetoceros muelleri* n'était pas la même après 120 min d'incubation. Pour la souche d'*A. minutum* ayant l'activité allélopathique la plus puissante, cette concentration était de 4220 ± 480 cellules/ml (Long et al., 2018a).

# 1. Mode d'action des composés allélochimiques produits par *Alexandrium* sur les protistes.

Les recherches visant à élucider les modes d'action des composés allélochimiques chez les microalgues sont plutôt rares. Les études mettent bien souvent en évidence un ensemble de conséquences de l'interaction allélopathique, sans pour autant déterminer le mécanisme. La cible initiale de ces métabolites secondaires entrainant ces effets délétères sur les protistes n'est pas encore définie.

### Activité allélopathique des espèces du genre Alexandrium affectant les membranes

Les composés allélochimiques produits par le genre Alexandrium engendrent la lyse des cellules d'un large spectre de microalgues (Tillmann et al., 2007). Mais le mécanisme par lequel ces composés allélochimiques agissent sur les membranes est encore peu connu. Une fraction lytique du surnageant du dinoflagellé Alexandrium tamarense a été testé sur les membranes de cellules neuronales de rat. Cette fraction semble augmenter la perméabilité aux ions Ca2+ des cellules cibles même quand celles-ci ont leur canaux Ca<sup>2+</sup> bloqués avec du cadmium. Cette augmentation intracellulaire des ions Ca<sup>2+</sup> serait le résultat d'un afflux accru de Ca<sup>2+</sup> par des sites endommagés sur la membrane (Ma et al., 2011). Cette même étude a montré que ces composés lytiques auraient une plus grande affinité pour des membranes riches en certains stérols – les stérols jouant un rôle important dans la régulation de la fluidité et de la perméabilité membranaire. Ces composés se lieraient préférentiellement dans l'ordre aux cholestérols (4desméthyl-stérol) > ergostérols (4-desméthyl-stérol)> brassicastérols (4-desméthyl-stérol)> dinostérols (4-alpha-méthyl-stérol). Chez les espèces étudiées, seul Alexandrium tamarense contient du dinostérol, ce qui pourrait expliquer son insensibilité à ses propres composés lytiques (Ma et al, 2011). En plus des membranes cytoplasmiques, les composés lytiques d'Alexandrium tamarense auraient également pour cible les membranes mitochondriales et chloroplastiques (Zheng et al., 2016). L'observation des organelles de la diatomée P. tricornutum mise en co-culture avec ce dinoflagellé a montré que les membranes chloroplastiques étaient partiellement rompues avec des thylacoïdes dégradés alors que les mitochondries étaient déformées (Zheng et al, 2016).

Une autre espèce de ce genre, *A. minutum* est elle aussi capable d'affecter les membranes de la diatomée *C. muelleri* (Long et al., 2018b). Plus précisément son filtrat altère la composition lipidique des membranes de cette diatomée en induisant une augmentation des stérols membranaires après 60 min d'incubation. Ici, leur augmentation serait une défense de la diatomée contre les composées lytiques. En parallèle des changements de composition en termes de classes lipidiques, la composition des acides gras polaires et neutres qui composent les membranes de *C. muelleri* change significativement (Long et al., 2018b). Les acides gras

neutres, qui sont principalement des lipides de stockage, diminuent chez la diatomée, probablement du fait de la mobilisation des triglycérides pour la synthèse de nouvelles membranes. Enfin, le métabolite secondaire augmenterait aussi l'index d'insaturation des acides gras polaires de *C. muelleri*. Les acides gras polaires jouent un rôle important dans la composition des membranes car ils en sont les principaux constituants. Ainsi une augmentation des stérols et des acides gras polaires saturés rendraient les membranes de la diatomée moins fluides et la rigidifierait (Long et al., 2018b). Ces changements constatés dans la composition lipidiques des membranes de *C. muelleri* semblent être une réponse de défense aux composés allélochimiques de *A. minutum*. Mais la cible initiale de ces composés allélochimiques n'a toujours pas été identifiée.

### Activité allélopathique du genre Alexandrium affectant la photosynthèse

Plusieurs espèces d'*Alexandrium* sont capables d'affecter l'appareil photosynthétique de certaines diatomées ; c'est le cas d'*A. minutum* (Lelong et al., 2011), *Alexandrium fundyense* (Lyczkowski, & Karp-Boss et al., 2014) et *Alexandrium tamarense* (Zheng et al, 2016 ; Fistarol et al., 2004). En particulier, le filtrat de plusieurs souches d'*A. minutum* inhibent le Fv/Fm du PSII de la diatomée *C. muelleri*. La souche CCMI1002 inhibe 27% du Fv/Fm de *C. muelleri* après 60 min d'incubation (Long et al., 2018a), alors que la souche AM89BM est plus efficace et inhibe le Fv/Fm de cette même diatomée de l'ordre de 33% après seulement 15 min d'incubation (Lelong et al., 2011). Comme déjà discuté dans l'introduction générale, une diminution du Fv/Fm peut être due à une inhibition directe du PSII par des composés allélochimiques ou à l'inhibition d'une autre étape photosynthétique qui peut entrainer indirectement la photoinhibition des PSII. Il est donc difficile de conclure par la seule mesure du Fv/Fm sur la cible exacte du composé allélochimique sur l'appareil photosynthétique de *C. muelleri*.

D'autres espèces comme *Alexandrium ostenfeldii* semblent n'avoir aucun effet sur le Fv/Fm du PSII de plusieurs espèces (*Rhodomonas sp*, *Dunaliella salina*; *Thalassiosira weissflogii*; *Emiliania huxleyi*; *Scrippsiella trochoidea*) (Tillmann et al, 2007). Les auteurs concluent que l'activité photosynthétique de ces espèces n'est pas inhibée par les composés allélochimiques libérés par *Alexandrium ostenfeldii*. Or la mesure du rendement quantique maximal du PSII est dans ce cas mal interprétée, car le Fv/Fm ne nous renseigne pas sur l'activité photosynthétique en général mais seulement sur l'intégrité du PSII. Ainsi les composées allélochimiques pourraient agir sur un autre complexe photosynthétique sans que cela n'entraine de photoinhibition du PSII et donc une diminution du Fv/Fm des PSII des différentes espèces cibles.

Des phénomènes de blanchiment (perte de la pigmentation) des cellules de deux diatomées (*T. pseudonana* et *C. muelleri*) ont été observés en présence du filtrat d'*A. fundyense* et d'*A. minutum* (Lelong et al., 2011, Lyczkowski, & Karp-Boss et al., 2014). De même le filtrat d'*A. tamarense* provoque la perte de la pigmentation de tout un groupe d'espèces phytoplanctoniques présentes dans un échantillon naturel (Fistarol et al., 2004).

### **Objectifs du chapitre**

Les effets des molécules allélochimiques libérées par *A. minutum* sur la physiologie des diatomées ont été largement décrits, un certain nombre de questions restent sans réponse : Quelle est la cible première de ces molécules ? Quelle est la chronologie des différentes altérations physiologiques chez la diatomée (photosynthèse, intégrité des membranes, dépigmentation, lyse, mort cellulaire...) ? Quelle est la nature de la molécule impliquée ? Pendant ma deuxième année de thèse, nous avons collaboré avec Marc Long et Hélène Hégaret du laboratoire LEMAR (Université de Bretagne Occidentale) pour étudier l'interaction allélopathique entre le dinoflagellé *A. minutum* et la diatomée *C. muelleri*, deux espèces qui co-existent dans les eaux côtières (Chapelle et al., 2015). Nous nous sommes efforcés (i) d'évaluer l'effet des composés allélochimiques impliqués sur les membranes plasmiques de la diatomée *Chaetoceros muelleri*, et (ii) de décortiquer le mécanisme d'inhibition de l'activité photosynthétique de la diatomée - ce deuxième point correspondant plus précisément à ma contribution dans cette étude. Article: "Allelochemicals from *Alexandrium minutum* lead to membrane disruption and photosynthesis inhibition in a co-occurring diatom"

Article à soumettre: Allelochemicals from *Alexandrium minutum* lead to membrane disruption and photosynthesis inhibition in a cooccurring diatom.

# Allelochemicals of *Alexandrium minutum*: kinetics of membrane disruption and photosynthesis inhibition in a diatom

Marc Long<sup>1,2\*</sup>, Alexandra Peltekis<sup>3\*</sup>, Carmen González-Fernández<sup>2</sup>, Hélène Hégaret<sup>2</sup>, Benjamin Bailleul<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, University of Wollongong, NSW 2522, Australia

<sup>2</sup> Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER –Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

<sup>3</sup> Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC), UMR 7141, CNRS and Université Pierre et Marie Curie (UPMC), 75005 Paris, France

\* First co-authors

#### Summary

• Allelopathy is an efficient strategy by which some microalgae can outcompete other species. Allelochemicals from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* have deleterious effects on diatoms, inhibiting metabolism and photosynthesis and therefore giving a competitive advantage to the dinoflagellate. The precise mechanisms of allelochemical interactions and the molecular target of allelochemicals remain however unknown.

• To understand the mechanisms, we investigated the short-term effects of *A. minutum* allelochemicals on the physiology of the diatom *Chaetoceros muelleri*. We investigated the effect of a filtrate on the diatom cytoplasmic membrane integrity (polarity and permeability) using flow-cytometry and the photosynthetic electron transfer chain using fluorescence and absorption spectroscopy.

• Within 10 minutes, the unknown allelochemicals induced a depolarization of the cytoplasmic membranes and an impairment of photosynthesis through the inhibition of the plastoquinone-mediated electron transfer between photosystem II and cytochrome  $b_6 f$ . At longer times of exposure, the cytoplasmic membranes were permeable and the integrity of photosystems I, II and cytochrome  $b_6 f$  was compromised.

• The membranes are essential in the allelochemical interaction, thus providing new insight in the characterization of the allelochemical nature and specificity. The relationship between cytoplasmic membranes and the inhibition of the photosynthetic electron transfer remains unclear and warrants investigation.

### Introduction

Understanding the factors that favor the establishment and the persistence of harmful algal blooms (HAB) is essential to predict them, and mitigate their consequences on the environment. Dinoflagellates are under constant biotic pressures (e.g. grazing, competition, parasitism, virus), however the toxic dinoflagellate Alexandrium minutum can form dense blooms reaching up to  $10^7$  cells/L (Chapelle et al., 2015), indicating the involvement of defensive mechanisms. Evidences indicate that the dinoflagellates of the genus Alexandrium release unknown bioactive extracellular compounds with a range of biological activities, including allelochemical activity (Long et al., 2018a; Tillmann and Hansen, 2009; Tillmann and John, 2002) that may affect bloom dynamics. In aquatic ecosystems, our understanding of the ecological role of allelochemical interactions on plankton dynamics is hindered by the poor knowledge of the chemical natures and modes of action of allelochemicals. The reported allelochemical effects include growth inhibition (Chen et al., 2015; Paul et al., 2009; Pushparaj et al., 1998; Suikkanen et al., 2011; Ternon et al., 2018), damages to cell membranes or cell lysis (Hakanen et al., 2014; Ma et al., 2009; Poulin et al., 2018; Prince et al., 2008; Tillmann et al., 2007) and inhibition of photosystem II (PSII) (Gantar et al., 2008; Long et al., 2018b; Poulin et al., 2018; Prince et al., 2008; Ternon et al., 2018; Tillmann et al., 2007). The allelochemical interactions between the dinoflagellates Alexandrium spp. (probably the most studied one within marine phytoplankton) and other protists, also lead to membrane disruption, modification of membrane biochemistry, inhibition of photosynthesis and esterase activity, increased production of reactive oxygen species (Flores et al., 2012; Lelong et al., 2011; Long et al., 2018a and b; Ma et al., 2011; Tillmann et al., 2007). However, the sequence of these physiological responses remains unknown, in part because of the use of different algal couples (Alexandrium minutum/Chaetoceros muelleri; Alexandrium tamarense/Rhodomonas salina; Alexandrium tamarense/Tiarina fusus; Alexandrium tamarense/Polykrikos kofoidii). For instance, disruption of membranes was shown in targets of A. tamarense (Ma et al., 2011), but was not investigated for the ones of A. minutum. The inhibition of PSII in allelochemical interactions is probed in a quasi-routine manner simply because PSII activity is easy to measure with the very sensitive and widespread fluorescence techniques. A modification of the integrity of the PSII has been reported for diatoms in the presence of A. minutum filtrate (Lelong et al., 2011; Long et al., 2018b), and in other allelochemical interactions (Hagmann and Jiittner, 1996; Prince et al., 2008; Tillmann et al., 2007). However, the inhibition of PSII can be the direct consequence of an allelochemical targeting PSII specifically, but can also be the indirect consequence of an

inhibition elsewhere in the photosynthetic electron transfer chain (ETC) or even outside of the plastid.

From these observations, several questions arise: What are the mechanisms and cellular targets of allelochemicals? Do *A. minutum* allelochemicals specifically target photosynthetic membranes or do they also disrupt cytoplasmic membranes?

We therefore investigated the specific effects of allelochemicals produced by *A. minutum* on photosystems, photosynthesis activity and cytoplasmic membranes of the common diatom *Chaetoceros muelleri*, co-occurring in the field with *A. minutum* (Chapelle et al., 2015). Allelochemicals were separated from *A. minutum* cells by filtration to specifically focus on allelochemical interactions and avoid interference of cell-cell interactions. The short-term effects of a pulse of allelochemicals on photosynthetic and cytoplasmic membranes of *C. muelleri* were investigated, by absorption and fluorescence spectroscopy and flow-cytometry respectively.

#### Materials and methods

#### Microalgal cultures

A strain of Alexandrium minutum (strain CCMI1002, isolated in Ireland and obtained from the Culture Collection of the Marine Insitute of Galway), not producing paralytic shellfish toxins, was selected according to its high allelochemical potency (Long et al., 2018a). A strain of Chaetoceros muelleri (strain CCAP 1010-3 obtained from the CCAP culture collection, formerly listed as Chaetoceros neogracile or Chaetoceros sp.) was selected because of its sensitivity to A. minutum allelochemicals (Borcier et al., 2017; Lelong et al., 2011; Long et al., 2018a) and of its co-occurrence in the field with A. minutum (Chapelle et al., 2015). Cells of A. minutum were grown in autoclaved synthetic ocean seawater (Morel et al., 1979) supplemented with L1 (Guillard and Hargraves, 1993) media (salinity = 35 psu, pH = 8.4). Cultures of the diatom C. muelleri were grown in filtered (0.2 µm) natural seawater supplemented with L1 media (salinity = 35 psu, pH = 8.4) and silicate (1.06 x  $10^{-4}$  M). The natural seawater used for culturing C. muelleri was filtered over a carbon filter to retain organic compounds that could possibly inhibit microalgal growth and interfere with A. minutum allelochemicals in this study. All cultures were maintained under exponential growth under a 12/12 h light/dark cycle in similar conditions: at 18°C at a light intensity of 30 µmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Neons LUMILUX T8 L 36W/965 BIOLUX) in Brest laboratory, and at 19°C at a light intensity of 38 µmol photons

m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (OSRAM L 30W/640) in Paris laboratory. Cultures were not axenic but were handled under sterile conditions to minimize additional bacterial contamination.

#### Counts of microalgal cells and preparation of filtrate

Counts of microalgal cells were performed using a cell counter (Beckman Coulter, Z2 Cell and Particle Counter) or a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer with a 488 nm argon laser. Counts with the flow cytometer were estimated according to flowrate (Marie et al., 1999). Cell variables, e.g. forward scatter (Forward scatter, FSC), side scatter (Side scatter, SSC) and red auto-fluorescence (Fl3, red emission filter long pass, 670 nm) were used to select microalgal populations.

Filtrates were prepared with 0.2  $\mu$ m syringe filters (Minisart, 16534-K, Sartorius) with an acetate cellulose membrane to avoid any loss of allelochemicals on the membrane (Lelong et al., 2011). The filtrate concentrations were expressed as cell concentration (cells ml<sup>-1</sup>) based on the initial culture concentration prior to filtration.

#### Inhibitors

3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl benzoquinone (DBMIB) and carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) were obtained from Sigma-Aldrich and dissolved in ethanol. Hydroxylamine (HA) and methylviologen (MV) were dissolved in water. DCMU, DBMIB, MV and CCCP were used at a final concentration of 10  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1 mM and 100  $\mu$ M respectively. PSII inhibition was achieved using 15  $\mu$ M DCMU and 150  $\mu$ M HA.

#### Photosynthesis measurements

For photosynthesis measurements, cultures of *C. muelleri* in exponential growth phase, at 1-2  $10^6$  cells/mL, were concentrated by centrifugation (4500 rpm, 4 min) and resuspended in its own supernatant to reach a final concentration in the range of 5 to 10  $10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. The centrifuged samples were then left ~30 minutes to allow the cells to recover from centrifugation. The filtrate of *A. minutum* was obtained from an initial culture within the range of 18 to 22  $10^3$  cells mL<sup>-1</sup>. After adding the filtrate of *A. minutum* (or the filtrate of *C. muelleri* for the control), flasks were incubated for 10 minutes prior to measurements. We measured some key parameters (light dependency of photosynthesis, see below) concomitantly with flow-cytometry

measurement to ensure that the effect of the supernatant of *A. minutum* on the photosynthetic physiology of *C. muelleri* was the same in the two laboratories.

For measurements of photosynthetic parameters, we used a Joliot-type spectrophotometer (JTS-10, Biologic, Grenoble, France) equipped with a white probing LED (Luxeon; Lumileds) and a set of interference filters (3–8 nm bandwidth). The device combines absorbance and fluorescence spectroscopy measurements, allowing us to study in the same conditions, on the same sample, the activities of the two photosystems independently, as well as the photochemical rate (which reflects the additive activities of both photosystems, see below). The actinic light was provided by a crown of red light emitting diodes (LED) (619 nm) or by a dye laser at 690 nm. In the fluorescence spectroscopy mode, the JTS-10 was equipped with a white probing LED (Luxeon; Lumileds) and a blue filter (470 nm) for detecting pulses. The cut-off filter on the measuring photodiode is a LPF650 + RG 665 from Schott (Mainz, Germany) and on the reference side is a BG39 filter from Schott. In the absorption mode, the cut-off filters were the same on measure and reference photodiodes (BG39 for ECS measurements and a high pass RG695 for P700 measurements).

*Fluorescence spectroscopy.* PSII parameters were calculated as described in (Genty et al., 1989). Maximum quantum yield of PSII was calculated as  $F_v / F_m = (F_m-F_0)/F_m$ , where  $F_0$  is the fluorescence of the dark-adapted (1 minute) sample and  $F_m$  the fluorescence when a saturating pulse is applied on dark-adapted sample (Figure 3A). Quantum yields in light-adapted samples of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) was calculated as  $\Phi_{PSII}=(F_m^2-F_{stat})/F_m^2$ , where  $F_{stat}$  is the fluorescence of the sample adapted to the actinic light and  $Fm^2$  the fluorescence when a saturating pulse is applied on light-adapted sample. The electron transport rate through PSII (ETR<sub>PSII</sub>) was normalized to the maximal value in the control at 800 µmol photons  $m^{-2} s^{-1}$  to focus on filtrate-induced changes and correct for variations in the initial photosynthetic physiology of *C. muelleri*. It was calculated as ETR<sub>PSII</sub> =  $\Phi_{PSII} * I / (\Phi_{PSII-800} * 800)$ , where I is the actinic light irradiance (Fig 3 E).

Fluorescence induction kinetics was performed at room temperature using a DeepGreen Fluorometer (JBeamBio). Samples were dark-adapted for 1 minute before measurements.

*P700 measurements.* For photosystem I (PSI) parameters, the redox state of the PSI primary donor (P700) was calculated as the difference between the absorption changes kinetic at 705 nm and 735 nm, to eliminate spectrally flat contributions due to diffusion. Properties of PSI

were calculated from the measurements of the absorption changes (Figure 3B) in the dark ( $P_0$ ), in the light-adapted condition ( $P_{stat}$ ) and after a saturating pulse ( $P_{sp}$ ). The quantum yield of PSI ( $\Phi_{PSI}$ ), the donor side (Y(ND)) and acceptor side (Y(NA)) limitations were then calculated according to (Klughammer and Schreiber, 2008).

$$\begin{split} \Phi_{PSI} &= (P_{sp} - P_{stat}) / (P_{max} - P_0) \\ Y(ND) &= (P_{stat} - P_0) / (P_{max} - P_0) \\ Y(NA) &= (P_{max} - P_{sp}) / (P_{max} - P_0) \end{split}$$

All data were normalized to  $P_{max} - P_0$  (corresponding to 100% oxidized P700),  $P_{max}$  being the absorption change after a saturating pulse in the presence of the PSII inhibitor DCMU. The electron transport rate through PSI (ETR<sub>PSI</sub>) was normalized to the maximal value of the control at 800 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (like for ETR<sub>PSI</sub>) and calculated as ETR<sub>PSI</sub> =  $\Phi_{PSI} * I/(\Phi_{PSI-800} * 800)$ , where I is the actinic light irradiance (Fig 3F).

*Measurement of linear and quadratic ECS spectra.* To obtain the spectra of the linear and quadratic Electro-Chromic Shift (ECS) signals in *C. muelleri*, we generated a strong electric field by shining a 10 ms saturating pulse (red light, 619 nm, 6000  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), then used the approach described in (Bailleul et al., 2015). In brief, we followed the kinetics of the absorption changes following the pulse, removing the first 50 ms after the pulse (additional signals like the ones associated to the redox changes of the c-type cytochromes are then relaxed). Then we fitted the ECS decay kinetics as a sum of a linear and a quadratic component, which allowed to reconstruct the two spectra (Fig 1). Cells were treated with 100 $\mu$ M of the uncoupler CCCP to ensure that no trans-thylakoidal electric field was present in the dark-adapted sample, prior to the pulse.

Determination of the appropriate wavelengths for measurements. The linear and quadratic ECS spectra (Fig 1) revealed that 520 nm and 563 nm are convenient wavelengths where only linear and quadratic signals contribute to ECS, respectively. On that basis, we used a three wavelengths deconvolution, to obtain contributions from linear ECS, quadratic ECS and c-type cytochromes (Cyt c). The latter was calculated as:

Cyt c= [554] - 0.4\* [520] - 0.4\* [563], where [554], [520] and [563] are the absorption difference signals at 554 nm, 520 nm and 563 nm, respectively.

Then, the linear ECS (ECSlin) was calculated as ECSlin = [520] - 0.25 \* Cyt c, and the quadratic ECS (ECSquad) was calculated as ECSquad = [554] + 0.15 \* Cyt c.

*Flash-induced ECS kinetics.* The ECS kinetics following a single turnover of both photosystems were measured using a 6 ns saturating laser flash provided by a dye laser at 690 nm. Then the kinetics of flash-induced ECS and cytochromes redox changes were calculated using the deconvolution procedure described above. The linear ECS signal at the first point (measured shortly -150  $\mu$ s- after the flash) provides the contribution to the electric field of 1 charge separation per photosystem (used for normalization, see below).

*Photochemical rates.* The photochemical rate (rate at which PSI and PSII perform charge separations) was calculated from ECS measurements as described in (Bailleul et al., 2010). The slope of ECS was measured for the first 5 ms after light offset and then normalized by the laser flash induced ECS increase, providing an expression of the photochemical rate in charge separations per photosystem per second (charge sep. PS<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Like for ETR<sub>PSII</sub> and ETR<sub>PSI</sub>, data were normalized to the maximal value in the control at 800 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Fig 2B).

#### Flow-cytometric (FCM) measurements

The *A. minutum* filtrate (from a culture at 20 000  $\pm$  2 000 cells.ml<sup>-1</sup>) used for flow cytometry was checked for photosynthesis measurements in parallel, to ensure that all experiments were were made in the same conditions of inhibition and ensure reproductible results. For FCM measurements, cultures of *C. muelleri* were diluted 10 times with their own filtrate to reach a final concentration around 200 000 cells/mL.

*Cytoplasmic membrane potential.* Modifications of the cytoplasmic membrane potential were assessed using an EasyCyte Plus cytometer (Guava Technologies, Millipore, Billerica, MA) equipped with a 488-nm argon laser and three fluorescence detectors: green (525 nm, 30 nm bandwidth), yellow (583/26 nm), and red (680/30 nm). To estimate the relative depolarization of cytoplasmic membranes, cells were stained with Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol, DiBAC4(3) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 10 min at a final concentration of 0.97  $\mu$ M. DiBAC4(3) is a fluorescent probe emitting at 516 nm that can enter cells with depolarized cytoplasmic membranes (Seoane et al., 2017). Once inside the cells,

DiBAC<sub>4</sub>(3) binds to intracellular proteins and membranes. The amount of protein-bound DiBAC<sub>4</sub>(3) is dependent on the cytoplasmic membrane potential (Bräuner et al., 1984). Cells with an increased depolarization (increase in the membrane potential toward a total depletion of potential) of their cytoplasmic membrane exhibit an increase in their internal fluorescence (i.e. proportional to the accumulation of dye within the cell). To obtain a positive control (cells with depolarized membranes), *C. muelleri* cell membranes were depolarized with digitonin (30min incubation, final concentration of 40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), a weak non-ionic detergent (Prado et al., 2012). The relative depolarization of membranes was expressed as the mean fluorescence value of the cell population. After checking the homoscedasticity and the normality of data, the significant differences in the DiBAC<sub>4</sub>(3) fluorescence between *C. muelleri* from the control or exposed to the filtrate, for 10 min or 30 min, were compared with a Student t-test.

Membrane permeability. Measurements of membrane permeability were performed on the FACSCalibur flow cytometer. To assess the membrane permeability, samples were stained with SYTOXGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for at least 10 min at a final concentration of 0.05  $\mu$ M (Koppel et al., 2017). SYTOXGreen is a fluorescent probe (523 nm) that cannot cross cell membranes unless membrane integrity is compromised. Once inside the cell, the probe binds to DNA and forms a fluorescent dye. Thus, only cells that lost their membrane integrity (i.e. became permeable) become fluorescent. Membrane permeabilization was thus expressed as the percentage of fluorescent cells. After checking for homoscedasticity and normality of data, the significant differences in the percentage of cells permeable to SYTOXGreen between *C. muelleri* from the control or exposed to the filtrate, after 10 min or 30 min were compared with a Student t-test.

### **Results and discussion**

#### An inhibition of photosynthetic activity in steady state illumination

In order to assess the effect of *A. minutum* filtrate on the photosynthetic activity of *C. muelleri*, we first measured the overall activity of photosynthesis at different irradiances. This was done by using the electro-chromic shift (ECS) of photosynthetic pigments (Witt, 1979). In *C. muelleri*, like in other diatoms (Bailleul et al., 2015) and pinguiophytes (Berne et al., 2018), the

ECS is the sum of a linear and a quadratic component, which have been deconvoluted as described in the Methods section (Fig 1).



Figure 1: Deconvolution of the linear and quadratic ECS contributions in Chaetoceros muelleri, treated with  $100\mu M$  CCCP (see Methods). Left panel: Relaxation of the absorption changes (AI/I) induced by a saturating pulse of light, at different wavelengths. Lines are extrapolation of the experimental points by a sum of two exponentials (see Methods). Middle panel: the linear and quadratic ECS spectra are obtained from the amplitudes of the two exponentials in the extrapolation shown in the left panel (see Methods). Right panel: Absorption changes at 563 nm (where only quadratic ECS contributes, see middle panel) is plotted as a function of the absorption change at 520 nm (where only linear ECS contributes, see middle panel). The experimental points are fitted by a quadratic function (red line), which validates the deconvolution procedure.

The linear ECS is proportional to the electric field generated by the photosynthetic process and can be used to measure the overall photosynthetic activity (Bailleul et al, 2010). Briefly, under steady-state illumination, the ECS signal results from positive contributions to the transmembrane potential from PSII, the cytochrome b<sub>6</sub>f complex and PSI (which translocate protons from the stroma to the lumen, increasing the electric field) as well as the negative one by the chloroplastic ATP synthase (moving protons out of the lumen). Because only PSI and PSII use light as a substrate, the change of slope of the ECS at the offset of a steady-state light (Figure 2A) is a direct measurement of the photochemical rate, i.e. the rate at which PSI and PSII were performing charge separations under illumination. In the control, the photochemical rate increased with light irradiance (Figure 2B), as expected, and did not reach saturation at 800 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The fact that photosynthesis was not yet fully saturated at such a high photon flux stems from the wavelength of the red actinic light used, chosen to correspond to the minimum of absorption in diatoms to ensure a homogeneous light condition in the cuvette. In the presence of A. minutum filtrate, the slope of the ECS at the offset of a steady-state light was drastically reduced (Figure 2A), resulting in an almost full inhibition of C. muelleri photochemical rates at all light intensities (Figure 2B).



Figure 2: Effect of A. minutum supernatant on the overall photosynthesis activity. A) Linear ECS changes at the offset of steady state illumination in the absence (black dots/lines) and presence (red dots/lines) of A. minutum filtrate. White bar represents the light phase (here, 800 µmol photons  $m^{-2} s^{-1}$ ), dark bar the period of darkness. The arc of circles represents the change of slope at the light offset. B. Light dependency of photochemical rates of C. muelleri with (red dots/lines) or without (black dots/lines) A. minutum filtrate. Data were normalized to the maximal value at 800 µmol photons  $m^{-2} s^{-1}$  (see Methods). Results are expressed in relative unit (r.u.). Error bars represent standard deviation (n = 4).

The very strong inhibition of the photochemical rate by the filtrate of A. minutum suggests that both the activities of the linear electron flow (from water to PSI acceptors) and the cyclic electron flow around PSI (Shikanai, 2007), a process whose extent is still under debate in diatoms (Falciatore et al, 2019) are suppressed by the allelochemicals of A. minutum. To further confirm this hypothesis, we measured the activities of PSII and PSI in the diatom (Figure 3) under the same illumination conditions. The activity of PSII should reflect the efficiency of the linear process only, whereas PSI activity is the sum of the linear and cyclic pathways. The quantum yield of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) was measured with fluorescence spectroscopy and the quantum yield of PSI (ΦPSI) with P700 absorption measurements (Fig 3 A/B). As expected, both the quantum yields of PSII (Figure 3C) and PSI (Figure 3D) decreased with light irradiance in the control sample. However, at all light irradiances, the quantum yields of both photosystems were significantly lower in the presence of A. minutum filtrate (Figures 3C and 3D). In the control, the dependence of the electron transfer rate through PSII (ETR<sub>PSII</sub>) upon light irradiance was very similar to the one of the photochemical rate (Figure 3E). The filtrate of A. minutum almost fully inhibited ETR<sub>PSII</sub>, which confirms that it hampers the linear electron flow. PSI electron flow rates (ETR<sub>PSI</sub>) were also almost fully suppressed in the presence of filtrate of A. minutum



allelochemicals (Figure 3F). This confirms that both linear and cyclic electron flow rates are very low in the presence of *A. minutum* filtrate.

Figure 3: Effects of A. minutum filtrate on the activity of PSII (A, C, E) and PSI (B, D, F) of C. muelleri. Dark: control, red: in the presence of A. minutum filtrate. A/B: The fluorescence and P700 measurements for the calculation of PSII (A) and PSI (B) quantum yields (see Methods for explanations of the different parameters). In panel B, the dashed lines and rectangles show the absorption changes in the control with DCMU. Data in panels A and B were obtained under 340 µmol photons  $m^{-2} s^{-1}$  actinic light. C/D: Light dependencies of the quantum yields of PSII (C) and PSI (D). E/F: Light dependency of the electron transfer rates through PSII (ETR<sub>PSII</sub>, E) and through PSI (ETR<sub>PSI</sub>, F). Results are normalized to the value at the highest intensity (see Methods). Error bars represent standard deviation (n = 3 for the right panels (B, D, F), n-6 for the left panels (A, C, E)).
#### The first target of A. minutum is a non-photochemical step of photosynthesis.

Such a complete suppression of photosynthetic activity under steady state illumination could be due to the specific inhibition of any of the photosynthetic steps, i.e. at the level of photosynthetic complexes (PSII, PSI, cytochrome b<sub>6</sub>f, ATPase), or an impairment of the diffusion of the electron carriers transferring electrons from one photosynthetic complex to another (e.g. plastoquinones or cytochrome c6) or an inhibition of the Calvin-Benson-Bassham cycle. One could imagine that the photosystems themselves are inhibited by the allelochemicals. Indeed, an inhibition of the maximal quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) was shown to occur within 30 minutes in these conditions (Long et al., 2018b) and this inhibition was even proposed as a bioassay for these allelopathic interactions (Long et al., 2018a). In agreement with that, we observed a strong inhibition of both PSII and PSI activities at the end of the measurements, in the exposed samples only. The  $F_v/F_m$  decreased by ~50 % and the total amount of photooxidizable P700 ( $P_{max}$ ) decreased by ~75 % at the end of the experiment (Sup Fig. 1). However, neither PSI nor PSII activities were inhibited at the beginning of the experiment (highlighted by the similar yields of PSII and PSI in the dark in absence or presence of A. minutum filtrate; Figure 3C/D), whereas the inhibition of the photosynthetic activity in the light occurred immediately, from the first light step, as observed for the photochemical rate, ETRPSII or ETRPSI (Fig 3 E/F). In order to confirm that the suppression of the photosynthetic activity was not due to photosystems inhibition, we performed another experiment to measure the quantum yield of both PSI and PSII in the dark and in moderate light, with the two measurements performed in close succession. This experiment showed that the activities of both PSI and PSII in the presence of light were already suppressed in the presence of A. minutum filtrate (Fig 4A) in conditions where PSI and PSII integrity (maximal efficiencies) were unaffected (Fig 4B), demonstrating that the A. minutum filtrate inhibits photosynthetic activity by targeting a nonphotochemical step first.



Figure 4: Short-term effect of A. minutum supernatant on the PSI and PSII activities of C. muelleri. A: The quantum yields of PSII and PSI, as well as the donor-side (Y(ND)) and acceptor-side (Y(NA)) limitations are shown for the control (white bars) and in the presence of A. minutum filtrate (red bars), with (hatched) and without (plain) the PSI acceptor methylviologen (1mM). All experiments were performed at 340 µmol photons  $m^2 s^{-1}$  actinic light. Error bars represent standard deviation (n = 3). B:  $F_vF_m$  for the control (black dots/lines) and filtrate (red dots/lines) exposed samples were  $0.66 \pm 0.02$  and  $0.69 \pm 0.03$ , respectively. A saturating pulse (white rectangle) is applied on dark-adapted (black rectangle) samples to measure  $F_vF_m$ . Results are normalized to the Fm.

#### The photosynthetic inhibition occurs between PSII and PSI.

Our results lead to two possibilities: the allelochemicals affect the electron transfer from PSII to PSI or the electron transfer downhill PSI. More specifically, the two possibilities are (i) the electron transfer from  $Q_{\Lambda}$ , the first quinone acceptor in PSII, to P700 at the PSI level (this part of the photosynthetic chain is usually referred to as the donor side of PSI), or (ii) the electron transfer from ferredoxins to the carbon fixation in the Calvin Benson-Bassham cycle and other alternative pathways (acceptor side of PSI). To distinguish between these two possibilities, we first measured the acceptor (Y(NA)) and donor (Y(ND)) side limitation of PSI (see Methods) under the same illumination. The data clearly show that the decrease of PSI quantum yield  $(\Phi_{PSI})$  is due to an increase in the donor side limitation in the treated sample (Figure 4A). In other terms, a lower proportion of PSI centers is open (and participating to electron transfer) because of a higher percentage of oxidized P700 in the light ( $P700^+$ ,  $\sim 70\%$  in the treated sample vs ~20% in the control). This indicates that the inhibition occurs between PSII and PSI, and not on the acceptor side of PSI. To further confirm this, we used the artificial PSI electron acceptor, methylviologen (MV, or paraquat), which releases acceptor side limitation by providing an efficient sink to electrons from PSI. In agreement with the Y(ND) and Y(NA) measurements, the addition of 1 mM MV did not modify the activities of PSII or PSI, neither in the control nor in the treated sample (Figure 4A). Together, these results indicate that the first site of inhibition of the photosynthetic electron transfer chain takes place between  $Q_A$  and P700.

# A. minutum first photosynthetic target is the thylakoid membrane (electron transfer from PSII to b6f)

To determine the primary target of the unknown secondary metabolite(s) produced by *A. minutum*, we used the ECS kinetics following a saturating laser flash, because ECS can probe the activity of each photosynthetic complex (PSI, PSII,  $b_6f$ , ATPase). Indeed, photosystems and cytochrome  $b_6f$  participate to the generation of the electric field, whereas ATPase consumes it by releasing protons from the lumen to the stroma. We also measured the redox changes of the c-type cytochromes (cytochrome *f* and cytochrome  $c_6$ ) as described in Methods. The results are shown in Figure 5 for diatom cells alone or 10 min after adding *A. minutum* filtrate. After a saturating laser flash, three distinct phases are typically observed (Joliot & Delosme, 1974).

i) Right after the flash (150  $\mu$ s) all photosystems I and II perform one (and only one) charge separation, increasing the electric field by as much ("a phase"). The similar "a phase" in control and exposed cells confirm that the photochemical events at PSII and PSI level are not the direct targets of the allelopathic compound (first time point after the flash, panel A). These charge separations correspond to the electron transfer from water to the Q<sub>A</sub> pocket in PSII and from P700 to ferredoxins at the PSI level. At the same time point, we observe an oxidation of the c-type cytochromes (cytochromes c<sub>6</sub> in the lumen and cytochrome *f*) which is similar in control and exposed cells (panel B). This means that regardless of the exposure to the filtrate or not, the transfer from c-type cytochromes to P700 is faster than 150  $\mu$ s.

The quadratic ECS increase right after the flash is difficult to interpret, as it depends on both the electric field generated by PSII and PSI charge separations and the preexisting electric field (Joliot and Joliot, 1979, Bailleul et al, 2010, Bailleul et al, 2015). However, theoretically, the ratio of the quadratic-to-linear ECS is a direct measurement of the pre-existing electric field, the electric component of the proton motive force (pmf) (Bailleul et al, 2010; Bailleul et al, 2015). This ratio is significantly reduced in the exposed cells, suggesting that the pmf in the dark is affected by *A. minutum* filtrate.

ii) The second phase ("b phase",  $\sim 10$  ms) corresponds to the electron transfer from plastoquinols to c-type cytochromes catalyzed by the cytochrome b<sub>6</sub>f. The filtrate

does not affect this phase, since the re-reduction of c-type cytochromes is not significantly modified by the filtrate. Because of the proton pumping activity of the cytochrome  $b_6 f$ , the "b phase" leads to a second rise of the electric field (Joliot & Delosme, 1974) but this phase is hidden by the fast activity of the ATPase here.

iii) The last phase of ECS kinetics ("c phase") corresponds to the consumption of the flash-induced pmf by the ATPase, resulting in the relaxation of the ECS. This phase does not seem to be affected by *A. minutum* filtrate.

Altogether, these results indicate that the electron transfer from plastoquinone to PSI acceptor side is not affected. Indeed, the normal "a phase" of ECS and the unaffected oxidation and reduction of c-type cytochromes reveal together a normal electron transfer from the plastoquinol in the  $Q_0$  pocket in the cytochrome  $b_6 f$  to P700, and from P700 to ferredoxins downhill PSI. At the same time, the absence of effect of the filtrate on the  $F_v/F_m$  means that the transfer of electrons from water to  $Q_A$  functions normally. At this stage, the results point to a limitation of the electron flow between the  $Q_B$  pocket in PSII and the  $Q_0$  pocket in  $b_6 f$ .



Figure 5. Kinetic of the linear ECS (left), c-type cytochromes oxidation (middle) and quadratic ECS (right) after a saturating laser flash. Dark: control diatom cells. Red: After 10 min of incubation with the filtrate of A. minutum. The linear and quadratic ECS and c-type cytochrome are calculated from absorption changes at 520, 554, 563 nm (see Methods). Error bars represent standard deviation (n = 4).

To confirm this, we measured the fluorescence induction and relaxation kinetics to get further insight into the mechanism of inhibition (see Methods). The protocol consists in the measurement of the  $F_0$  parameter in the dark, followed by 500 ms of low light illumination (fluorescence reaches  $F_{stat}$ ). Then a saturating pulse is applied ( $F_m$  is measured) and the kinetics of relaxation of the fluorescence is measured in subsequent darkness. The latter phase of

fluorescence relaxation (from Fm to F0) reflects the re-oxidation of QA, i.e. the electron transfer from this quinone pocket in PSII to the oxidized components of the ETC at the end of the saturating pulse, i.e. cofactors in the cytochrome  $b_6 f$ , cytochromes  $c_6$  or P700. The slowing down of this phase after exposition to the filtrate therefore confirms that the treatment with A. minutum supernatant impairs the electron transfer from QA to PSI donors (Fig 6A). The phase of fluorescence increase is more informative. When the light is turned on in the control, fluorescence increases in <100ms and reaches a steady state value before the saturating pulse is applied. In the presence of the filtrate, after a first increase which is similar to the one observed in the control, a second increase of fluorescence occurs in the 100 to 400 ms time range, which reflects an over-saturation of the ETC (Fig 6A). The kinetics of increase can be compared to the one of the control with DCMU (10  $\mu$ M), an inhibitor of Q<sub>B</sub> pocket of PSII, and DBMIB (0.5  $\mu$ M), an inhibitor of the cytochrome b<sub>6</sub>f. In both cases, a strong increase of the stationary fluorescence is observed, but the kinetics is different: in DCMU conditions, PSII can perform only one charge separation before  $Q_A$  is fully reduced and reaches  $F_m$  very fast, whereas in DBMIB conditions, QB and the whole plastoquinol pool must be reduced before QA becomes fully reduced and fluorescence reaches Fm with a slower kinetics. The comparison between the fluorescence induction curve in the presence of the filtrate and in the presence of DCMU indicate that the inhibition of photosynthesis is not at the QB level; the effect of the filtrate is closer to the one of DBMIB (Fig 6B). This experiment rules out the possibility that the inhibition step is in vicinity to PSII and therefore points to an inhibition at the level of the PQ pool.



Figure 6. Effect of A. minutum filtrate on C. muelleri fluorescence induction and relaxation curves. A: Fluorescence induction curve of C. muelleri control (black dots/lines) and in presence of A. minutum filtrate (red dots/lines). B: Fluorescence induction curve of C. muelleri in the presence of A. minutum filtrate (red dots/lines), with DCMU (10 $\mu$ M) (blue dots/lines) and DBMIB (0.5  $\mu$ M) (green dots/lines). Error bars correspond to the S.D (3 independent replicates).

Altogether, at short time of exposure (10 min) with *A. minutum* filtrate, we could show that PSII and PSI were fully functional (Figures 4) and that the electron transfer from  $Q_0$  in the  $b_0 f$  to ferredoxins was unaffected (Figures 5). Simultaneously, the overall photosynthetic activity (measured via three different techniques: fluorescence P700 or ECS measurements) was decreased by 80-90%. These results point to a primary target of *A. minutum* on the photosynthetic apparatus of *C. muelleri* at the level of the electron transfer between  $Q_B$  in PSII and  $Q_0$  in  $b_0 f$ , i.e. the diffusion of the plastoquinol/plastoquinone in the thylakoid membrane (or its docking to the cytochrome  $b_0 f$ ). This conclusion is in agreement with the kinetics of fluorescence rise at the onset of light, as well as the kinetics of re-oxidation of  $Q_A$ .

### A degradation of the whole photosynthetic apparatus is observed at longer incubation times

To get a more complete view of the time response of the photosynthetic apparatus to the exposure to *A. minutum* filtrate, we measured the flash-induced ECS and c-type cytochromes redox kinetics at different exposure times (10, 40 and 90 minutes), in parallel to photochemical rate measurements (Fig 7). In the control cells, the flash-induced ECS kinetics and the photochemical rate were the same at the three time points, which indicates that the overall photosynthetic characteristics and performance were constant over time. Again, after 10 min exposure, PSI and PSII activities (measured as the extent of the "a phase" of ECS, Fig 7C), the electron transfer from c-type cytochromes to ferredoxins (measured as the amount of c-type cytochromes oxidation, Fig 7B), the  $b_0 f$  activity (measured as the rate of the CS relaxation, Fig 7F) were not significantly modified by an exposure to *A. minutum* filtrate. However, the photochemical rate (Fig 7A) and the quadratic-to-linear ratio (used as a proxy of the extent of the dark pmf, Fig 7D) were already strongly reduced.

At longer times of exposure (40 and 90min), the photochemical rate (Fig 7A) and dark pmf remained lower in the treated cells, whereas the decrease of PSI and PSII efficiencies only appeared at longer times of incubation, in agreement with previous results based on fluorescence and P700 measurements (Sup Fig. 1). The b<sub>6</sub>f turnover rate also decreased with

time (Fig 7E). These results highlight an overall degradation of the photosynthetic apparatus (PSI, PSII,  $b_{6}f$ ) as time of exposure increases.



Fig. 7. Effect of the filtrate of A. minutum on photosynthetic complexes and overall photosynthesis at different times of exposure (10, 40 and 90 minutes). Black: control. Red: cells treated with the filtrate of A. minutum. A: photochemical rate measured after 3 minutes illumination at 800 µmol photons  $m^2 s^{-1}$ . B/E: oxidation (B) and rereduction (E) of c-type cytochromes. D: ratio of the quadratic-to-linear ECS increase 150 µs after the saturating laser flash. C/F: fast rise (a phase, 150 µs after the saturating laser flash, C) and decay (c phase, C) of linear ECS. The linear and quadratic ECS and c-type cytochrome oxidation are calculated from absorption changes at 520, 554, 563 nm (see Methods). The ECS and c-type cytochromes signals become too small after 90 minutes exposure to allow measurements of the quadratic-to-linear ECS, or  $b_{cf}$  and ATPase kinetic constants. Error bars represent standard deviation (n = 3-5).

#### A modification of membranes?

The inhibition of the electron transfer chain is due to a problem in the quinone-mediated electron transfer between  $Q_B$  to the quinone-binding site  $Q_O$  in the cytochrome  $b_{6f}$  in the thylakoid membrane. Given that allelochemicals from A. tamarense cause the disruption of membranes that leads to lytic activity (Ma et al., 2011), we wondered if such a disruption of membranes could take place with A. minutum allelochemicals. In other words, are A. minutum allelochemicals perturbating all cellular membranes? Flow-cytometry analysis revealed that A. minutum filtrate induced a strong depolarization of cytoplasmic membranes of more than 95% of C. muelleri cells within only 10 min (Figures 8A). Only metabolically active cells with no damages to membranes can maintain a normal membrane potential (Jepras et al., 1997; Prado et al., 2012). Depolarization of membranes can originate from membrane permeabilization or from an inhibition of the energy metabolism. Simultaneously, a significant increase in the percentage of cells with permeable cytoplasmic membranes as compared to the control could be observed (Figure 8B). This strongly suggests that the depolarization of membranes represents an early signal of membrane disruption as the uncoupling agent eliminates the proton gradient. This is later confirmed by the strong increase in the percentage of cells with permeable membranes after 30 minutes of exposure (Figure 8B).



Figure 8: Effect of A. minutum filtrate on C. muelleri cytoplasmic membranes. A) Variation in the proportion of cells with a depolarized membrane after 10 min of exposure to the filtrate (labelled with  $DiBAC_4(3)$ ). B) Variation in the proportion of cells with a permeable membrane after 10 and 30 min of exposure to the filtrate (labelled with SYTOXGreen). Cells in the control are shown in dark grey and cells in the presence of A. minutum filtrate are shown in light grey. \*\*\* indicate a level of significance < 0.001. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error (n = 3).

In agreement with the mode of action of *A. tamarense* allelochemicals on other protists (Ma et al., 2011), allelochemicals from *A. minutum* induce a disruption of membrane of the diatom *C. muelleri*. It is hypothesized that allelochemicals disrupt the cytoplasmic membranes, first inducing a depolarization of membranes that eventually leads to a permeabilization of cytoplasmic membrane (Figure 8B). Such a disruption and permeabilization of membranes could have side-effects on photosynthesis.

### **Conclusion-discussion**

This study reveals that the (thylakoid and cytoplasmic) membranes are the really first physiological targets of allelochemicals from the dinoflagellate *A. minutum*. We could distinguish two phases, allowing us to identify "primary" targets from the side effects of filtrate exposure, and to hypothesize the cascades of events occurring within the different membranes of *C. muelleri*.

In the first phase (within the first 10 min), a general depolarization of cytoplasmic membranes and permeabilization of external membranes from few cells was induced concomitantly with an inhibition of electron flow between PSII and  $b_6 f$ . The electric field across thylakoids in the dark-adapted diatoms was also strongly reduced, indicating that the pmf in the dark collapsed. This can be due to an inhibition of mitochondrial respiration or to an uncoupling effect of the secondary metabolites that affect mitochondria, the chloroplast, or both.

After longer times of exposure, the membranes of *C. muelleri* seemed to become much more affected by *A. minutum* allelochemicals. Cytoplasmic membranes appeared more permeable, suggesting that the loss of membrane polarization could be attributed to small pores in the membranes that became larger or more numerous with longer exposure time. Meanwhile, in the photosynthetic membranes, strong inhibitions of PSI and PSII, and the slowed-down turnover of the cytochrome  $b_6 f$  occurred. It also highlights that, while PSII can be probed to measure allelochemical potency (Long et al, 2018), it is not a specific target. These alterations of photosynthetic complexes may be a consequence of the dysfunction of the diffusion of the quinones between  $Q_B$  and cytochrome  $b_6 f$ , leading to the suppression of the photosynthetic rate. The overall deleterious effects on the photosynthetic apparatus induced photoprotection mechanisms previously measured in *C. muelleri* exposed to *A. minutum* filtrate (Long et al., 2018b). These defense mechanisms are, however, likely insufficient to counteract the severe

damages to the membranes. Furthermore, how allelochemicals interact with photosynthetic membranes remains unclear. Do allelochemicals target the photosynthetic membranes or does the loss of membrane permeability induce indirect effects that could affect homeostasis or trigger programmed cell death? One interesting hypothesis that we would like to propose is that the allelochemical activity resemble to microbial peptide activity. Indeed, the three main consequences of the allelochemicals were i) the disruption of cytoplasmic membranes, ii) the decrease of the plastoquinone diffusion and ii) to suppress the electric component of the proton motive force in the dark-adapted cells, which are three effects that can be induced by antimicrobial peptides (Heath et al., 2018; Brogden et al., 2005). While we could not find any reference of antimicrobial peptides production by dinoflagellates, some dinoflagellates are known to produce other pore-forming compounds such as amphidinols or karlotoxins (Iwamoto et al., 2017; Adolf et al., 2006). The nature of allelochemicals of *A. minutum* still eludes us, but our results bring new clue on their potential characteristics.

Membranes being the first targets for *A. minutum* allelochemicals, the study of their biochemical composition is essential. Membrane biochemical composition varies greatly among eukaryotes, we can thus hypothesize that the biochemical composition of membranes might drive, at least partially, the tolerance of cells to *A. minutum* allelochemicals. The composition of membranes was already suggested to be an important factor for allelochemical interactions (Morsy et al., 2008a, Ma et al., 2011) and a better knowledge must help to predict the plankton communities affected by allelochemical interactions.

Overall, this study also highlights promising tools for the study of allelochemical interactions. Indeed, in depths study of photosynthesis do not only allow a fine understanding of toxicity mechanisms but can also provide new insights for microalgal interactions. The use of electrochromic shift (ECS), which displays different spectral signatures in different photosynthetic clades, potentially allows for the extraction of photosynthetic responses in a complex species assembly. Photosynthetic activities of different clades could therefore be assessed in a mixture, allowing to measure allelopathic interactions in a more "natural way" without artificially separating species with filters. The use of electrochromic shift (ECS) thus appears particularly interesting in the study of photosynthesis during microalgal interactions, especially in field studies.

#### Acknowledgments

This study was carried out with the financial support of the Centre National de la Recherche Scientifique, Sorbonne Université, the Région Bretagne, the University of Wollongong and the GDR Phycotox. ML, CGF and HH acknowledge support from the National Research Agency (ANR) "ACCUTOX" project 13-CESA-0019 (2013–2017). AP and BB were supported by the Europen Research Council (ERC) PhotoPHYTOMICS project (Starting Grant agreement N° 715579). AP had financial support from the French Ministry of Education.

#### References

Adolf, J. E., Bachvaroff, T. R., Krupatkina, D. N., Nonogaki, H., Brown, P. J. P., Lewitus, A. J., ... & Place, A. R. (2006). Species specificity and potential roles of Karlodinium micrum toxin. *African Journal of Marine Science*, *28*(2), 415-419.

Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroutsos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., Villanova, V., Bligny, R., Flori, S., Falconet, D., Krieger-Liszkay, A., Santabarbara, S., Rappaport, F., Joliot, P., Tirichine, L., Falkowski, P.G., Cardol, P., Bowler, C., Finazzi, G., 2015. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO 2 assimilation in diatoms. Nature 524, 366–369. doi:10.1038/nature14599

Bailleul, B., Cardol, P., Breyton, C., Finazzi, G., 2010. Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis. Photosynth. Res. 106, 179–189. doi:10.1007/s11120-010-9579-z

Berne, N., Fabryova, T., Istaz, B., Cardol, P., Bailleul, B., 2018. BBA - Bioenergetics The peculiar NPQ regulation in the stramenopile Phaeomonas sp. challenges the xanthophyll cycle dogma. BBA - Bioenerg. 1859, 491–500. doi:10.1016/j.bbabio.2018.03.013

Borcier, E., Morvezen, R., Boudry, P., Miner, P., Charrier, G., Laroche, J., Hegaret, H., 2017. Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus*. Aquat. Toxicol. 184, 142–154. doi:10.1016/j.aquatox.2017.01.009

Bräuner, T., Hülser, D.F., Strasser, R.J., 1984. Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 771, 208–216. doi:10.1016/0005-2736(84)90535-2

Chapelle, A., Le Bec, C., Le Gac, M., Labry, C., Amzil, Z., Guillou, L., Dreanno, C., Klouch, K., Siano, R., Pineau, L., Savar, V., Destombe, C., Dia, A., Lazure, P., Petton, S., Plus, M., Le Brun, L., Abernot, C., Duval, A., Doner, A., Gouriou, J., Gal, D. Le, Caradec, F., Andrieux, F., Malestroit, P., 2015a. Étude sur la prolifération de la microalgue *Alexandrium minutum* en rade de Brest 61.

Chen, J., Ye, Q., Gu, H.-F., Li, H.-Y., Lv, S.-H., Liu, J.-S., Yang, W.-D., 2015. Variability in the allelopathic action of the *Alexandrium tamarense* species complex along the coast of China. Harmful Algae 47, 17–26. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2015.05.008

Joliot, Pierre, and Rene Delosme. "Flash-induced 519 nm absorption change in green algae." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 357.2 (1974): 267-284.

Falciatore, Angela, et al. "Diatom Molecular Research Comes of Age: Model Species for Studying Phytoplankton Biology and Diversity." *The Plant Cell* (2019).

Flores, H.S., Wikfors, G.H., Dam, H.G., 2012. Reactive oxygen species are linked to the toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium* spp. to protists. Aquat. Microb. Ecol. 66, 199–209. doi:10.3354/amc01570

Gantar, M., Berry, J.P., Thomas, S., Wang, M., Perez, R., Rein, K.S., 2008. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. FEMS Microbiol. Ecol. 64, 55–64. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00439.x

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 990, 87–92. doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9

Guillard, R. R. L., and P. E. Hargraves. "Stichochrysis immobilis is a diatom, not a chrysophyte." *Phycologia* 32.3 (1993): 234-236.

Hagmann, L., Jiittner, F., 1996. Fischerellin A, a Novel Photosystem-Il-inhibiting Allelochemical of the Cyanobacterium *Fischerella muscicola* with Antifungal and Herbicidal Activity 37, 6539–6542.

Hakanen, P., Suikkanen, S., Kremp, A., 2014. Allelopathic activity of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: Intra-population variability and response of co-occurring dinoflagellates. Harmful Algae 39, 287–294. doi:10.1016/j.hal.2014.08.005

Iwamoto, M., Sumino, A., Shimada, E., Kinoshita, M., Matsumori, N., & Oiki, S. (2017). Channel formation and membrane deformation via sterol-aided polymorphism of amphidinol 3. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

Jepras, R.I., Paul, F.E., Pearson, S.C., Wilkinson, M.J., Pharmaceuticals, S.B., Frontiers, N., Park, S., Cm, E., Kingdom, U., 1997. Rapid Assessment of Antibiotic Effects on *Escherichia coli* by Flow Cytometry. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2001–2005.

Joliot, P., & Joliot, A. (1979). Comparative study of the fluorescence yield and of the C550 absorption change at room temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 546(1), 93-105.

Klughammer, C., Schreiber, U., 2008. Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I. PAM Appl. Notes 11–14.

Koppel, D.J., Gissi, F., Adams, M.S., King, C.K., Jolley, D.F., 2017. Chronic toxicity of five metals to the polar marine microalga *Cryothecomonas armigera* – Application of a new bioassay. Environ. Pollut. 228, 211–221. doi:10.1016/j.envpol.2017.05.034

Lelong, A., Haberkorn, H., Le Goïc, N., Hégaret, H., Soudant, P., 2011. A new insight into allelopathic effects of *Alexandrium minutum* on photosynthesis and respiration of the diatom *Chaetoceros neogracile* revealed by photosynthetic-performance analysis and flow cytometry. Microb. Ecol. 62, 919–930. doi:10.1007/s00248-011-9889-5

Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Lambert, C., Le Grand, F., Sarthou, G., Jolley, D., Hégaret, H., 2018a. A rapid quantitative fluorescence-based bioassay to study allelochemical interactions from *Alexandrium minutum*. Environ. Pollut. 1–8. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.119

Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Le Grand, F., Donval, A., Lambert, C., Sarthou, G., Jolley, D.F., Hégaret, H., 2018b. Allelochemicals from *Alexandrium minutum* induce rapid inhibition and modify the membranes from *Chaetoceros muelleri*. Algal Res. 35, 508–518. doi:10.1016/j.algal.2018.09.023

Ma, H., Krock, B., Tillmann, U., Bickmeyer, U., Graeve, M., Cembella, A., 2011. Mode of action of membranedisruptive lytic compounds from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. Toxicon 58, 247–258. doi:10.1016/j.toxicon.2011.06.004

Ma, H., Krock, B., Tillmann, U., Cembella, A., 2009. Preliminary characterization of extracellular allelochemicals of the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* using a *Rhodomonas salina* bioassay. Mar. Drugs 7, 497–522. doi:10.3390/md7040497

Maric, D., Brussaard, C.P.D., Thyrhaug, R., Bratbak, G., Vaulot, D., 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 65, 45–52.

Morel, F.M.M., Rueter, J.G., Anderson, D.M., Guillard, R.R.L., 1979. Aquil: a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal tudies. J. Phycol. doi:10.1111/j.1529-8817.1979.tb02976.x

Morsy, N., Konoki, K., Houdai, T., Matsumori, N., Oishi, T., Murata, M., & Aimoto, S. (2008). Roles of integral protein in membrane permeabilization by amphidinols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(6), 1453-1459.

Paul, C., Barofsky, A., Vidoudez, C., Pohnert, G., 2009. Diatom exudates influence metabolism and cell growth of co-cultured diatom species. Mar. Ecol. Prog. Ser. 389, 61–70. doi:10.3354/meps08162

Poulin, R.X., Hogan, S., Poulson-ellestad, K.L., Brown, E., 2018. *Karenia brevis* allelopathy compromises the lipidome, membrane integrity, and photosynthesis of competitors. Sci. Rep. 1–9. doi:10.1038/s41598-018-27845-9

Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2012. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. Ecotoxicol. Environ. Saf. 86, 219–226. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.09.015

Prince, E.K., Myers, T.L., Kubanek, J., 2008. Effects of harmful algal blooms on competitors: Allelopathic mechanisms of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. Limnol. Occanogr. 53, 531–541. doi:10.4319/lo.2008.53.2.0531

Pushparaj, B., Pelosi, E., Jüttner, F., 1998. Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. J. Appl. Phycol. 10, 527–530. doi:10.1023/A:1008080615337

Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2017. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. Chemosphere 171, 339–347. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.097

Shikanai, Toshiharu. "Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches." *Annu. Rev. Plant Biol.* 58 (2007): 199-217.

Suikkanen, S., Hakanen, P., Spilling, K., Kremp, A., 2011. Allelopathic effects of Baltic Sea spring bloom dinoflagellates on co-occurring phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 439, 45–55. doi:10.3354/meps09356

Ternon, E., Pavaux, A.S., Marro, S., Thomas, O.P., Leméc, R., 2018. Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and a co-occurring diatom. Harmful Algae 75, 35–44. doi:10.1016/j.hal.2018.04.003

Tillmann, U., Hansen, P.J., 2009. Allelopathic effects of *Alexandrium tamarense* on other algae: Evidence from mixed growth experiments. Aquat. Microb. Ecol. 57, 101–112. doi:10.3354/ame01329

Tillmann, U., John, U., 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. Mar. Ecol. Prog. Ser. 230, 47–58. doi:10.3354/meps230047

Tillmann, U., John, U., Cembella, A., 2007. On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. J. Plankton Res. 29, 527–543. doi:10.1093/plankt/fbm034

Witt, H.T., 1979. Energy conversion in the functionnal membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. Biochim. Biophys. Acta 505, 355–427.



Sup Fig. 1: (A) Fluorescence of C. muelleri exposed to A. minutum filtrate where a saturating pulse is applied immediately after exposure, after 15 min of dark exposure and after 2 hours of light treatments. (B) Relative amount of P700 photo-oxidizable in absence (black dots/lines) and presence (red dots/lines) of A. minutum filtrate given by the change in  $\Delta I/I$  under different light conditions. Results are expressed in relative unit (r.u.).

## Discussion

Les composés allélochimiques produits par les espèces du genre Alexandrium affectent la physiologie des protistes de plusieurs façons : inhibition de la croissance, inhibition de l'activité du PSII, dommages membranaires ou lyse cellulaire. Mais le mécanisme de l'interaction allélopathique, la nature du composé allélochimique ainsi que sa cible exacte sur les diatomées reste encore inconnue. Nous avons choisi dans cette étude de travailler avec un couple de microalgues qui co-existe dans la nature et pour lequel l'interaction allélopathique avait déjà été démontrée, le dinoflagellé A. minutum et la diatomée C. muelleri (Lelong et al., 2011 ; Long et al., 2018a). Notre étude est la première à mesurer simultanément l'effet du filtrat d'A. minutum sur la photosynthèse (par spectroscopie de fluorescence et d'absorption) et sur la membrane cytoplasmique (par cytométrie en flux) de C. muelleri au cours des premiers instants de l'effet allélopathique. Nous avons pu montrer que le PSII n'est pas une cible première des composés allélochimiques, mais un effet indirect de l'inhibition de l'activité photosynthétique et de la dégradation des thylacoïdes à moyen terme. Les premiers effets induits par le filtrat d'A. minutum, mesurés après 10 minutes d'incubation, s'avèrent être (i) une inhibition du transfert d'électron photosynthétique entre le PSII et le PSI, probablement au niveau du transfert médié par les plastoquinones, (ii) une diminution du gradient électrochimique de protons dans le noir, et (iii) une dépolarisation des membranes plasmiques. A temps plus long, et probablement comme conséquences des effets premiers, nous avons observé une perméabilisation des membranes plasmiques, une baisse des rendements maximum des deux photosystèmes et une dégradation générale de l'appareil photosynthétique.

Certains points méritent des éclaircissements et les résultats obtenus font apparaître plusieurs questions. La discussion s'articulera autour de 5 parties : (1) pourquoi le gradient électrochimique de proton dans le noir diminue chez *C. muelleri* en réponse au filtrat d'*A. minutum* ? (2) Quelle est le mode d'action du filtrat d'*A. minutum* sur les membranes de *C. muelleri* ? (3) Quelle est le lien entre l'effet du filtrat sur les membranes cytoplasmiques et l'inhibition de la photosynthèse ? (4) Quelle est la nature du composé allélochimique libéré par *Alexandrium* ? (5) Ces interaction allélopathiques sont-elles susceptibles de prendre place dans le milieu naturel ?

# I. Comment les composés allélochimiques d'*A. minutum* diminuent-t-il la pmf à l'obscurité chez *C. muelleri* ?

Nous avons vu (Discussion du Chapitre 1, section 1) qu'une pmf à travers les membranes des thylacoïdes était présente dans le noir et liée à l'activité respiratoire chez les diatomées (Figure 45, panneau A). Elle peut être mesurée, soit à travers le tracé du signal ECS quadratique en fonction du signal ECS linéaire (parabole) ou par le ratio des signaux quadratique et linéaire après un flash laser saturant. Comme nous avons vu dans le chapitre précédent, les deux méthodes donnent, au moins qualitativement, le même résultat et c'est la deuxième méthode, plus simple, que nous avons utilisée dans cette étude. La baisse significative de l'ECS quadratique (mais pas de l'ECS linéaire) après un flash saturant en présence du filtrat d'A.minutum (Figure 5 du manuscrit) indique que la composante électrique de la pmf diminue fortement chez la diatomée en présence d'A.minutum (Figure 7 du manuscrit). Ici, contrairement à ce qui avait été observé avec les quinolones, la respiration de C. muelleri en présence du filtrat d'A. minutum semble inchangée après 60 min d'incubation (Lelong et al., 2011). Comment expliquer la diminution de la pmf générée dans le noir chez C. muelleri par le filtrat d'A. minutum? Différents scenarios permettent d'expliquer la diminution de la pmf généré à travers les membranes des thylacoïdes de C. muelleri en présence du filtrat d'A. minutum :

Dans un premier scénario, l'effet serait extérieur au chloroplaste. La diminution de la pmf généré à travers les membranes des thylacoïdes serait due à une diminution de l'import d'ATP d'origine mitochondrial (Figure 45, panneau B). L'inhibition ou la diminution de la production d'ATP par la mitochondrie peut être due :

- à la perturbation des membranes mitochondriales par une molécule découplante (molécule qui perturberait les membranes de telle sorte à dissiper la pmf générée), il s'ensuit une dissipation de la pmf généré dans la mitochondrie avec augmentation de la vitesse de respiration (consommation d'oxygène), sans production d'ATP.
- à une inhibition de la respiration (transport d'électron dans la chaîne respiratoire), il n'y a plus de pmf généré dans la mitochondrie, donc plus de production d'ATP mitochondrial.

- ou à l'inhibition de l'ATP synthase mitochondriale qui va ralentir ou inhiber le transport d'électron dans la chaîne respiratoire et donc affecter la production d'ATP.
- même si la production d'ATP par la mitochondrie était inchangée, on peut imaginer que l'arrêt du transport d'ATP entre les deux organelles aurait lui aussi pour effet d'inhiber le pmf généré à travers le thylacoïde dans le noir.

Un deuxième scénario met en jeu un effet au niveau du chloroplaste (Figure 45, panneau C). La diminution de la pmf généré à travers les membranes des thylacoïdes dans le noir serait dû à l'effet d'une molécule découplante, c'est-à-dire une molécule qui perturbe les membranes chloroplastiques de telle sorte à dissiper la pmf (soit par la formation de pores soit en perturbant les membranes chloroplastiques).



Figure 45 : Gradient électrochimique de proton généré dans le noir dans le chloroplaste grâce à l'ATP mitochondrial (A) : contrôle. (B) Lorsque l'import d'ATP depuis la mitochondrie est empêché. (C) lorsqu'un effet découplant induit la dissipation du gradient électrochimique de proton du thylacoïde.

Pour distinguer entre ces deux différents scénarios, une indication nous vient de l'activité de l'ATP synthase chloroplastique, mesurée par la phase « c » de la cinétique de l'ECS après le flash saturant. Dans notre étude la phase c mesurée grâce à l'ECS linéaire chez *C. muelleri* semble inchangé à 10 min et aurait tendance à accélérer après 40 min d'incubation avec le filtrat d'*A. minutum*, mais nos barres d'erreur sont beaucoup trop grandes pour conclure avec certitude. L'accélération de la phase c irait dans le sens de la présence d'un découplant dans le filtrat d'*A. minutum* qui serait capable d'affecter les thylacoïdes, ce qui entrainerait la dissipation du pmf généré dans le noir dans le chloroplaste. Cependant, nos résultats ne permettent pas de répondre avec certitude sur l'activité exacte du composé allélochimique d'*A. minutum* sur le chloroplaste et les mitochondries de *C. muelleri* entrainant la diminution de la pmf généré dans le noir à travers les membranes des thylacoïdes. Pour y répondre, il faudrait :

- mesurer la respiration de *C. muelleri* après 10 min d'incubation avec le filtrat d'*A. minutum.* Une accélération de la consommation d'oxygène irait dans le sens d'un effet découplant dans la mitochondrie alors qu'une diminution de la production d'oxygène dans le sens d'une inhibition de la chaîne respiratoire où de l'ATP synthase mitochondriale.
- quantifier la diminution de la pmf généré dans le noir chez *C. muelleri* en présence du filtrat d'*A. minutum*, en utilisant le protocole éprouvé basé sur la relaxation des signaux quadratique et linéaire (parabole, Bailleul et al., 2015).
- 3) tester la présence d'un effet découplant sur les thylacoïdes. Pour cela, une approche possible serait de mesurer la relaxation du champ électrique (la phase c) dans des conditions où l'ATP synthase chloroplastique est inactive. Dans ces conditions une accélération de la dissipation du champ électrique généré par le flash ne serait due qu'à la présence de molécules capables de découpler la membrane du thylacoïde. Pour inhiber ou ralentir fortement l'activité de l'ATP synthase chloroplastique il est très courant de mettre les microalgues dans des conditions d'anaérobiose, ce qu'on obtient facilement en utilisant du glucose et une enzyme, la glucose oxydase, qui catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et en D-glucono-δ-lactone et consomme ainsi très rapidement l'O<sub>2</sub> présent dans l'échantillon.

# II. Quelles sont les effets de ces composés allélochimiques sur la membrane cytoplasmique ?

Certains composés allélochimiques encore inconnus produits par les espèces du genre Alexandrium ont la capacité de perturber les membranes cytoplasmiques et d'induire la lyse cellulaire de différents protistes (Tillmann et al., 2007a ; Tillmann et al., 2007b ; Ma et al., 2011; Fistarol et al., 2004; Tillmann & John 2002; Weissbach et al., 2010; Hansen, 1989). Comme discuté dans l'introduction de ce chapitre, les composés liberés par Alexandrium tamarense présentent une affinité pour certaines stéroles membranaires. De plus la présence de dinostérols sur ses membranes, qui sont des 4a-méthyl-stérols rappelle le mécanisme d'autoprotection du dinoflagellé K. veneficum (voir Introduction, section V.5) qui se protège de ces propres composés allélochimiques (les karlotoxines) par la présence dans sa membrane de gymnodinostérols et perturbent les membranes biologiques des autres microalgues dépourvues de gymnodinostérols (Deeds & Place, 2006). Les gymnodinostérols et les dinostérols, tous deux des 4a-méthyl-stérols, immuniseraient Alexandrium tamarense et K. veneficum de leurs propres composés lytiques, empêchant l'autolyse (Ma et al., 2011; Deeds & Place, 2006). Une augmentation de la concentration en stérols a été observée dans la membrane cytoplasmique de C. muelleri en réponse au filtrat d'A. minutum, probablement comme un moyen de défense en rigidifiant la membrane (Long et al., 2008). Il est par conséquent raisonnable de penser qu'il existe des similitudes entre les mécanismes à l'œuvre chez ces trois dinoflagellés. Chez K. veneficum, les composés lytiques forment des pores sur les membranes biologiques et augmentent leur perméabilité, ce qui provoque la lyse à plus long terme (Deeds & Place, 2006). De même, le filtrat d'A. tamarense induit la perméabilité de la membrane plasmique aux ions Ca<sup>2+</sup>, même quand les canaux Ca<sup>2+</sup> sont bloqués avec du cadmium. (Ma et al., 2011). Le même mécanisme pourrait être à l'œuvre chez A. minutum, qui expliquerait les résultats obtenus. Dans cette étude, nous avons mesuré les effets du filtrat d'A. minutum sur la membrane cytoplasmique de C. muelleri grâce à la cytométrie en flux. Deux sondes ont étés utilisées pour mesurer la polarité et la perméabilité des membranes plasmiques de C. muelleri : le DiBAC4(3) et le 189

SYTOX green (Koppel et al., 2017) respectivement. Les résultats montrent une dépolarisation de la membrane cytoplasmique dès 10 minutes d'incubation et une perméabilisation après 30 minutes. La formation de pores dans la membrane, de plus en plus larges ou nombreux, induiraient effectivement une dépolarisation de celle-ci et l'augmentation conséquente de la perméabilisation.

Nos résultats montrent une perméabilisation relativement faible à 10 minutes, qui n'augmente significativement qu'après 30 minutes. Cela suggère a priori que la perméabilisation de la membrane n'est pas le premier effet des molécules allélochimiques d'*A. minutum*. Il faut cependant prendre cette cinétique avec prudence. En effet, il existe un biais dans notre approche pour mesurer la perméabilité membranaire de *C. muelleri* ; la sonde utilisé SYTOX green ne traverse que des membranes très compromises, c'est-à-dire des membranes de cellules mortes. Il se peut donc que la perméabilité des membranes cytoplasmiques de *C. muelleri* soit sousestimée, et qu'elle soit déjà importante dès 10 minutes d'incubation.

# III. Quelle est le lien entre l'effet sur les membranes cytoplasmiques et l'inhibition de la photosynthèse ?

La perturbation des membranes plasmiques (dépolarisation et perméabilisation) de *C. muelleri* en présence du filtrat d'*A. minutum* est parallèle à l'inhibition de la photosynthèse, à la réoxydation plus lente des plastoquinols et à la diminution de la pmf générée à travers les membranes du thylacoïde. Dans cette étude nous n'avons pas réussi à faire le lien entre l'activité du filtrat sur la membrane cytoplasmique et l'inhibition rapide de la photosynthèse, ni à déterminer la cible moléculaire initiale du composé induisant tous ces phénotypes indirects.

Il semblerait que la membrane cytoplasmique n'est pas la seule à être perturbée par les composés allélochimiques produits par les espèces d'*Alexandrium*. Les membranes chloroplastiques et mitochondriales en seraient aussi la cible (Zheng et al., 2016). En effet, 24 hr de co-culture avec *Alexandrium tamarense* perturbe les membranes chloroplastiques et mitochondriales de *P. tricornutum* (Zheng et al., 2016). Cette perturbation se traduit par une rupture des membranes du chloroplaste, la détérioration des thylacoïdes et des crêtes 190

mitochondriales ainsi que la déformation de la mitochondrie (Figure 46) (Zheng et al., 2016). Il est possible que le même phénomène ait lieu dans l'interaction entre *A. minutum* et *C. muelleri*, auquel cas, cela pourrait indiquer que l'inhibition du transfert d'électrons au niveau du pool de PQ est due à une perturbation de la membrane thylacoïdienne concomitante avec celle de toutes les membranes cellulaires.

Une autre approche pour mieux cerner le lien entre les effets sur les membranes et l'inhibition de la photosynthèse serait d'améliorer notre capacité à saisir la dynamique de ces deux phénotypes. Mieux comprendre la cinétique des différents évènements aiderait à déterminer l'étape initiant la cascade de phénotypes observée. Cette étude est la première à montrer l'inhibition quasi-complète de l'activité photosynthétique de C. muelleri après seulement 10 min d'incubation avec le filtrat d'A. minutum, quand les études précédentes mesuraient l'effet du filtrat sur le Fv/Fm du PSII de C. muelleri uniquement (Lelong et al., 2018a). Il serait intéressant d'essayer de mesurer les différents paramètres photosynthétiques à des temps plus court, de l'ordre de la minute -cela est possible avec l'ECS et la fluorescence ainsi qu'avec la mesure de l'oxydoréduction de P700. Mesurer la perméabilité de la membrane cytoplasmique à des temps si courts d'incubation serait difficile mais il me semble que ce serait utile d'essayer d'optimiser le protocole basé sur la cytométrie en flux pour améliorer sa résolution temporelle. Peut-être A. minutum ne produit-il pas un composé allélochimique mais plusieurs ? Les phénotypes observés en photosynthèse et sur la membrane cytoplasmique peuvent résulter de l'effet de plusieurs molécules allélochimiques agissant sur plusieurs sites. Tester cette hypothèse nécessitera l'isolation des différentes molécules impliquées, ce qui n'a pas encore été possible jusqu'ici (voir section suivante).



Figure 46: Image représentant l'effet des composés allélochimiques *d'Alexandrium tamarense* sur les mitochonries et les membranes de *Phaeodactylum tricornutum*. Observation des plastes et mitochondries au sein des cellules de *Phaeodactilum tricornutum*, seul (panneau du haut) ou en co-culture pendant 24h avec *Alexandrium tamarense* (panneau du bas). N : Noyau Mt : Mitochondrie, Ch : chloroplaste V : vacuoles, En : endosome. D'après (Zheng et al., 2016).

# IV. Quelle est la nature du composé allélochimique libéré par *Alexandrium minutum* ?

Les composes allélochimiques responsables de l'activité allélopathique des espèces du genre *Alexandrium* n'ont pas encore été identifiés à ce jour. On sait par contre que les phycotoxines déjà connues comme les PST (Flores et al., 2012 ; Hakanen et al., 2014 ; Tillmann & John, 2002) et les spirolides (Tillmann et al., 2007) ne sont pas les agents responsables de l'activité allélopathique des espèces d'*Alexandrium*. On sait également que ces composés ont une forte activité mais sont fortement dilués dans le milieu. Afin de lever le voile sur la nature de ces composés allélochimiques, certaines études ont tenté de les isoler et de les caractériser chez *A. tamarense* (Ma et al., 2011 ; 2009 ; Flores et al., 2012 ; Zheng et al., 2016). Plusieurs contraintes ont ralenti l'identification de ces composés allélochimique chez cette espèce : (i) ils sont en faible concentration dans le filtrat, (ii) les rendements d'extraction et de purification sont faibles, et (iii) ces composés semblent être particulièrement sujets à se coller sur les plastiques qui ne peuvent pas toujours être évités sur certain filtres ou matériaux de purification (Ma et al., 2011 ; Ma et al., 2009).

Afin de définir un protocole adéquat d'isolement de ce/ces composé(s) lytique(s) chez *A. tamarense*, les propriétés physico-chimiques des composés et la stabilité de l'activité biologique dans le filtrat et les différentes fractions ont été étudiées (Ma et al., 2009). Il en ressort que l'activité allélopathique des composés n'était conservée que dans des récipients en verre, à température ambiante, et nécessitait une agitation vigoureuse du flacon, ce qui suggère une liaison de ces composés au verre. Ces composés allélochimiques sont résistants à la congélation (-20 °C pendant 3 mois), à des températures dites modérées (60°C pendant 15 min) mais perdent leurs propriétés lytiques lorsqu'ils sont chauffés à 95°C pendant 15 min (Ma et al 2009). De plus ces composés sont tolérants aux variations de pH et leur activité est maximale à pH=8 et diminue avec l'augmentation ou la diminution du pH du milieu.

La résistance à la chaleur semble indiquer que les composés allélochimiques ne sont pas des enzymes. Ces molécules semblent être des molécules amphipatiques de haut poids moléculaire (7 à 15 kDa). Les auteurs concluent que les candidats ne sont ni protéiques ni

polysaccharidiques, mais ils ne sont pas parvenus à isoler des candidats de masse précise (Ma et al., 2011). Dans une autre étude (Zheng et al., 2016), 11 composés candidats avec des masses moléculaires inférieures (<1.6 kDa) ont été détectés dans le surnageant d'*Alexandrium tamarense*, mais leur activité lytique doit encore être confirmée. Les divergences entre les études sur la masse moléculaire de ces composés lytiques suggèrent qu'*Alexandrium tamarense* ne produit pas un composé extracellulaire unique mais plusieurs qui seraient responsables de cette activité allélochimique, ou que cette molécule formerait des agrégats (micelles) rendant difficile sa purification (Ma et al, 2009).

Il n'existe pas à ce jour de travaux sur la nature du/des composé(s) allélochimique(s) libérés par *A. minutum*. Néanmoins, il semblerait que ce/ces composé(s) présentent des caractéristiques communes avec ceux d'*Alexandrium tamarense*, comme leur grande affinité pour les plastiques (Long et al, 2018). Différentes approches pourraient faciliter leur identification :

- la métabolomique comparative (entre les souches à activité allélochimiques et non allélochimiques) qui est un moyen d'identifier des candidats. Mais ces composés présentent une forte activité allélopathique à de faible concentration, et leur signal pourrait être inférieur au bruit chimique de la fraction étudiée, il est donc intéressant de les cultiver dans du milieu de mer artificiel.
- obtenir une souche d'*A.minutum* axénique ou travailler dans des conditions ou la présence bactérienne est faible (en présence d'antibiotiques) permettrait de diminuer le « bruit » venant de métabolites libérés par les bactéries. Il n'y a pas d'indication d'une origine bactérienne de ces composés allélochimiques (Fistarol et al., 2004 ; John et al., 2015 ; Tillmann et al., 2008).
- optimiser les chances d'observer les molécules allélochimiques en rajoutant du cuivre dans la culture de cette espèce, ce qui augmente l'effet allélopathique et donc a priori la production de ces composés (Long et al., 2018).

Je n'ai pas essayé d'isoler le composé allélochimiques de cette espèce au cours de ma thèse mais nos collaborateurs, Marc Long et Hélène Hégaret, sont actuellement en train de travailler sur cet aspect. Dans ce cadre, il faut noter que l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence et d'absorption (P<sub>700</sub> et ECS) devrait fournir des tests rapides et sensibles de l'activité

allélopathique du filtrat d'*A.minutum* et dans chaque étape de purification, en utilisant la meilleure compréhension que nous avons désormais du mode d'inhibition de la photosynthèse par ces composés.

# V. Quel rôle écologique pour l'effet allélopathique d'*Alexandrium minutum* sur les diatomées ?

Les deux espèces étudiées dans ce chapitre, *Alexandrium minutum* et *Chaetoceros muelleri*, coexistent dans l'environnement (Chapelle et al., 2015). Il est raisonnable de penser que l'inhibition de la photosynthèse et de la croissance de la diatomée par *A. minutum* influence la dynamique de leurs populations dans les zones côtières où elles co-existent. La question qui se pose est : est-ce que les concentrations d'*Alexandrium minutum* dans l'environnement sont suffisantes pour affecter la dynamique de la population de *Chaetoceros muelleri* et des diatomées en général ?

Pour répondre à cette question, il faut pouvoir comparer les concentrations minimales du dinoflagellé engendrant des effets sur la physiologie de la diatomée aux concentrations observées sur le terrain. Deux études ont déterminé le seuil de la concentration cellulaire de plusieurs souches d'A. minutum à partir de laquelle l'inhibition des PSII de la diatomée apparait (Lelong et al., 2018). La souche d'A. minutum avec l'activité allélopathique la plus puissante avait une concentration de demi-inhibition du Fv/Fm (EC<sub>50</sub>) de  $4220 \pm 480$  cellules/ml (Long et al 2018). Or, les concentrations d'A. minutum de l'ordre du millier de cellules par mL ne sont pas rares (voir Figure 44) et les concentrations maximales de cette espèce retrouvées dans la nature lors d'efflorescences peuvent atteindre 40 000 cellules /ml (Chapelle et al., 2015) ou 47 000 cellules /ml (Garcés et al., 2004). Cela signifie que des interactions allélopathiques pourraient bien se mettre en place dans le milieu naturel et avoir un effet sur la compétition écologique entre A. minutum et les diatomées. De plus, l'activité allélopathique des composés libérés par les espèces d'Alexandrium ne se restreint pas aux espèces cultivées en laboratoire mais peut aussi affecter toute une communauté planctonique provenant d'un échantillon naturel. Ainsi le filtrat de certaines espèces comme Alexandrium tamarense et Alexandrium fundyense diminue la croissance de toute une communauté planctonique naturelle (Tillmann & 195

John, 2002). Dans cette étude, le degré d'inhibition était différent pour chaque groupe/espèce causant un changement dans l'abondance relative de ces groupes. Après incubation avec le filtrat d'*Alexandrium tamarense*, les espèces dominantes étaient des dinoflagellés (de taille < 30 µm) alors que les espèces affectées étaient des ciliés, des diatomées et des nanoflagellés (< 20 µM) (Fistarol et al., 2004). La libération de ces composés allélochimiques pourraient donc altérer une grande partie de la communauté planctonique pendant l'apparition d'efflorescence d'*Alexandrium* en diminuant la diversité des espèces présentent et en favorisant les plus résistantes (ici les dinoflagellés par rapport aux diatomées, ciliées et nanoflagellés).

Il serait intéressant de refaire le même type d'expérience en présence du filtrat d'*A. minutum* et de regarder l'effet de ses composés allélopathiques sur des communautés naturelles. Une autre expérience intéressante consisterait à tester l'effet du filtrat d'*A. minutum* sur la photosynthèse de différentes espèces de diatomées, autres que *C. muelleri*, et sur d'autres espèces de microalgues comme des dinoflagellés, des haptophytes et des prasinophytes. Ceci permettrait d'évaluer la sensibilité des différentes espèces aux composés allélochimiques d'*A. minutum*.

Une approche plus ambitieuse serait d'étudier l'activité allélopathique d'A. minutum pendant des efflorescences sur le terrain. Il existe différents sites en France où des efflorescences d'A. minutum ont lieu tous les ans comme reporté par le REPHY (Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines, Ifremer, https://envlit.ifremer.fr/surveillance/phytoplancton phycotoxines). Pour montrer qu'une activité allélopathique a potentiellement lieu pendant une efflorescence d'A. minutum, la concentration cellulaire de ce dinoflagellé dans le milieu naturel doit être suffisamment importante comme expliqué ci-dessus. De ce point de vue, le contrôle hebdomadaire des sites par le REPHY pour les différentes espèces de dinoflagellés toxiques comme A. minutum nous permettrait de nous informer sur l'apparition d'une efflorescence liée à cette espèce afin de pouvoir réagir suffisamment rapidement. Il serait alors envisageable d'échantillonner A. minutum pendant une efflorescence et de tester son activité allélopathique sur différentes espèces phytoplanctoniques dans des chambres de co-culture séparées par une membrane de dialyse et de mesurer l'influence d'A. minutum sur la croissance et/ou la photosynthèse de ces espèces. L'effet spécifique de ce métabolite secondaire sur la photosynthèse (diminution du

gradient électrochimique de proton généré à l'obscurité à travers le thylacoïde de *C. muelleri*) représente une signature de cette molécule et nous permet de la distinguer des autres molécules allélochimiques ou stress abiotiques potentiellement à l'œuvre dans l'échantillon naturel.

# Chapitre 3 : Mesurer la photosynthèse en mélange, révèle des interactions allélopathiques : *Amphidinium carterae* inhibe la photosynthèse des diatomées.

La prise de conscience récente de l'importance de la contribution - jusqu'à 50% - des phototrophes marins à la photosynthèse de la Terre (Field et al., 1998) a entraîné un effort majeur pour étudier la photosynthèse dans le phytoplancton. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucune approche méthodologique permettant de mesurer les activités photosynthétiques de plusieurs micro-algues dans un mélange. Ce verrou méthodologique limite l'étude de la photosynthèse dans le milieu aquatique, où le mélange est la règle, mais aussi les mesures de photosynthèse dans le cadre d'études sur la compétition biotique et l'allélopathie en laboratoire.

En effet, les méthodes classiques utilisées pour mesurer l'activité photosynthétique (fixation du CO<sub>2</sub> ou production d'O<sub>2</sub>) ne distinguent pas les contributions des différentes espèces composant le mélange naturel ou artificiel (Rodriguez-Ramos et al., 2007), tout simplement parce qu'ils s'appuient sur des observables qui sont communes et identiques chez toutes les espèces. Les spectres d'action de la fluorescence des eucaryotes marins peuvent différer de ceux de certaines cyanobactéries et ces différences sont utilisées pour séparer les contributions photosynthétiques de ces deux groupes au sein d'une communauté (Jakob et al., 2005). Malheureusement, cette approche ne parvient pas à trier les eucaryotes photosynthétiques : diatomées, coccolithophores, prasinophytes ou dinoflagellés. Il existe cependant au moins une observable permettant l'étude fine de la fonction photosynthétique en mélange ; c'est l'effet Stark ou décalage électrochromique (ECS) que nous avons déjà largement utilisé dans cette thèse.

## L'ECS : une sonde universelle, des signatures spectrales différentes

L'ECS s'avère être l'outil idéal pour séparer et donc étudier les différentes contributions photosynthétiques dans un mélange. D'abord, les spectres ECS, comme la composition pigmentaire, varient d'une espèce photosynthétique à l'autre, fournissant une observable

spécifique à chaque branche d'eucaryotes photosynthétiques. Le choix de longueurs d'onde appropriées permet ainsi de rendre une des deux microalgues « transparentes » (spectroscopiquement) et donc de mesurer l'ECS spécifique de l'autre espèce au sein d'un mélange. Ensuite, tous les complexes impliqués dans le transfert d'électrons photosynthétique participent à la génération (photosystèmes, cytochrome  $b_{6}f$ ) ou à sa consommation (ATP synthase) du champ électrique sondé par l'ECS. Cette méthode peut ainsi mesurer l'activité photosynthétique mais aussi évaluer séparément l'activité de chacun de ces complexes ou leurs quantités relatives (Bailleul et al, 2010).

La mise au point de cette méthode a largement bénéficié de la collaboration avec la station biologique de Roscoff et à l'accueil de Laure Guillou lors de missions sur le terrain. En particulier, nous avons pu largement utiliser la collection de microalgues de la RCC (<u>http://roscoff-culture-collection.org/</u>) pour tester notre méthode sur un grand nombre de couples de microalgues marines. Des résultats préliminaires mettent en évidence un grand nombre de mélanges dans lesquels la photosynthèse d'une microalgue est inhibée par une autre, par exemple l'inhibition de la photosynthèse de la diatomée *T. pseudonana* par le dinoflagellé *Karlodinium veneficum*, ou celle des prassinophycées *Bathycoccus prasinos* et *Nephroselmis pyriformis* par l'haptophyte *P. parvum*.

Ce chapitre présente un exemple d'application de cette méthode utilisant l'ECS pour mesurer la photosynthèse en mélange ; il présente le mécanisme d'inhibition par le dinoflagellé *Amphidinium carterae* de la photosynthèse du phytoplancton, et de la diatomée *Thalassiosira pseudonana* en particulier.

# Introduction : *Amphidinium carterae*, une « usine » à métabolites secondaires

## I. Classification du genre Amphidinium

Le genre *Amphidinium* appartient à la classe des dinoflagellés (Dinophyceae ou Dinophytes) et a été récemment transféré de l'ordre des Gymnodiniales à l'ordre des Amphidiniales, dans une nouvelle famille, celle des Amphidiniaceae (Moestrup & Calado, 2018). Parmi les espèces de dinoflagellés, on distingue les dinoflagellés « nus » des dinoflagellés « cuirassés » possédant une thèque rigide de cellules. Contrairement aux espèces du genre *Alexandrium*, les espèces du genre *Amphidinium* sont des dinoflagellés « nus ». Pour le reste, comme *Alexandrium*, ils possèdent deux flagelles (un transversal et un longitudinal) assurant leur motilité. Le cingulum sépare la cellule en une partie supérieure appelée épicone et une partie inférieure appelée hypocone. Chez *Amphidinium* l'épicone, est minuscule, irrégulier, de forme triangulaire ou en croissant et dévié vers la gauche, une caractéristique qui le distingue des autres espèces de dinoflagellés « nus » (Figure 47) (Jørgensen et al., 2004).



Figure 47 : Dessin d'*Amphidinium carterae*. Cp : Chloroplaste, Py : pyrénoïde, N : noyau. D'après (Taylor, 1971).

Le genre *Amphidinium* est composé d'une vingtaine d'espèces marines (Figure 48), phototrophes et hétérotrophes (Jørgensen et al., 2004). Deux espèces hétérotrophes sont connues à ce jour : *Amphidinium incoloratum* (Campbell, 1973) et *Amphidinium yuroogurrum* (Murray & Patterson, 2002) alors que les espèces phototrophes sont divisés en deux clades :

- le Clade d'Herdmanii qui est composé d'espèces avec un degré élevé de diversité génétique : A. steinii, A. mootonorum, A. herdmanii, et A. cupulasticquama (Jørgensen et al., 2004).
- le Clade d'Operculatum qui est composé d'espèces très proches génétiquement, formant un clade monophylétique : A. carterae, A. massartii, A. gibossum A. thermaeum, A. trulla, A. pauciacanulatum, A. fijiensis, A. magnum, A. theodori, A. tomasii, A. pseudomassartii, A. klebsii A. operculatum et A. glabrum (Jørgensen et al., 2004; Karafas et al., 2017; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2015).



Figure 48 : Images obtenues par microscopie optique du genre Amphidinium. 1 Amphidinium carterae,
2 Amphidinium operculatum, 3 Amphidinium steinii, 4 Amphidinium gibossum, 5 Amphidinium incoloratum. La barre d'échelle = 10 μm pour toutes les images (Saburova et al., 2009).

## II. Stratégie nutritionnelle et cycle de vie

## 1. Stratégies nutritionnelles

La plupart des espèces du genre Amphidinium connues à ce jour sont des espèces phototrophes (Flo Jorgensen et al., 2004). Ces espèces benthiques comptent parmi les dinoflagellés les plus abondants dans les sédiments sableux marins et sont retrouvées la plupart du temps, dans des eaux peu profondes (< 2m) (Murray et al., 2015; Sampayo, 1985; Lee et al., 2013). Certaines sont épiphytiques, attachées sur des macro-algues (Paul et al., 1995a; Huang et al., 2009; Fukuyo, 1981; Garaté-Lizarraga, 2012; Murray et al., 2015), ou symbiotiques de vers plats (Kobayashi, 2008; Doi et al., 1997). Elles peuvent parfois être ponctuellement remises en suspension dans la colonne d'eau via une perturbation (comme les courants) et se retrouver dans le plancton ; on parle alors d'espèces tychoplanctoniques (Gárate-Lizárraga et al., 2019). Une fois dans le plancton, si les conditions deviennent propices, elles peuvent proliférer et former des efflorescences phytoplanctoniques (Baig et al., 2006 ; Santiago & Sanchez, 1979 ; Murray et al., 2015; Gárate-Lizárraga et al., 2019). Les facteurs biotiques et abiotiques favorisant l'apparition des efflorescences d'Amphidinium ne sont pas connues à ce jour, mais la plupart de ces efflorescences semblent se développer dans des environnements eutrophiques, souvent favorisés par l'activité humaine (Santiago & Sanchez, 1979 ; Sampayo, 1985 ; Lee et al., 2003; Murray et al., 2015).

## 2. Cycle de vie

Toutes les étapes du cycle de vie des *Amphidinium* ne sont pas connues à ce jour. Comme chez les autres dinoflagellés, deux types de reproduction ont été décrits chez *A. klebsii* et *A. carterae* :

- i) Une reproduction asexuée par division végétative des cellules qui se fait par fission binaire et mitose (Sampayo, 1985; Barlow & Triemer, 1988; Cao Vi, 1967; Murrray et al., 2004). Les cellules sont à ce stade sous forme haploïde (n chromosomes).
- ii) Une reproduction sexuée avec fusion de deux gamètes haploïdes (n chromosomes) qui forment par la suite une cellule diploïde (2n chromosomes) : un planozygote (un zygote flagellé) chez *A. klebsii* et un aplanozygote (zygote dépourvu de flagelles) chez *A. carterae* (Cao Vi, 1967 ; Cao Vi, 1968 ; Barlow & Triemer, 1988). Comme pour la plupart des dinoflagellés, la sexualité peut être induite en présence d'excès d'azote (Pfiester et al., 1984 ; Pfiester and Anderson, 1987).

Comme les autres dinoflagellés, *Amphidinium* peut former deux types de kystes, hypnozygote (Anderson & Wall, 1978) ou kyste pelliculé (temporaire ou ecdysal) (Dale, 1977 ; Bravo et al., 2010 ; Taylor, 1980 ; Fistarol et al., 2004), qui apparaissent en réponse à un stress (Toth et al., 2004). Une présence de métaux lourds comme le cuivre (Lage et al., 2001) entraine l'enkystement spontané des cellules d'*A. carterae*. Certains kystes forment des agrégats (Lage et al., 2001), d'autres sont entourés d'une substance mucilagineuse alors que d'autres sont hyalins (Gárate-Lizárraga et al., 2012 ; Gárate-Lizárraga et al., 2019). Ces kystes hyalins semblent être des kystes pelliculés entourés d'une seule membrane. Ils ont été retrouvés dans des boulettes fécales de zooplancton suggérant une forme de protection lors de l'ingestion par les prédateurs. Enfin, dans les deux types de kystes, hypnozygote ou pelliculé, les cellules d'*A. carterae* étaient mobiles (Gárate-Lizárraga et al., 2019). De même, les kystes observés chez *A. klebsii* peuvent contenir de 2 à 8 cellules et semblent représenter des sites de division végétative, favorisant la survie de cette espèce dans des conditions défavorables (Barlow & Triemer, 1988).

## **III.** Distribution et occurrence d'efflorescences

Les espèces du genre *Amphidinium* sont retrouvées dans le monde entier (Figure 49), dans les écosystèmes tropicaux, subtropicaux, tempérés (Murray et Patterson, 2002 ; Hoppenrath et al, 2000). Elles sont répandues des deux côtés de l'Atlantique Nord (Martin & Nelson, 1929), dans le golfe du Mexique (Gárate-Lizárraga et al., 2019), la mer du Nord (Hoppenrath, 2000) et la mer Méditerranée (Santiago & Sanchez, 1979 ; Dolapsakis et Economou-Amilli, 2015 ; Hulburt, 1957 ; Lee et al., 2003). On les retrouve également en mer d'Arabie (Baig et al., 2006), en Australie (Murray et al., 2015), en Nouvelle-Zélande (Echigoya et al., 2005) au Bahamas (Meng et al., 2009), au Japon (Kobayashi, 2008 ; Paul et al., 1995a) et en Corée (Satake et al., 2017). Elles sont présentes dans les estuaires (Santiago & Sanchez, 1979), les baies (Paul et al., 1995a ; Houdai et al., 2004), les étangs (Sampayo, 1985), les lagons (Murray et al., 2015) et les ports (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2015).



Figure 49 : Répartition mondiale des observations d'*Amphidinium*. Les points vert foncé indiquent les emplacements d'observation sans donnée quantitative (319 observations). Les points vert clair indiquent les emplacements d'observation de « présence uniquement » (7989 observations). Les étoiles jaunes indiquent les emplacements de toute série chronologique signalant les espèces d'*Amphidinium* (76 sites).

https://www.st.nmfs.noaa.gov/nauplius/media/copepedia/taxa/T2000128/maps/distMAP\_T2000128\_00.jpg

Le premier cas d'efflorescence du genre Amphidinium a été décrit en 1929 par Martin et Nelson dans la baie de Delaware au New Jersey. Les deux espèces de dinoflagellés dominants cette marée rouge, Amphidinium fusiforme et Gymnodinium splendens, étaient concentrées dans des patchs différents ou mixtes (Martin & Nelson, 1929). Ces dernières années (2005-2019), des efflorescences récurrentes et saisonnières parfois monospécifiques (Murray et al., 2015 ; Baig et al.,2006), d'A. carterae ont été décrites (Tableau 4). Elles sont apparues en Espagne (Santiago & Sanchez, 1979) au Portugal (Sampayo, 1985), dans la mer d'Arabie (Baig et al., 2006), en Israël (Lee et al., 2003), en Australie (Murray et al., 2015) et au Mexique, dans le golfe de Californie (Gárate-Lizárraga et al., 2019). Une des premières efflorescences connues d'A. carterae a été décrite en Espagne en 1979 où la concentration cellulaire de cette microalgue pendant l'efflorescence avait atteint un maximum de 4510 cellules/ml, cette prolifération n'a pas été corrélée à la mort de poisson (Santiago & Sanchez, 1979). Toutes les efflorescences reportées ces dernières années du genre Amphidinium sont uniquement dûes à la prolifération d'A. carterae, qui a pu atteindre selon l'efflorescence des concentrations cellulaires maximales allant de 1000 à 180 000 cellules/ml, (Tableau 4) (Baig et al., 2006 ; Santiago & Sanchez, 1979 ; Murray et al., 2015; Gárate-Lizárraga et al., 2019). Une étude plus récente a montré des variations saisonnières de l'abondance d'A. carterae dans le golfe de Californie, avec des concentrations maximales en décembre et janvier (jusqu'à 1000 cellules/ml). Les auteurs attribuent ce maximum d'abondance à des phénomènes d'« upwelling » (remontée d'eau des profondeurs riche en nutriments) qui ont lieu en décembre dans cette région et à des températures favorables à la prolifération d'A. carterae (21-23°C) (Gárate-Lizárraga et al., 2019).
| Année | Localisation              | Espèce       | Concentration | Mort de  | Référence      |
|-------|---------------------------|--------------|---------------|----------|----------------|
|       |                           |              | maximale      | poissons |                |
|       |                           |              | (cellules/ml) |          |                |
| 1929  | Baie de Delaware,         | A. fusiforme |               |          | Martin &       |
|       | New Jersey                |              |               |          | Nelson, 1929   |
| 1979  | Ria de Vigo, Espagne      | A. carterae  | 4510          |          | Santiago &     |
|       |                           |              |               |          | Sanchez, 1979  |
| 1985  | Estuaire Sado, Portugal   | A. carterae  |               | oui      | Sampayo,1985   |
| 2003  | Eilat, Israël             | A. carterae  |               |          | Lee et al.,    |
|       |                           |              |               |          | 2003           |
| 2005  | Mer d'Arabie              | A. carterae  | 12000         |          | Baig           |
|       |                           |              |               |          | etal.,2006     |
| 2012  | Sud Est de l'Australie    | A. carterae  | 36000-180000  | oui      | Murray et al., |
|       |                           |              |               |          | 2015           |
| 2015  | Bahia de La Paz, Mexique, | A. carterae  | 1000          |          | Gárate-        |
|       | Gulf de Californie        |              |               |          | Lizárraga et   |
|       |                           |              |               |          | al., 2019      |

Tableau 4 : Principales efflorescences observées d'Amphidinium dans le monde.

Les observations de toxicité des efflorescences des espèces du genre *Amphidinium* sont rares, avec seulement deux signalements de mortalité chez le poisson, la première dans des étangs à poissons peu profonds (0,8 m) de Sado au Portugal (Sampayo, 1985). La deuxième observation correspond à l'efflorescence d'*A. carterae* la plus abondante jamais décrite, dans une lagune côtière peu profonde (< 2m) au Nord de Sydney, en Australie (Murray et al., 2015). Des concentrations cellulaires de 36 000 et 180 000 cellules/mL ont été mesurées, et ont été corrélées à des quantités d'azote élevées et à des quantités de phosphre limitantes. Cette efflorescence phytoplanctonique s'est avérée ichtyotoxique (300 poissons mort retrouvés parmi trois espèces : *Acanthopagrus australis, Mugil cephalus, Anguilla reinhardtii*).

#### IV. Métabolites secondaires produits par le genre Amphidinium

Les espèces du genre Amphidinium sont connues pour produire une grande variété de molécules appartenant à la famille des polycétides, des métabolites secondaires provenant de la condensation de sous-unités acétyles ou maloniques. Les polycétides dérivés des dinoflagellés peuvent être classés en trois catégories selon leurs caractéristiques structurales : les polyéthers cycliques, les macrocycles (y compris les macrolides et les non-macrolides), et les polyéthers linéaires (Rein & Borrone, 1999). Chez les espèces du genre Amphidinium, les molécules qui ont été isolées font partie du sous-groupe des macrolides et des polyéthers linéaires. Notons que la différence de structure entre un polyéther linéaire et un macrocycle peut être très fine, un polyéther linéaire pouvant être issu de l'hydrolyse d'un macrolide. Certaines de ces molécules sont connues pour leur activité ichtyotoxique (Huang et al., 2009; Yasumoto et al., 1987), antifongique (Washida et al., 2006; Yasumoto et al., 1987), hémolytique (Yasumoto et al., 1987), antibiotique (Kubota et al., 1998) et anticancéreuse (Huang et al., 2004a), ce qui rend ces espèces très attrayantes pour la recherche et les groupes pharmaceutiques. Du fait de ces motivations médicales, l'énorme quantité de métabolites secondaires connus et que je vais présenter dans cette section tranche avec le peu d'information sur leur rôle dans le monde marin (section suivante Toxicité et allélopathie du genre Alexandrium).

#### 1. Les macrolides d'Amphidinium :

#### Amphidinolides

Les amphidinolides (amphidinolide A à Y et leurs macrolides associés, amphidinolactone A et B et iriomoteolide) sont des molécules appartenant au groupe des macrolides, molécules composées d'un macrocycle de lactone souvent associés à des sucres neutres ou aminés (Figure 50). Dans le cas des amphidinolides, le nombre de chaînons composant le macrocyclique de lactone varie de 12 à 29. La plupart de ces polycétides cycliques peuvent contenir une chaîne carbonée ou une unité exométhylène (ou les deux), en position vicinale de la fonction lactone. Plus de 45 amphidinolides ont été isolés de cultures de différentes souches d'*Amphidinium* sp, symbiotiques de vers plats marins (*Amphiscolops vreviviridis, magniviridis*), collectées à 208

Okinawa au Japon (Kobayashi, 2008). D'autres ont été isolés d'un *Amphidinium sp* benthique d'Okinawa où d'*Amphidinium operculatum* isolé au large des îles vierges aux USA (Kobayashi et al., 2008). La plupart de ces métabolites présentent une cytotoxicité et une activité antitumorale puissantes. Malgré leurs structures originales et leurs activités cytotoxiques, l'impossibilité de les isoler en quantité suffisante pour poursuivre les tests biologiques a poussé plusieurs équipes à la synthèse de ces molécules d'intérêt. Ainsi, plus de 15 amphidinolides sont synthétisés à ce jour (Kobayashi, 2008).



Figure 50 : Deux exemples de structure d'amphidinolides. Amphidinolide A et amphidinolide N.

Les différents amphidinolides, de A à Y sont tous décrits dans la revue de Kobayashi, 2008. Le premier amphidinolide à avoir été isolé en 1986, l'amphidinolide A (Figure 50), d'une culture d'espèce d'*Amphidinium sp* (souche Y-5) initialement symbiotique du ver plat marin *Amphiscolops vreviviridis*, est composée de 20 chaînons et présente une activité contre la prolifération des cellules cancéreuses de lignées de lymphome murin (L1210) avec une IC<sub>50</sub> de 2  $\mu$ g/ml (Kobayashi et al., 1986). Parmis tous les amphidinolides de A à Y, y compris ceux qui vont être introduit par la suite c'est l'amphidinolide N (Figure 50), qui a montré la plus puissante activité cytotoxique. Ce métabolite secondaire est constitué d'un macrocycle de lactone à 26 chaînons et possède une activité antinéoplasique in vitro de l'ordre du nanomolaire sur des lignées de lymphome murin (L1210) (avec une IC<sub>50</sub> de 0,00048 $\mu$ g/ml) et de carcinome épidermoïde humain (KB) (avec une IC<sub>50</sub> de 0,0005 $\mu$ g/ml) (Ishibashi et al., 1994).

L'amphidinolide N, a été isolé en 1994 à partir de l'espèce d'*Amphidinium* (souche Y-5) par l'équipe du Professeur Kobayashi et la synthèse totale de ce composé a été achevée en 2016. (Kobayashi., 2008 ; Ochiai et al., 2016)

#### *Amphidinolactones*

Les macrolides amphidinolactones A et B (Figure 51) ont tous deux étés isolés de la culture d'une espèce d'*Amphidinium*, symbiotique du ver plat marin *Amphiscolops vreviviridis*, collecté à Okinawa au Japon (Takahashi et al., 2007a). L'amphidinolactone A, macrolide de 13 chaînons, est le premier macrolide isolé qui ne possède ni méthyle ramifié ni d'exométhylène. L'amphidinolactone B est un macrolide composé de 26 chaînons, qui possède une plus grande cytotoxicité comparée à l'amphidinolactone A contre les lignées de lymphome murin (Takahashi et al., 2007b).



Figure 51 : Structure des amphidinolactones A et B.

#### *Iriomoteolides*

Il existe quatre formes d'iriomoteolide. Tous ont été isolés de la même souche d'*Amphidinium* benthique collectés au large de l'île d'Iriomote (Okinawa, Japon). Les macrocycles des iriomoteolides 1a, 1b, 1c sont tous composés de 20 chaînons, alors que celui de l'iriomoteolide

3a en contient 15 (Figure 52). Ces quatre molécules sont toxiques contre les lignées de lymphome murin *in vitro* ainsi que sur le carcinome épidermoïde humain (Kobayashi, 2008).



Figure 52 : Structure des iriomoteolides1a-c et 3a.

Tous les amphidinolides ont été testés sur des cellules cancéreuses à des fins médicales (une approche limitée par la faible production par *Amphidinium*) mais le rôle écologique de ces molécules n'a jamais été étudié et reste encore à être déterminé.

#### 2. Polyéthers linéaires : amphezonol A et colopsinols

Plusieurs polyéthers linéaires ont été isolés chez les espèces du genre *Amphidinium* : l'amphezonol A, les colopsinols, et enfin les amphidinols et leurs composé associés (carteraol E, karatungiol, lingshuiol, lutéophanol). Ces différents polyéthers linéaires ont des activités antibiotiques, antifongiques, anti-diatomées ; certains montrent des activités hémolytiques ou ichtyotoxiques.

#### Amphezonol A

L'amphezonol A est un métabolite polyhydroxyle linéaire à chaîne carbonée (Figure 53), qui a été isolé d'une culture d'une souche d'*Amphidinium*, initialement symbiotique du ver plat *Amphiscolops sp* et récolté à Okinawa au Japon (Kubota et al., 2006). Il possède un cycle tétrahydrofurane, deux cycles tétrahydropyrane et 21 groupes hydroxyles sur une chaîne aliphatique linéaire en C60 avec une ramification exo-méthylène et une ramification méthyle. L'Amphezonol A présente une activité inhibitrice modeste contre l'ADN polymérase  $\alpha$  avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 15  $\mu$ M (Kubota et al., 2006)



Figure 53 : Structure l'amphezonol A.

#### **Colopsinols**

Les colopsinol A-E sont les premiers membres d'une nouvelle classe de polycétides linéaires dont la structure est composée d'un fragment glucoside et d'un ester de sulfate (Figure 54), isolés chez une espèce d'*Amphidinium*. Les colopsinols ont été isolés dans la même souche d'*Amphidinium* que les amphidilonides, mais à partir de fractions plus polaires (Kubota et al., 1999 ; Kobayashi et al., 1999). D'un point de vue biosynthétique, il est intéressant de noter que des types très différents de polycétides tels que les colopsinols et les amphidinolides sont produits à partir de la même souche d'*Amphidinium sp*.



Figure 54 : Structure des colopsinols A-E.

Les différents colopsinols présentent un fragment polycétide constitué d'une chaîne aliphatique linéaire en C<sub>53</sub> ou C<sub>56</sub> avec des ramifications C<sub>1</sub> (exo-méthylène ou méthyles), cétones, glucosides, ester sulfates, hydroxy et/ou des cycles tétrahydropyrane, tétrahydrofurane ou époxyde. Le colopsinol A présente une activité inhibitrice puissante contre l'ADN polymérase  $\alpha$  et  $\beta$  avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 13 et 7  $\mu$ M, respectivement, mais aucune cytotoxicité sur le carcinome épidermoïde humain (Kobayashi et al., 1999). Les différents colopsinols présentent des cytotoxicités variables contre les lignées de lymphome murin *in vitro* (Kubota et al., 2000 ; Kobayashi et al., 1999).

#### 3. Polyéthers linéaires : les amphidinols et leurs composés apparentés

Les amphidinols (AMs) ont été extraits de deux dinoflagellés : Amphidinium klebsii et Amphidinium carterae, dont la toxicité (ichtyotoxicité, activité hémolytique, mortalité des souris) avait été montré dès 1987 (Yasumoto et al., 1987). Ces métabolites secondaires présentent une activité hémolytique, antifongique, cytotoxique et anti-diatomée. Le premier membre de la famille des AMs a été isolé d'A. klebsii en 1991 par Satake et al. (Satake et al., 1991). Les AMs forment des pores sur les membranes biologiques et augmentent de cette manière leur perméabilité, conduisant la plupart du temps à la lyse cellulaire. A ce jour, 21 AMs ont été isolés et caractérisés depuis A. klebsii (Satake et al., 1991 ; Paul et al., 1995a ; Paul et al., 1995b ; Paul et al., 1995c ; Paul et al., 1995d ; Morsy et al., 2005 ; Morsy et al., 2006) puis depuis des souches d'A. carterae (Houdai et al., 2001 Echigoya et al., 2004 ; Meng et al., 2008 ; Nuzzo et al., 2014 ; Satake et al., 2017 ; Martinez et al., 2019). Ces 21 molécules ont été appelées AM1 à AM22 (l'AM16 est absent de la littérature), et les structures sont connues pour toutes sauf l'AM8. Deux AMs ont été extraits chez les deux espèces Amphidinium, l'AM2 et l'AM4, ce qui laisse penser que les AMs ne sont pas forcément spécifiques d'une espèce d'Amphidinium. Les AMs ont été purifiés à partir d'extraits cellulaires mais sont aussi présents dans le surnageant, suggérant un rôle allélopathique pour ces métabolites secondaires. Deux derniers amphidinols ont été isolés récemment d'un A. carterae isolé dans un lac près de Naples en Italie (Cutignano et al., 2017) : l'amphidinol A (AM-A) et l'amphidinol B (AM-B).

#### Structure des amphidinols

Toutes les AMs dont la structure a été déterminée partagent un même squelette central (Figure 55), commun comportant un corps central composé de deux cycles tetrahydropyranes, les deux cycles sont reliés par une chaîne à 6 carbones, 6 doubles liaisons, dont un triène trans conjugué, un exométhylène, un méthyle ramifié, un méthyle vinylique, une chaîne polyhydroxyle et une chaîne polyénique (Figure 55,Tableau 5).



Figure 55 : Structure centrale commune à toutes les amphidinols. Les différences structurales entre les différents AMs apparaissent au niveau des fragments R1 et R2.

Les différences structurales entre les différents AMs apparaissent au niveau du fragment R1 de la chaîne polyénique (un vinyle, un butadiényle ou un diol-1,2) et au niveau du fragment R2 de la chaîne polyhydroxyle, avec une répétition de structures de type butanol ou hexanol (Tableau 5).



Tableau 5 : Structures développée des fragments R1 et R2 des 21 AMs, tableau repris et mis à jour de Rival, 2012.

Les stuctures des deux autres AMs recemment isolés, l'AM-A et l-AM-B, sont présentées dans la Figure 56. L'AM-A présentait une forte activité antifongique, avec une concentration minumum d'inhibition de *Candida albicans* de 19  $\mu$ g / ml (Cutignano et al., 2017).



Figure 56 : Structure planaire de l'AM-A et AM-B.

#### Lutéophanols

Les lutéophanols (A à D) ont été eux aussi isolés d'une culture d'*Amphidinium* symbiotique du ver plat marin *Pseudaphanostoma luteocoloris* isolé à Okinawa au Japon (Doi et al., 1997).



Figure 57 : Structure des lutéophanols A, B, C, D. La structure commune est présentée au-dessus du cadre. Les fragments R1 et R2 sont présentés dans le cadre pour chacun des 4 lutéophanols.

Les lutéophanols sont constitués d'une longue chaîne aliphatique avec des cycles tétrahydropyranes, de nombreux groupes hydroxy, 1-exo-méthylène, deux groupes méthyle ramifiés (Figure 57) et un groupe sulfate ester (pour la forme A uniquement, Kubota et al., 1998, 2005). Contrairement aux AMs, aucune activité antifongique n'a encore été détectée. Toutefois, les lutéophanol A et D ont une forte activité antibactérienne contre les bactéries Gram positives, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* pour la forme A (Doi et al., 1997), *Micrococcus luteus* pour la forme D (Kubota et al., 1998)

Le lutéophanol A est le premier métabolite secondaire de type détecté pendant une efflorescence *d'A. carterae* (en 2012, en Australie) sur la base de son temps de rétention et de son spectre UV (Murray et al., 2015), ce métabolite n'avait été isolé que chez *A. klebsii*. La mortalité des poissons, associée à la présence de ce composé ont conduit à effectuer des tests histopathologiques sur le poisson *Anguilla reinhardtii*. Ces tests ont montré des lésions sur les cellules épithéliales des branchies, suggérant que cette le lutéophanol A est ichtyotoxique (Murray et al., 2015).

#### Lingshuiols

Les lingshuiols ont été isolés d'une souche d'*Amphidinium* non caractérisée, isolée de la surface d'une macroalgue dans la Baie de Lingshui, en Chine. Trois molécules ont été isolées de cette même souche, le lingshuiol (Huang et al., 2004a) et les lingshuiols A et B (Huang et al., 2004b). La structure centrale du lingshuiol est la même que celle des AMs (Figure 58), mais contrairement aux AMs qui sont constitués d'une chaîne alkyl terminale polyinsaturé, le lingshuiol possède en position terminale une chaîne alkyl saturée avec une seule double liaison carbone – carbone, rendant cette molécule moins hydrophobe. Les structures des lingshuiols A et B combinent des caractéristiques des lutheophanols et des AMs. La structure principale du lingshuiol A, (C1-C51) est exactement la même que celle du luteophanol B, alors que le lingshuiol B partage les mêmes caractéristiques structurelles du fragment C1- C41 du lutheophanol B. Les deux autres extrémités des lingshuiols A et B sont composés de la même chaîne alkyl polyinsaturé que l'AM2.

Aucun test de toxicité des lingshuiols A et B n'a encore été effectué (Huang et al., 2004b). En revanche, le lingshuiol possède une forte activité cytotoxique contre des lignées de cellules cancéreuses (cellules épithéliales alvéolaires) humaines (Huang et al., 2004a). Le mode d'action de cette molécule a été étudié sur des hépatocytes de rat et sur des mitochondries isolées de ces même hépatocytes, sur lesquels il présente également une forte cytotoxicité. En présence de cette molécule, les mitochondries gonflent, phénomène suivi d'une fuite de Ca<sup>2+</sup> indiquant un changement de la perméabilité membranaire par le lingshuiol. Ce mode d'action rappelle fortement le mode d'action des AMs sur les membranes et une étude comparative

indique que le lingshuiol serait 30 fois plus cytotoxique que l'AM2 contre les hépatocytes de rat (Qi et al., 2007).



Figure 58 : Structure du lingshuiol, du lingshuiol A et du lingshuiol B.

#### Karatungiols

Les karatungiols A et B ont été isolé d'une culture d'*Amphidinium* symbiotique d'un ver plat marins non identifié au large de l'île Karatung en Indonésie (Washida et al., 2006). Les karatungiols sont au niveau de leur structure similaire au lingshuiol comportant une chaîne alkyl saturée terminale (avec une seule double liaison carbone-carbone terminale) rendant ces molécules plus hydrophiles (Figure 59). La partie centrale de la molécule est la même que les AMs, avec un groupe cétone et deux cycles 3,4,5-trihydroxy-tétrahydropyrannes. La seule différence entre les deux karatungiols est la présence d'un groupe hydroxyle en plus en position C15 chez le karatungiol A. Le karatungiol A présente une activité antifongique puissante contre

Aspergillus niger et une activité antiprotozoaire contre Trichomonas foetus (Washida et al., 2006).



Figure 59 : Structure des karatungiols A et B

#### Carteraol E

Le carteraol E a été isolé d'une culture d'*Amphidinium carterae* épiphyte de macroalgue, sur les côtes de Taiwan (Huang et al., 2009). Le carteraol E est un analogue d'AMs et est structurellement proche des karatungiols avec trois cycles tétrahydropyranes et 19 groupes hydroxyles sur une chaîne aliphatique linéaire en C<sub>69</sub> avec un fragment cétone, un exométhylène et trois ramifications méthyle (Figure 60). Le carteraol E présente une activité antifongique contre *Aspergillus niger* et une ichtyotoxicité puissante (Huang et al., 2009).



Figure 60 : Structure du Carteraol E.

#### V. Toxicité et allélopathie

L'intérêt pharmaceutique pour les métabolites décrits dans la section précédente ne s'est pas suivi d'un effort pour essayer de comprendre le rôle de ces composés dans le milieu marin. Ainsi, paradoxalement, *Amphidinium* est probablement le dinoflagellé de marées rouges pour lesquels on connait le mieux le spectre de ses métabolites secondaires, mais on connait peu de choses sur leur rôle écologique. On ne connait pas les mécanismes de la toxicité d'*Amphidinium* sur les réseaux trophiques supérieurs, et on connait peu de choses sur l'allélopathie d'*Amphidinium* en direction des autres micro-algues.

#### 1. Toxicité pour les réseaux trophiques supérieurs

La toxicité de plusieurs espèces du genre *Amphidinium* a été testée sur des espèces modèles appartenant aux réseaux trophiques supérieurs comme des invertébrés, des poissons ou des mammifères. Ceci permet d'évaluer la toxicité de ces espèces de dinoflagellés en cas d'efflorescence phytoplanctonique sur l'homme (via le test souris), et sur le bon fonctionnement de l'écosystème (test sur l'oursin et les poissons). Enfin la production de ce grand nombre de phycotoxines pourrait être un moyen de défense contre des prédateurs potentiels de ces dinoflagellés comme certaines espèces de zooplancton (test crustacé). Cependant, l'ensemble de ces études de toxicité sont faites à partir de cellules d'*Amphidinium* ou d'extraits cellulaires. Aucun test de toxicité des métabolites secondaires décrits dans la section précédente n'a été effectué sur les réseaux trophiques supérieurs.

L'activité biologique de différentes espèces du genre *Amphidinium* a largement été testée sur un crustacé modèle très utilisé dans les tests écotoxicologiques, *Artemia salina*, connu pour être un prédateur potentiel des dinoflagellés. Ces études montrent que l'ingestion de cellules d'*A*. *carterae*, du lyophilisat ou d'un extrait cellulaire, affecte fortement la survie des *A. salina* juvéniles et adultes, ce qui suggère un moyen de défense contre ces prédateurs (Ismael et al., 1999 ; Pagliara et al., 2012 ; Karafas et al., 2017). Une seule étude a également montré la toxicité du lysat des cellules d'*A. carterae* pour le stade embryonnaire de l'oursin, un invertébré très sensible de notre écosystème marin et un organisme modèle, très utilisé dans les tests écotoxicologiques comme indicateur de pollution du milieu marin (Pagliara et al., 2012). Des

222

cultures d'*A. klebsii* centrifugées ont montré également un effet ichtyotoxique sur deux espèces de poisson, *Lebestes retkulatus* et *Gambusia sp* (McLaughlin & Provasoli, 1957). Le surnageant d'une culture d'*A. carterae* centrifugée provoque une perte d'équilibre et de coordination chez le poisson *Fundulux heteroclitus*, et le lyophilisat de ces cellules induisent la mort de *Lebestes reticulatusalors* après moins de 30 min (Thurberg et al., 1973). Enfin, une étude a montré une mortalité des souris en présence du lyophilisat de cellule d'*A. carterae* et d'*A. klebsii* (Thurberg et al., 1973 ; Yasumoto et al.,1987), ceci implique que des intoxications liées au genre *Amphidinium* lors d'efflorescence phytoplanctonique, pouraient bien affecter l'Homme, vi la consomation de produit de la mer.

#### 2. Allélopathie sur le phytoplancton

Au sein du genre *Amphidinium*, deux espèces, *A. klebsii* et *A. carterae*, ont montré une activité allélopathique sur d'autres microalgues et en particulier sur les diatomées (Paul et al., 1995a ; Paul et al., 1997 ; Sugg et al., 1999 ; Ji et al., 2012). Le rôle de certains des polycétides décrits dans la section précédente, en particulier les amphidinols, a été démontré dans ces phénomènes d'allélopathie.

L'effet allélopathique d'*A. klebsii* a été montré dès 1995, au cours d'une recherche de nouveaux composés bioactifs ayant des activités antifongiques. La présence d'au moins sept amphidinols dans le surnageant d'une culture d'*A. klebsii* suggérait que ces AMs jouent un rôle allélochimique. En effet, cinq de ces AMs présentent une activité anti-diatomée, avec des concentrations minimales d'inhibition de la croissance de *Nitzchia sp* allant de 0,1 à 1 µg/mL selon l'AM testé (Paul et al., 1995a ; Paul et al., 1995b ; Paul et al., 1996). L'effet allélopathique d'*A. klebsii* sur d'autres dinoflagellés a également été mis en évidence en utilisant l'approche classique dite de culture croisée. La croissance des dinoflagellés *Gambierdiscus toxicus* et *Ostreopsis lenticularis* étaient en effet transitoirement inhibée dans le milieu préconditionné d'*A. klebsii* (Sugg et al., 1999). Depuis, aucune autre étude ne s'est intéressée à l'effet allélopathique d'*A. klebsii* sur la diatomée *Nitzchia sp*. et les dinoflagellés *Gambierdiscus toxicus* et *Ostreopsis lenticularis* n'a jamais été élucidé.

L'activité allélopathique d'*A. carterae* a très peu été étudiée, on ne retrouve qu'une seule publication scientifique dans la littérature montrant l'activité allélopathique de cette espèce sur d'autre microalgues (Ji et al., 2012). Dans cette étude, les filtrats d'*A. carterae* inhibent fortement la croissance de la diatomée *Skeletonema costatum* (Figure 61) et de façon moins forte celles des dinoflagellés *Prorocentrum micans* et *Scripsiella trochoidea* (Ji et al., 2012).



Figure 61 : Courbes de croissance de *Skeletonema costatum* contrôle (CN) et en présence du filtrat d'*A*. *carterae* prélevé en phase exponentielle de croissance (A) et stationnaire (B) de croissance. (Ji et al., 2012).

Après une heure d'incubation avec l'extrait brut du filtrat d'*A. carterae,* on observe également un blanchiment des cellules de la diatomée *Skeletonema costatum* (Figure 62). Rien de plus n'est connu sur la nature du métabolite secondaire responsable de l'activité allélopathique d'*A. carterae*, sa cible moléculaire ou le mécanisme de l'inhibition de la croissance.



Figure 62 : Culture de *Skeletonema costatum* seul (A) ou en présence de l'extrait brut du filtrat d'*A*. *carterae*. Les quantités d'éxtrait brut ajoutées sont 1  $\mu$ l (B),  $3\mu$ L (C) et  $5\mu$ L (D) et les images ont été prises après 1 heure d'incubation (Ji et al., 2012).

## **Objectifs de ce chapitre**

Au démarrage, l'objectif de ma thèse était de développer une méthode basée sur l'ECS permettant de mesurer en détail l'activité de plusieurs microalgues dans un mélange. Une telle méthode permettrait de mettre en évidence rapidement les interactions allélopathiques ciblant la photosynthèse, en évitant les écueils des méthodes plus classiques basée sur la croissance : durée des expériences basées sur la croissance, risque de « faux négatifs » lorsque le métabolite secondaire est instable ou quand le contact de cellule-à-cellule est requis, etc... En appliquant cette méthode de mesure de l'activité photosynthétique en mélange au cas patriculier de l'interaction entre *A. carterae* et *Thalassiosira pseudona,* nous avons pu observer une inhibition de la photosynthèse de la diatomée par le dinoflagellé.

Si, motivées par des intérêts pharmaceutiques ou de santé humaine, l'isolation et la caractérisation d'un grand nombre de métabolites secondaires produits par *A. carterae*, une des espèces phytoplanctoniques dont on connaît le mieux l'exométabolome, nos connaissances sur le rôle de ces molécules sur l'écologie de cette micro-algue sont pour le moins limitées. Une seule étude montre une activité allélopathique des filtrats d'*A. carterae* sur la diatomée *Skeletonema costatum* et deux dinoflagellés (Ji et al., 2012). Dans ce chapitre, nous voulons visualiser et décortiquer le mécanisme d'inhibition par *A. carterae* de la photosynthèse du phytoplancton et de la diatomée *Thalassiosira pseudonana* en particulier, directement dans un mélange des deux micro-algues.

## Méthodes

### I. Matériel et cultivation

La souche de *Thalassiosira pseudonana* est obtenue de la collection de Bigelow (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCMP 1335), les souches d'*A. carterae* (RCC 1522), de *Pseudopedinella sp* (RCC 668, rouge), de *Nephroselmis pyriformis* (RCC 618) et de *Bathycoccus prasinos* (RCC 419) viennent de la collection d'algues de Roscoff (Roscoff Culture Collection, roscoff-culture-collection.org). Les souches utilisées dans ce chapitre ont été cultivées à 19.0  $\pm$  0.5 °C avec un rythme jour/nuit 12h/12h dans un milieu F/2 sans silice (Guillard & Ryther, 1962), sauf pour *T. pseudonana* où un milieu F/2 avec silice Guillard & Ryther 1962), était utilisé. L'intensité de lumière était de 36 µmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Pour la purification des amphidinols, une souche d'*Amphidinium carterae* isolée dans le lac Fusaro (Naples, Italie) (Cutignano et al. 2017) a été cultivée dans du milieu K (Keller et al., 1987) à 22.0  $\pm$  0.5 °C, sous un régime de lumière 14h jour :10 h nuit. Les cellules étaient cultivées dans des bouteilles Fernbach d'1.8L en verre stériles, sous une intensité de lumière de 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## II. Préparation des filtrats d'A. carterae.

Afin d'obtenir le filtrat allélopathique de la culture d'*A. carterae,* nous avons toujours utilisé des cultures d'*A. carterae* en phase startionnaire de croissance, d'une concentration <250.000 cellules/ ml. Deux filtres différents ont été utilisé afin d'obtenir un filtrat allélopathique : i) filtre en acétate de cellulose, filtre à seringue Minisart® NML, 0,45  $\mu$ m, stérile (Sartorius), ii) filtre à seringue polyethersulfone (PES), 0,45  $\mu$ m, stérile (Fisherbrand <sup>TM</sup>).

#### III. Spectroscopie de fluorescence et d'absorption

Pour les mesures de spectroscopie de différence d'absorption, nous avons utilisé un spectrophotomètre de type Joliot (JTS-10, Biologic, Grenoble, France) équipé d'une LED de détection blanche (Luxeon ; Lumileds) et d'un ensemble de filtres interférentiels (bande passante 3–8 nm). La lumière actinique est fournie par une couronne de LEDs rouges (619 nm) ou par un laser à colorant à 690 nm. Devant les photodiodes, des filtres BG39 (Schott, Mainz, Germany) ont été ajoutés pour couper la lumière actinique rouge). Les méthodes pour la mesure du signal ECS (signal dur flash laser saturant, vitesse photochimique) ont déjà été décrites dans les chapitres précédents. Nous mesurons la cinétique de l'ECS après un flash laser saturant et la vitesse photochimique comme décrit auparavant mais à 532 nm dans ce chapitre. Un filtre interférentiel centré à 532 nm ( $\pm$  6 nm) a été utilisé.

#### **IV.** Isolation des amphidinols

Les 10L de culture d'*Amphidinium carterae* ont été prélevés en phase stationnaire (230 000 cells/mL) et centrifugées dans une centrifugeuse swing-out (Allegra 12-XR) pendant 10 min à 4 °C et à 2300g. Le culot (2 g) était extrait dans le méthanol ( $3 \times 10$  mL) par sonication puis centrifugé pour éliminer les débris. La phase organique a été filtrée sur papier et concentrée sous vide jusqu'à obtenir 192 mg d'extrait, par la suite factionnée sur une colonne (Chromabond C-18 Hydra column) en utilisant un protocole d'élution par paliers avec H<sub>2</sub>O et MeOH comme décrit précédemment (Nuzzo et al, 2014). L'élution sous 70% MeOH fournit l'amphidinol B (AM-B) alors que l'amphidinol A (AM-A) et l'amphidinol 22 (AM-22) 100% M (Cutignano et al., 2017). Les produits étaient ensuite purifiés par HPLC d'après Cutignano et al., 2017. Les structures des amphidinols étaient attribuées par Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse.

## Résultats

## I. *A. carterae* inhibe la photosynthèse de *T. pseudonana* et d'autres microalgues marines

Nous avons utilisé dans les deux chapitres précédents l'ECS pour mesurer la vitesse photochimique à la lumière, qui correspond à la vitesse à laquelle les deux photosystèmes effectuent des évènements photochimiques et créent les séparations de charge initiant le transfert d'électrons photosynthétique. Pour rappel, cette mesure est basée sur le fait qu'à la coupure de la lumière, seuls les photosystèmes I et II s'arrêteront instantanément (parce que la lumière est leur substrat). Le changement de pente dans l'évolution du champ électrique transmembranaire et de l'ECS est pour cette raison une mesure directe de l'activité qu'avaient les PSI et PSII à la lumière. En pratique, nous mesurons expérimentalement le changement de pente de l'absorption des cellules – qui reflète principalement l'ECS mais contient aussi d'autres contributions (en particulier les signaux d'oxydoréduction des cytochromes, parfois visibles vers 555 nm). Nous négligerons ces autres contributions pour l'instant mais nous y reviendrons quand c'est nécessaire.

Si, pour une intensité de lumière donnée, nous mesurons ce changement de pente de l'ECS à différentes longueurs d'onde et que nous le traçons ensuite en fonction de la longueur d'onde, nous obtenons un spectre (dont la forme représente la signature de l'espèce) et une amplitude (qui renseigne sur l'efficacité de la photosynthèse, plus exactement de la vitesse photochimique).



Figure 63 : Spectres de différence d'absorption, représentant la vitesse photochimique, de différentes microalgues, seules ou en mélange. A : *Pseudopedinella sp.* (rouge) et *Isochrysis galbana* (noir), les deux microalgues en mélange (bleu, cercles ouverts) et le spectre théorique en mélange (bleu, cercles bleus pleins). B/C/D : *A. carterae* (rouge) et la diatomée *T. pseudonana* (noir, B) ou les prasinophycées *Nephroselmis pyriformis* (noir, C) et *Bathycoccus prasinos* (noir, D) (noir), ainsi que pour chaque panneau les deux microalgues en mélange (bleu, cercles ouverts) et le spectre théorique en mélange (bleu, cercles bleus pleins). Les spectres ont tous été obtenus à une intensité lumineuse de 800 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sauf pour la figure B où ils ont été obtenus à 340 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

La Figure 63 (A), présente le résultat d'une telle expérience sur deux microalgues : le dictiophyte *Pseudopedinella sp* (RCC 668, rouge) et l'haptophyte *Isochrysis galbana* (en noir). Le spectre obtenu lorsque les deux échantillons sont mélangés en égale proportion est présenté (cercles bleus ouverts) ainsi que le spectre attendu (cercles bleus pleins, somme des spectres rouge et noir). Comme on peut le constater, le spectre obtenu dans le mélange est bien la somme des spectres des deux micro-algues mesurées seules.

Les panneaux B, C et D de la même figure présentent les spectres d'*Amphidinium carterae* (en rouge) de *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1335, en noir dans le panneau B), *Nephroselmis pyriformis* (RCC 618, en noir dans le panneau C) et *Bathycoccus prasinos* (RCC 419, en noir dans le panneau D). Contrairement à ce qui a été observé pour le mélange *Pseudopedinella sp* + *Isochrysis galbana*, dans ces trois mélanges impliquant *A. carterae*, le spectre expérimental en mélange obttenu (cercles bleus ouverts) est très différent de celui attendu (cercles bleus pleins). Il ressemble très fortement à celui d'*A. carterae* seul. Cela indique que la contribution des microalgues *T. pseudonana*, *N. pyriformis* et *B. prasinos* sont quasi-nulles dans les mélanges, ce qu'on interprète ici comme une inhibition quasi-complète de leurs activités photosynthétiques lorsqu'elles sont en mélange avec le dinoflagellé.

Pour passer de cette visualisation qualitative de l'inhibition photosynthétique à une mesure quantitative du degré d'inhibition, nous allons utiliser une « astuce spectroscopique » : nous observons qu'à 532 nm, le signal ECS du dinoflagellé est nul. C'est une longueur d'onde pratique : grâce à l'ECS à 532 nm, on pourra mesurer la photosynthèse de l'algue en mélange avec *A. carterae*, comme si elle était seule. On rend de cette façon *A. carterae* spectroscopiquement « transparente » car il ne contribuera pas au signal ECS à cette longueur d'onde. A partir d'ici et jusqu'à la fin du chapitre, nous nous focaliserons sur l'interaction entre *A. carterae* et la diatomée *T. pseudonana*, mais nous montrerons pour quelques expériences clé, que les résultats sont similaires avec le prasinophyte *B. prasinos*. La seule observable qui sera utilisée jusqu'à la section 5 (Vers une compréhension plus fine du mécanisme allélopathique) est la différence d'absorption (ECS) à 532 nm.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la vitesse photochimique de *T. pseudonana* et *B. prasinos* à différentes intensités lumineuses, afin d'obtenir la dépendance lumineuse de la

photosynthèse chez ces deux souches (Figure 64). Cela a été fait à la fois dans la culture seule et dans le mélange avec *A. carterae*. Comme attendu, les résultats montrent que la photosynthèse augmente avec l'intensité lumineuse jusqu' atteindre une valeur maximale aux intensités saturantes. Cette valeur maximale correspond à ~180 et ~220 séparations de charge par seconde et par photosystème, chez *T. pseudonana* et *B. prasinos* respectivement. En présence du dinoflagellé, ces valeurs sont diminuées à ~30 et ~50 séparations de charge par seconde et par photosystème, respectivement, correspondant à une inhibition proche de 80 % chez les deux algues.



Figure 64 : Courbes photosynthèse-intensité de la diatomée *T. pseudonana* (A) et du prasinophyte *Bathycoccus prasinos* (B) seuls (cercles pleins) ou en mélange avec *A. carterae* (cercles ouverts). La vitesse photochimique a été mesurée à 532 nm après plusieurs minutes d'acclimatation à chaque intensité lumineuse. Les données sont les moyennes ( $\pm$  S.D) de 3 échantillons indépendants et les données ont été extrapolées à partir d'une fonction y = A (1 – exp (-I/Ek)).

#### II. Allélopathie et co-cultures de *T. pseudonana* et *A. carterae*

Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier si l'inhibition de la photosynthèse chez T. pseudonana se traduisait, comme attendu pour un autotrophe, par un phénotype en croissance. Sur la base de la méthode basée sur l'ECS présentée dans la section précédente, nous pouvons étudier la photosynthèse dans un mélange d'Amphidinium carterae et de Thalassiosira pseudonana. Cela nous a conduit à effectuer une expérience de co-culture et de suivre la photosynthèse et la croissance des deux microalgues dans le même erlenmeyer. Comme la phase de croissance des cellules a souvent un effet sur leur effet allélopathique, nous avons effectué cette expérience de co-culture dans deux conditions : nous avons initialement mélangé une culture de T. pseudonana en phase exponentielle, dans un cas, avec une culture d'A. carterae prélevée en phase exponentielle également, dans l'autre cas, avec une culture d'A. carterae prélevée en phase stationnaire (~400 000 cellules/mL). Nous avons ensuite suivi la croissance des deux microalgues (Figure 65). La présence de la diatomée ne semble pas affecter la croissance du dinoflagellé, que la culture soit prélevée initialement en phase exponentielle (rouge) ou en phase stationnaire (bleu) (Figure 65, panneau B). En effet, dans les deux cas, la courbe de croissance du dinoflagellé avec (ronds pleins) ou sans (ronds vides) sont comparables. Ce n'est pas le cas pour la diatomée (Figure 65, panneau A). Si les courbes de croissance de la diatomée seule (noir) et avec le dinoflagellé « exponentiel » (rouge) sont semblables, la courbe de croissance en présence du dinoflagellé « stationnaire » présente un délai de 5 jours avant la reprise d'une croissance alors normale. En parallèle au suivi de croissance, nous avons mesuré la vitesse photochimique (à 532 nm, le dinoflagellé est « transparent » spectroscopiquement) à 3 moments clés : 1 jour après la mise en co-culture, juste avant (jour 4) et juste après la reprise de la croissance (jour 7) dans l'échantillon inhibé. Dans la monoculture de la diatomée, la vitesse photochimique ne varie pas significativement au cours de l'expérience. Dans la culture présentant un délai, nous n'avons pas été capables de mesurer le moindre signal ECS pendant le délai (la vitesse photochimique a été mise arbitrairement à 0 car la normalisation conduit à faire le rapport de deux valeurs proches de zéro, (Figure 65, panneau C). En revanche, la reprise de la croissance (jour 7) s'accompagne d'une reprise significative de l'activité photosynthétique. De façon surprenante, l'efficacité photosynthétique reste basse par rapport à la mono-culture ; pourtant le taux de croissance au jour 7 semble équivalent au taux de croissance maximal mesuré dans la monoculture. Encore plus surprenant, il semble y avoir une claire inhibition de la photosynthèse de la diatomée en présence du dinoflagellé « exponentiel », sans phénotype en croissance. Cela indique, non seulement, que la corrélation entre photosynthèse et croissance n'est pas évidente, mais surtout que la simple mesure de la croissance ne refléte pas la présence/absence d'une interaction allélopathique : un « faux négatif » en croissance ne l'est pas avec notre méthode en mélange. Au jour 7, le seul pour lequel nous avions des signaux pour les trois cultures ou co-cultures de *T. pseudonana*, nous avons mesuré la vitesse photochimique à trois intensités différentes (Figure 65, panneau D), ce qui permet d'observer que l'inhibition plus ou moins intense de la photosynthèse en présence du dinoflagellé est vraie quelle que soit l'intensité.



Figure 65 : Co-cultures entre la diatomée *T. pseudonana* (A/C/D) et le dinoflagellé *A. carterae*. Au temps 0, des cultures de *T. pseudonana* initialement prélevées en phase exponentielle et d'*A. carterae* initialement prélevées en phase exponentielle (en rouge) ou stationnaire (en bleu) ont été utilisées. Panneau A/B : courbes de croissance de la diatomée (A) et du dinoflagellé (B). C : vitesse photochimique de la diatomée au cours de l'expérience, mesurée en phase stationnaire à une lumière de 800 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (les étoiles bleues indiquent des signaux ECS trop faibles pour faire la mesure). D : dépendance lumineuse de la vitesse photochimique de la diatomée au jour 7. Dans les panneaux A/C/D, les points noirs, rouges et bleus correspondent à la diatomée seule, en présence du dinoflagellé « exponentiel » ou en présence du dinoflagellé « stationnaire », respectivement. Dans le panneau B, les points ouverts correspondent à la monoculture et les points fermés à la co-culture. Les données sont les moyennes ( $\pm$  S.D) de 3 cultures indépendantes.

Le résultat de cette expérience conduit à se poser une question évidente : qu'est-ce qui explique la reprise de la photosynthèse et de la croissance après 5 jours de délai dans la culture de diatomée inhibée ? Est-ce dû à un arrêt de l'effet allélopathique du dinoflagellé ou au développement d'une résistance de la diatomée ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des cultures de la diatomée et du dinoflagellé « témoin ». Dans ces cultures « témoin », le phénomène allélopathique était bien présent : le dinoflagellé « témoin » inhibait la photosynthèse de la diatomée « témoin » à ~96%. Quand nous avons ajouté cette culture de dinoflagellé « témoin » aux trois cultures contenant la diatomée, l'activité photosynthétique de la diatomée était largement inhibée aussi bien en monoculture que dans les deux co-cultures (Figure 66, panneau de gauche). Cela indique que la diatomée n'a pas développé de résistance particulière aux composés allélochimiques du dinoflagellé. En revanche, l'effet des dinoflagellés des différentes co-cultures n'inhibent que très faiblement la diatomée « témoin » (Figure 66, panneau de droite), alors que ceux des monocultures inhibent encore significativement. Cela indique que l'allélopathie des dinoflagellés a diminué en présence des diatomées, probablement parce qu'une partie des composés allélochimiques sont dégradés au cours de l'interaction ou colle sur les débris cellulaires de ces cultures vieillissantes.



Figure 66 : Tests allélopathiques sur les différentes mono- et co- cultures avec des diatomées et dinoflagellés « témoin ». Panneau de gauche : la sensibilité des diatomées a été testée grâce à un dinoflagellé « témoin ». Panneau de doite : l'allélopathie des dinoflagellés a été testée grâce à une diatomée « témoin ».

#### III. A. carterae dissipe la pmf chez la diatomée T. pseudonana

Comme pour les chapitres précédents, la cinétique du signal ECS après un flash laser saturant permet de sonder l'activité des différents complexes photosynthétiques, et nous permet d'aller plus loin dans l'élucidation du mécanisme d'inhibition de la photosynthèse. La Figure 67 présente cette cinétique chez *T. pseudonana* et *B. prasinos*, seules ou en mélange avec le dinoflagellé. La présence d'*A. carterae* ne semble pas avoir d'influence sur la phase a, l'augmentation rapide d'ECS correspondant aux séparations de charge dans les deux PSs. Cela signifie que, dans les conditions où la photosynthèse est inhibée, les photosystèmes restent fonctionnels et ne sont donc pas les cibles de l'allélopathie d'*A. carterae*. En revanche, la phase de déclin de l'ECS (phase c) qui traduit la consommation des protons par l'ATP synthase chloroplastique principalement (et les autres voies participant à la perméabilité membranaire des thylacoïdes), est perturbée en présence du dinoflagellé. Cette phase est en général ralentie

juste après la mise en mélange et accélère ensuite, mais le phénotype, parfois très intense, montre une reproductibilité faible entre échantillons indépendants. Cela nous a fait penser à l'effet d'une molécule découplante car l'augmentation de la perméabilité membranaire a deux effets opposés (voir discussion, section 1 du chapitre 2) : une contribution supplémentaire due à l'effet découplant, mais aussi une inactivation de l'ATP synthase chloroplastique à faible pmf (Joliot & Joliot, 2008 ; Bailleul et al., 2015).



Figure 67 : Signal ECS induit par un flash laser saturant après chez la diatomée *T. pseudonana* (A) et le prassinophyte *Bathycoccus prasinos* (B) dans des conditions d'anaérobiose, induites par l'utilisation de glucose (20mM) et de glucose oxydase (280 U ml<sup>-1</sup>). Les données en noir et en rouge correspondent aux signaux obtenus en absence et présence d'*A. carterae*, respectivement. Le signal ECS a été mesuré à 532 nm dans des échantillons adaptés à l'obscurité après 12 minutes d'incubation pour l'echantillon (A) et pendant au moins 10 minutes pour l'échantillon (B). Les données sont la moyenne ( $\pm$  S.D) de 3 échantillons indépendants (A) et la moyenne de 2 réplicats techniques sur le même échantillon (B).

Pour essayer de tester cette hypothèse, nous avons volontairement utilisé des conditions dans lesquelles la pmf est suffisamment faible pour inactiver l'ATP synthase : l'anaérobiose. En utilisant l'enzyme glucose oxydase et du glucose en excès (voir Chapitre 2, Discussion section I), la réaction consommera l'O<sub>2</sub> du milieu. Cela arrêtera la respiration mitochondriale, ce qui aura pour conséquent la diminution de l'ATP cellulaire et l'inactivation de l'ATP synthase

chloroplastique. Dans ces conditions, la phase c reflète la perméabilité membranaire, hors ATP synthase. La présence d'*A. carterae* accélère alors significativement la relaxation de l'ECS, à la fois chez *T. pseudonana* et chez *B. prasinos*, ce qui indique une augmentation de la perméabilité membranaire des thylacoïdes par des composés libérés par le dinoflagellé (Figure 67). La cinétique de cette accélération de la phase c, est très rapide (Figure 68) puisque dès 15 s après l'incubation avec les cellules d'*A. carterae*, le temps de demi-vie de l'ECS est déjà largement diminué d'à peu près 75%, suivi d'une 2<sup>e</sup> phase d'accélération en ~20 minutes.



Figure 68 : Evolution de la demi-vie de l'ECS en présence du dinoflagellé *A. carterae*. Pour chaque temps d'incubation, le t1/2 a été calculé comme le temps de demi-relaxation de l'ECS puis normalisé à la valeur initiale, prise 2 minutes avant l'ajout de glucose (20 mM) et de glucose oxydase (280 U ml<sup>-1</sup>). Cercles pleins : contrôle ; cercles ouverts : en présence d'*A. carterae*. Le signal ECS a été mesuré à 532 nm dans des échantillons gardés à l'obscurité pendant l'expérience. Les données sont la moyenne (± S.D) de 3 échantillons indépendants.

# IV. Identification des métabolites secondaires impliqués dans l'effet allélopathique

En nous basant sur l'inhibition de la photosynthèse et les propriétés découplantes du composé allélochimique libéré par *A. carterae* sur *T. pseudonana*, nous avons essayé d'identifier dans la littérature une molécule candidate, parmi les métabolites secondaires déjà isolés chez *A. carterae*. Certains composés, les amphidinols ont attiré notre attention, car ils étaient capables d'inhiber la croissance de la diatomée *Nitzschia sp* ainsi que de perturber les membranes biologiques. A travers une collaboration avec Angelo Fontana (Institute of Biomolecular Chemistry, ICB, Italie), nous avons pu tester si ce sont des molécules de type amphidinols qui sont responsables de l'inhibition de l'activité photosynthétique de *T. pseudonana*. Nos collaborateurs nous ont fait parvenir des échantillons à chaque étape de purification, en partant d'extraits cellulaires d'une culture d'*A. carterae* (voir Méthodes), issue d'une souche isolée dans un lac de Naples (Martínez et al., 2019). Les différentes étapes de la purification sont décrites dans les Méthodes (Introduction, section 6) et sont représentées dans la Figure 69. A chaque étape, nous avons effectué une titration de l'activité photosynthétique par l'extrait reçu, en utilisant toujours la vitesse photochimique de la diatomée *T. pseudonana* mesurée à 532 nm.



Figure 69 : Inhibition de la photosynthèse de *T. pseudonana* par les fractions obtenues lors de la purification des amphidinols (voir Méthodes). La vitesse photochimique a été mesurée à 532 nm en régime stationnaire de lumière (800  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Les structures des amphidinols purifiés dans chaque fraction finale (vérifiées par RMN et spectrométrie de masse) sont représentées dans les cadres orange.

L'extrait brut des cellules (voir Méthodes) inhibe effectivement la photosynthèse avec une concentration de mi-inhibition (I50) de ~9µg/mL. Lors de la première étape de purification, deux fractions semi-purifiées appelées AFUS24A4 (contenant entre autres l'AM-A et l'AM 22) et AFUS23A3 (contenant entre autres l'AM B) ont pu être testées. La fraction AFUS24A4 avait un effet bien plus grand sur la photosynthèse avec un I50 ~1.5 µg/mL et une photosynthèse quasi nulle à 5 µg/mL. Pour AFUS23A3, l'efficacité était moindre qu'avec l'extrait brut (I50 ~14 µg/mL). De plus, AFUS24A4 à une concentration de 5 µg/mL, inhibe entièrement la croissance de la diatomée *T. pseudonana*, comme attendu d'après les résultats de photosynthèse (Figure 70).



Figure 70 : Effet de la fraction AFUS24A4 sur la croissance de la diatomée *T. pseudonana*. Cercles pleins : contrôle en présence d'éthanol 0.5% ; cercles ouverts : en présence de 5  $\mu$ g d'AFUS24A4 par mL. Les données sont la moyenne (± S.D) de 3 échantillons indépendants. La flèche représente le moment où l'éthanol (contrôle) ou l'AFUS24A4 a été ajouté.
A partir de la fraction AFUS24A4, deux amphidinols purs ont été obtenus, dont les structures ont été vérifiées par RMN et spectrométrie de masse. Entre nos mains, l'AM22 ne montre pas d'effet sur la photosynthèse alors que l'AM-A provoque une inhibition presque complète de la photosynthèse de *T. pseudonana* avec un I50 ~ 3  $\mu$ g/mL. Cela fait de l'AM-A un candidat pour le mécanisme d'inhibition de la photosynthèse de la diatomée. Des résultats préliminaires indiquent que 3.9  $\mu$ g/mL de l'AM-A est suffisante pour inhiber complètement la croissance de *T. pseudonana* mais nous n'avions pas assez de molécule purifiée pour réaliser cette expérience en triplicats. Du fait de la faible production d'amphidinols par *A. carterae* et surtout du faible rendement d'extraction, 10 L de cultures en phase stationnaire (l'équivalent de 2.3 milliards de cellules) ne fournissent qu'une faible quantité d'AM-A. Nos collaborateurs préparent des cultures pour une deuxième purification afin de terminer de caractériser l'effet de cet amphidinol sur la diatomée *T. pseudonana* (voir Discussion), mais malheureusement nous les récupèrerons après la fin de ma thèse.

# V. Vers une compréhension plus fine du mécanisme allélopathique

Avec l'amphidinol purifié, il sera possible d'aller beaucoup plus loin qu'avec les méthodes basées sur l'ECS, qui étaient les seules utilisables en mélange. C'est aussi le cas s'il est possible d'utiliser le surnageant de la culture d'*A. carterae*. Pendant une bonne partie de ma thèse, les filtrats obtenus à partir des cultures d'*A. carterae*. Pendant une bonne partie de ma thèse, les c'est seulement en fin de thèse que j'ai identifié un filtre - constitué d'acétate de cellulose – qui permet d'obtenir un filtrat actif (Figure 71). L'obtention d'un filtrat retenant l'activité allélopathique, et l'identification de molécules candidates ouvre la voie à une compréhension plus fine du mécanisme d'inhibition de la photosynthèse par le dinoflagellé. En utilisant les méthodes spectroscopiques utilisées dans les autres chapitres de cette thèse (fluorescence, ECS, mesure de l'état redox des cofacteurs de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique), nous devrions pouvoir confirmer le modèle dessiné dans la section 2, ou éventuellement converger vers un autre modèle (voir discussion).



Figure 71 : Inhibition de vitesse photochimique de *T. pseudonana* par le filtrat d'*A. carterae*. La vitesse photochimique était mesurée en régime stationnaire de lumière à 800  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> à 532 nm. L'échantillon a été mélangé (à part égale) avec le filtrat d'*A. carterae* après filtration sur un filtre en acétate de cellulose (Sartorius) ou avec un filtre en pollyethersulfone (Fischerbrand). Dans le contrôle, le filtrat d'*A. carterae* a été remplacé par le filtrat de *T. pseudonana*. Les données sont la moyenne (± S.D) de 3 échantillons indépendants.

Encore une fois, ces avancées sont arrivées trop tard dans ma thèse pour pouvoir les rentabiliser. Mais nous avons pu étudier l'activité photosynthétique par fluorescence en présence du filtrat d'*A. carterae* ou des différentes fractions de purification (Figure 72). Nous avons mesuré le rendement maximal du PSII (Fv/Fm), le rendement du PSII à la lumière (ΦPSII) ainsi que les variations de la fluorescence maximale (afin de calculer le NPQ). Dans tous les cas (Figure 72), nous avons observé la même tendance, même si les cinétiques varient beaucoup entre les différents traitements (probablement parce que la concentration d'AM-A est différente).



Figure 72 : Influence du filtrat d'*A. carterae* (panneaux A/B/C), du sous-produit de purification AFUS24A4 (panneaux D/E/F) et de l'AM-A purifié (panneaux G/H/I), sur les paramètres photosynthétiques de *T. pseudonana* mesurée par la fluorescence. Le rendement maximal du PSII (Fv/Fm), le rendement du PSII après 600 ms d'une lumière actinique de 130  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> et le NPQ ont été mesurés pendant 10 à 40 minutes. Les échantillons étaient conservés à l'obscurité entre chaque mesure

Le premier effet est une baisse du  $\Phi_{PSII}$  (panneaux B/E/H) qui traduit une inhibition du flux photosynthétique du PSII. Ensuite, l'augmentation du Fv/Fm (panneaux A/D/G) et la baisse du NPQ (qui devient négatif) reflète l'existence d'un quenching non-photochimique dans le noir (panneaux C/F/I), que le surnageant d'*A. carterae* et l'AM-A dissipe. Ce phénotype suggère fortement un effet découplant sur les thylacoïdes de la diatomée (voir discussion). Enfin, à plus long terme, une baisse du Fv/Fm et une augmentation du NPQ pourraient indiquer un phénomène de photo-inhibition des PSII ou de dégradation des PSII. Ces résultats confirment que le phénotype obtenu en mélange ou avec le filtrat d'*A. carterae* est équivalent à celui obtenu avec l'AM-A, faisant de cette molécule l'effecteur le plus probable du mécanisme d'inhibition de la photosynthèse chez la diatomée.

# Discussion

Le développement d'une nouvelle méthode permettant d'étudier les interactions allélopathiques en mélange, basée sur l'ECS, a permis de montrer la puissante activité allélopathique en mélange du dinoflagellé *Amphidinium carterae* sur l'activé photosynthétique et la croissance de la diatomée *Thalassiosira pseudonana*.

Ce chapitre n'est pas complètement abouti. En effet, il reste plusieurs expériences à effectuer pour déterminer avec plus de précision le mécanisme de l'inhibition photosynthétique. Est-ce que l'effet découplant seul explique l'inhibition de l'activité photosynthétique ? Est-ce que l'amphidinol qui a été purifié explique seul les phénotypes observés en mélange ? Ce sont les premiers points que nous aborderons dans cette discussion. Plusieurs autres questions restent en suspens qui articulent le plan de cette discussion : Dans quelles conditions *A. carterae* produit-il son composé allélochimique ? Est-il envisageable d'observer et d'étudier l'activité allélopathique d'*A. carterae* sur le terrain ?

# I. Mécanisme de l'interaction allélopathique entre *A. carterae* et *T. pseudonana*.

Grâce à l'ECS nous avons montré que les cellules d'*A. carterae* provoquaient la dissipation du gradient électrochimique de proton généré à travers les membranes du thylacoïde de *T. pseudonana*, via la libération dans le milieu d'une molécule découplante. Cette molécule pourrait former des pores sur les membranes thylacoïdiennes provoquant la dissipation de la pmf. Afin de confirmer ce phénotype et d'aller plus loin dans notre analyse, il aurait été nécessaire de refaire certaines expériences avec d'autres observables que l'ECS. Cependant, cela ne peut pas être réalisé en mélange et nécessite d'utiliser le filtrat des cultures d'*A. carterae* ou les métabolites secondaires isolés.

Utiliser le filtrat semble facile d'un point de vu méthodologique, mais pendant la plus grande partie de cette thèse, nous n'avions pas trouvé de filtre permettant de conserver l'activité allélopathique dans le filtrat. L'utilisation de filtres constitués d'acétate de cellulose, nous a permis d'aller plus loin dans l'analyse de l'interaction, mais nous ne sommes parvenus à cela que tard dans la thèse et n'avons pas pu terminer cette analyse. De même, grâce à la collaboration avec Angelo Fontana (Institut de Biologie moléculaire de de biochimie ICB, Italie) qui a pu nous fournir des extraits purifiés, nous avons désormais une molécule candidate produisant les mêmes phénotypes que les cellules d'*A. carterae*. Il est de ce fait urgent -et relativement simple avec les outils spectroscopiques utilisés dans cette thèse- d'étudier en détail l'effet de cette molécule sur l'appareil photosynthétique pour tester notre modèle. Malheureusement, du fait du faible rendement d'extraction des amphidinols, la quantité de AM-A que nos collaborateurs nous ont fournie, n'a pas permis d'aller plus loin et nous attendons une deuxième vague de purification pour effectuer ces expériences supplémentaires.

Enfin, l'activité allélopathique retrouvée dans le filtrat de la culture d'*A.carterae* nous indique que le contact de cellule à cellule entre le dinoflagellé et la diatomée n'est pas nécessaire à la libération des composés allélochimiques. On peut donc également envisager de cultiver les deux microalgues dans un système de chambres de co-culture séparées par une membrane de dialyse. La membrane empêcherait le contact entre les cellules tout en permettant la diffusion des composées allélochimiques. Il serait ainsi possible de mesurer la croissance et la photosynthèse des deux microalgues dans la co-culture.

Ces différentes approches (filtrat, extraits purifiés, amphidinols, chambres de co-culture), couplées aux méthodes spectroscopiques utilisées dans cette thèse (fluorescence, ECS, mesure de l'état redox des cofacteurs de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique) nous permettront de décrire de façon plus fine le mécanisme de l'inhibition. D'ores et déjà, les résultats obtenus en mélange (avec l'ECS) et avec le filtrat d'*A. carterae* (en utilisant la fluorescence) sont compatibles. Tous deux indiquent clairement une inhibition de l'activité photosynthétique de la diatomée *T. pseudonana*. En effet, le rendement quantique du PSII (par fluorescence) à la lumière en présence du filtrat d'*A. carterae* ou des amphidinols purifiés est largement diminué, tout comme la vitesse photochimique (par ECS) dans le mélange avec les cellules d'*A. carterae*.

De la même façon, ces deux approches convergent vers un effet découplant du composé allélochimique sur les thylacoïdes de la diatomée. Cela est visualisé par une accélération du

déclin du champ électrique, lorsque l'ATP synthase est inactive, et par une augmentation du rendement maximal du PSII et une relaxation du NPQ à l'obscurité. Ces deux derniers effets ont déjà été observés à plusieurs reprises chez les diatomées en présence de découplants (Jakob et al.,1999 ; Grouneva et al., 2009 ; Jakob et al., 2001). Cela a été interprété comme la dissipation d'un quenching non photochimique (NPQ) présent à l'obscurité chez les diatomées, majoritairement attribué au quenching énergétique (qE) qui implique des mécanismes de dissipation sous forme de chaleur induits par l'acidification du lumen. Ce mécanisme de photoprotection est en effet contrôlé par la génération du gradient de proton ( $\Delta$ pH) qui régule la conversion de la xanthophylle, diadinoxanthine (DD) en diatoxanthine (DT). Ceci a été démontré chez les diatomées, où la présence d'un  $\Delta$ pH et de la diatoxanthine engendraient un NPQ sensible aux molécules découplantes (Jakob et al., 1999 ; Grouneva et al., 2009 ; Jakob et al., 2001).

A ce stade, un modèle de l'action allélopathique serait que l'amphidinol AM-A (Figure 56) dissipe la pmf à travers le thylacoïde. La dissipation de la pmf entraine un manque d'ATP qui conduit à un ralentissement du cycle CBB. Cela expliquerait l'inhibition du flux d'électrons photosynthétique et, de là, le ralentissement de la croissance chez la diatomée autotrophe.

# II. Les Amphidinols, perturbateurs des membranes biologiques

En nous basant sur l'inhibition de la photosynthèse et les propriétés découplantes du composé allélochimique libéré par *A. carterae* sur *T. pseudonana*, nous avons essayé d'identifier dans la littérature une molécule candidate, parmi les métabolites secondaires déjà isolés chez *A. carterae*. Certains composés, les amphidinols, ont attiré notre attention, car ils étaient capables d'inhiber la croissance de la diatomée *Nitzschia sp.* et de perturber les membranes biologiques. Afin d'obtenir des amphidinols et de tester leur activité sur l'activité photosynthétique de *T. pseudonana*, nous avons effectué une collaboration avec Angelo Fontana (Institut de Biologie moléculaire de de biochimie ICB, Italie) qui nous a fait parvenir des amphidinols : AM-A

(Figure 56) et AM22 (Tableau 5, Figure 55) purifié, isolé chez la souche *A. carterae* (Martínez, et al., 2019).

Les différentes fractions de purification ainsi que l'AM-A (Figure 72) (Martínez et al., 2019) ont été testés sur l'activité photosynthétique de *T. pseudonana* grâce à l'ECS et à la fluorescence et nous avons pu retrouver les phénotypes obtenus en mélange ou avec le filtrat sauf pour l'AM22 qui ne semble pas présenter d'activité sur la photosynthèse de la diatomée. Cela nous a permis d'identifier une molécule candidate, l'AM-A, libéré par *A. carterae* dans le milieu, qui pourrait être le composé médiant cette interaction allélopathique. Ces molécules sont largement caractérisées et leur mode d'action sur les membranes est compatible avec les résultats que nous avons obtenus. Il faut rappeler ici que la souche utilisée par le laboratoire d'Angelo Fontana était une souche différente de celle obtenue depuis la collection d'algues de Roscoff. Il faudra bien-sûr dans l'avenir s'assurer que l'AM-A est bien présente dans le filtrat de nos cultures au laboratoire et/ou tester la souche d'*A. carterae* du laboratoire italien pour s'assurer que les deux résultats sont bien compatibles.

# 1. Mode d'actions des amphidinols

Les amphidinols interagissent avec les membranes biologiques et forment des pores. Leur mode d'action a surtout été étudié chez l'AM3 (Espiritu et al., 2014 ; Iwamoto et al., 2017), en se basant sur la puissante activité biologique (activité hémolytique et antifongique). La structure des AMs et de l'AM3 a été présentée dans la Figure 55 et le Tableau 5. L'activité biologique des AMs serait directement liée à la conformation que ces métabolites secondaires prennent lors de leur interaction avec les membranes biologiques. Ainsi, au contact avec les membranes, le corps central de tous les AMs adopte une conformation en « épingle à cheveux », stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. La chaîne polyénique hydrophobe, quant à elle, s'insère dans la bicouche phospholipidique des membranes. La chaîne poly-hydroxyle, hydrophile, serait responsable de la formation de pores ou de lésions à travers la membrane. Cette interaction spécifique avec les membranes biologiques serait due à l'affinité de ces molécules pour les stérols membranaires (cholestérol et ergostérol), qui auraient un rôle central dans l'activité des AMs (Espiritu et al., 2014 ; Iwamoto et al., 2017).

En effet, des tests effectués sur des liposomes ont montré que la perméabilisation de ceux-ci par l'AM3 était totalement dépendante de la présence de stérols (Morsy et al., 2008). L'AM3 aurait de ce fait une affinité jusqu'à 1000 fois plus élevée pour les membranes contenant de l'ergostérol et du cholestérol que pour celles dépourvues de stérols (Swasono et al., 2010). L'activité de perméabilisation dépend encore plus fortement du groupe 3-OH des stérols présents en configuration  $\beta$  (3 $\beta$ -hydroxystérol) (Espiritu et al., 2014). Les polyéthers linéaires peuvent former au contact avec les membranes deux types de pores (Figure 73) : des pores de type « douve de tonneaux » (en anglais, Barrel-stave model) ou alors des pores de type « toroïdaux » (en anglais, Toroidal model) (Espiritu et al., 2014). Une étude récente, de 2017, a montré que l'AM3 peut former ces deux types de pores dans les membranes riches en ergostérols et en cholestérols (Iwamoto et al., 2017).



Figure 73 : Schémas représentant les pores de type « douves de tonneaux » (à gauche) et « Toroïdaux » (à droite), (Rival, 2012).

Le corps central d'AM3 interagit étroitement avec le groupe 3-OH de l'ergostérol et du cholestérol, formant la partie stable et rigide de cette interaction avec la membrane. La chaîne polyène hydrophobe, plus courte, est insérée dans la membrane et ancre ainsi l'AM3 dans la membrane riche en stérol. L'AM3 prend alors deux types de conformations (Figure 74) : la forme en  $\Gamma$ , lorsque la chaîne polyhydroxy se trouve à la surface de la membrane, et la forme en  $\eta$  lorsque la chaîne hydrophile polyhydroxy s'insère elle aussi dans la membrane (Iwamoto et al., 2017).



Figure 74 : Interaction de l'AM3 avec les membranes biologiques. L'AM3 interagit avec la membrane en prenant deux type de conformations différentes : la forme en  $\Gamma$ , lorsque la chaîne polyhydroxy se trouve à la surface de la membrane et la forme en  $\eta$  lorsque la chaîne hydrophile polyhydroxy sincère elle aussi dans la membrane (Iwamoto et al., 2017).

Les conformations en  $\Gamma$  ou en  $\eta$  et le type de pore « toroïdal » ou en « douve de tonneau » dépendent de la concentration de l'AM3 dans la membrane. A faible concentration, la forme en  $\eta$  favorise les pores de type « douves de tonneaux » (Figure 75, A) alors qu'à forte concentration, la forme en  $\Gamma$  crée des pores de type toroïdaux, pouvant atteindre jusqu'à 10 nm de diamètre (on les appelle alors « canaux JUMBO », en anglais JUMBO channel, Figure 75, B). La formation de ces « canaux JUMBO », facilite le flip-flop de l'ergostérol (ou du cholestérol), partageant ainsi des caractéristiques avec les pores toroïdaux connus (Iwamoto et al., 2017).



Figure 75 : Formes de pores de type « douves de tonneaux » (Barrel-stave model, A) ou toroïdaux, ici canaux JUMBO (B). D'après (Iwamoto et al., 2017).

Ainsi, l'effet de l'AM3 sur les membranes riches en stérols des organismes (par exemple des microalgues), dépendrait de la concentration de l'amphidinol. A forte concentration de AM3, la formation de JUMBO chanel engendrerait de fortes perturbations des membranes, jusqu'à leur perméabilisation et leur lyse. Une plus faible concentration en AM3 pourrait engendrer la perte du potentiel membranaire de ces espèces cibles, sans pour autant les tuer (Iwamoto et al., 2017). Comme *A. carterae* produit plusieurs amphidinols de structures différentes (Paul et al., 1995a, 1997; Echigoya et al., 2005), ce cocktail de molécules pourrait en effet agir différemment sur les membranes des microalgues voisines, selon leurs compositions en stérol.

D'autres métabolites secondaires comme les karlotoxines qui sont des composés de type amphidinols, produits par le dinoflagellé *K. veneficum*, ont une structure et un mode d'action similaire aux amphidinols (voir Introduction générale, V). Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les karlotoxines ont une affinité particulière pour les 4-desmetyl stérol

membranaire et ont une très faible affinité pour les  $4\alpha$  -méthyl-stérols retrouvées sur les membranes de dinoflagellés, comme les gymnodinostérols de *K. veneficum*. Il est intéressant de mentionner que les membranes d'*A. carterae* sont elles aussi riches en amphistérols qui sont des  $4\alpha$  -méthyl-stérols (Whiters et al., 1978), suggérant qu'*A. carterae* pourrait lui aussi être immunisé contre ces propres AMs. De plus il a été montré que la karlotoxine-2 n'affecte pas la croissance d'*A. carterae* et ceci même a de très forte concentration (Adolf et al., 2006). Il serait donc intéressant de tester les amphidinols et les karlotoxines sur la croissance et la photosynthèse d'*A. carterae* afin de confirmer cette hypothèse. Enfin nous n'avons pas mesuré pendant cette étude la composition en stérols des membranes de *T. pseudonana* mais d'après la littérature ses membranes sont principalement composées de 24-methylenecholesterol, de fucostérol et de isofucostérol (Zhukova, 2004), qui sont des 4-desmetyl-stérols, ce qui pourrait expliquer l'affinité des AMs pour cette diatomée.

Certaines études ont comparé l'activité des AMs sur les membranes biologiques à celui de l'amphotéricine B (AmB), un autre polyène isolé chez la bactérie Streptomyces nodosus (Ellis, 2002). Le mode d'action de l'AmB sur les membranes biologiques ressemble fortement à celui des AMs. Ce polyène macrocyclique (Figure 76) se lie préférentiellement sur des membranes riches en stérols comme l'ergostérol et le cholestérol. Il formerait ainsi des pores sur les membranes biologiques, probablement de type « douve de tonneaux », affectant la perméabilité membranaire et provoquant la lyse cellulaire (Ellis, 2002). Son activité ainsi que la formation de pores dépendraient, comme pour les AMs, de la concentration du métabolite secondaire (Ellis, 2002). Il était donc intéressant, et tentant, de tester l'activité de ce composé, sur l'activité photosynthétique de T. pseudonana. Ce composé, qui n'avait jamais été testé sur une microalgue auparavant, montre les mêmes phénotypes que le filtrat d'A. carterae ou l'AM-A. L'AmB induit l'inhibition rapide (après 1 min d'incubation) de la vitesse photochimique de T. pseudonana et l'inhibition du transfert d'électron photosynthétique a été confirmée par la baisse du rendement du PSII à la lumière. Ce composé induit aussi la diminution du NPQ dans le noir et l'augmentation du Fv/Fm. Nous ne sommes pas allés plus loin dans l'élucidation du mode d'action de l'AmB sur la photosynthèse de T. pseudonana car ceci n'était pas le sujet de cette thèse. Cependant, ces résultats confirment une fois de plus le lien entre cette famille de molécules (ayant une forte affinité pour les stérols des membranes et formant des pores) et les phénotypes observés dans l'interaction entre *A. carterae* et *T. pseudonana*.



Figure 76 : Structure de l'amphotéricine B.

## 2. Tester notre molécule candidate

Afin d'aller plus loin et de montrer l'activité découplante de l'AM-A sur l'appareil photosynthétique de *T. pseudonana* plusieurs expériences seraient nécessaires en utilisant les différentes méthodes ECS.

Une première expérience intéressante serait de mesurer, comme nous l'avons fait dans le mélange, la relaxation du champ électrique (phase c) après un flash laser saturant chez *T. pseudonana*, en présence de l'AM-A, dans des conditions ou l'activité de l'ATPsynthase chloroplastique est inhibée (Figure 76). Ceci permettrait de confirmer que les amphidinols sont bien des molécules capables de découpler les thylacoïdes. Si ces composés sont des molécules découplantes, elles devraient être capables de dissiper le gradient électrochimique de proton généré à travers les membranes chloroplastiques dans le noir chez *T. pseudonana* (Bailleul *et al*, 2015). Cela peut également être vérifié en utilisant la mesure du champ électrique à travers la membrane du thylacoïde avec la « méthode de la parabole » (voir chapitre Quinolones, Fig 7 de l'article).

La mesure de l'état redox de la paire spéciale du PSI sera aussi intéressante pour tester notre modèle de travail : si l'inhibition du transfert d'électrons photosynthtéique est dû à un

ralentissement du cycle CBB par manque d'ATP, cela doit se traduire par une limitation des PSI du côté accepteur, visualisable grâce à P700 (voir chapitres 1 et 2).

Enfin certaines molécules découplantes peuvent affecter le chloroplaste ainsi que les mitochondries. Il serait intéressant de mesurer la respiration chez *T. pseudonana* en présence de l'AM-A. Une perturbation de la respiration serait probable puisque l'amphidinol 2 augmente la perméabilité membranaire de mitochondries isolées du foie de rat, avec une fuite d'ions  $Ca^{2+}$  (Qi et al., 2007).

# III. Quels facteurs influencent l'allélopathie d'A. carterae ?

Dans cette étude, nous n'avons pas abordé les conditions dans lesquels *A. carterae* libérait ses composés allélochimiques. Mais nous avons certaines indications suggérant que les composés allélochimiques sont libérés surtout pendant la phase stationnaire de croissance. En effet, pour chaque expérience effectuée en phase stationnaire de croissance (~300 000 cellules/mL), les cellules d'*A.carterae* présentaient une forte activité allélopathique. De plus, pendant la photosynthèse et la croissance était plus intense lorsque les cellules d'*A. carterae* étaient prélevées d'une culture se trouvant, initialement, en phase stationnaire de croissance. Il semblerait ainsi que la phase de croissance joue un rôle important dans l'activité allélopathique d'*A. carterae*.

Afin de déterminer plus précisément les conditions dans lesquelles *A. carterae* produit ses composés allélochimiques et essayer de stimuler leur production, plusieurs expériences pourraient être réalisées :

- Tester au cours du temps, en suivant la courbe de croissance d'*A. carterae,* son activité allélopathique sur *T. pseudonana*.
- Varier les paramètres abiotiques au niveau des cultures d'*A. carterae* (concentrations en azote et phosphore, intensité de la lumière, pH, température) et tester l'effet sur l'allélopathie.
- Tester d'autres souches d'*A. carterae* comme cela a été fait pour le dinoflagellé *A. minutum* (Long et al., 2018a).

# IV. Activité allélopathique d'A. carterae sur le terrain

Le dinoflagellé *Amphidinium carterae* est une espèce tychoplanctonique (principalement benthique et qui se retrouve par hasard dans la colonne d'eau), qui formait rarement des efflorescences. Toutefois, ces dernières années les efflorescences mono-spécifiques d'*A. carterae* semblent avoir augmenté en fréquence dans des environnements où l'activité humaine engendre une eutrophisation (Santiago & Sanchez, 1979 ; Sampayo,1985 ; Lee et al., 2003 ; Murray et al., 2015). La nature monospécifique de ces efflorescences pourrait refléter la libération de composés allélochimiques affectant les autres microalgues et favorisant la seule prolifération d'*A. carterae*. C'est évidemment une hypothèse que j'aimerais tester un jour sur le terrain. Cependant il est difficile à ce jour d'étudier l'activité allélopathique d'*A. carterae* sur le terrain, à moins d'être informé rapidement du développement d'une efflorescences. De plus, en France, cette espèce n'est pas surveillée par le réseau REPHY.

Afin de déterminer si cette interaction allélopathique peut se mettre en place dans le milieu marin et jouer un rôle écologique important, on peut, comme nous l'avons fait pour *Alexandrium minutum* dans le chapitre précédent, comparer les concentrations d'*A. carterae* pour lesquelles nous avons observé l'allélopathie et les concentrations observées sur le terrain. Dans notre expérience en co-culture d'*A. carterae* et de *T. pseudonana*, le dinoflagellé était capable d'affecter la photosynthèse d'une culture concentrée de *T. pseudonana* (1 million de cellules/ml) dès 30.000 cellules/ml. Les concentrations d'*A. carterae* lors d'efflorescences ont déjà atteint un maximum de 180 000 cellules/ml en Australie en septembre 2012 (Murray et al., 2015), ce qui suggère qu'au moins dans ces conditions, l'allélopathie pourrait avoir joué un rôle dans la compétition entre espèces.

Une autre manière de montrer la présence d'une activité allélopathique sur le terrain serait de mettre en évidence le composé allélochimique dans l'environnement pendant le développement de l'efflorescence d'*A. carterae*. Il s'agirait alors de tester la présence d'amphidinols. Jusqu'ici, la seule observation d'un métabolite secondaire d'*A. carterae* est celle du luteophanol A, secrété par ce dinoflagellé lors de l'efflorescence en Australie (Murray *et al.*, 2015). Aucune étude n'a

testé l'activité allélopathique du luteophanol A, très proche structurellement des amphidinols (Figure 57). Il ne présente aucune activité antifongique mais plutôt une activité bactéricide (Doi *et al.,* 1997). Il serait ainsi intéressant de tester ce métabolite secondaire sur l'activité photosynthétique de *T. pseudonana* pour voir s'il a la même activité que les amphidinols.

Pendant le déroulement de cette thèse, nous avons établi une collaboration avec Laure Guillou et la collection d'algues (UMR 7144) de la station biologique de Roscoff, afin d'étudier le spectre d'action d'*A. carterae* sur différents groupes de microalgues de la collection de Roscoff et sur des microalgues provenant du milieu naturel. Dans l'estuaire de la rivière Penzé, proche de Roscoff, l'espèce *Amphidinium carterae* est détectée régulièrement en présence de diatomées, dont le genre *Thalassiosira*, ce qui en fait une plateforme de choix pour tester dans le futur le phénomène d'allélopathie étudié dans ce chapitre.

Dans un premier temps, nous avons ainsi testé l'activité allélopathique d'*A. carterae* (cultivé au laboratoire) en mélange sur deux échantillons naturels (prélevés en Baie de Penzé) qui étaient principalement composés de diatomées : *Chaetoceros neogracilis* (2017) et *Guinardia delicatula* (2018). Grâce à l'approche ECS en mélange, nous avons montré qu'*A. carterae* inhibe quasiment totalement l'activité photosynthétique des diatomées présentes dans les deux échantillons naturels : le spectre expérimental obtenu pour le mélange correspond presque à celui du dinoflagellé Fig (77).



Figure 77 : Activité allélopathique d'*A. carterae* sur deux échantillons de diatomées prélevés dans la baie de Penzé en juin 2017 (A), et juin 2018 (B). A : l'échantillon prélevé dans la baie de Penzé en juin 2018 est composé à 79% de la diatomée *Guinardia delicatula*. B : L'échantillon prélevé dans la baie de Penzé en juin 2017 est composé 95% de la diatomée *Chaetoceros sp*. Les deux graphiques représentent les spectres de l'activité photosynthétique (la pente de l'ECS à la coupure de la lumière) pour le dinoflagellé *A. carterae* seul (rouge, cercles fermés rouges), des diatomées présentent dans l'échantillon naturel seules (en noire) et en mélange avec le dinoflagellé *A. carterae* (bleu, cercle ouvert), ainsi que du mélange théorique attendu en cas d'absence d'inhibition de la photosynthèse pour les deux espèces dans le mélange (cercle bleu, ouvert).

# **Discussion Générale**

Au cours de ma thèse, j'ai pu observer que l'appareil photosynthétique des diatomées était une cible préférentielle des composés allélochimiques libérés par les dinoflagellés comme Alexandrium minutum (Lelong et al., 2011), Amphidinium carterae (cette inhibition n'avait pas encore été mise en évidence) et Ostreopsis ovata (Ternon et al., 2018). En parallèle de leur effet sur la photosynthèse, les métabolites d'Alexandrium minutum, comme ceux d'Alexandrium tamarense sont également capables de perturber les membranes cytoplasmiques (Ma et al., 2011 ; Tillmann et al., 2007 ; Weissbach et al., 2010). Nous avons aussi observé qu'ils affectent la membrane thylacoïdienne, au niveau du pool de plastoquinone, sans que nous puissions pour autant déterminer le mécanisme exact. Dans le cas d'Amphidinium carterae, nous avons également montré un effet découplant sur les membranes thylacoïdiennes de la diatomée T. pseudonana, conduisant à une dissipation du gradient électrochimique de proton dans le noir. Ainsi, un certain nombre de molécules allélochimiques libérées par des dinoflagellés de marée rouge, semblent avoir cette double activité d'inhibition de la photosynthèse et de perturbation des membranes des micro-algues ciblées. Dans cette discussion, j'aimerais essayer de résumer les observations communes à tous ces effets allélopathiques et déterminer s'ils permettent d'esquisser une stratégie commune. Dans un deuxième temps, j'aimerais questionner les aspects méthodologiques pour l'étude de l'allélopathie au sein du phytoplancton, au laboratoire et sur le terrain.

# I. L'allélopathie chez les dinoflagellés de marée rouge, une stratégie commune ?

# 1. Inhibition de la photosynthèse

Dans la littérature, plusieurs espèces de dinoflagellés formant des marées rouges, sont capables d'affecter l'appareil photosynthétique de diatomées comme *Alexandrium fundyense* (Lyczkowski, & Karp-Boss et al., 2014), *Alexandrium tamarense* (Zheng et al., 2016 ; Fistarol et al., 2004), *Alexandrium minutum* (Lelong et al., 2011), *Ostreopsis ovata* (Ternon et al., 2018) et *K. brevis* (Prince et al., 2008 ; Poulson-Ellestad et al., 2014 ; Poulin et al., 2017). L'action de ces composés est la plupart du temps rapide, l'activité photosynthétique des diatomées étant inhibée après une à deux minutes d'incubation.

# 2. Perturbation des membranes des micro-algues cibles.

Un autre point commun entre les effets allélopathiques de ces différentes espèces de dinoflagellés est leur propension, à endommager les membranes cytoplasmiques des espèces cibles (Ma *et al.*, 2011 ; Prince *et al.*, 2008 ; Poulson-Ellestad *et al.*, 2014 ; Poulin *et al.*, 2017 ; Deeds & Place, 2006). Les deux phénotypes d'inhibition de la photosynthèse et de perturbation des membranes sont observés de façon concomitante, comme chez *K. brevis* qui affecte l'intégrité des membranes et l'appareil photosynthétique de la diatomée *T. pseudonana* (Poulin *et al.*, 2017). Nous avons fait la même observation pour le couple *A. minutum* et *C. muelleri*, ainsi que dans l'effet du dinoflagellé *A. carterae*, sur la diatomée *T. pseudonana*,

## 3. Nature et mode d'action des composés allélopathiques

Dans le cas des phénomènes d'allélopathie en milieu d'eau douce, plusieurs composés allélochimiques ont été isolés et caractérisés, permettant d'identifier des cibles ainsi que le mécanisme à l'œuvre. Ceci n'est pas le cas pour le monde marin.

Dans la plupart des cas, le composé allélochimique n'est pas caractérisé, rendant difficile l'étude de son activité sur la physiologie des microalgues cibles. Pour tenter de résoudre ce mystère, nous avons testé certains métabolites secondaires isolés depuis une culture d'*A*.

*carterae*, où nous avons montré que les amphidinols sont très probablement les molécules allélochimiques à l'œuvre dans l'inhibition de la photosynthèse de la diatomée *T. pseudonana*. Les espèces du genre *Amphidinium* libèrent d'autres métabolites secondaires, avec une structure ressemblant fortement aux amphidinols comme le carteraol E (Figure 60), les karatungiols (Figure 59), les lingshuiols (Figure 58) et les lutéophanols (Figure 57), qui pourraient éventuellement aussi agir comme composés allélochimiques. Par exemple, un autre dinoflagellé, *K. veneficum* produit des karlotoxines, dont l'activité allélopathique sur plusieurs microalgues a déjà été montré (Adolf et al., 2006). Ces karlotoxines, sont des molécules possédant la même structure que les amphidinols (Figure 78). Le mode d'action des amphidinols, molécule antifongique, a été très étudié à des fins pharmaceutiques et semblent avoir le même mode d'action que les karlotoxines sur les membranes biologiques : tous deux forment des porse en se liant sur les stérols membranaires (Deeds & Place, 2006 ; Iwamoto et al., 2017). *Karlodinium armiger* produit lui aussi un composé possédant la même structure que les amphidinols, la karmitoxine (Figure 78), mais l'effet sur l'appareil photosynthétique n'a jamais été étudié (Rasmussen *et al.*, 2017).



Figure 78 : Structure plannaire de la karmitoxine.

Il serait intéressant de tester l'effet de ces molécules –karlotoxines, karmitoxines – sur l'activité photosynthétique des diatomées. Si les amphidinols sont capables d'inhiber l'activité photosynthétique et de générer des pores dans les membranes (y compris les thylacoïdes), alors ces autres métabolites secondaires connus, ayant la même structure, pourraient agir de la sorte.

On a vu que les molécules de type amphidinols se liaient préférentiellement avec les stérols membranaires en s'insérant dans les membranes biologiques. Il est intéressant de mentionner que le mode d'action des composés de type-amphidinols n'est pas unique, et est aussi retrouvé chez les peptides antimicrobiens (PAMs, en anglais AMPs), également appelés peptides de défense de l'hôte (Matsuzaki, 2009). Ces peptides font partie de la réponse immunitaire innée, trouvée dans un grand nombre de tissus et de cellules chez les plantes, les invertébrés, les animaux (Ganz et al., 1998 ; Zasloff, 2002). Ils sont de puissants antibiotiques à large spectre qui peuvent entrainer la mort de bactéries à Gram positif et négatif (Brogden 2005 ; Matsuzaki, 2009). Contrairement à la majorité des antibiotiques classiques, les PAMs déstabilisent les membranes biologiques, en formant des pores (Brogden 2005) et l'attraction des PAMs sur les membranes bactériennes se fait par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre ces peptides –cationiques- et les phospholipides acides chargés négativement (les phosphatidylglycérols et les cardiolipines) (Chou et al., 2008 ; Matsuzaki, 2009), composant la couche lipidique externe de la membrane bactérienne (Matsuzaki, 2009).

Une fois leur cible atteinte, les PAMs déstabilisent les membranes bactériennes en s'insérant dans la bicouche lipidique et forment des pores provoquant la lyse cellulaire (Brogden 2005). Comme les amphidinols, les PAMs ont plusieurs états de fixations sur la membrane lipidique, deux états dits de surface pendant la formation des pores nommés « état S » et « état I » (Huang, 2000). L'« état S » correspond à l'état où les peptides sont à plat sur la membrane, en provoquant ainsi son amincissement (Chen et al., 2003). Cette conformation est retrouvée sur les membranes lorsque le ratio peptide/ lipide est faible et l'« état S » est considéré comme un état inactif des peptides (Yang et al., 2001). Une augmentation du ratio peptide/ lipide entraine un changement d'orientation des peptides au niveau des membranes, qui vont s'orienter perpendiculairement à celle-ci et s'y insérer. C'est alors qu'ils vont former des pores transmembranaires, c'est l'« état I ». Ainsi, la formation de pores dépend de la concentration en PAM. Plusieurs modèles ont été proposés dans le cas des PAMs sur le type de pores formés sur les membranes comme les pores de type « douve de tonneaux » ou de type « toroïdaux » (Brogden, 2005). C'est encore un point commun avec les amphidinols (voir la discussion du Chapitre III). Un troisième modèle a été proposé, nommé modèle « en tapis » (en anglais,

« carpet model »). A forte concentration, les peptides vont se fixer sur la membrane bactérienne grâce à des interactions électrostatiques, sans s'insérer dans la membrane hydrophobe (Shai *et al.* 2001) et vont former un tapis. La forte concentration en peptide va provoquer un effondrement de la membrane, une fois qu'une concentration seuil est atteinte (Ehrenstein *et al.* 1977). Pour que ceci soit possible, il faut que les peptides recouvrent toute la membrane. Ils ont, dans ce modèle, une action plutôt du type détergent. Ainsi, le mode d'action des composés de type amphidinols sur la membrane eucaryote semble très proche de celui des PAMs sur les membranes bactériennes.

## 4. Rôle des stérols

De plus, le composé allélochimique (encore inconnu) libéré par *Alexandrium tamarense* et affectant les membranes cytoplasmiques et chloroplastique des espèces cibles, semble avoir le même mode d'action que les composés de types amphidinols, (Ma et al., 2011). Cet aspect semble également être commun à plusieurs composés allélochimiques libérés par des dinoflagellés de marée rouge ; *K. veneficum* (Deeds & Place, 2006), *Karenia Brevis* (Leblond, 2002), *Alexandrium tamarense* (Ma et al., 2011).

L'affinité différente de ces composés allélochimiques pour les différents stérols suggère que toutes les microalgues ne présenterons pas la même sensibilité allélopathique (Deeds & Place, 2006). De plus, la concentration de ces composés joue un rôle important dans la taille des pores qui peuvent se former sur les membranes, pouvant entrainer la lyse ou juste dépolariser légèrement les membranes des espèces cibles (Iwamoto et al., 2017). Certaines cellules pourraient ainsi se retrouver lysées alors que d'autres pourrait résister à l'activité de ces composés, ceci dépendrait de la concentration de ces composés sur les membranes de la microalgue cible (Iwamoto et al., 2017).

## 5. Autoprotection des espèces à activité allélopathique

Les espèces de dinoflagellés, produisant ces composés allélopathiques s'autoprotègent de leur propre composés allélopathiques par la présence sur leur membrane de gymnodinostérols (Deeds & Place, 2006) ou des dinostérols (Ma et al., 2011), qui sont des 4-alpha-méthyl stérol,

qui contrairement aux autres stérols présentent un groupement méthyl supplémentaire en position C-4 (Deeds & Place, 2006). Ce type de stérol est retrouvé chez *A. carterae* (Whiters et al., 1978), *K. brevis* (Leblond, 2012), *Alexandrium tamarense* (Ma et al., 2011). Il serait intéressant de tester l'activité des composés de type-amphidinols sur les différentes espèces de dinoflagellés présentant ces stérols sur leurs membranes, afin de voir si elles sont toutes résistantes à ces composés allélopathiques. Un tel mécanisme de défense favoriserait dans l'environnement les espèces présentant dans leurs membranes des stérols de types 4-alphaméthyl stérol, par rapport aux autres microalgues. Cela pourrait avoir une grande influence sur la dynamique de la communauté phytoplanctonique, et dans certains cas favoriser la seule espèce produisant ces composés lytiques.

# II. Allélopathie au sein du phytoplancton : quelles méthodes ?

## 1. Avantages et désavantages de la nouvelle méthode ECS en mélange

Un des principaux objectifs de cette thèse était de développer une nouvelle méthode qui permette de mesurer l'activité photosynthétique de deux microalgues directement dans un mélange, afin de mettre en évidence des interactions allélopathique affectant la photosynthèse. La méthode basée sur l'ECS que j'ai développé et utilisé dans le Chapitre 3 permet d'éviter l'utilisation du filtrat, parfois appauvri en composé allélochimique à cause de leur rétention sur les membranes de filtrations. De même, les composés allélochimiques présents dans le filtrat peuvent être instables dans le temps. Enfin, certaines interactions allélopathiques nécessitent le contact de cellule à cellule pour la libération du composé allélochimique dans le milieu par l'espèce allélopathique.

Comme nous l'avons vu, l'ECS nous permet (i) de mesurer la photosynthèse dans des cocultures afin de suivre l'activité photosynthétique de deux micro-algues tout au long de l'expérience (ii) de déterminer la cible du composé allélochimique sur l'appareil photosynthétique et ceci directement dans le mélange et (iii) d'aider à isoler le composé allélochimique lors des différentes étapes de purification. Enfin, nous avons pu observer dans le chapitre 2 qu'une interaction allélopathique ciblant la photosynthèse pouvait avoir lieu sans donner de phénotype significatif en croissance. Cela suggère que les méthodes basées sur la croissance passent à côté de beaucoup d'interactions entre micro-algues, que notre méthode en mélange révèle. Cette méthode, relativement rapide surtout par rapport aux méthodes basées sur la croissance, peut être mise à profit pour effectuer un criblage permettant de mettre en évidence des interactions allélopathiques affectant la photosynthèse entre différentes microalgues. Nous ne l'avons pas fait pendant le déroulement de cette thèse, mais notre collaboration avec la collection de microalgues de Roscoff va nous permettre d'effectuer ce criblage à large échelle en septembre 2020.

Il serait ainsi intéressant d'étudier, grâce à l'ECS, l'activité allélopathique des dinoflagellés libérant des composés proches des amphidinols (karlotoxines, karmitoxines) sur l'appareil photosynthétique des diatomées. La vitesse photochimique permet alors de détecter, le cas échéant, une inhibition de la photosynthèse de la diatomée en mélange. Grâce aux deux sondes ECS linéaire et quadratique présentes chez les diatomées (Bailleul et al., 2015 ; article du chapitre 2), nous pouvons quantifier le gradient électrochimique de protons généré dans le noir à travers les membranes du thylacoïde, et déterminer ainsi si les composés allélochimiques agissent comme découplant sur les thylacoïdes.

Parmi les limites de la méthode, il faut noter qu'elle ne permet pas de mesurer l'activité photosynthétique dans un mélange de microalgues provenant d'un même clade phylogénique. En effet, les spectres ECS semblent conservés dans chaque groupe photosynthétique (par exemple les diatomées ou les dinoflagellés) ; il est ainsi impossible de les distinguer dans un mélange. Enfin, cette méthode basée sur la spectroscopie d'absorption nécessite des échantillons de microalgues concentrés afin d'obtenir un signal sur-bruit suffisant, concentrations qui sont pour l'instant bien supérieures aux plus hautes concentrations de diatomées et dinoflagellés retrouvées dans l'environnement.

## 2. Autres méthodes pour l'étude des interactions allélopathique

La fluorescence de la chlorophylle est une observable de l'activité photosynthétique bien plus sensible. Si elle ne permet pas, à l'heure actuelle, de déconvoluer les activités photosynthétiques de plusieurs micro-algues dans un mélange, elle reste un outil extrêmement puissant pour aborder ces questions. L'approche de fluorescence sur cellule unique, qui s'est développée récemment, permet de mesurer grâce à un microscope, l'activité photosynthétique, algue par algue, dans un mélange. Il est ainsi possible d'obtenir les différents paramètres de fluorescence (Fv/Fm,  $\Phi_{PSII}$ , NPQ) pour deux micro-algues différentes et d'étudier une interaction allélopathique affectant la photosynthèse dans un échantillon dilué.

Afin de travailler dans des conditions de co-culture plus diluée que les co-cultures que nous avons effectuées (et donc plus proche des concentrations trouvées dans l'environnement), il est possible de cultiver deux microalgues dans un système de co-culture, avec deux chambres séparées par une membrane de dialyse. On peut alors mesurer, grâce à la spectroscopie de fluorescence, l'activité photosynthétique de chacune des microalgues dans leurs chambres.

Mais ceci doit être fait avec précaution car de la nature de la membrane dépend la diffusion des composés allélochimiques impliqués dans l'interaction.

# 3. Quel paramètre basé sur la fluorescence du PSII utiliser, dans l'étude des interactions allélopathiques ?

Enfin, nous avons remarqué que la mesure du rendement quantique maximale du PSII (Fv/Fm) dans les différentes études s'intéressant aux interactions allélopathiques, était utilisé pour évaluer l'activité photosynthétique d'une microalgue. Or, cette mesure renseigne sur l'efficacité maximale du PSII à effectuer la photochimie (et donc son intégrité) et non sur l'état de la chaîne photosynthétique dans son ensemble. Ainsi, le transfert d'électron au sein de la chaîne photosynthétique peut être inhibé sans que cela ne provoque de diminution du Fv/Fm. Le composé allélochimique pourrait agir sur un autre complexe photosynthétique assez loin du PSII sans pour autant provoquer sa dégradation par des phénomènes de photoinhibition. Il est donc en partie illusoire d'espérer déterminer la cible d'un composé allélochimique sur l'appareil photosynthétique par la seule mesure du Fv/Fm. Afin de mesurer plus rapidement une inhibition du transfert d'électron dans la chaîne photosynthétique grâce à la fluorescence, la mesure du rendement quantique à la lumière du PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) me semble être une mesure plus appropriée dans l'étude des interactions allélopathiques ciblant la photosynthèse. Cela est bien illustré dans le cas de l'inhibition de la photosynthèse de la diatomée Chaetoceros muelleri par Alexandrium minutum : à des temps pour lesquels le Fv/ Fm était inchangé, le  $\Phi_{PSII}$  était déjà largement diminué.

# Annexe

# I. Article soumis: Allelochemistry in the dynamics of microalgal species: case study of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*.

Une collaboration avec Eva Ternon (Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Sorbonne Université, CNRS UMR7093) s'intéresse à l'activité allélopathique du dinoflagellé *Ostreopsis ovata* sur la diatomée *Licmophora paradoxa*. Nos collaborateurs avaient montré que le dinoflagellé était capable d'inhiber l'activité du PSII de la diatomée après des temps d'incubation longs, mais la molécule responsable de cette activité reste encore inconnue. *Ostreopsis ovata* produit plusieurs métabolites secondaires, dont les ovatoxines, qui pourraient être les agents responsables de l'activité allélopathique du dinoflagellé sur la diatomée. Dans ce projet, ma contribution a été relativement mineure (Figure 6 du manuscrit, soumis) : j'ai pu montrer que les ovatoxines inhibaient effectivement l'activité photosynthétique de la diatomée sans pouvoir identifier la cible exacte de cette inhibition. Limnology and Oceanography



## Allelochemistry in the dynamics of microalgal species: case study of the toxic benthic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata.

| Journal:                         | Limnology and Oceanography  |
|----------------------------------|---|
| Manuscript ID                    | Draft   |
| Wiley - Manuscript type:         | Original Article  |
| Date Submitted by the<br>Author: | n/a   |
| Complete List of Authors:        | TERNON, Eva; GEOAZUR Library, ; LOV,<br>Pavaux, Anne-Sophie; LOV,<br>Peltekis, Alexandra; IBPC<br>Gémin, Marin-Pierre; Ifremer Département Ressources Biologiques et<br>Environnement<br>Jauzein, Cécile; Ifremer Centre de Brest<br>Bailleul, Benjamin; IBPC<br>Lemée, Rodolphe; LOV,<br>Thomas, Olivier; NUI Galway   |
| Keywords:                        | Ostreopsis cf. ovata, allelochemistry, toxins, species succession,<br>Photosystem II  |
| Abstract:                        | As increasing knowledge has been gained on the chemical interactions<br>between marine organisms, their role in shaping communities is now well<br>accepted and should be considered for species dynamics. Among<br>microalgae, toxic dinoflagellates are likely to use chemical interactions<br>due to their rich and complex specialized metabolism. Recurrent blooms<br>of the toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata have been reported in the<br>Northern Mediterranean Sea and field observations suggest that the<br>growth of other microalgae sharing the same habitat is inhibited during<br>toxic blooms. A series of experiments was carried out in replete nutrients<br>conditions, including co-cultures between O. cf. ovata and its<br>competitors, and bioassays against these competitors with O. cf. ovata's<br>chemical extracts as well as pure toxins. The sensitivity towards O. cf.<br>ovata cells was highly species specific and linked to physiological traits of<br>the microalgae, like their motility. A mixture of ovatoxins but also other<br>uncharacterized metabolites were shown to impair the growth of the<br>competitors N. arenaria, L. paradoxa and P. lima. Further investigation of<br>the effects of the ovatoxins on the photosynthetic electron transfer chain<br>of L. paradoxa revealed that the PSII is not a target for the toxins. A<br>downstream step is rather being affected although not identified at this<br>stage. Altogether, these results show that the specialized metabolism<br>can greatly influence species dynamics and should be considered for a<br>better assessment of the ecosystem composition. |

Limnology and Oceanography

- Allelochemistry in the dynamics of microalgal species: case study of the toxic 1
- benthic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata. 2
- 3 Ternon Eva<sup>a,b,c</sup>, Pavaux Anne-Sophie<sup>b</sup>, Peltekis Alexandra<sup>d</sup>, Gemin Marin-Pierre<sup>e</sup>, Jauzein Cécile<sup>f</sup>, Bailleul
- 4 Benjamin<sup>d</sup>, Lemée Rodolphe<sup>b</sup>, Thomas Olivier P.<sup>a,g</sup>
- 5 a. Université Côte d'Azur, CNRS, OCA, IRD, Géoazur, 250 rue Albert Einstein, 06560 Valbonne, France
- b. Sorbonne Universités, CNRS UMR7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, 06234 6
- 7 Villefranche sur mer, France, pavaux@obs-vlfr.fr, lemee@obs-vlfr.fr
- 8 c. Center for Marine Biotechnology and Biomedicine, Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, La Jolla, CA, 92093, United States 9
- 10 d. Sorbonne Université, CNRS UMR7141, IBPC, Laboratoire de Biologie du chloroplaste et perception 11 de la lumière chez les micro-algues, Paris, France, bailleul@ibpc.fr, peltekis@ibpc.fr
- e. IFREMER, Phycotoxins Laboratory, F-44311 Nantes, France, Marin.Pierre.Gemin@ifremer.fr 12
- 13 f. IFREMER, Centre de Brest, DYNECO PELAGOS, F-29280 Plouzané, France, 14 Cecile.Jauzein@ifremer.fr
- g. Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway 15 (NUI Galway), University Road, H91 TK33 Galway, Ireland, olivier.thomas@nuigalway.ie 16
- 17

#### 18 Abstract

| 17 |   |
|----|---|
| 18 | Abstract  |
| 19 | As increasing knowledge has been gained on the chemical interactions between marine organisms, their              |
| 20 | role in shaping communities is now well accepted and should be considered for species dynamics. Among             |
| 21 | microalgae, toxic dinoflagellates are likely to use chemical interactions due to their rich and complex           |
| 22 | specialized metabolism. Recurrent blooms of the toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata have been               |
| 23 | reported in the Northern Mediterranean Sea and field observations suggest that the growth of other                |
| 24 | microalgae sharing the same habitat is inhibited during toxic blooms. A series of experiments was carried         |
| 25 | out in replete nutrients conditions, including co-cultures between O. cf. ovata and its competitors, and          |
| 26 | bioassays against these competitors with O. cf. ovata's chemical extracts as well as pure toxins. The             |
| 27 | sensitivity towards O. cf. ovata cells was highly species specific and linked to physiological traits of the      |
| 28 | microalgae, like their motility. A mixture of ovatoxins but also other uncharacterized metabolites were           |
| 29 | shown to impair the growth of the competitors N. arenaria, L. paradoxa and P. lima. Further investigation         |
| 30 | of the effects of the ovatoxins on the photosynthetic electron transfer chain of <i>L. paradoxa</i> revealed that |

Page 3 of 29

## Limnology and Oceanography

- 31 the PSII is not a target for the toxins. A downstream step is rather being affected although not identified
- 32 at this stage. Altogether, these results show that the specialized metabolism can greatly influence species
- 33 dynamics and should be considered for a better assessment of the ecosystem composition.
- 34

## 35 Introduction

36 Microalgae are major components of marine food webs due to their critical role in regulating 37 biogeochemical cycles (Falkowski et al., 1998) and achieving nearly half of the total global atmospheric 38 CO<sub>2</sub> fixation (Field et al., 1998). Understanding the mechanisms that control their distribution and species 39 dynamics is crucial as higher trophic levels and major biogeochemical cycles may be impacted (Falkowski 40 et al., 1998). The co-existence of a large diversity of species in marine ecosystems yield to specific 41 ecological niches that are largely defined by fundamental physiological processes such as access to the 42 resources (nutrients and light), along with resistance to predators and pathogens (Margalef, 1979). A full 43 access to the resource leads to inter-specific competition for which microalgae have developed eco-44 physiological and morphological traits to help them succeed (Litchman et al., 2007). 45 Allelopathy is increasingly being highlighted as an important trait in all microalgal clades for inter-specific 46 competition (Schwartz et al., 2016; Brown et al., 2019 for reviews). The release of allelochemicals may 47 impact the competitors by modifying their nutrient uptake (Lyczkowski and Karp-Boss, 2014), motility (Lim 48 et al., 2014; Fernández-Herrera et al., 2016), photosynthetic efficiency (K. Poulson-Ellestad et al., 2014), growth (Wang et al., 2017a) or even cell integrity (Poulson-Ellestad et al., 2014; Wang et al., 2017b; Poulin

- 49 growth (Wang et al., 2017a) or even cell integrity (Poulson-Ellestad et al., 2014; Wang et al., 2017b; Poulin 50 et al., 2018). Even though chemical interactions occur at the individual scale, they can have major
- 51 implications at the ecosystem level (Hattenrath-Lehmann and Gobler, 2017). However, and despite recent
- 52 efforts on the characterization of allelochemicals produced by microalgae (Pohnert, 2005; Gillard et al.,
- 53 2013; Selander et al., 2015; Gallo et al., 2017), only a limited number of these metabolites have been
- 54 structurally identified. Our knowledge on the physiological effects of microalgal allelochemicals is also
- 55 insufficient although recent findings showed a disruption of osmoregulation, photosynthesis, or lipid
- 56 biosynthesis (Poulson-Ellestad et al., 2014; Poulin et al., 2018; Long et al., 2018). The recent development
- 57 of co-culture devices for microbial communities by the group of Pohnert (Paul et al., 2013) has paved the
- 58 way for the characterization of chemical interactions. Indeed this type of device allows the investigation
- 59 of the structure of the allelochemicals together with their cellular effects in either inter- or intra-specific
- 60 interactions, shedding new light on microalgal species dynamics (Dunker et al., 2017).
- 61 Dinoflagellates are one of the major clades of microalgae and possess a rich and complex specialized
- 62 metabolome (Shimizu, 1993; Simon et al., 2009). Because some dinoflagellates are known to produce

## Limnology and Oceanography

Page 4 of 29

63 metabolites that were found to be toxic to other marine organisms and humans (Botana, 2014), they 64 represent a good model to study microalgal allelochemistry. Various studies have already reported cellular 65 effects induced by dinoflagellates allelochemicals on other microalgal species, like diatoms (Hakanen et al., 2014; Lim et al., 2014; Lyczkowski and Karp-Boss, 2014; Poulson-Ellestad et al., 2014; Sala-Pérez et al., 66 67 2016; Long et al., 2018). Interestingly, the allelochemical nature of the toxins have been rarely demonstrated (Kubanek et al., 2005; K. Poulson-Ellestad et al., 2014), therefore questioning the real 68 69 ecological role of these compounds in the ecosystems. 70 This study intends to bring some new insights on the role of dinoflagellates metabolites in the species dynamics of microalgae. The benthic and toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata was chosen as a model 71 72 as it frequently blooms in the Northern Mediterranean Sea (Mangialajo et al., 2011) and constitutes a 73 health and ecological concern. The culture medium of O. cf. ovata has already been shown to inhibit the 74 photosystem II (PSII, (Ternon et al., 2018)) and the growth of several competitors (Monti and Cecchin, 75 2012; García-Portela et al., 2016), suggesting the presence of allelochemicals. This species is known to contain structural analogues of the potent palytoxin named ovatoxins (Ciminiello et al., 2008; Brissard et 76 77 al., 2015) that could act as allelochemicals. In previous study, the distance interactions between the toxic 78 dinoflagellate O. cf. ovata and one of its competitors, the diatom Licmophora paradoxa, was investigated. 79 The results suggested that a contact or at least close interactions between cells were needed to impair the growth of the competitor (Ternon et al., 2018). Contact interactions playing an important role in chemical 80 81 ecology due to the dilution factors at a longer distance (Jonsson et al., 2009), the present study aims to 82 investigate the contact interactions between O. cf. ovata and several co-occurring microalgal species. 83 Additionally, the thick mucus produced by O. cf. ovata (Honsell et al., 2013) could serve as an ideal 84 environment for the concentration of allelochemicals, including the toxins (Giussani et al., 2015). In this 85 study, co-culture experiments allowing cell-cell contacts were carried out at various growth stages of the 86 dinoflagellate and its natural competitors to investigate the variability of the chemical interactions over 87 their growth. The effects of all chemical fractions obtained from O. cf. ovata as well as a mixture of 88 ovatoxins were also examined on all competitors at the same growth stages. Finally, the photosynthetic 89 performance of the competitor L. paradoxa was more deeply evaluated as a possible target of ovatoxins. 90

## 91 Material and Method

A scheme of the experimental design is given in Figure 1 and includes a set of co-cultures (testing the
influence of alive *O*. cf. *ovata* cells) and two sets of bioassays (testing the activity of chemical fractions and
the ovatoxins). All experiments were performed on four microalgal species known to occupy the same

Page 5 of 29

105

## Limnology and Oceanography

ecological niche as O. cf. ovata (Accoroni et al., 2016; Marro et al., 2019; Ninčević Gladan et al., 2019): the 95 96 diatoms Licmophora paradoxa and Navicula arenaria; and the dinoflagellates Prorocentrum lima and 97 Coolia monotis. All strains were monoclonal and obtained from the MCCV (Mediterranean Culture Collection of Villefranche, MCCV33, 109, 47 and 112 respectively) and grown in L1 medium (Guillard and 98 99 Ryther, 1962) prepared with autoclaved aged and filtered seawater adjusted to a salinity of 38 and maintained at 22 °C, under a 14:10 light/dark cycle with a light intensity of 250 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Both the co-100 cultures and the bioassays were performed at three stages of growth of O. cf. ovata and its competitors 101 to investigate a potential variability of the metabolic response through the growth. Due to small variability 102 of the growth curve between the five species, an average time was chosen to investigate the (i) induction 103 104 (IN), (ii) exponential (EX) and (iii) stationary (ST) phases at days 3, 10 and 17 of their growth, respectively.

#### 106 Co-culture experiments

107 The co-culture experiments allowed cell-cell contacts between O. cf. ovata and one competitor, as a dual 108 interaction. All competitors were grown in separate 75 mL flasks and O. cf. ovata in one 300 mL Fernbach for 20 days, and these parent flasks were used to seed the co-cultures at days 3, 10 and 17 of growth. To 109 110 mimic natural conditions, the ratios of cells O. cf. ovata/competitors observed in the field at the (i) beginning, (ii) peak and (iii) end of the 2016 bloom at the Rochambeau site (43°41'35.64"N-7°18'31.54"E, 111 Northwestern Mediterranean Sea) were used to seed the three respective sets of co-cultures (Table 1). 112 113 To do so, 1 mL was sampled from both the parent flasks and Fernbach and immediately fixed with acidic 114 lugol (4% v/v) for cell counting under microscope. After determination of the cell abundance, 15 daughters 50 mL co-culture flasks were seeded with one of the four competitors (60 flasks in total) among which 12 115 116 received cells of O. cf. ovata at a concentration of 150 cell/mL, and three were control flasks. Three 117 additional control flasks were set for O. cf. ovata alone using the same cell concentration. Each co-culture 118 was maintained for 17 days and every 3-4 days, a 1 mL aliquot was sampled from each flask after scraping 119 the bottom of the flask to disseminate the cells, and the aliquots were fixed with acidic lugol to monitor 120 the cell concentration. Additionally, 15 mL was sampled in sterile conditions at days 14 and 17 from all flasks and filtered on a 0.2 µm syringe filters to remove cells. These filtrates were stored -20 °C until 121 122 analyses of both the nitrate and nitrite concentrations. 123 Cell counting – All countings were performed under microscope using Sedgewick rafter counting chamber. 124 Nutrients measurements - Nitrite (NO2-) and Nitrate (NO3-) concentrations were measured to follow the

- 125 microalgae uptake, using an Auto-analyser II Technicon (Bendschneider and Robinson, 1952).
- 126

Limnology and Oceanography

Page 6 of 29

## 127 Chemistry of Ostreopsis cf. ovata

128 Extraction of the exo- and endo-metabolome along the growth - Twelve 300 mL flasks were filled with 129 300 mL of L1 medium and 9 of them were further seeded with Ostreopsis cf. ovata at an initial concentration of 1,100 cell.mL<sup>-1</sup>, the three remaining flasks being the blanks (no cells). All flasks were 130 131 placed in an incubator at 24 °C avoiding any shading between them. At days 3, 10 and 17, one blank and three O. cf. ovata flasks were sampled and 1 mL was subsampled for cell counting while the rest of the 132 flasks were transferred to 50 mL falcon tubes that were further centrifuged at 900 g and 21 °C for 10 min. 133 The supernatant was collected and filtered upon 0.2 µm of a glass filtering device and the cell pellet was 134 flash-frozen using liquid nitrogen and further stored at -20 °C. The sterile supernatants were immediately 135 extracted using C18 discs (47 mm diameter, Supelco) under low vacuum (< 5 mm Hg), following the method 136 137 described in Ternon et al., 2018. Briefly, the procedure provided by the supplier was followed using MeOH as the eluent (3 x 5 mL for activation and conditioning and 3 x 3 mL for elution). The organic extracts were 138 139 evaporated to 250 µL under a stream of nitrogen before being stored at -20 °C until analysis.

140 Preparation of a pool of ovatoxins - A mixture of 5 ovatoxins (OVTX-a to -e) was obtained from pellets of O. cf. ovata MCCV 54 cultivated in L1 medium. Toxins were extracted from 5 g pellets (75 g in total) with 141 142 20 mL of MeOH:water (1:1, v/v) by vortex-mixing during 1 min. After centrifugation (4000 g, 5 min), the 143 supernatant was collected, and the pellet rinsed twice with the same volume of mixture of solvents. All supernatants were pooled and concentrated at 30 °C under a stream of nitrogen until a final volume of 1.2 144 145 mL. These concentrated extracts were further fractionated by exclusion chromatography (Sephadex LH20, 146 column of 70 x 1.5 cm) according to (Brissard et al., 2015) by using 300 mL of pure MeOH for the elution 147 and collecting 10 mL fractions. Ovatoxin content of each fraction was determined by LC-MS/MS as in 148 (Gémin et al., in rev.). The OVTX-containing fractions were pooled and concentrated before purification by 149 semi-prep chromatography according to (Brissard et al., 2015) using a liquid chromatographic system (Agilent 1160) coupled to a DAD detector (1260 Infinity II DAD WR) ( $\lambda$  = 233 and  $\lambda$  = 263 nm). Ovatoxins 150 151 were purified trough the semi preparative column Uptisphere C<sub>18</sub>-TF (Interchim, 250 mm x 10 mm, 5 μm) 152 at 25 °C. The elution gradient (water (A) and a mixture of acetonitrile/water (95:5 v/v) (B) both with 0.2 % of acetic acid) was: 20 to 100% of B during 30 min, maintained 5 min at 100%. Fractions corresponding to 153 154 the pool of OVTXs were collected in polypropylene tubes and finally concentrated at 30 °C under a flux of 155 nitrogen in 1 mL DMSO.

156 **Preparation of the fractions** – A volume of 1.4 L of a 10 days culture containing 20,240 cell.mL<sup>-1</sup> of O. cf.

157 ovata was centrifuged at 800 g and 21 °C for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet

158 flash-frozen using liquid nitrogen to quench any cell metabolism, and further stored at -20 °C prior to

Page 7 of 29

## Limnology and Oceanography

freeze-drying. A mass of 85 mg of dried cells was extracted using 4 mL of MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) in an 159 160 ultrasonic bath for 10 min. The extract was centrifuged at 1000 g during 10 min and the supernatant was 161 collected and transferred into a glass vial. The procedure was repeated 2 more times to obtain 12 mL of 162 extract. The extract was then concentrated under a gentle flow of N2 at 35 °C until evaporation of the 163 MeOH (leaving about 2-3 ml of water). The aqueous extract was loaded on a C18 SPE cartridge (500 mg, Supelco) previously washed with MeOH (6 mL) and conditioned with MilliQ-water (6 mL). Prior to the 164 elution, the sample was desalted with 6 mL of MilliQ-water and a step-gradient elution was then applied 165 using 6 mL of mixtures of H<sub>2</sub>O/MeOH (100:0) to H<sub>2</sub>O/MeOH (0:100), and steps of 20% of MeOH. An 166 additional elution with 6 mL of acetonitrile was performed, yielding a total of seven fractions (FW, FW8M2, 167 FW6M4, FW4M6, FW2M8, FM and FACN, from the most polar to non-polar eluents, W for H<sub>2</sub>O; M for 168 MeOH, ACN for acetonitrile and the numbers for the corresponding percentage of solvent). Aliquots of 169 100  $\mu$ L sampled from each fraction were concentrated to dryness under a N<sub>2</sub> stream (35 °C) to assess their 170 171 respective weight. A volume of 1 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to the 7 fractions before evaporation of the organic solvents leading to a DMSO solution for each fraction. Based on the fractions 172 weight, their volume of solubilisation were further adjusted using DMSO to reach a concentration of 173 174 3 mg.mL<sup>-1</sup>. All fractions were stored at -20 °C until further bioassays and chemical analysis.

175

UHPLC-HRMS analyses - An analysis of the chemical content of (i) all fractions and (ii) the endo and 176 177 exometabolome of O. cf. ovata was performed by UHPLC-HRMS using an Agilent 1290 system (Agilent 178 Technologies, USA) equipped with a diode array detector and coupled to an Agilent 6540 QToF mass 179 spectrometer (Agilent Technologies, USA). Analyses were performed in full scan positive mode (ESI +). A 180 volume of 10 µL of each sample was injected and analysed on a reverse phase column (Acquity UPLC HSS 181 T3 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm, Waters) using a linear elution gradient over 15 min with H<sub>2</sub>O/MeOH/ formic 182 acid 0.1% from 90:10 (v:v, isocratic from 0 to 2mins) to 0:100 (v:v, isocratic from 12 to 13 mins) at a flow 183 rate of 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. Collision energies (CE) of 70 eV were applied to obtain the MS/MS spectra. UV spectra 184 were extracted at 210, 233 and 263 nm. The spectrometer analyser parameters were set as follows: 185 nebulizer sheath gas, N<sub>2</sub> (35 psig); drying gas, N<sub>2</sub> (11 L.min<sup>-1</sup>); Gas Temperature, 300 °C; capillary, 4.129 186 µA; Vaporizer/Sheath Gas Temp, 350 °C. A quantification of the ovatoxins was performed using 187 commercial palytoxin as a reference (Wako Chemicals, GmbH, Neuss, Germany) considering similar MS 188 responses for all the analogues. A calibration curve for palytoxin was built using concentrations between 1 and 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> and the major triply charged adduct [M+3H-4H<sub>2</sub>O]<sup>3+</sup> at m/z 870.1571 for quantification. 189

Limnology and Oceanography

Page 8 of 29

The same adduct was used to quantify ovatoxin a (m/z 859.4956) in all samples, considering other 190 analogues in the pool of ovatoxins negligible (Brissard et al., 2014). 191 192 Bioassays Three sets of bioassays were carried out to investigate the impact of both ovatoxins and fractions of O. cf. 193 ovata on the physiology of each of the four competitors at three different growth stages (IN, EX, ST). Each 194 competitor was grown in a 150 mL mother flask for 20 days. At days 3, 10 and 17, a volume of 1 mL was 195 196 sampled in sterile conditions from this mother flask and added to 2 mL of fresh L1 medium in 12 well plates 197 to reach 200 cell.mL<sup>-1</sup> for each species. In total, 10 assays were performed for each species - ovatoxins 1 and 10 µg.mL<sup>-1</sup>; chemical fractions FW to FACN at 10 µg.mL<sup>-1</sup> and a control – and all assays were performed 198 199 in triplicates. DMSO solutions of 3 and 0.3 mg.mL<sup>-1</sup> were prepared for both the ovatoxins and the fractions, 200 and 10 µL of each chemical solutions were added to the corresponding well to reach a concentration of 10 and 1 µg.mL<sup>-1</sup>. For control conditions, 10 µL of DMSO only was added yielding a final non-toxic 201 202 concentration of 0.3% of DMSO each well. The well-plates were further incubated at 22 °C for 24 h until 203 assessment of the photosynthetic efficiency of the competitors. 204 PAM measurement - The method used in this study was described previously (Ternon et al., 2018). Briefly, 205 after being incubated 24 h with either the mixture of ovatoxins or the fractions, the well-plates containing 206 the competitors were placed in the dark for 15 min before being transferred to a 2 mL glass cuvette 207 immediately moved to a MC-PAM (Multi-Color Pulse-Amplitude-Modulated, Heinz Walz Gmbh, Effeltrich, 208 Germany) equipped with a blue LED (440 nm) as a source for the actinic light and a white LED used for the

saturating pulses. The Fv/Fm (maximum quantum yield) of the photosystem II (PSII) was used as a proxy of the microalgae physiological state. It was calculated as (Fm – F0)/Fm, where F0 is the fluorescence of a dark-adapted sample and Fm is measured after application of a saturation pulse of light (intensity 431  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, 300 ms duration). Curve-fitting software provided with the instrument (PAMwin V3.20W) was used to obtain Fv/Fm. All curve fits and fluorescence transients were manually inspected in real time. An activity of the toxins and fractions was calculated as a percentage based on the Fv/Fm of the PSII using the following equation:

....

$$\% = \left(1 - \frac{\left(\frac{Fv}{Fm}\right)treatment}{Average\left(\frac{Fv}{Fm}\right)control}\right) * 100$$

217

216

Page 9 of 29

## Limnology and Oceanography

Photosynthetic performance - The effect of ovatoxins on the photosynthetic performance of L. paradoxa 218 219 was measured using a Joliot-type spectrometer (JTS-10, Biologic, Grenoble, France). Maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) was calculated as explained before. The PSII quantum yield in light-adapted (800 µE.m<sup>-</sup> 220  $^{2}$ .s<sup>-1</sup>) samples of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) was calculated as  $\Phi_{PSII}$  = (Fm' – Fstat)/Fm', where Fstat is the fluorescence of the 221 sample adapted to the actinic light (800  $\mu\text{E.m}^{\text{-2}}\text{.s}^{\text{-1}}$ ) and Fm' the fluorescence when a saturating pulse is 222 applied on light-adapted sample. The photochemical rate (PSI + PSII activity) was calculated using as 223 224 described in (Bailleul et al., 2010). In brief, the Electro-chromic Shift of photosynthetic pigments was 225 followed at 532 nm under steady-state illumination (800 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) and at the offset of light. The slope of ECS was measured for the first 5 ms after light offset and then normalized by a saturating laser flash-226 227 induced ECS increase, providing an expression of the photochemical rate in charge separations per 228 photosystem per second (charge sep. PS<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>).

229

#### 230 Statistics

Unpaired two-sided *t*-tests were performed on R 3.4.0 to obtain significant differences in cell abundance in the co-culture experiments. Levels of significance were given as \*p < 0.1, \*\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.01.

233

## 234 Results

#### 235 Co-culture experiments

*Competitors* – Since metabolic variations may occur along the microalgae growth, we designed co-culture
experiments with the aim to also assess whether this variability influences the interactions between
species. Therefore, three co-culture were set up, by transferring cells that either reached the (i) induction
(IN), (ii) exponential (EX) or (iii) stationary (ST) phases. All co-cultures were maintained 17 days, mimicking
an approximate duration of a bloom of *O*. cf. *ovata*.
The effects of the presence of *O*. cf. *ovata* on the competitors' growth varied between species as shown

by the evolution of their cell concentrations in the co-cultures (Figure 2). Whereas no significant change was observed on the growth of the dinoflagellate *C. monotis* when co-cultured with *O. cf. ovata* (Figure 2D), the growth of all other competitors (both the diatoms *L. paradoxa*, and *N. arenaria* and the dinoflagellate *P. lima*) were influenced, positively or negatively according to their growth stage (Figure 2A to C).

The decrease in cell abundance was found to be the most significant for *P. lima* ( $p \le 0.1$ ; Figure 2C), particularly for cells seeded in the **EX** phase. The inhibition was particularly marked from day 10 onwards,

with a decrease of the cell abundance by a factor 4 to 6.5 ( $236 \pm 95$  against  $67 \pm 31$  cell.mL<sup>-1</sup>). Interestingly,
Page 10 of 29

the two diatoms L. paradoxa and N. arenaria were both either positively or negatively impacted, 250 251 depending on the phase of the cells transferred to the co-cultures. While the growth of IN and EX cells (3 252 and 10 days) of *L. paradoxa* was significantly impaired ( $p \le 0.1$ ; Figure 2A), the growth of **ST** cells (17 days) was stimulated after day 10 (increase by a factor 1.6 of the cell abundance), although not statistically 253 254 significant (Figure 2A). A different pattern was observed for the diatom N. arenaria, for which cells first benefitted from being co-cultured with O. cf. ovata (p < 0.05) until they reach day 14, 10 and 7 (Figure 2B), 255 respectively. A slower growth was then observed towards the end of the experiment, with a start of the 256 decrease positively correlated with the age of the transferred cells (day 10 at ST against 14-17 at EX and 257 258 IN phases). Nutrients consumption - The nitrate and nitrite concentrations were monitored at days 14 and 17 of the 259 260 co-culture experiments in all flasks (Table 2) to ensure that nutrient limitation has not occurred. The consumption of nitrates fluctuates with the species, with particularly high consumption rates measured 261 for L. paradoxa, in accordance with the high cell concentration measured (up to 180,000 cells.mL<sup>-1</sup>). For all 262 species and conditions, nitrates were sufficiently supplied to the cells until the end of the experiment. 263 Critical concentration of 1 µM was almost reached for only one replicate of L. paradoxa at day 17 of the 264 first co-culture (IN, 1.14  $\mu$ M), but the measured value is unlikely to had an impact on the growth of the 265 266 diatoms. Interestingly, nitrites are released by O. cf. ovata in monocultures within proportions positively correlated 267 268 to the nitrates concentration (e.g.  $[NO_2]=35 \ \mu\text{M}$  and  $[NO_3]=406 \ \mu\text{M}$ ,  $[NO_2]=0.05 \ \mu\text{M}$  and  $[NO_3]=2.05 \ \mu\text{M}$  and  $[NO_3]=2.05$ 269 μM co-cultures I and II at day 17, respectively). This phenomenon is also noticed when O. cf. ovata is co-270 cultured with all four competitors, mostly at day 14 but also at day 17 in some cases (e.g. [NO<sub>2</sub>] = 30 µM 271  $[NO_3]$  = 55  $\mu$ M for N. arenaria). No significant concentrations of nitrites were detected in any of the 272 competitors' monocultures. 273 O. cf. ovata concentration - The abundance of O. cf. ovata cells was monitored in the three sets of co-274 cultures (Figure 3) in order to assess whether the species could be influenced by the presence of the four

275competitors. Different growth trends were observed, depending on the competitor and the growth phase276reached by the cells being transferred. Overall, the presence of competitors did not induce a significant277increase in cell abundance of O. cf. ovata as expected from a mixotrophic species. Conversely, O. cf. ovata278cells transferred at **EX** phase (Figure 3) were significantly less abundant throughout the experiment when279co-cultured with several of its competitors ( $p \le 0.1$ ; N. arenaria, P. lima, C. monotis). Similarly, the growth280of O. cf. ovata transferred during the **ST** phase was inhibited by all competitors after 14 days of co-culture

281 (Figure 3). Being transferred at the IN phase, O. cf. ovata cells started to grow exponentially at the end of

Page 11 of 29

#### Limnology and Oceanography

- the experiment in the first set of co-culture (Figure 3), making any conclusion about the growth pattern 282 283 difficult to draw, except that most competitors induce a decrease in O. cf. ovata cell abundance. 284 Analysis of the ovatoxin content The concentration in ovatoxin-a in both the cells and the medium was evaluated at days 3, 10 and 17 in a 285 monoculture of O. cf. ovata. A slight increase of the cellular toxin content from  $24.6 \pm 8.7$  to  $35.2 \pm 7.4$  pg 286 equivalent pltx.cell $^{-1}$  was measured between day 3 and 10, followed by a decrease on day 17 with 12.5  $\pm$ 287 3.4 pg eq pltx.cell-1 (Figure 4). In the meantime, the toxin content in the medium positively correlates the 288 cell growth, starting from 0 to 12.8  $\pm$  8.8  $\mu g.L^{\text{-1}}.$ 289 Evaluation of the ecotoxicity of the ovatoxins 290 291 The activity of the ovatoxins on O. cf. ovata's competitors was assessed through the measurement of the 292 variation of the maximal efficiency of the microalgal photosystem II (PSII), i.e. its maximal quantum yield (Fv/Fm, see Methods) after 24 h of exposure to the mixture of ovatoxins. Again, this bioassay was 293 294 performed using cultures of micro-algal cells in IN, EX and ST phases to assess whether their sensitivity to 295 ovatoxins was growth-dependent (Figure 5). While 1 µg.mL<sup>-1</sup> of ovatoxins did not affect the PSII of any competitors, a concentration of 10 µg.mL<sup>-1</sup> (or 296 297 approximately 3.77 µM) did significantly inhibit the PSII of both diatoms (L. paradoxa and N. arenaria) and 298 one dinoflagellate (P. lima). The sensitivity to ovatoxins was dependent on the age of the cells. L. paradoxa was more sensitive at IN and ST stages of growth (100 and 90% of activity) than during the EX phase (50%). 299 300 The sensitivity of N. arenaria increased with cell age, as shown by the increase of the toxin activity from 301 35% to 100%. Prorocentrum lima only showed a significant inhibition by the ovatoxins at ST stage of growth 302 (45%). 303 The mechanisms involved in the inhibition of the PSII efficiency were more deeply investigated for the 304 highly sensitive *L. paradoxa*. After 6 min of exposition to 10 µg.ml<sup>-1</sup> of ovatoxins, the maximum quantum yield of the PSII did not vary (Figure 6 A). However, under steady state illumination, photosynthesis was 305 306 significantly affected. A decrease by 48 ± 25 % of the quantum yield of the PSII was measured after the samples were exposed to six minutes of high light (800 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, Figure 6B). Furthermore, under the same 307 irradiance, the exposure to ovatoxins decreased the photochemical rate of photosystem I (PSI) and PSII by 308 309 36 ± 12 % (Figure 6C). Taken together, these results indicate that the efficiency of the photosynthetic chain
- 310 of *L. paradoxa* is impaired at short time scale (minutes) by a concentration of 10 μg.mL<sup>-1</sup> of ovatoxins.
- 311
- 312 Evaluation of the toxicity of Ostreopsis fractions

Page 12 of 29

To investigate whether other metabolites than ovatoxins produced by O. cf. ovata could affect the 313 314 efficiency of the PSII, the metabolome was fractionated into seven chemical fractions of different polarity. 315 Each fraction was tested for its activity on the four competitors, using a concentration of 10 µg.mL<sup>-1</sup> for 316 each fraction. Again, the bioassays were performed at the three growth stages (IN, EX and ST phases) to 317 assess existing growth variability in the response of the microalgae. Ovatoxins were detected in both FW2M8 and FM (20.66 and 4.99 µg of ovatoxin a, respectively), yielding 318 final concentrations in the bioassays of 46 and 2.17 ng.mL<sup>-1</sup>, respectively. No ovatoxin analogs were 319 320 detected by MS in the other fractions. The activity of the fractions highly depended on the species tested and their growth stage (Figure 7) and was not only linked to the presence of the ovatoxins. Indeed, in the 321 322 IN stage, the activity of all fractions was negligible (< 10%) for all competitors (Figure 7). Fraction FACN 323 showed a significant activity on both diatoms in the EX phase (25 and 35% for L. paradoxa and N. arenaria, respectively, Figure 7). In late growth phases ST, FACN no longer showed activity on any of the competitors, 324 325 but the FM significantly inhibited the PSII of N. arenaria (18%, Figure 7) and FW to FW6M4 also induced a 326 reduced maximal quantum yield of PSII in the dinoflagellate P. lima (10%, Figure 7). These results suggest that metabolites other than the ovatoxins might be involved in the ecological interactions. 327

328

## 329 Discussion

Regular field observations show that a dramatic decrease in the abundance of diatoms occurs 330 331 during natural blooms of Ostreopsis cf. ovata (Accoroni et al., 2016; Marro et al., 2019) whereas the 332 abundance of other dinoflagellates remains rather stable (Vila et al., 2001; Ninčević Gladan et al., 2019). Interestingly, no significant variation of the nutrients concentrationis simultaneously detected, ruling out 333 334 a direct link with the species dynamics in the water column (Jauzein, personal observation). The replete 335 nutrient conditions maintained during the co-culture experiments also exclude the nitrates as a limiting factor to the growth of the microalgae. Allelochemistry is rather likely involved in the interactions between 336 337 species as further suggested by the bioassay experiments.

338

#### 339 Influence of the presence of O. cf. ovata on its competitors

Although *O*. cf. *ovata* biosynthesizes ovatoxins (palytoxins analogues, Ciminiello et al., 2008; Brissard et al., 2015; García-Altares et al., 2015) found to be harmful to various organisms of the marine benthic community (Faimali et al., 2012; Migliaccio et al., 2016; Pavaux et al., 2019; Privitera et al., 2012), effects of this dinoflagellate on the photosynthetic consortium does seem contrasted and not as critical as expected. In accordance with results obtained for other dinoflagellates species (Kubanek et al., 2005; K.

Page 13 of 29

#### Limnology and Oceanography

Poulson-Ellestad et al., 2014), the negative impact on the competitors' cell abundance appears species 345 346 specific. While the dinoflagellate C. monotis is not affected by the presence of O. cf. ovata, both the diatom 347 L. paradoxa and the dinoflagellate P. lima showed drastic decrease in their cell abundance when placed in 348 co-cultures with O. cf. ovata. Unexpectedly, the diatom N. arenaria benefited from the presence of O. cf. 349 ovata at early stages of growth before being impaired. Interestingly, the variations in the physiology and metabolism of microalgae did not deeply modify the outcome of the interactions as shown for other 350 species (Barofsky et al., 2009). A temporal shift in the decrease of the cell abundance was, however, 351 observed for ST N. arenaria cells. Alternatively, ST cells of L. paradoxa exhibited a different trend in its cell 352 abundance as switching from being inhibited to stimulated by the presence of O. cf. ovata. This occasional 353 positive effect of the presence of O. cf. ovata on both N. arenaria and L. paradoxa remains unexplained. 354 355 These results obtained from the co-cultures are consistent with observations on the natural microalgae consortium made during O. cf. ovata blooms which report unchanged abundances of the 356 357 dinoflagellate C. monotis (Marro et al., 2019; Ninčević Gladan et al., 2019), a decrease of the dinoflagellate P. lima (Vila et al., 2001; Marro et al., 2019) and a drastic reduction in diatoms abundance (Accoroni et al., 358 2016; Marro et al., 2019), particularly on the non-motile ones (i.e. Licmophora paradoxa; Accoroni et al., 359 2016). No clade-specific response was evidenced and the success in outcompeting O. cf. ovata may be 360 attributed to peculiar ecophysiological traits of each species. All bioassays combined, a positive correlation 361 between cell concentration (normalized to the control) and their motility was evidenced (Figure 8A). It was 362 363 particularly significant at early growth stages of the competitors (days 3 and 7; Figure 8B) when motility is 364 at its maximum (Kingston, 2009). The less motile species L. paradoxa and P. lima (an absence of motility is 365 observed in the MCCV monoclonal cultures), were the most sensitive to the presence of O. cf. ovata (Figure 366 2A and C) while the species had no impact on the very motile C. monotis (Figure 2D) and a contrasted 367 impact on the moderately motile N. arenaria (Figure 2B). All these data converge to suggest that motility 368 may be an important physiological trait for interspecific allelopathic interactions. Indeed, motility enables 369 microalgae to navigate across environments as shown for benthic diatoms in sediments (Consalvey et al., 370 2004) or when attracted by pheromones (Gillard et al., 2013; Bondoc et al., 2019) and could allow them to escape toxic phycospheres. To confirm this assumption, a larger dataset will be needed to address its 371 372 statistical relevance. 373

## 374 Nature of the allelochemicals

- 375 *O*. cf. *ovata* biosynthesizes ovatoxins that could be involved in allelochemistry. An increase in the
- 376 ovatoxin-a concentration along the growth is detected in the medium (up to 12.8 ± 8.8 μg.L<sup>-1</sup> at day 17 as

Page 14 of 29

a function of cell abundance, Figure 4), and this amount may even locally be augmented by toxins hotspots formed in the mucus (Giussani et al., 2015). Both chemical fractions obtained from *O. cf. ovata* biomass as well as enriched ovatoxins were tested on the whole set of competitors to investigate whether the toxins or other specialized metabolites could explain the variations in the cell abundance observed in the cocultures.

382 Overall, the activity of the chemicals varies with the tested species and also with the growth phase of the microalgae, highlighting species-specific response to the allelochemicals as well as a variation of 383 their metabolic resistance through the growth. The activity of the ovatoxins measured on both C. monotis 384 385 and L. paradoxa could explain our observations in co-cultures. Indeed, no toxic activity on C. monotis mirrors a stable cell abundance when co-cultured with O. cf. ovata. The toxicity of ovatoxins on L. paradoxa 386 387 (>50% of activity) is consistent with the drastic decrease in its cell abundance when co-cultured with O. cf. ovata. On the other hand, the alteration of the PSII caused by the ovatoxins for both P. lima and N. arenaria 388 is not correlated with the trends in cell abundance for co-cultures with O. cf. ovata. The high sensitivity of 389 P. lima to the presence of O. cf. ovata does not match its resistance to ovatoxins (activity < 10% except for 390 ST cells) and will be discussed thereafter. Cell age greatly influences the response of N. arenaria when 391 exposed to both the ovatoxins (35%<activity<100%) and O. cf. ovata cells. With the time, N. arenaria cells 392 393 become more sensitive to the ovatoxins, potentially causing the late decrease in cell abundance in the cocultures. This enhanced sensitivity may also be attributed to the loss of motility through the growth 394 395 (Kingston, 2009).

396 Other specialized metabolites are likely to be involved in O. cf. ovata allelochemistry as evidenced 397 by the activity of some chemical fractions prepared from O. cf. ovata biomass. Indeed, both FM and FACN 398 fractions where ovatoxins were undetectable do inhibit the photo-efficiency of both the diatoms N. 399 arenaria and L. paradoxa while no activity was measured for the FW2M8 enriched in ovatoxins (46 ng.mL-400 1). According to the solvents used for their elution, the compounds contained in both fractions are less 401 polar than the ovatoxins. Similarly, the fractions FW to FW6M4 that contain very polar specialized 402 metabolites showed a low activity on older cells of P. lima (up to 10%), indicating that P. lima cells may become more sensitive at the ST phase to various allelochemicals, that remain to be identified. 403

Altogether the results support a combined action of the ovatoxins and other unknown specialized metabolites biosynthesized by *O*. cf. *ovata* on the growth of its competitors. Therefore, unlike other dinoflagellates (Kubanek et al., 2005; Prince et al., 2010), the toxins produced by *O*. cf. *ovata* are at least partially involved in competitive microalgal interactions.

Page 15 of 29

#### Limnology and Oceanography

408 It is worth noting that all fractions were tested at a concentration of 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> for homogeneity 409 with tested ovatoxins concentrations, but such concentrations may underestimate the natural 410 concentrations of allelochemicals. For instance, the ovatoxins-containing fractions FW2M8 and FM 411 contained 46 and 2.17 ng.mL<sup>-1</sup> of ovatoxins when tested in bioassays, which is a thousand times lower than 412 the active concentration of 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (i.e 3.77  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) that can be reached when cell concentration is 1 to 2.85 x 10<sup>5</sup> cell.mL<sup>-1</sup> (considering a range of 20 to 35 pg.cell<sup>-1</sup> of ovatoxins;{Guerrini et al., 2010; Pezzolesi 413 414 et al., 2012; Brissard et al., 2014), or through accumulation in the mucus (Giussani et al., 2015). Further 415 investigation should test more concentrated fractions on all four competitors to confirm our conclusions and even highlight new active fractions. 416

417

### 418 Intra-cellular target of the ovatoxins

Further investigation on the mechanisms responsible for the inhibition of photosynthesis of the 419 420 diatom L. paradoxa indicated that the PSII is not the first target for the ovatoxins. Indeed, after short 421 exposition to ovatoxins (6 min), the PSII maximal quantum yield was not affected, but the overall activity of the photosynthetic electron transfer chain in the light was affected and this conclusion can be reached 422 423 using two sets of data. Under a steady state light irradiance of 800  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> the quantum yield of PSII in light-adapted L. paradoxa was reduced by  $48 \pm 25$  %, while the photochemical rate, which measures the 424 combined activities of PSII and PSI, was decreased by  $36 \pm 12\%$ . Together with the absence of effect on 425 426 Fv/Fm, the decrease of photosynthetic activity should therefore stem from the inhibition of an 427 uncharacterized photosynthetic step downstream PSII. This finding also sheds some light on the results obtained with P. lima. The absence of effect on the Fv/Fm for this dinoflagellate may reflect an unknown 428 429 target rather than an absence of toxicity, underlying that the photo-efficiency may not be a good proxy 430 when assessing the toxicity of ovatoxins on other microalgae. Other steps of the photosynthetic electron transfer chain could be impaired without noticeable effect on the PSII, and we could not conclude on the 431 432 responsibility of the ovatoxins for the toxicity of O. cf. ovata on P. lima.

433

#### 434 Implication for natural blooms

Our data suggest that the dinoflagellate *O.* cf. *ovata* has an impact on the abundance of competitors through its specialized metabolites and could therefore play a role in species succession in the ecosystems. The extent of this control must, however, be mitigated by the retro-control that can be applied by the competitors on *O.* cf. *ovata* abundance. Indeed, despite a mixotrophic character (Jauzein et al., 2017), the cell abundance of *O.* cf. *ovata* does not significantly increase when co-cultured with its

Page 16 of 29

competitors. Conversely, a significant decrease in cell concentration is observed in the presence of *C. monotis*, *N. arenaria* and *P. lima*, particularly in the **EX** phase (Figure 3). Diatoms are also known to produce
a large array of small molecules that can act as allelochemicals (Pohnert, 2005; Gillard et al., 2013; Gallo
et al., 2017), including toxins (e.g domoïc acid, Lefebvre and Robertson, 2010); and some of them have
been shown to inhibit the growth of dinoflagellates (Xu et al., 2015; Wang et al., 2017a; Ternon et al.,
2018; Xu et al., 2019).
The chemical impact of *O.* cf. *ovata* on ecological succession also depends on several factors such

as the intensity and the duration of the blooms (i.e variations in the amount and nature of the toxins and other metabolites that are biosynthesized) and the competitor species (adaptive ecophysiological traits like motility, metabolic variations through growth). Moreover, other parameters could influence the outcome of this control in natural ecosystems, such as the availability in nutrients that can modulate allelopathic interactions (Grover and Wang, 2013), the intra-species variability of the individuals (Meyer and Pohnert, 2019) and eventually the considerable complexity of natural assemblages that involve several parties (Bigalke and Pohnert, 2019).

The complexity of interspecific chemical interactions has precluded their use in classic ecosystem modelling so far (Ayata et al., 2013), but some promising attempts are being undertaken (Grover and Wang, 2013; Mandal et al., 2014). Thus, by influencing species dynamics, chemical interactions could directly affect global biogeochemical cycles like the carbon cycle by favoring one species or clade over others and should therefore be considered when modelling species dynamics.

459

## 460 Acknowledgments

461 This work benefited from the support of the project OCEAN-15 (ANR-15-CE35-0002-01) of the French 462 National Research Agency (ANR). The authors are grateful to Julien Lopez and Lola Miro-Solé for their help 463 with maintaining the co-cultures and cell counting.

464

## 465 References

| 466 | Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Totti, C., 2016. Effects of the bloom of harmful benthic |
|-----|--|
| 467 | dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata on the microphytobenthos community in the northern               |
| 468 | Adriatic Sea. Harmful Algae 55, 179–190. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.003                   |
| 469 | Ayata, SD., Lévy, M., Aumont, O., Sciandra, A., Sainte-Marie, J., Tagliabue, A., Bernard, O., 2013.  |
| 470 | Phytoplankton growth formulation in marine ecosystem models: Should we take into account             |
| 471 | photo-acclimation and variable stoichiometry in oligotrophic areas? Adv. Mar. Ecosyst. Model.        |
| 472 | Res. III 125, 29–40. https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2012.12.010                                   |

Page 17 of 29

Limnology and Oceanography

473 Bailleul, B., Cardol, P., Breyton, C., Finazzi, G., 2010. Electrochromism: a useful probe to study algal 474 photosynthesis. Photosynth. Res. 106, 179-189. https://doi.org/10.1007/s11120-010-9579-z 475 Barofsky, A., Vidoudez, C., Pohnert, G., 2009. Metabolic profiling reveals growth stage variability in 476 diatom exudates. Limnol. Oceanogr. Methods 7, 382-390. 477 https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.382 478 Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of 479 nitrite in sea water. (Technical report No. 8). Oceanographic laboratories, University of 480 Washington. 481 Bigalke, A., Pohnert, G., 2019. Algicidal bacteria trigger contrasting responses in model diatom 482 communities of different composition. MicrobiologyOpen 8, e00818. 483 https://doi.org/10.1002/mbo3.818 484 Bondoc, K.G.V., Lembke, C., Lang, S.N., Germerodt, S., Schuster, S., Vyverman, W., Pohnert, G., 2019. 485 Decision-making of the benthic diatom Seminavis robusta searching for inorganic nutrients and 486 pheromones. ISME J. 13, 537-546. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0299-2 487 Botana, L.M., 2014. Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Third 488 Edition. CRC Press. 489 Brissard, C., Herrenknecht, C., Sechet, V., Herve, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lemee, R., Chomerat, N., Hess, P., Amzil, Z., 2014. Complex toxin profile of French Mediterranean Ostreopsis cf. ovata 490 491 strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. Mar. Drugs 12, 2851-76. 492 https://doi.org/10.3390/md12052851 493 Brissard, C., Herve, F., Sibat, M., Sechet, V., Hess, P., Amzil, Z., Herrenknecht, C., 2015. Characterization 494 of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin 495 analysis and purification. J. Chromatogr. A 1388, 87-101. 496 https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.015 497 Brown, E.R., Cepeda, M.R., Mascuch, S.J., Poulson-Ellestad, K.L., Kubanek, J., 2019. Chemical ecology of 498 the marine plankton. Nat. Prod. Rep. 36, 1093-1116. https://doi.org/10.1039/C8NP00085A 499 Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. 500 Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in Ostreopsis ovata collected along the 501 Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 19, 111-20. 502 https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.001 Consalvey, M., Paterson, D.M., Underwood, G.J.C., 2004. The ups and downs of life in a benthic biofilm: 503 504 migration of benthic diatoms. Diatom Res. 19, 181-202. 505 https://doi.org/10.1080/0269249X.2004.9705870 506 Dunker, S., Althammer, J., Pohnert, G., Wilhelm, C., 2017. A Fateful Meeting of Two Phytoplankton 507 Species—Chemical vs. Cell-Cell-Interactions in Co-Cultures of the Green Algae Oocystis marsonii 508 and the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Microb. Ecol. 74, 22-32. 509 https://doi.org/10.1007/s00248-016-0927-1 510 Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-511 Vietti, R., Mangialajo, L., Chiantore, M., 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate 512 Ostreopsis ovata on invertebrate and vertebrate marine organisms. Mar. Environ. Res., Emerging 513 and persistent impacts on Marine Organisms: Detection methods and action mechanisms 76, 514 97–107. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.010 515 Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean 516 Primary Production. Science 281, 200. https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200 517 Fernández-Herrera, L.J., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Hernández-Guerrero, C.J., Bustillos-518 Guzmán, J.J., Núñez-Vázquez, E., 2016. Allelopathic effect of Chattonella marina var. marina 519 (Raphidophyceae) on Gymnodinium catenatum (Dinophycea). Harmful Algae 51, 1-9. 520 https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.009

Page 18 of 29

| 521<br>522  | Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary Production of the Biosphere:<br>Integrating Terrestrial and Oceanic Components. Science 281, 237. |
|-------------|--|
| 523         | https://doi.org/10.1126/science.281.53/4.23/   |
| 524         | Gallo, C., d'Ippolito, G., Nuzzo, G., Sardo, A., Fontana, A., 2017. Autoinhibitory sterol sulfates mediate   |
| 525         | programmed cell death in a bloom-forming marine diatom. Nat. Commun. 8, 1292.  |
| 526         | https://doi.org/10.1038/s41467-017-01300-1   |
| 527         | Garcia-Altares, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Carnicer, O., Iglesia, P. de la, Forino, M., Diogène, J.,  |
| 528         | Ciminiello, P., 2015. The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative  |
| 529         | palytoxin) from Ostreopsis cf. ovata (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high  |
| 530         | resolution MSn. Anal. Bioanal. Chem. 407, 1191–1204. https://doi.org/10.1007/s00216-014-   |
| 531         | 8338-y   |
| 532         | Garcia-Portela, M., Riobó, P., Franco, J.M., Bañuelos, R.M., Rodriguez, F., 2016. Genetic and toxinological  |
| 533         | characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate Ostreopsis and allelopathic   |
| 534         | interactions with toxic and non-toxic species from the genera Prorocentrum, Coolia and   |
| 535         | Gambierdiscus. Harmful Algae 60, 57–69. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.007  |
| 536         | Gémin, MP., Réveillon, D., Hervé, F., Pavaux, AS., Tharaud, M., Séchet, V., Bertrand, S., Lemée, R.,   |
| 537         | Amzil, Z., n.d. Toxin content of Ostreopsis cf. ovata depends on bloom phases, depth and   |
| 538         | macroalgae in the NW Mediterranean Sea. Harmful Algae accepted.  |
| 539         | Gillard, J., Frenkel, J., Devos, V., Sabbe, K., Paul, C., Rempt, M., Inze, D., Pohnert, G., Vuylsteke, M.,   |
| 540         | Vyverman, W., 2013. Metabolomics Enables the Structure Elucidation of a Diatom Sex   |
| 541         | Pheromone. Angew. Chem. Int. Ed. 52, 854–857. https://doi.org/10.1002/anie.201208175   |
| 542         | Giussani, V., Sbrana, F., Asnaghi, V., Vassalli, M., Faimali, M., Casabianca, S., Penna, A., Ciminiello, P.,   |
| 543         | Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Mazzeo, A., Chiantore, M., 2015. Active role of the mucilage in  |
| 544         | the toxicity mechanism of the narmful benthic dinofiagellate Ostreopsis cf. ovata. Harmful Algae   |
| 545         | 44, 46–53. https://doi.org/10.1016/J.nai.2015.02.006   |
| 546         | Grover, J.P., Wang, FB., 2013. Competition for one nutrient with internal storage and toxin mortality.   |
| 547<br>= 10 | Math. blosti. 244, 62–90. https://doi.org/10.1016/j.https.2013.04.009  |
| 540         | Guerrini, F., Fezzolesi, E., Feller, A., Kitcardi, M., Cimmelio, F., Den Aversano, C., Tartagnole, L., Deno  |
| 550         | cultured Ostreopeis quata from the Tyrrhonian and Adriatic Seas. Tovicon Off 1. Int. Sec.  |
| 551         | Toxinology 55, 211–20, https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.019   |
| 552         | Guillard B.R.L. Ryther, I.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. Cyclotella papa Hustedt, and   |
| 552         | Detonula Confervação (Cleve) Gran Can I Microhiol & 229–239 https://doi.org/10.1139/m62-   |
| 554         | 029  |
| 555         | Hakanen P. Suikkanen S. Kremp A. 2014 Allelonathic activity of the toxic dinoflagellate Alexandrium  |
| 556         | ostenfeldii: Intra-population variability and response of co-occurring dinoflagellates. Harmful  |
| 557         | Algae 39, 287–294, https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.005   |
| 558         | Hattenrath-Lehmann, T.K., Gobler, C.L. 2017. Identification of unique microbiomes associated with  |
| 559         | harmful algal blooms caused by Alexandrium fundvense and Dinophysis acuminata. Harmful   |
| 560         | Algae 68, 17–30, https://doi.org/10.1016/i.hal.2017.07.003   |
| 561         | Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C.,   |
| 562         | Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. New insights on cytological and  |
| 563         | metabolic features of Ostreopsis cf. ovata Fukuvo (Dinophyceae): A multidisciplinary approach.   |
| 564         | PloS One 8, e57291. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057291.g001  |
| 565         | Jauzein, C., Couet, D., Blasco, T., Lemée, R., 2017. Uptake of dissolved inorganic and organic nitrogen by   |
| 566         | the benthic toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata. Harmful Algae 65, 9–18.   |
|             | https://doi.org/10.1016/j.bol.2017.04.005  |

567 https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.005

Page 19 of 29

Limnology and Oceanography

568 Jonsson, P.R., Pavia, H., Toth, G., 2009. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by 569 allelopathic interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 11177-11182. 570 Kingston, M.B., 2009. Growth and motility of the diatom Cylindrotheca closterium: implications for 571 commercial applications. J. N. C. Acad. Sci. 125, 138-142. Kubanek, J., Hicks, M.K., Naar, J., Villareal, T.A., 2005. Does the red tide dinoflagellate Karenia brevis use 572 573 allelopathy to outcompete other phytoplankton? Limnol. Oceanogr. 50, 883-895. 574 https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.3.0883 Lefebvre, K.A., Robertson, A., 2010. Domoic acid and human exposure risks: A review. Toxins Seaf. 56, 575 576 218-230. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.034 577 Lim, A.S., Jeong, H.J., Jang, T.Y., Jang, S.H., Franks, P.J.S., 2014. Inhibition of growth rate and swimming 578 speed of the harmful dinoflagellate Cochlodinium polykrikoides by diatoms: Implications for red 579 tide formation. Harmful Algae 37, 53-61. https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.003 580 Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., Falkowski, P.G., 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. 581 582 Ecol. Lett. 10, 1170-1181. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01117.x 583 Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Le Grand, F., Donval, A., Lambert, C., Sarthou, G., Jolley, D.F., Hégaret, 584 H., 2018. Allelochemicals from Alexandrium minutum induce rapid inhibition of metabolism and 585 modify the membranes from Chaetoceros muelleri. Algal Res. 35, 508-518. 586 https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.023 Lyczkowski, E.R., Karp-Boss, L., 2014. Allelopathic effects of Alexandrium fundyense (Dinophyceae) on 587 588 Thalassiosira cf. gravida (Bacillariophyceae): a matter of size. J. Phycol. 50, 376-387. 589 https://doi.org/10.1111/jpy.12172 590 Mandal, P.S., Allen, L.J.S., Banerjee, M., 2014. Stochastic modeling of phytoplankton allelopathy. Appl. 591 Math. Model. 38, 1583-1596. https://doi.org/10.1016/j.apm.2013.08.031 592 Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfune, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., 593 Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grossel, H., Marco-Miralles, F., 594 Maso, M., Rene, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemee, R., 2011. 595 Trends in Ostreopsis proliferation along the Northern Mediterranean coasts. Toxicon Off. J. Int. 596 Soc. Toxinology 57, 408-20. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.019 597 Margalef, R., 1979. The Organization of Space. Oikos 33, 152–159. https://doi.org/10.2307/3543992 598 Marro, S., Pavaux, A.-S., Drouet, K., Lemée, R., 2019. Diversity of benthic microphytoplankton associated 599 to Ostreopsis cf. ovata bloom in the NW Mediterranean Sea. 600 Meyer, N., Pohnert, G., 2019. Isolate-specific resistance to the algicidal bacterium Kordia algicida in the 601 diatom Chaetoceros genus. Bot. Mar. 0. https://doi.org/10.1515/bot-2019-0007 602 Migliaccio, O., Castellano, I., Di Cioccio, D., Tedeschi, G., Negri, A., Cirino, P., Romano, G., Zingone, A., 603 Palumbo, A., 2016. Subtle reproductive impairment through nitric oxide-mediated mechanisms 604 in sea urchins from an area affected by harmful algal blooms. Sci. Rep. 6, 26086. 605 Monti, M., Cecchin, E., 2012. Comparative Growth of Three Strains of Ostreopsis ovata at Different Light 606 Intensities with Focus on Inter-Specific Allelopathic Interactions. Cryptogam. Algol. 33, 113–119. 607 https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.113 Ninčević Gladan, Ž., Arapov, J., Casabianca, S., Penna, A., Honsell, G., Brovedani, V., Pelin, M., 608 609 Tartaglione, L., Sosa, S., Dell'Aversano, C., Tubaro, A., Žuljević, A., Grbec, B., Čavar, M., Bužančić, 610 M., Bakrač, A., Skejić, S., 2019. Massive Occurrence of the Harmful Benthic Dinoflagellate 611 Ostreopsis cf. ovata in the Eastern Adriatic Sea. Toxins 11, 300. 612 Paul, C., Mausz, M.A., Pohnert, G., 2013. A co-culturing/metabolomics approach to investigate 613 chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. Metabolomics 9, 349-359. https://doi.org/10.1007/s11306-012-0453-1 614

Page 20 of 29

| 615<br>616<br>617<br>618 | Pavaux, AS., Rostan, J., Guidi-Guilvard, L., Marro, S., Ternon, E., Thomas, O.P., Lemée, R., Gasparini, S.,<br>2019. Effects of the toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata on survival, feeding and<br>reproduction of a phytal harpacticoid copepod. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 516, 103–113.<br>https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.05.004 |
|--------------------------|--|
| 619                      | Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M.,  |
| 620                      | Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2012. Influence of temperature and salinity on Ostreopsis cf. ovata  |
| 621                      | growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. Water Res. 46,  |
| 622                      | 82–92. https://doi.org/10.1016/j.waires.2011.10.029<br>Pohnart G. 2005. Diatom/Congred Interactions in Plankton: The Indiract Chamical Defense of  |
| 624                      | Unicellular Algae ChemBioChem 6, 946–959, https://doi.org/10.1002/chic.200400348   |
| 625                      | Poulin R X. Hogan S. Poulson-Ellestad K I. Brown F. Fernández F M. Kubanek I. 2018 Karenia   |
| 626                      | brevis allelopathy compromises the lipidome, membrane integrity, and photosynthesis of   |
| 627                      | competitors. Sci. Rep. 8, 9572. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27845-9   |
| 628                      | Poulson-Ellestad, Jones, ., Roy, J., Viant, M.R., Fernandez, F.M., Kubanek, J., Nunn, B.L., 2014.  |
| 629                      | Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine  |
| 630                      | phytoplankton. PNAS 111, 9009–9014. https://doi.org/10.1073/pnas.1413432111  |
| 631                      | Poulson-Ellestad, K., McMillan, E., Montoya, J.P., Kubanek, J., 2014. Are offshore phytoplankton   |
| 632                      | susceptible to Karenia brevis allelopathy? J. Plankton Res. 36, 1344–1356.   |
| 633                      | https://doi.org/10.1093/plankt/fbu064  |
| 634                      | Prince, E.K., Poulson, K.L., Myers, T.L., Sieg, R.D., Kubanek, J., 2010. Characterization of allelopathic  |
| 635                      | compounds from the red tide dinoflagellate Karenia brevis. Harmful Algae 10, 39–48.  |
| 636                      | https://doi.org/10.1016/j.nai.2010.06.003  |
| 637                      | Privitera, D., Glussani, V., Isola, G., Falmali, M., Plazza, V., Garaventa, F., Asnagni, V., Cantamessa, E.,   |
| 630                      | of Paracentrotus lividus. Harmful Algae 18, 16–23, https://doi.org/10.1016/j.bal.2012.03.009   |
| 640                      | Sala-Pérez M. Albermann T.I. Krock B. Tillmann II. 2016 Growth and bioactive secondary   |
| 641                      | metabolites of arctic Protoceratium reticulatum (Dinophyceae). Harmful Algae 55, 85–96   |
| 642                      | https://doi.org/10.1016/i.hal.2016.02.004  |
| 643                      | Schwartz, E.R., Poulin, R.X., Mojib, N., Kubanek, J., 2016. Chemical ecology of marine plankton. Nat. Prod.  |
| 644                      | Rep. 33, 843–860. https://doi.org/10.1039/C6NP00015K   |
| 645                      | Selander, E., Kubanek, J., Hamberg, M., Andersson, M.X., Cervin, G., Pavia, H., 2015. Predator lipids  |
| 646                      | induce paralytic shellfish toxins in bloom-forming algae. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 6395–6400.   |
| 647                      | https://doi.org/10.1073/pnas.1420154112  |
| 648                      | Shimizu, Y., 1993. Dinoflagellates as Sources of Bioactive Molecules, in: Attaway, D.H., Zaborsky, O.R.  |
| 649                      | (Eds.), Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. Springer US, Boston, MA, pp. 391–410.   |
| 650                      | https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2391-2_10   |
| 651                      | Simon, N., Cras, A.L., Foulon, E., Lemée, R., 2009. Diversity and evolution of marine phytoplankton.   |
| 652                      | Numéro Spéc. Evol., Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Séries Biologies 332, 159–170.  |
| 653                      | Ternon, E., Pavaux, AS., Marro, S., Thomas, O.P., Lemée, R., 2018. Allelopathic interactions between the   |
| 654                      | benthic toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata and a co-occurring diatom. Harmful Algae 75,   |
| 655                      | 35-44. https://doi.org/10.1016/j.nai.2018.04.003   |
| 657                      | vila, Mi., Garces, E., Maso, M., 2001. Potentially toxic epiphytic difforagenate assemblages on macroalgae   |
| 658                      | Wang R Wang I Xue O Sha X Tan L Guo X 2017a Allelonathic interactions between  |
| 659                      | Skeletonema costatum and Alexandrium minutum. Chem. Ecol. 33, 485–498  |
| 660                      | https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1332187  |
| 661                      | Wang, R., Xue, Q., Wang, J., Tan, L., Zhang, Q., Zhao, Y., Anderson, D.M., 2017b. Effects of an  |
| 662                      | allelochemical in Phaeodactylum tricornutum filtrate on Heterosigma akashiwo: Morphological,   |

Page 21 of 29

Limnology and Oceanography

- 663 physiological and growth effects. Chemosphere 186, 527–534.
- 664 https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.024
- 665 Xu, N., Tang, Y., Qin, J., Duan, S., Gobler, C., 2015. Ability of the marine diatoms Pseudo-nitzschia
- 666 multiseries and P. pungens to inhibit the growth of co-occurring phytoplankton via allelopathy. 667
  - Aquat. Microb. Ecol. 74, 29-41.
- 668 Xu, W., Wang, J., Tan, L., Guo, X., Xue, Q., 2019. Variation in allelopathy of extracellular compounds
- 669 produced by Cylindrotheca closterium against the harmful-algal-bloom dinoflagellate
- 670 Prorocentrum donghaiense. Mar. Environ. Res. 148, 19-25.
- 671 https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.05.005 672

are



Page 22 of 29



# Page 23 of 29

Limnology and Oceanography





Page 24 of 29



Page 25 of 29

Page 26 of 29



# Page 27 of 29

Limnology and Oceanography



Limnology and Oceanography





Page 29 of 29

Limnology and Oceanography

Figure 1. Scheme of the experimental set up. At the three growth phases **IN**, **EX** and **ST**, triplicate flasks were seeded with one competitor to which were added either alive cells of *O*.cf *ovata* in the same growth phase, enriched ovatoxins or chemical fractions obtained from *O*. cf. *ovata* biomass.

Figure 2. Evolution of the cell abundance of the competitors (A) *Licmophora paradoxa*, (B) *Naviculae arenaria*, (C) *Prorocentrum lima*, (D) *Coolia monotis* in control flasks (plain line) and when co-cultured with *Ostreopsis* cf. *ovata* (dashed-line), for the three growth stages (IN) 3-days, (EX) 10-days and (ST) 17-days. Pair-sample t-test were used for statistical analysis (\*\*: p <0.05).

Figure 3. Evolution of the cell abundance of *O*. cf. *ovata* in control flasks (plain line) and when co-cultured with competitors (*Licmophora p., Naviculae a., Prorocentrum I., Coolia m.*), for the three growth stages (IN) 3-days, (EX) 10-days and (ST) 17-days. Pair-sample t-test were used for statistical analysis (\*\*: p <0.05).

Figure 4. Intra- and extra-cellular toxin content (left and right axis, respectively) obtained from cultures aging 3, 10 and 17 days.

Figure 5. Toxic activity (%) of the ovatoxins (calculated from the Fv/Fm, see Methods) on each competitor, testing concentrations of 1 and 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> and an exposure time of 24 hours. The sensitivity of the competitors was tested at three stages of growth (**IN**) 3, (**EX**) 10, and (**ST**) 17 days.

Figure 6. Photosynthetic response of *Licmophora paradoxa* to short-term exposures (6 minutes) to 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of ovatoxins: (A) Maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) in dark-adapted cells, (B) Quantum yield of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) under 800  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light illumination, (C) Photochemical rate under 800  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light illumination, and (D) Fv/Fm,  $\Phi_{PSII}$  and Photochemical rates were normalized to the control.. Black bars represent the control (0.6% of DMSO final volume), and grey bars represent the ovatoxin-treated samples. Mean value  $\pm$  S.D of 4 independent biological samples are shown. Pair-sample t-test were used for statistical analysis (\*\*: p <0.05).

Figure 7. Toxic activity (%) of the seven chemical fractions FW8M2 to FACN obtained from *O*. cf. *ovata* biomass (calculated from the Fv/Fm, see Methods) on each competitor, testing a concentration of 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> and an exposure time of 24 hours. The sensitivity of the competitors was tested at three stages of growth (IN) 3, (EX) 10, and (ST) 17 days.

Figure 8. Cell concentration of all competitors normalized to their respective control and correlated to an arbitrary motility index set from observations made on MCCV monocultures (1 for *L. paradoxa*; 1.5 for *P. lima*; 2 for *N. arenaria*; and 3. *C. monotis*): (A) all replicates from all sampling time and at the three stages of growth, and (B) all replicates from days 3 and 7 of sampling at the three stages of growth. A linear regression was obtained for each set of data.

Table 1. Cell ratios ostreopsis: competitor used to seed the co-culture experiments, based on field observations made in 2016 at the Rochambeau site at the (IN) beginning, (EX) peak and (ST) end of *Ostreopsis* bloom.

|                     | IN  | EX  | ST  |
|---------------------|-----|-----|-----|
| Prorocentrum lima   | 4:3 | 5:1 | 5:1 |
| Coolia monotis      | 4:3 | 5:1 | 5:1 |
| Licmophora paradoxa | 1:1 | 5:1 | 8:1 |
| Naviculae arenaria  | 6:5 | 5:1 | 1:1 |

Page 30 of 29

Table 2. Mean concentration and standard deviation of nitrites and nitrates ( $\mu$ M) measured at days 14 and 17 in co-cultured triplicate flasks of the three co-culture experiments (**IN**, **EX** and **ST** phases), for all competitors and in *O*. cf. *ovata* monocultures.

| NO3 <sup>-</sup> / | IN     |             | EX         |             | ST        |             |
|--------------------|--------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| NO <sub>2</sub>    | Day 14 | Day 17      | Day 14     | Day 17      | Day 14    | Day 17      |
| L naradova         | n.d    | 4.28 ± 3.45 | 32 ± 32    | 5.42 ± 3.25 | 15 ± 15   | 5.07 ± 1.8  |
|                    | n.d    | 1.6 ±2.6    | 20 ±17     | 0.17 ±0.08  | 18 ±22    | 0.22 ±0.18  |
| N grongrig         | n.d    | 273 ± 2     | 90 ± 20    | 17 ± 1      | 19 ± 6    | 55 ± 8      |
| N. arenana         | n.d    | 20 ±4       | 31 ±21     | 0.39 ±0.31  | 27±5      | 30.24 ±5.17 |
| Dlima              | n.d    | 306 ± 17    | 20 ± 6     | 34 ± 2      | 10 ± 5    | $12 \pm 10$ |
| P. IIma            | n.d    | 55 ±3       | 6.5±4      | 4.16 ±6.04  | 14±18     | 0.91 ±1.57  |
| C monotic          | n.d    | 276 ± 50    | 367 ± 83   | 13 ± 3      | 5 ± 1     | 23 ± 18     |
| C. monotis         | n.d    | 25 ±2       | 27±1       | 2.21±3.23   | 1.76±0.88 | 0.44 ±0.53  |
| 0 of overte        | n.d    | 406 ±12     | 0.76 ±2.27 | 2.05 ±1.2   | 62 ±43    | 2.53 ±0.81  |
|                    | n.d    | 35 ±1       | 1.02 ±1.70 | 0.05±0.04   | 22±16     | 1.69±1.97   |

# **Bibliographie**

Abadie, E., Amzil, Z., Belin, C., Comps, M. A., Elzière-Papayanni, P., Lassus, P., ... & Poggi, R. (1999). Contamination de l'étang de Thau par Alexandrium tamarense : épisode de novembre à décembre 1998. *Bilans et Prospectives*.

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... & Cárdenas, P. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119. Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., ... & Heiss, A. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of eukaryotic microbiology*, 59(5), 429-514.

Adolf, J. E., Bachvaroff, T. R., Krupatkina, D. N., Nonogaki, H., Brown, P. J. P., Lewitus, A. J., ... & Place, A. R. (2006). Species specificity and potential roles of Karlodinium micrum toxin. *African Journal of Marine Science*, 28(2), 415-419.

Adolf, J. E., Bachvaroff, T. R., Krupatkina, D. N., Nonogaki, H., Brown, P. J. P., Lewitus, A. J., ... & Place, A. R. (2006). Species specificity and potential roles of Karlodinium micrum toxin. *African Journal of Marine Science*, 28(2), 415-419.

Adolf, J. E., Bachvaroff, T. R., Krupatkina, D. N., Nonogaki, H., Brown, P. J. P., Lewitus, A. J., ... & Place, A. R. (2006). Species specificity and potential roles of Karlodinium micrum toxin. *African Journal of Marine Science*, 28(2), 415-419.

Agogué, H., Mallet, C., Orvain, F., De Crignis, M., Mornet, F., & Dupuy, C. (2014). Bacterial dynamics in a microphytobenthic biofilm: a tidal mesocosm approach. *Journal of sea research*, *92*, 36-45.

Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., ... & Aro, E. M. (2013). Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 4111-4116.

Allen, A. E., Dupont, C. L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J. P., & Bowler, C. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 473(7346), 203.

Allen, A. E., LaRoche, J., Maheswari, U., Lommer, M., Schauer, N., Lopez, P. J., ... & Bowler, C. (2008). Whole-cell response of the pennate diatom Phaeodactylum tricornutum to iron starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10438-10443.

Allen, J. F. (2002). Photosynthesis of ATP - Electrons, proton pumps, rotors, and poise. Cell, 110(3), 273-276.

Allen, J. F. (2003). Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends in Plant Science*, 8(1),15-19.

Alric, J. (2010). Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae. *Photosynthesis research*, 106(1-2), 47-56.

Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., & Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nature Reviews Microbiology*, 1-13.

Amin, S. A., Green, D. H., Hart, M. C., Küpper, F. C., Sunda, W. G., & Carrano, C. J. (2009). Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(40), 17071-17076.

Amin, S. A., Hmelo, L. R., Van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., ... & Ingalls, A. E. (2015). Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*, *522*(7554), 98.

Amin, S. A., Parker, M. S., & Armbrust, E. V. (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology* and *Molecular Biology Reviews*, 76(3), 667-684.

Amzil, Z., & Motteau, L. (2000). Toxines amnésiantes en France. *Rapport interne IFREMER*. DEL/MP/RST/00/07, Nantes.

Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., & Abadie, E. (2007). Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine drugs*, 5(4), 168-179.

Andersen, R. A. (2004). Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *American Journal of Botany*, 91, 1508–1522.

Anderson, D. M. (1980). Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax* tamarensis (Dinophyceae) hypnozygotes 1. Journal of Phycology, 16(2), 166-172.

Anderson, D. M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. *Red tides: biology, environmental science and toxicology*, 11-16.

Anderson, D. M. (1994). Red tides. Scientific American, 271(2), 62-68.

Anderson, D. M. (1997). Diversity of harmful algal blooms in coastal waters. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1009-1022. Anderson, D. M., & Wall, D. (1978). Potential importance of benthic cysts of Gonyaulax tamarensis and G. excavata in initiating toxic dinoflagellate blooms 1, 2, 3. *Journal of Phycology*, 14(2), 224-234.

Anderson, D. M., & Wall, D. (1978). Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms 1, 2, 3. *Journal of Phycology*, *14*(2), 224-234.

Anderson, D. M., & White, A. W. (1992). Marine biotoxins at the top of the food chain. *Oceanus*, 35(3), 55-61. Anderson, D. M., Alpermann, T. J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., & Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10-35.

Anderson, D. M., Keafer, B. A., McGillicuddy Jr, D. J., Mickelson, M. J., Keay, K. E., Libby, P. S., ... & He, R. (2005). Initial observations of the 2005 Alexandrium fundyense bloom in southern New England: General patterns and mechanisms. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *52*(19-21), 2856-2876.

Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., ... & Blażewicz-Paszkowycz, M. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current biology*, 22(23), 2189-2202.

Araki, G., & Murai, T. (1952). Molecular structure and absorption spectra of carotenoids. *Progress of Theoretical Physics*, 8(6), 639-654.

Archibald, J. (2012). The evolution of algae by secondary and tertiary endosymbiosis. *Advances in Botanical Research*, 64, 87–118.

Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., ... & Brzezinski, M. A. (2004). The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, *306*(5693), 79-86.

Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, *10*(2), 228-237.

Arzul, G., Seguel, M., Guzman, L., & Erard-Le Denn, E. (1999). Comparison of allelopathic properties in three toxic Alexandrium species. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 232(2), 285-295.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, *50*(1), 601-639.

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.

Avron, M. (1961). The inhibition of photoreactions of chloroplasts by 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. *Biochemical Journal*, 78(4), 735.

Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782-791.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 257-263.

Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L., & Maršálek, B. (2007). Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia*, 46(2), 137-142.

Bachvaroff, T. R., Sanchez-Puerta, M. V., & Delwiche, C. F. (2006). Rate variation as a function of gene origin in plastid-derived genes of peridinin-containing dinoflagellates. *Journal of molecular evolution*, 62(1), 42-52.

Backer, L. C., Manassaram-Baptiste, D., LePrell, R., & Bolton, B. (2015). Cyanobacteria and algae blooms: review of health and environmental data from the harmful algal bloom-related illness surveillance system (HABISS) 2007–2011. *Toxins*, 7(4), 1048-1064.

Bagchi, S. N., Chauhan, V. S., & Marwah, J. B. (1993). Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* late-virens on growth, photosynthesis, and toxicity of *Microcystis aeruginosa*. *Current Microbiology*, *26*(4), 223-228.

Baig, H. S., Saifullah, S. M., & Dar, A. (2006). Occurrence and toxicity of Amphidinium carterae Hulburt in the North Arabian Sea. *Harmful Algae*, *5*(2), 133-140.

**Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroutsos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., ... & Krieger-Liszkay, A.** (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO 2 assimilation in diatoms. *Nature*, *524*(7565), 366-369.

Bailleul, B., Cardol, P., Breyton, C., & Finazzi, G. (2010). Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis. *Photosynthesis research*, *106*(1-2), 179.Banerjee, R. V., & Matthews, R. G. (1990). Cobalamin-dependent methionine synthase. *The FASEB journal*, *4*(5), 1450-1459.

Barlow, S. B., & Triemer, R. E. (1988). Alternate life history stages in *Amphidinium klebsii* (Dinophyceae, Pyrrophyta). *Phycologia*, *27*(3), 413-420.

Barlow, S. B., & Triemer, R. E. (1988). Alternate life history stages in Amphidinium klebsii (Dinophyceae, Pyrrophyta). *Phycologia*, *27*(3), 413-420.

**Bassler, B. L., Wright, M., & Silverman, M. R.** (1994). Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in Vibrio harveyi: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular microbiology*, *13*(2), 273-286.

**Bates, S. S.** (1998). Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. *NATO ASI series G Ecological Sciences*, *41*, 405-426.

Bell, W. H., Lang, J. M., & Mitchell, R. (1974). Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products 1. *Limnology and Oceanography*, 19(5), 833-839.

Bell, W., & Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological Bulletin*, 143(2), 265-277.

Benavides, H., Prado, L., Diaz, S., & Carreto, J. J. (1995). An exceptional bloom of Alexandrium catenella in the Beagle Channel, Argentina. *Lavoisier, Paris(France).*, 113-119.

Bendall, D. S., & Manasse, R. S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1229*(1), 23-38.

**Ben-Gharbia, H., Yahia, O. K. D., Amzil, Z., Chomérat, N., Abadie, E., Masseret, E. & Laabir, M.** (2016). Toxicity and growth assessments of three thermophilic benthic dinoflagellates (*Ostreopsis cf. ovata, Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*) developing in the Southern Mediterranean Basin. *Toxins*, 8(10), 297.

Berkaloff, C., Caron, L., & Rousseau, B. (1990). Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. *Photosynthesis research*, 23(2), 181-193.

Berne, N., Fabryova, T., Istaz, B., Cardol, P., & Bailleul, B. (2018). The peculiar NPQ regulation in the stramenopile Phaeomonas sp. challenges the xanthophyll cycle dogma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1859(7), 491-500.

Bhattacharya, D., Archibald, J. M., Weber, A. P. M., & Reyes-Prieto, A. (2007). How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays, 29*, 1239–1246.

Bhattacharya, D., Yoon, H. S., & Hackett, J. D. (2004). Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays*, 26(1), 50-60.

**Bilger, W., & Björkman, O.** (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of Hedera canariensis. *Photosynthesis research*, 25(3), 173-185.

Biré, R., Krys, S., Frémy, J. M., Dragacci, S., Stirling, D., & Kharrat, R. (2002). First evidence on occurrence of gymnodimine in clams from Tunisia. *Journal of natural toxins*, 11(4), 269-275.

Blankenship, R. E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis research*, *33*(2), 91-111. Blom, J. F., Brütsch, T., Barbaras, D., Bethuel, Y., Locher, H. H., Hubschwerlen, C., & Gademann, K. (2006). Potent algicides based on the cyanobacterial alkaloid nostocarboline. *Organic Letters*, *8*(4), 737-740.

Blossom, H. E., Daugbjerg, N., & Hansen, P. J. (2012). Toxic mucus traps: a novel mechanism that mediates prey uptake in the mixotrophic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax*. *Harmful Algae*, *17*, 40-53.

Böhme, H., & Kunert, K. J. (1980). Photoreactions of cytochromes in algal chloroplasts. *European journal of biochemistry*, 106(1), 329-336.

**Bolch, C. J., & de Salas, M. F.** (2007). A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates Gymnodinium catenatum and the Alexandrium "tamarensis complex" to Australasia. *Harmful Algae*, 6(4), 465-485.

Bonnet, S., Webb, E. A., Panzeca, C., Karl, D. M., Capone, D. G., & Wilhelmy, S. A. S. (2010). Vitamin B12 excretion by cultures of the marine cyanobacteria *Crocosphaera* and *Synechococcus*. *Limnology and oceanography*, 55(5), 1959-1964.

Bork, P., Bowler, C., De Vargas, C., Gorsky, G., Karsenti, E., & Wincker, P. (2015). Tara Oceans studies plankton at planetary scale. *Science*, *348*(6237), 873.

**Böttcher, B., & Gräber, P.** (2000). The structure of the H+-ATP synthase from chloroplasts and its subcomplexes as revealed by electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1458*(2-3), 404-416.

Bouchouicha, D. S., Sahraoui, I., Mabrouk, H. H., & Sakka, A. H. (2012). Seasonal dynamics of genus Alexandrium (potentially toxic dinoflagellate) in the lagoon of Bizerte (North of Tunisia) and controls by the abiotic factors. *Comptes rendus biologies*, 335(6), 406-416.

Bowes, G., Ogren, W. L., & Hageman, R. H. (1972). Light Saturation, photosynthesis rate, RuDP carboxylase activity, and specific leaf weight in soybeans grown under different light intensities 1. *Crop Science*, *12*(1), 77-79. Bowler, C., & Falciatore, A. (2019). Phaeodactylum tricornutum. *Trends in Genetics*, *35*(9), 706-707.

Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., ... & Rayko, E. (2008). The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239.

Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry*, 66(1), 717-749.

Brandenburg, K. M., Wohlrab, S., John, U., Kremp, A., Jerney, J., Krock, B., & Van de Waal, D. B. (2018). Intraspecific trait variation and trade-offs within and across populations of a toxic dinoflagellate. *Ecology letters*, *21*(10), 1561-1571.

**Bravo, I., Figueroa, R. I., Garces, E., Fraga, S., & Massanet, A.** (2010). The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: the example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *57*(3-4), 166-174.

Bravo, I., Fraga, S., Figueroa, R. I., Pazos, Y., Massanet, A., & Ramilo, I. (2010). Bloom dynamics and life cycle strategies of two toxic dinoflagellates in a coastal upwelling system (NW Iberian Peninsula). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(3-4), 222-234.

**Brogden, K. A.** (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews microbiology*, *3*(3), 238-250.

Buchan, A., LeCleir, G. R., Gulvik, C. A., & González, J. M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 686-698.

Buck, J. M., Sherman, J., Bártulos, C. R., Serif, M., Halder, M., Henkel, J., ... & Falkowski, P. G. (2019). Lhex proteins provide photoprotection via thermal dissipation of absorbed light in the diatom Phaeodactylum tricornutum. *Nature communications*, *10*(1), 1-12.

Burki, F., Flegontov, P., Oborník, M., Cihlář, J., Pain, A., Lukeš, J., & Keeling, P. J. (2012). Re-evaluating the green versus red signal in eukaryotes with secondary plastid of red algal origin. *Genome biology and evolution*, 4(6), 626-635.

Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. (2019). The new tree of eukaryotes. *Trends in ecology* & *evolution*, *35*(1), 43-55.

Butler, W. L. (1978). Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 345-378.

**Calvin, M., Bassham, J. A., Benson, A. A., Lynch, V. H., Ouellet, C., Schou, L., ... & Tolbert, N. E.** (1951, January). Carbon dioxide assimilation in plants. In *Symposia of the Society for Experimental Biology* (Vol. 5, pp. 284-305). UNIV CAMBRIDGE DEPT ZOOLOGY, DOWNING ST, CAMBRIDGE CB2 3EJ, CAMBS, ENGLAND: COMPANY BIOLOGISTS LTD.

Camacho, F. A. (2008). Macroalgal and cyanobacterial chemical defenses in freshwater communities. In *Algal chemical ecology* (pp. 105-119). Springer, Berlin, Heidelberg.

Camefort, H., & Paniel, J. (1962). Morphologie et anatomie des végétaux vasculaires.

Campbell, P. H. (1973). Studies on brackish water phytoplankton.

Cao Vien, M. (1967). Sur l'existence de phenomenes sexuels chez un Peridinien libre, l'Amphidinium carteri. *CR Acad. Sci. Ser. D*, *264*, 1006-1008.

Cardol, P., Alric, J., Girard-Bascou, J., Franck, F., Wollman, F. A., & Finazzi, G. (2009). Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in Chlamydomonas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(37), 15979-15984.

Cardol, P., Forti, G., & Finazzi, G. (2011). Regulation of electron transport in microalgae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 912-918.

Carlucci, A. F., & Silbernagel, S. B. (1969). Effect of vitamin concentrations on growth and development of vitamin-requiring algae. *Journal of Phycology*, 5(1), 64-67.

Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, 72(6), 445-459.

Caron, L., Berkaloff, C., Duval, J. C., & Jupin, H. (1987). Chlorophyll fluorescence transients from the diatom Phaeodactylum tricornutum: relative rates of cyclic phosphorylation and chlororespiration. *Photosynthesis research*, *11*(2), 131-139.

Caruana, A. M., & Amzil, Z. (2018). Microalgae and toxins. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 263-305). Academic Press.

Cavalier-Smith, T. (1982). The origins of plastids. Biological Journal of the Linnean Society, 17(3), 289-306.

**Cavalier-Smith**, **T.** (2018). Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma*, 255(1), 297-357.

**Cembella, A. D.** (2003). Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, 42(4), 420-447.

Cermeño, P., Lee, J., Wyman, K., Schofield, O., & Falkowski, P. (2011). Competitive dynamics in two species of marine phytoplankton under non-equilibrium conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 429, 19-28.

Chambouvet, A., Morin, P., Marie, D., & Guillou, L. (2008). Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science*, *322*(5905), 1254-1257

Chan, A. T., Andersen, R. J., Le Blanc, M. J., & Harrison, P. J. (1980). Algal plating as a tool for investigating allelopathy among marine microalgae. *Marine Biology*, 59(1), 7-13.

Chapelle, A., Le Gac, M., Labry, C., Siano, R., Quere, J., Caradec, F., ... & Gouriou, J. (2015). The Bay of Brest (France), a new risky site for toxic *Alexandrium minutum* blooms and PSP shellfish contamination. *Harmful Algae news*, *51*, 4-5.

Chaux, F., Burlacot, A., Mekhalfi, M., Auroy, P., Blangy, S., Richaud, P., & Peltier, G. (2017). Flavodiiron proteins promote fast and transient O2 photoreduction in Chlamydomonas. *Plant physiology*, *174*(3), 1825-1836. Chen, F. Y., Lee, M. T., & Huang, H. W. (2003). Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophysical journal*, *84*(6), 3751-3758.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, *415*(6871), 545.

Cho, B. C., & Azam, F. (1988). Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature*, 332(6163), 441-443.

Chou, H. T., Kuo, T. Y., Chiang, J. C., Pei, M. J., Yang, W. T., Yu, H. C., ... & Chen, W. J. (2008). Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against Vibrio spp. *International journal of antimicrobial agents*, *32*(2), 130-138.

Chukhutsina, V. U., Büchel, C., & van Amerongen, H. (2014). Disentangling two non-photochemical quenching processes in Cyclotella meneghiniana by spectrally-resolved picosecond fluorescence at 77 K. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1837*(6), 899-907.

**Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., ... & Pistocchi, R.** (2007). Spirolide toxin profile of Adriatic Alexandrium ostenfeldii cultures and structure elucidation of 27-hydroxy-13, 19-didesmethyl spirolide C. *Journal of natural products*, 70(12), 1878-1883.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., ... & Pistocchi, R. (2010). Complex palytoxin-like profile of Ostreopsis ovata. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(18), 2735-2744.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., & Montresor, M. (2000). Saxitoxin and neosaxitoxin as toxic principles of Alexandrium andersoni (Dinophyceae) from the Gulf of Naples, Italy. *Toxicon*, 38(12), 1871-1877. Cohen, Y., & Rosenberg, E. (1989). *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*.

**Cohen-Bazire, G., & Sistrom, W. R.** (1966). The procaryotic photosynthetic apparatus. In *The chlorophylls* (pp. 313-341). Academic Press.

**Cole, J. J.** (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *13*(1), 291-314.

Cole, J. J., Findlay, S., & Pace, M. L. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine ecology progress series*. *Oldendorf*, 43(1), 1-10.

Coleman, A. M. E. (1990). Ciguatoxin-induced food poisoning in a community. *West Indian Medical Journal*, *39*, 233-238.

Cornforth, J. W., & James, A. T. (1956). "Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin." *Biochemical Journal*, 63(1), 124-130.

Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M. J., Neveux, J., ... & Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature*, *370*(6487), 255-255.

Crenn, K., Duffieux, D., & Jeanthon, C. (2018). Bacterial epibiotic communities of ubiquitous and abundant marine diatoms are distinct in short-and long-term associations. *Frontiers in microbiology*, 9, 2879.

Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B 12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, *438*(7064), 90-93.

Cuellar Martinez, T., Ruiz-Fernández, A. C., Alonso-Hernández, C., Amaya, O., Quintanilla, R., Carrillo-Ovalle, H. L.& Chow-Wong, N. F. (2018). Addressing the problem of harmful algal blooms in Latin America and the Caribbean-a regional network for early warning and response. *Frontiers in Marine Science*, *5*, 409.

Curien, G., Flori, S., Villanova, V., Magneschi, L., Giustini, C., Forti, G., ... & Finazzi, G. (2016). The water to water cycles in microalgae. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1354-1363.

**Cutignano, A., Nuzzo, G., Sardo, A., & Fontana, A.** (2017). The Missing piece in biosynthesis of amphidinols: First evidence of glycolate as a starter unit in New Polyketides from Amphidinium carterae. *Marine drugs*, *15*(6), 157.

**Cutignano, A., Nuzzo, G., Sardo, A., & Fontana, A.** (2017). The Missing piece in biosynthesis of amphidinols: First evidence of glycolate as a starter unit in New Polyketides from Amphidinium carterae. *Marine drugs*, *15*(6), 157.

Dahms, HU, Ying X. & Pfeiffer C. (2006). Antifouling potential of cyanobacteria: a minireview. *Biofouling*, 22(5), 317-327.

**Dale, B.** (1977). Cysts of the toxic red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* (Braarud) Balech from Oslofjorden, Norway. *Sarsia*, 63(1), 29-34.

**Dall'Osto, L., Bressan, M., & Bassi, R.** (2015). Biogenesis of light harvesting proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1847*(9), 861-871.

**Dambek, M., Eilers, U., Breitenbach, J., Steiger, S., Büchel, C., & Sandmann, G.** (2012). Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in Phaeodactylum tricornutum. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5607-5612.

**De Clerck, O., Bogaert, K. A., & Leliaert, F.** (2012). Diversity and evolution of algae: primary endosymbiosis. *In Advances in botanical research* (Vol. 64, pp. 55-86). Academic Press.

de Duve, C. (2007). The origin of eukaryotes: A reappraisal. Nature Reviews Genetics, 8, 395-403.

**Deeds**, J. R., & Place, A. R. (2006). Sterol-specific membrane interactions with the toxins from Karlodinium micrum (Dinophyceae)—a strategy for self-protection? *African Journal of Marine Science*, 28(2), 421-425.

**Deeds, J. R., & Place, A. R.** (2006). Sterol-specific membrane interactions with the toxins from Karlodinium micrum (Dinophyceae)—a strategy for self-protection? *African Journal of Marine Science*, 28(2), 421-425.

del Castillo, C. S., Wahid, M. I., Takeshi, Y., & Taizo, S. (2007). Isolation and inhibitory effect of anti-Vibrio substances from Pseudoalteromonas sp. A1-J11 isolated from the coastal sea water of Kagoshima Bay. *Fisheries science*, 74(1), 174-179.

del Castillo, C. S., Yoshikawa, T., Hashimoto, M., & Sakata, T. (2008). Correlation between chemical structures and inhibitory activities of anti-bacterial substances from marine Pseudoalteromonas sp. A1-J11. *Fish Pathology*, 43(2), 65-71.

**Demmig-Adams, B., & Adams III, W. W.** (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant science*, *1*(1), 21-26.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2004). Analysis of Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(5), 1339-1344.

Dickey, R. W. (2008). Ciguatera toxins: chemistry, toxicology, and detection. In Seafood and Freshwater Toxins (pp. 497-518). CRC Press.

Diggle, S. P., Cornelis, P., Williams, P., & Cámara, M. (2006). 4-Quinolone signalling in Pseudomonas aeruginosa: old molecules, new perspectives. *International journal of medical microbiology*, 296(2-3), 83-91.

**Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., ... & Williams, P.** (2007). The Pseudomonas aeruginosa 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry & biology*, *14*(1), 87-96.

**Doan, N. T., Rickards, R. W., Rothschild, J. M., & Smith, G. D.** (2000). Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix. Journal of Applied Phycology*, *12*(3-5), 409-416.

Dodge, J. D., & Hart-Jones, B. (1982). Marine dinoflagellates of the British Isles. HMSO.

Doi, Y., Ishibashi, M., Nakamichi, H., Kosaka, T., Ishikawa, T., & Kobayashi, J. I. (1997). Luteophanol A, a new polyhydroxyl compound from symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium sp. *The Journal of Organic Chemistry*, *62*(12), 3820-3823.

**Doi, Y., Ishibashi, M., Nakamichi, H., Kosaka, T., Ishikawa, T., & Kobayashi, J. I.** (1997). Luteophanol A, a new polyhydroxyl compound from symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium sp. *The Journal of Organic Chemistry*, *62*(12), 3820-3823.

**Doi, Y., Ishibashi, M., Nakamichi, H., Kosaka, T., Ishikawa, T., & Kobayashi, J. I.** (1997). Luteophanol A, a new polyhydroxyl compound from symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium sp. *The Journal of Organic Chemistry*, *62*(12), 3820-3823.

**Dolapsakis, N. P., & Economou-Amilli, A.** (2015). A new marine species of Amphidinium (Dinophyceae) from Thermaikos Gulf, Greece. *Acta Protozoologica*, 48(2), 153-170.

**Dorgham, M. M.** (2014). Effects of eutrophication. In *Eutrophication: Causes, consequences and control* (pp. 29-44). Springer, Dordrecht.

**Doucette, G. J., Cembella, A. D., & Boyer, G. L.** (1989). Cyst formation in the red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae): Effects of iron stress 1. *Journal of Phycology*, 25(4), 721-731.

**Droop, M. R.** (1970). Vitamin B12 and marine ecology, V: continuous culture as an approach to nutritional kinetics. *Helgolander Wiss Meeresunters*, 20, 629-636.

**Droop, M. R.** (2007). Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of plankton research*, 29(2), 107-113.

**Dubern, J. F., & Diggle, S. P.** (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species. *Molecular Biosystems*, 4(9), 882-888.

**Duke, S. O., Cedergreen, N., Velini, E. D., & Belz, R. G.** (2006). Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management*, *17*(1), 29-33.

**Dumas, L., Chazaux, M., Peltier, G., Johnson, X., & Alric, J.** (2016). Cytochrome b 6 f function and localization, phosphorylation state of thylakoid membrane proteins and consequences on cyclic electron flow. *Photosynthesis research*, *129*(3), 307-320.

Durkin, C. A., Mock, T., & Armbrust, E. V. (2009). Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryotic cell*, 8(7), 1038-1050.

Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F. A. (2008). The dynamics of photosynthesis. Annual review of genetics, 42, 463-515.

Echigoya, R., Rhodes, L., Oshima, Y., & Satake, M. (2005). The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from Amphidinium carterae collected in New Zealand. *Harmful Algae*, 4(2), 383-389.

Echigoya, R., Rhodes, L., Oshima, Y., & Satake, M. (2005). The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from Amphidinium carterae collected in New Zealand. *Harmful Algae*, 4(2), 383-389.

Echigoya, R., Rhodes, L., Oshima, Y., & Satake, M. (2005). The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from Amphidinium carterae collected in New Zealand. *Harmful Algae*, 4(2), 383-389.

Ehrenstein, G., & Lecar, H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly reviews of biophysics*, 10(1), 1-34.

**Eick, K.** (2017). *Metabolomic Analysis of the Allelopathic Interactions between Marine Planktonic Microalgae* (Doctoral dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena).

**Ellis, D.** (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(suppl\_1), 7-10.

Ellis, K. A., Cohen, N. R., Moreno, C., & Marchetti, A. (2017). Cobalamin-independent methionine synthase distribution and influence on vitamin B12 growth requirements in marine diatoms. *Protist*, *168*(1), 32-47.

El-Sheekh, M. M., Khairy, H. M., & El-Shenody, R. A. (2010). Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. *Allelopathy Journal*, 26(2).

**Emura, A., Matsuyama, Y., & Oda, T.** (2004). Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae*, *3*(1), 29-37.

Espiña, B., Cagide, E., Louzao, M. C., Vilariño, N., Vieytes, M. R., Takeda, Y.& Botana, L. M. (2016). Cytotoxicity of goniodomin A and B in non contractile cells. *Toxicology letters*, 250, 10-20.

**Espiritu, R. A.** (2013). Mechanism of Action of Membrane-Active Marine Natural Products Theonellamide A and Amphidinol 3. (Doctoral dissertation, Osaka University Knowledge Archive: OUKA)

Espiritu, R. A., Matsumori, N., Tsuda, M., & Murata, M. (2014). Direct and stereospecific interaction of amphidinol 3 with sterol in lipid bilayers. *Biochemistry*, *53*(20), 3287-3293.

Espiritu, R. A., Matsumori, N., Tsuda, M., & Murata, M. (2014). Direct and stereospecific interaction of amphidinol 3 with sterol in lipid bilayers. *Biochemistry*, 53(20), 3287-3293.

Etchegaray, A., Rabello, E., Dieckmann, R., Moon, D. H., Fiore, M. F., Von Döhren, H., & Neilan, B. A. (2004). Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella sp.* CENA 19. *Journal of Applied Phycology*, *16*(3), 237-243.

Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis research*, *39*(3), 235-258.

Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2013). Aquatic photosynthesis. Princeton University Press.

Faust, M. A., & Gulledge, R. A. (2002). Identifying harmful marine dinoflagellates. *Contributions from the United States National Herbarium, 42,* 1-144.

Fernández-Herrera, L. J., Band-Schmidt, C. J., López-Cortés, D. J., Hernández-Guerrero, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., & Núñez-Vázquez, E. (2016). Allelopathic effect of Chattonella marina var. marina (Raphidophyceae) on Gymnodinium catenatum (Dinophycea). *Harmful Algae*, *51*, 1-9.

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281(5374), 237-240.

Figueredo, C. C., Giani, A., & Bird, D. F. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? 1. *Journal of Phycology*, *43*(2), 256-265.

Figueroa, R. I., Bravo, I., & Garcés, E. (2005). Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia*, 44(6), 658-670.

**Figueroa, R. I., Bravo, I., & Garcés, E.** (2008). The significance of sexual versus asexual cyst formation in the life cycle of the noxious dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*. *Harmful Algae*, 7(5), 653-663.

Figueroa, R. I., Garces, E., & Bravo, I. (2007). Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture 1. *Journal of Phycology*, 43(5), 1039-1053.

Finazzi, G., & Rappaport, F. (1998). In vivo characterization of the electrochemical proton gradient generated in darkness in green algae and its kinetic effects on cytochrome b 6 f turnover. *Biochemistry*, *37*(28), 9999-10005. Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V., & Raven, J. A. (2010). Phytoplankton in a

changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of plankton research*, *32*(1), 119-137. **Finlay, B. J.** (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, *296*(5570), 1061-1063.

**Fistarol, G. O., Legrand, C., Rengefors, K., & Granéli, E.** (2004). Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology*, *6*(8), 791-798.

Fistarol, G. O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W., & Granéli, E. (2004). Allelopathy in Alexandrium spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic microbial ecology*, 35(1), 45-56.

Fistarol, G. O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W., & Granéli, E. (2004). Allelopathy in Alexandrium spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic microbial ecology*, 35(1), 45-56.

Flores, E., & Wolk, C. P. (1986). Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. *Archives of microbiology*, 145(3), 215-219.

Flores-Moya, A., Rouco, M., García-Sánchez, M. J., García-Balboa, C., González, R., Costas, E., & López-Rodas, V. (2012). Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate

Alexandrium minutum under selection of increased temperature and acidification. *Ecology and evolution*, 2(6), 1251-1259.

Flori, S., Jouneau, P. H., Bailleul, B., Gallet, B., Estrozi, L. F., Moriscot, C., ... & Maréchal, E. (2017). Plastid thylakoid architecture optimizes photosynthesis in diatoms. *Nature communications*, 8(1), 1-9.

Fong, Peggy R. M. D., & Zedler, J. B. (1993). Competition with macroalgae and benthic cyanobacterial mats limits phytoplankton abundance in experimental microcosms. *Marine Ecology Progress Series*, 100, 97-102.

Forrester, M. L., Krotkov, G., & Nelson, C. D. (1966). Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. I. Soybean. *Plant physiology*, *41*(3), 422-427.

Fraga, S., & Sanchez, F. J. (1979). A bloom of Amphidinium sp. in the Ria De Vigo (NW of Spain). *Developments in marine biology*, 1, 165-168.

Franco, J. M., Fernandez, P., & Reguera, B. (1994). Toxin profiles of natural populations and cultures of *Alexandrium minutum* Halim from Galician (Spain) coastal waters. *Journal of applied Phycology*, 6(3), 275-279. Frehi, H., Couté, A., Mascarell, G., Perrette-Gallet, C., Ayada, M., & Kara, M. H. (2007). Dinoflagellés toxiques et/ou responsables de blooms dans la baie d'Annaba (Algérie). *Comptes Rendus Biologies*, 330(8), 615-628.

Frommolt, R., Werner, S., Paulsen, H., Goss, R., Wilhelm, C., Zauner, S., ... & Lohr, M. (2008). Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis. *Molecular Biology* and Evolution, 25(12), 2653-2667.

Fuhrman, J. A., Ammerman, J. W., & Azam, F. (1980). Bacterioplankton in the coastal euphotic zone: distribution, activity and possible relationships with phytoplankton. *Marine Biology*, 60(2-3), 201-207.

**Fukuyo Y**, (1981). Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. 日本水産学会誌, 47(8), 967-978.

Gantar, M., Berry, J. P., Thomas, S., Wang, M., Perez, R., & Rein, K. S. (2008). Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS microbiology ecology*, *64*(1), 55-64.

Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current opinion in immunology*, 10(1), 41-44.

Gárate-Lizárraga, I., González-Armas, R., Verdugo-Díaz, G., Okolodkov, Y. B., Pérez-Cruz, B., & Díaz-Ortíz, J. A. (2019). Seasonality of the dinoflagellate Amphidinium cf. carterae (Dinophyceae: Amphidiniales) in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, *146*, 532-541.

Gárate-Lizárraga, I., González-Armas, R., Verdugo-Díaz, G., Okolodkov, Y. B., Pérez-Cruz, B., & Díaz-Ortíz, J. A. (2019). Seasonality of the dinoflagellate *Amphidinium cf. carterae* (Dinophyceae: Amphidiniales) in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Marine pollution bulletin*, *146*, 532-541.

Garcés, E., Bravo, I., Vila, M., Figueroa, R. I., Masó, M., & Sampedro, N. (2004). Relationship between vegetative cells and cyst production during *Alexandrium minutum* bloom in Arenys de Mar harbour (NW Mediterranean). *Journal of Plankton Research*, 26(6), 637-645.

Garneau, M. È., Schnetzer, A., Countway, P. D., Jones, A. C., Seubert, E. L., & Caron, D. A. (2011). Examination of the seasonal dynamics of the toxic dinoflagellate Alexandrium catenella at Redondo Beach, California, by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7669-7680.

**Gause, G. F., Nastukova, O. K., & Alpatov, W. W.** (1934). The Influence of Biologically Conditioned Media on the Growth of a Mixed Population of Paramecium caudatum and P. aureliax. *Journal of Animal Ecology*, *3*(2), 222-230.

Gleason, F. K., & Case, D. E. (1986). Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on angiosperms. *Plant physiology*, 80(4), 834-837.

Gleason, F. K., & Paulson, J. L. (1984). Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green alga, *Synechococcus sp. Archives of microbiology*, 138(3), 273-277.

Gleason, F. K., Case, D. E., Sipprell, K. D., & Magnuson, T. S. (1986). Effect of the natural algicide, cyanobacterin, on an herbicide-resistant mutant of *Anacystis nidulans* R2. *Plant science*, 46(1), 5-10.

Glibert, P. M. (2016). Margalef revisited: a new phytoplankton mandala incorporating twelve dimensions, including nutritional physiology. *Harmful Algae*, 55, 25-30.

Glibert, P. M., Al-Azri, A., Allen, J. I., Bouwman, A. F., Beusen, A. H., Burford, M. A., ... & Zhou, M. (2018). Key questions and recent research advances on harmful algal blooms in relation to nutrients and eutrophication. In *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms* (pp. 229-259). Springer, Cham.

Goecke, F., Thiel, V., Wiese, J., Labes, A., & Imhoff, J. F. (2013). Algae as an important environment for bacteria–phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia*, 52(1), 14-24. Goldman, J. A., Kranz, S. A., Young, J. N., Tortell, P. D., Stanley, R. H., Bender, M. L., & Morel, F. M.

(2015). Gross and net production during the spring bloom along the W estern A ntarctic P eninsula. *New Phytologist*, 205(1), 182-191.

Goss, R., & Jakob, T. (2010). Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis research*, *106*(1-2), 103-122.

Goss, R., & Jakob, T. (2010). Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis research*, 106(1-2), 103-122.

**Gould, S. B., Waller, R. R., & McFadden, G. I.** (2008). Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology, 59*, 491–517. Granéli, E., Salomon, P. S., & Fistarol, G. O. (2008). The role of allelopathy for harmful algae bloom formation. In *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection* (pp. 159-178). Springer, Dordrecht

Gram, L., Grossart, H. P., Schlingloff, A., & Kiørboe, T. (2002). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by Roseobacter strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8), 4111-4116.

Granéli, E., & Hansen, P. J. (2006). Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In *Ecology of harmful algae* (pp. 189-201). Springer, Berlin, Heidelberg.

Granéli, E., & Salomon, P. S. (2010). Factors Influencing Allelopathy and Toxicity in Prymnesium parvum. *Journal of the American Water Resources Association*, 46(1), 108-120.

Granéli, E., Edvardsen, B., Roelke, D. L., & Hagström, J. A. (2012). The ecophysiology and bloom dynamics of Prymnesium spp. *Harmful Algae*, *14*, 260-270.

Granéli, E., Salomon, P. S., & Fistarol, G. O. (2008). The role of allelopathy for harmful algae bloom formation. In *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection* (pp. 159-178). Springer, Dordrecht.

Green, B. R., & Durnford, D. G. (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 47(1), 685-714.

Green, D. H., Echavarri-Bravo, V., Brennan, D., & Hart, M. C. (2015). Bacterial diversity associated with the coccolithophorid algae *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus pelagicus* f. *braarudii*. *BioMed research international*, 2015, 1-15.

Gribble, K. E., Keafer, B. A., Quilliam, M. A., Cembella, A. D., Kulis, D. M., Manahan, A., & Anderson, D. M. (2005). Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *52*(19-21), 2745-2763.

Gromov, B. V., Vepritskiy, A. A., Titova, N. N., Mamkayeva, K. A., & Alexandrova, O. V. (1991). Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium). *Journal of Applied Phycology*, *3*(1), 55-59.

Gross, E. (1999). Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submersed macrophytes.

Gross, E. M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. Critical reviews in plant sciences, 22(3-4), 313-339.

Gross, E. M., Legrand, C., Rengefors, K., & Tillmann, U. (2012). Allelochemical interactions among aquatic primary producers. *Chemical ecology in aquatic systems*, 196-209.

Gross, E. M., Wolk, C. P., & Jüttner, F. (1991). Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *Journal of Phycology*, 27(6), 686-692.

Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7(6), 860-873.

Grouneva, I., Jakob, T., Wilhelm, C., & Goss, R. (2006). Influence of ascorbate and pH on the activity of the diatom xanthophyll cycle-enzyme diadinoxanthin de-epoxidase. *Physiologia Plantarum*, *126*(2), 205-211.

Grouneva, I., Jakob, T., Wilhelm, C., & Goss, R. (2009). The regulation of xanthophyll cycle activity and of non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms Phaeodactylum tricornutum and Cyclotella meneghiniana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1787*(7), 929-938.

**Grouneva, I., Jakob, T., Wilhelm, C., & Goss, R.** (2009). The regulation of xanthophyll cycle activity and of non-photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms Phaeodactylum tricornutum and Cyclotella meneghiniana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(7), 929-938.

Grouneva, I., Rokka, A., & Aro, E. M. (2011). The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *Journal of proteome research*, *10*(12), 5338-5353.

Grzebyk, D., & Berland, B. (1996). Influences of temperature, salinity and irradiance on growth *of Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research*, *18*(10), 1837-1849.

Guallar, C., Bacher, C., & Chapelle, A. (2017). Global and local factors driving the phenology of Alexandrium minutum (Halim) blooms and its toxicity. *Harmful Algae*, 67, 44-60.

Guan, C., Guo, X., Cai, G., Zhang, H., Li, Y., Zheng, W., & Zheng, T. (2014). Novel algicidal evidence of a bacterium Bacillus sp. LP-10 killing Phaeocystis globosa, a harmful algal bloom causing species. *Biological Control*, *76*, 79-86.

Guannel, M. L., Horner-Devine, M. C., & Rocap, G. (2011). Bacterial community composition differs with species and toxigenicity of the diatom Pseudo-nitzschia. *Aquatic Microbial Ecology*, 64(2), 117-133.

Guaratini, T., Cardozo, K. H., Pinto, E., & Colepicolo, P. (2009). Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(9), 1609-1616.

Guillard, R. R., & 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.

Gundermann, K., & Büchel, C. (2014). Structure and functional heterogeneity of fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms. In *The Structural Basis of Biological Energy Generation* (pp. 21-37). Springer, Dordrecht.

Hackett, J. D., Anderson, D. M., Erdner, D. L., & Bhattacharya, D. (2004). Dinoflagellates: A remarkable evolutionary experiment. *American Journal of Botany*, 91, 1523–1534.

Hackett, J. D., Maranda, L., Yoon, H. S., & Bhattacharya, D. (2003). Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of the plastid of Dinophysis (Dinophysiales, Dinophyceae). *Journal of Phycology*, *39*, 440–448.

Hager, A. T., & Stransky, H. (1970). Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. Archiv für Mikrobiologie, 71(2), 132-163.

**Hagmann, L., & Jüttner, F.** (1996). Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. *Tetrahedron letters*, *37*(36), 6539-6542.

Hahn, A., Vonck, J., Mills, D. J., Meier, T., & Kühlbrandt, W. (2018). Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science*, *360*(6389), eaat4318.

Haines, K. C., & Guillard, R. R. L. (1974). Growth of vitamin B12 requiring marine diatoms in mixed lab oratory cultures with vitamin B12-producing marine bacteria. *Journal of phycology, 10.* 245 – 252.

Hallegraeff, G. M. (1992). Harmful algal blooms in the Australian region. *Marine pollution bulletin*, 25(5-8), 186-190.

Hallegraeff, G. M. (2003). Harmful algal blooms: a global overview. *Manual on harmful marine microalgae*, *33*, 1-22.

Hallegraeff, G. M., Steffensen, D. A., & Wetherbee, R. (1988). Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *Journal of plankton research*, *10*(3), 533-541.

Han, M., Lee, H., Anderson, D. M., & Kim, B. (2016). Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate Alexandrium pacificum (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures. *Marine pollution bulletin*, 104(1-2), 34-43.

Hansen, G., Botes, L., & De Salas, M. (2007). Ultrastructure and large subunit rDNA sequence of Lepidodinium viride reveal a close relationship to Lepidodinium chlorophorum comb. nov. (= Gymnodiuium chlorophorum). *Phycological Research*, *55*, 25–41.

Hansen, P. J. (1989). The red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense*: Effects on behaviour and growth of a tintinnid ciliate. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 53(2), 105-116.

Hardin, G. (1960). The competitive exclusion principle. Science, 131(3409), 1292-1297.

Harju, K., Koskela, H., Kremp, A., Suikkanen, S., de la Iglesia, P., Miles, C. O., ... & Vanninen, P. (2016). Identification of gymnodimine D and presence of gymnodimine variants in the dinoflagellate Alexandrium ostenfeldii from the Baltic Sea. *Toxicon*, *112*, 68-76.

Harrison, J. P., Hoellein, T. J., Sapp, M., Tagg, A. S., Ju-Nam, Y., & Ojeda, J. J. (2018). Microplasticassociated biofilms: a comparison of freshwater and marine environments. In Freshwater microplastics (pp. 181-201). Springer, Cham.

Harvey, E. L., Deering, R. W., Rowley, D. C., El Gamal, A., Schorn, M., Moore, B. S., ... & Whalen, K. E. (2016). A bacterial quorum-sensing precursor induces mortality in the marine coccolithophore, Emiliania huxleyi. *Frontiers in microbiology*, 7, 59.

Hattenrath-Lehmann, T. K., & Gobler, C. J. (2011). Allelopathic inhibition of competing phytoplankton by North American strains of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*: Evidence from field experiments, laboratory experiments, and bloom events. *Harmful Algae*, *11*, 106-116.

Haynes, K., Hofmann, T. A., Smith, C. J., Ball, A. S., Underwood, G. J., & Osborn, A. M. (2007). Diatomderived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6112-6124.

Hays, G. C., Richardson, A. J., & Robinson, C. (2005). Climate change and marine plankton. *Trends in ecology* & *evolution*, 20(6), 337-344.

Hedges, S. B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D. Y., Thompson, A. S., & Watanabe, H. (2001). A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, *1*(1), 4.

Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P., & Cámara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS microbiology reviews*, 35(2), 247-274.

Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E., & Smith, A. G. (2011). Insights into the evolution of vitamin B12 auxotrophy from sequenced algal genomes. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2921-2933.

Hernandez-Becerril, D. U., Moreno-Gutierrez, S. P., & Baron-Campis, S. A. (2009). Morphological variability of the planktonic diatom Thalassiosira delicatula Ostenfeld emend. Hasle from the Mexican Pacific, in culture conditions. *Acta Botanica Croatica*, 68(2), 313-321.

Herzi, F. (2013). Caractérisation chimique des exsudats du dinoflagellé marin toxique *Alexandrium* catenella et de la diatomée marine *Skeletonema* costatum et étude de la réponse protéomique d'*Alexandrium catenella* en conditions de stress métalliques (Doctoral dissertation, Toulon).

Hirata, K., Takashina, J., Nakagami, H., Ueyama, S., Murakami, K., Kanamori, T., & Miyamoto, K. (1996). Growth inhibition of various organisms by a violet pigment, nostocine A, produced by *Nostoc spongiaeforme. Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(11), 1905-1906.

Hirata, K., Yoshitomi, S., Dwi, S., Iwabe, O., Mahakhant, A., Polchai, J., & Miyamoto, K. (2003). Bioactivities of nostocine A produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 512-517.

Holzenburg, A., Bewley, M. C., Wilson, F. H., Nicholson, W. V., & Ford, R. C. (1993). Three-dimensional structure of photosystem II. *Nature*, *363*(6428), 470-472.

Hopkinson, B. M., Dupont, C. L., Allen, A. E., & Morel, F. M. (2011). Efficiency of the CO2-concentrating mechanism of diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(10), 3830-3837.

Hoppenrath, M. (2000). Taxonomische und ökologische Untersuchungen von Flagellaten mariner Sande (Doctoral dissertation, Universität Hamburg).

Hoppenrath, M., & OKOLODKOV, Y. B. (2000). Amphidinium glabrum sp. nov.(Dinophyceae) from the North German Wadden Sea and European Arctic sea ice: morphology, distribution and ecology. *European Journal of Phycology*, 35(1), 61-67.

Houdai, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., & Murata, M. (2004). Membrane-permeabilizing activities of amphidinol 3, polyene-polyhydroxy antifungal from a marine dinoflagellate. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*)-*Biomembranes*, 1667(1), 91-100.

Houdai, T., Matsuoka, S., Morsy, N., Matsumori, N., Satake, M., & Murata, M. (2005). Hairpin conformation of amphidinols possibly accounting for potent membrane permeabilizing activities. *Tetrahedron*, 61(11), 2795-2802.

Houdai, T., Matsuoka, S., Murata, M., Satake, M., Ota, S., Oshima, Y., & Rhodes, L. L. (2001). Acetate labeling patterns of dinoflagellate polyketides, amphidinols 2, 3 and 4. *Tetrahedron*, *57*(26), 5551-5555.

Houdai, T., Matsuoka, S., Murata, M., Satake, M., Ota, S., Oshima, Y., & Rhodes, L. L. (2001). Acetate labeling patterns of dinoflagellate polyketides, amphidinols 2, 3 and 4. *Tetrahedron*, *57*(26), 5551-5555.

Howe, C. J., Barbrook, A. C., Nisbet, R. E. R., Lockhart, P. J., & Larkum, A. W. D. (2008). The origin of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1504), 2675-2685.

Hsia, M. H., Morton, S. L., Smith, L. L., Beauchesne, K. R., Huncik, K. M., & Moeller, P. D. (2006). Production of goniodomin A by the planktonic, chain-forming dinoflagellate *Alexandrium monilatum* (Howell) Balech isolated from the Gulf Coast of the United States. *Harmful Algae*, 5(3), 290-299.

Hu, T., Burton, I. W., Cembella, A. D., Curtis, J. M., Quilliam, M. A., Walter, J. A., & Wright, J. L. (2001). Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *Journal of natural products*, *64*(3), 308-312.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J.L.C. (1996). Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Letters*, *37*, 7671–7674.

Hu, Z. Q., Liu, Y. D., & Li, D. H. (2004). Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 19(6), 571-577.

Hu, Z. Q., Liu, Y. D., Li, D. H., & Dauta, A. (2005). Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia*, 534(1-3), 23-29.

Hu, Z., Li, D., Xiao, B., Dauta, A., & Liu, Y. (2008). Microcystin-RR induces physiological stress and cell death in the cyanobacterium *Aphanizomenon sp.* DC01 isolated from Lake Dianchi, China. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 173(2), 111-120.

Huang, H. W. (2000). "Action of antimicrobial peptides: two-state model." Biochemistry 39(29): 8347-52.

Huang, S. J., Kuo, C. M., Lin, Y. C., Chen, Y. M., & Lu, C. K. (2009). Carteraol E, a potent polyhydroxyl ichthyotoxin from the dinoflagellate Amphidinium carterae. *Tetrahedron Letters*, *50*(21), 2512-2515.

Huang, X. C., Zhao, D., Guo, Y. W., Wu, H. M., Lin, L. P., Wang, Z. H., ... & Lin, Y. S. (2004). Lingshuiol, a novel polyhydroxyl compound with strongly cytotoxic activity from the marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *14*(12), 3117-3120. (a)

Huang, X. C., Zhao, D., Guo, Y. W., Wu, H. M., Trivellone, E., & Cimino, G. (2004). Lingshuiols A and B, two new polyhydroxy compounds from the Chinese marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Tetrahedron letters*, 45(28), 5501-5504. (b)

Huisman, J., & Weissing, F. J. (2002). Oscillations and chaos generated by competition for interactively essential resources. *Ecological Research*, *17*(2), 175-181.

Hulburt, E. M. (1957). The taxonomy of unarmored Dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. *The Biological Bulletin*, 112(2), 196-219.

Hünken, M., Harder, J., & Kirst, G. O. (2008). Epiphytic bacteria on the Antarctic ice diatom Amphiprora kufferathii Manguin cleave hydrogen peroxide produced during algal photosynthesis. *Plant Biology*, *10*(4), 519-526.

Hunter, P. R. (1998). Cyanobacterial toxins and human health. In Symposium Series-Society for Applied Bacteriology (No. 27).

Hutchinson, G. E. (1961). The paradox of the plankton. The American Naturalist, 95(882), 137-145.

**Igarashi, T., Aritake, S., & Yasumoto, T.** (1998). Biological activities of prymnesin-2 isolated from a red tide alga Prymnesium parvum. *Natural toxins*, *6*(1), 35-41.

Imai, M., & Inoue, K. (1974). The mechanism of the action of prymnesium toxin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 352(3), 344-348.

Inagaki, Y., Dacks, J. B., Doolittle, W. F., Watanabe, K. I., & Ohama, T. (2000). Evolutionary relationship between dinoflagellates bearing obligate diatom endosymbionts: Insight into tertiary endosymbiosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*, 2075–2081.

**Ishibashi, M., Yamaguchi, N., Sasaki, T., & Kobayashi, J. I.** (1994). Amphidinolide N, a novel 26-membered macrolide with remarkably potent cytotoxicity from the cultured marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (12), 1455-1456.

**Ismael, A. A. H., Halim, Y., & Khalil, A. G.** (1999). Optimum growth conditions for *Amphidinium carterae Hulburt* from eutrophic waters in Alexandria (Egypt) and its toxicity to the brine shrimp *Artemia salina. Grana*, *38*(2-3), 179-185.

Iwamoto, M., Sumino, A., Shimada, E., Kinoshita, M., Matsumori, N., & Oiki, S. (2017). Channel formation and membrane deformation via sterol-aided polymorphism of amphidinol 3. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

Iwamoto, M., Sumino, A., Shimada, E., Kinoshita, M., Matsumori, N., & Oiki, S. (2017). Channel formation and membrane deformation via sterol-aided polymorphism of amphidinol 3. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

Iwamoto, M., Sumino, A., Shimada, E., Kinoshita, M., Matsumori, N., & Oiki, S. (2017). Channel formation and membrane deformation via sterol-aided polymorphism of amphidinol 3. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

Jakob, T., Goss, R., & Wilhelm, C. (1999). Activation of diadinoxanthin de-epoxidase due to a chiororespiratory proton gradient in the dark in the diatom Phaeodactylum tricornutum. *Plant Biology*, *1*(1), 76-82.

Jakob, T., Goss, R., & Wilhelm, C. (1999). Activation of diadinoxanthin de-epoxidase due to a chiororespiratory proton gradient in the dark in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Biology*, *1*(1), 76-82.

Jakob, T., Goss, R., & Wilhelm, C. (2001). Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom Phaeodactylum tricornutum. *Journal of Plant Physiology*, *158*(3), 383-390.

Jakob, T., Goss, R., & Wilhelm, C. (2001). Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Plant Physiology*, *158*(3), 383-390.

Jeffrey, L. C. (1995). Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of the chemical society, Chemical communications*, (20), 2159-2161.

Jensen, M. Ø., & Moestrup, Ø. (1997). Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities. *European Journal of Phycology*, 32(1), 9-18.

Jeong, H. J., Du Yoo, Y., Kim, J. S., Seong, K. A., Kang, N. S., & Kim, T. H. (2010). Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean science journal*, 45(2), 65-91.

Ji, X., Han, X., Yang, B., & Yu, Z. (2012). Analysis on allelochemicals in the cell-free Filtrates of Amphidinium carterae. *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica*, *32*(6), 1745-1754.

John, U., Litaker, R. W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M. L., & Anderson, D. M. (2014). Formal revision of the Alexandrium tamarense species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist*, *165*(6), 779-804.

Joint, I., Henriksen, P., Fonnes, G. A., Bourne, D., Thingstad, T. F., & Riemann, B. (2002). Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 29(2), 145-159.

Joliot, P., & Joliot, A. (2008). Quantification of the electrochemical proton gradient and activation of ATP synthase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(7-8), 676-683.

Jørgensen, M. F., Murray, S., & Daugbjerg, N. (2004). Amphidinium revisited. I. Redefinition of amphidinium (dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses 1. *Journal of Phycology*, *40*(2), 351-365.

Jørgensen, M. F., Murray, S., & Daugbjerg, N. (2004). AMPHIDINIUM REVISITED. I. REDEFINITION OF AMPHIDINIUM (DINOPHYCEAE) BASED ON CLADISTIC AND MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES 1. *Journal of Phycology*, *40*(2), 351-365.

Jüttner, F., Todorova, A. K., Walch, N., & von Philipsborn, W. (2001). Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. *Phytochemistry*, *57*(4), 613-619.

Kaczmarska, I., Ehrman, J. M., Bates, S. S., Green, D. H., Léger, C., & Harris, J. (2005). Diversity and distribution of epibiotic bacteria on Pseudo-nitzschia multiseries (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae*, 4(4), 725-741.

Kaplan, H. B., & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the Vibrio fischeri luminescence system. *Journal of bacteriology*, *163*(3), 1210-1214.

Karafas, S., Teng, S. T., Leaw, C. P., & Alves-de-Souza, C. (2017). An evaluation of the genus Amphidinium (Dinophyceae) combining evidence from morphology, phylogenetics, and toxin production, with the introduction of six novel species. *Harmful Algae*, *68*, 128-151.

Kaya, K., Mahakhant, A., Keovara, L., Sano, T., Kubo, T., & Takagi, H. (2002). Spiroidesin, a novel lipopeptide from the cyanobacterium *Anabaena spiroides* that inhibits cell growth of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa. Journal of natural products*, 65(6), 920-921.

Kaye, Y., Huang, W., Clowez, S., Saroussi, S., Idoine, A., Sanz-Luque, E., & Grossman, A. R. (2019). The mitochondrial alternative oxidase from Chlamydomonas reinhardtii enables survival in high light. *Journal of Biological Chemistry*, 294(4), 1380-1395.

Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T. T. V., Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., ... & Smith, A. G. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental microbiology*, *14*(6), 1466-1476.

Keeling, P. J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions* of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1541), 729-748.

Khandeparker, L., D'Costa, P. M., Anil, A. C., & Sawant, S. S. (2014). Interactions of bacteria with diatoms: influence on natural marine biofilms. *Marine ecology*, *35*(2), 233-248.

Kharrat, R., Servent, D., Girard, E., Ouanounou, G., Amar, M., Marrouchi, R., ... & Molgó, J. (2008). The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *Journal of neurochemistry*, *107*(4), 952-963.

Kim, E., & Archibald, J. M. (2009). Diversity and evolution of plastids and their genomes. In H. Aronsson, & A. S. Sandelius (Eds.), The chloroplast-interactions with the environment (pp. 1–39). *Berlin : Springer-Verlag* 

Kinoshita, H., Nagasaki, J., Yoshikawa, N., Yamamoto, A., Takito, S., Kawasaki, M., ... & Taniguchi, M. (2011). The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *The Plant Journal*, 65(1), 15-26.

Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., Nevo, R., ... & Reich, Z. (2011). Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20248-20253.

Kirchhoff, H., Schöttler, M. A., Maurer, J., & Weis, E. (2004). Plastocyanin redox kinetics in spinach chloroplasts: evidence for disequilibrium in the high potential chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1659(1), 63-72.

Kobayashi, J. I. (2008). Amphidinolides and its related macrolides from marine dinoflagellates. *The Journal of antibiotics*, *61*(5), 271.

Kobayashi, J. I., Ishibashi, M., Nakamura, H., Ohizumi, Y., Yamasu, T., Sasaki, T., & Hirata, Y. (1986). Amphidinolide-A, a novel antineoplastic macrolide from the marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Tetrahedron letters*, *27*(47), 5755-5758.

Kobayashi, J. I., Kubota, T., Takahashi, M., Ishibashi, M., Tsuda, M., & Naoki, H. (1999). Colopsinol A, a novel polyhydroxyl metabolite from marine dinoflagellate Amphidinium sp. *The Journal of organic chemistry*, 64(5), 1478-1482.

Koch, F., Hattenrath-Lehmann, T. K., Goleski, J. A., Sañudo-Wilhelmy, S., Fisher, N. S., & Gobler, C. J. (2012). Vitamin B1 and B12 uptake and cycling by plankton communities in coastal ecosystems. *Frontiers in microbiology*, *3*, 363.

Kodama, M., Ogata, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Wisessang, S., Saitanu, K., ... & Piyakarnchana, T. (1988). Protogonyaulax cohorticula, a toxic dinoflagellate found in the Gulf of Thailand. *Toxicon*, 26(8), 707-712.

Kok, B., Forbush, B., & McGloin, M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O2 evolution–I. A linear four step mechanism. *Photochemistry and Photobiology*, 11(6), 457-475.

Kopp, M., Doucette, G. J., Kodama, M., Gerdts, G., Schütt, C., & Medlin, L. K. (1997). Phylogenetic analysis of selected toxic and non-toxic bacterial strains isolated from the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense. *Fems microbiology ecology*, 24(3), 251-257.

Koppel, D. J., Gissi, F., Adams, M. S., King, C. K., & Jolley, D. F. (2017). Chronic toxicity of five metals to the polar marine microalga Cryothecomonas armigera–Application of a new bioassay. *Environmental Pollution*, 228, 211-221.

Kramer, D.M., Cruz, J.A. & Kanazawa, A. (2003). Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends in plant science*, *8*(1), 27-32.

Kroth, P. G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M. S., ... &

Krys, S., Arnich, N., & Fremy, J. M. (2007). Emergence de nouvelles toxicités d'origine marine : Vers une évolution significative des dispositifs de sécurisation des coquillages. *Rencontres en Toxinologie, Toxines Émergentes : Nouveaux Risques*, 117-122.

Kubanek, J., Hicks, M. K., Naar, J., & Villareal, T. A. (2005). Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? *Limnology and Oceanography*, *50*(3), 883-895.
Kubota, T., Sakuma, Y., Shimbo, K., Tsuda, M., Nakano, M., Uozumi, Y., & Kobayashi, J. I. (2006). Amphezonol A, a novel polyhydroxyl metabolite from marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Tetrahedron letters*, 47(26), 4369-4371.

Kubota, T., Takahashi, A., Tsuda, M., & Kobayashi, J. (2005). Luteophanol D, new polyhydroxyl metabolite from marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Marine Drugs*, *3*(4), 113-11.

Kubota, T., Tsuda, M., Doi, Y., Takahashi, A., Nakamichi, H., Ishibashi, M., ... & Kobayashi, J. I. (1998). Luteophanols B and C, new polyhydroxyl compounds from marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Tetrahedron*, *54*(48), 14455-14464.

Kubota, T., Tsuda, M., Takahashi, M., Ishibashi, M., Naoki, H., & Kobayashi, J. I. (1999). Colopsinols B and C, new long chain polyhydroxy compounds from cultured marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (23), 3483-3487.

Kubota, T., Tsuda, M., Takahashi, M., Ishibashi, M., OkA, S., & Kobayashi, J. I. (2000). Colopsinols D and E, new polyhydroxyl linear carbon chain compounds from marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 48(10), 1447-1451.

Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine drugs*, 13(9), 5847-5881.Kuzminov, F. I., & Gorbunov, M. Y. (2016). Energy dissipation pathways in Photosystem 2 of the diatom, Phaeodactylum tricornutum, under high-light conditions. *Photosynthesis research*, 127(2), 219-235.

Lage, O. M., Sansonetty, F., O'Connor, J. E., & Parente, A. M. (2001). Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper (II) on the marine dinoflagellate Amphidinium carterae. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 44(3), 226-235.

Lassus, P., Bardouil, M., Berthomé, J. P., Maggi, P., Truquet, P., & Le Déan, L. (1988). Seasonal occurrence of Dinophysis sp. along the French coast between 1983 and 1987. *Aquatic living resources*, *1*(3), 155-164.

Lau, W. W. Y., & Armbrust, E. V. (2006). Detection of glycolate oxidase gene glcD diversity among cultured and environmental marine bacteria. *Environmental microbiology*, 8(10), 1688-1702.Lavaud, J., Rousseau, B., Van Gorkom, H. J., & Etienne, A. L. (2002). Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom Phaeodactylum tricornutum. *Plant Physiology*, 129(3), 1398-1406.

**Leblond, J.** (2002). A survey of the sterol composition of the marine dinoflagellates Karenia brevis, Karenia mikimotoi and Karlodinium micrum: distribution of sterols within other members of the class Dinophyceae. *J. Phycol.*, *38*, 670-682.

Leblond, J. (2002). A survey of the sterol composition of the marine dinoflagellates Karenia brevis, Karenia mikimotoi and Karlodinium micrum: distribution of sterols within other members of the class Dinophyceae. *Journal of Phycology*, *38*, 670-682.

Lee, J. J., Shpigel, M., Freeman, S., Zmora, O., Mcleod, S., Bowen, S., ... & Szostek, A. (2003). Physiological ecology and possible control strategy of a toxic marine dinoflagellate, Amphidinium sp., from the benthos of a mariculture pond. *Aquaculture*, 217(1-4), 351-371.

Lee, K. H., Jeong, H. J., Kwon, J. E., Kang, H. C., Kim, J. H., Jang, S. H., ... & Kim, J. S. (2016). Mixotrophic ability of the phototrophic dinoflagellates *Alexandrium andersonii*, *A. affine*, and *A. fraterculus*. *Harmful Algae*, 59, 67-81.

Lee, S. O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., & Ohtake, H. (2000). Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium pseudoalteromonassp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.*, *66*(10), 4334-4339.

Leflaive, J., & Ten-Hage, L. (2009). Chemical interactions in diatoms: role of polyunsaturated aldehydes and precursors. *New Phytologist*, *184*(4), 794-805.

Legendre, L., & Rassoulzadegan, F. (1995). Plankton and nutrient dynamics in marine waters. *Ophelia*, 41(1), Legrand, C., & Carlsson, P. (1998). Uptake of high molecular weight dextran by the dinoflagellate *Alexandrium* catenella. Aquatic microbial ecology, 16(1), 81-86.

Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., & Graneli, E. (2003). Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406-419.

Lei, X., Li, D., Li, Y., Chen, Z., Chen, Y., Cai, G., ... & Zheng, T. (2015). Comprehensive insights into the response of Alexandrium tamarense to algicidal component secreted by a marine bacterium. *Frontiers in microbiology*, *6*, 7.

Leisinger, T., & Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews*, *43*(3), 422.

Lelong, A., Haberkorn, H., Le Goïc, N., Hégaret, H., & Soudant, P. (2011). A new insight into allelopathic effects of Alexandrium minutum on photosynthesis and respiration of the diatom Chaetoceros neogracile revealed by photosynthetic-performance analysis and flow cytometry. *Microbial ecology*, *62*(4), 919-930.

Lelong, A., Haberkorn, H., Le Goïc, N., Hégaret, H., & Soudant, P. (2011). A new insight into allelopathic effects of Alexandrium minutum on photosynthesis and respiration of the diatom Chaetoceros neogracile revealed by photosynthetic-performance analysis and flow cytometry. *Microbial ecology*, *62*(4), 919-930.

Lemaire, C., Wollman, F. A., & Bennoun, P. (1988). Restoration of phototrophic growth in a mutant of Chlamydomonas reinhardtii in which the chloroplast atpB gene of the ATP synthase has a deletion: an example of mitochondria-dependent photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(5), 1344-1348.

Lepetit, B., Gélin, G., Lepetit, M., Sturm, S., Vugrinec, S., Rogato, A., ... & Lavaud, J. (2017). The diatom P haeodactylum tricornutum adjusts nonphotochemical fluorescence quenching capacity in response to dynamic light via fine-tuned L hcx and xanthophyll cycle pigment synthesis. *New Phytologist*, *214*(1), 205-218.

Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J., & Rahme, L. G. (2004). Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by Pseudomonas aeruginosa. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(6), 862-869.

Lewis, R. J., & Sellin, M. (1992). Multiple ciguatoxins in the flesh of fish. Toxicon, 30(8), 915-919.

Li, H., Xie, P., Zhang, D., & Chen, J. (2009). The first study on the effects of microcystin-RR on gene expression profiles of antioxidant enzymes and heat shock protein-70 in *Synechocystis sp.* PCC6803. *Toxicon*, 53(6), 595-601.

Li, Y., Lei, X., Zhu, H., Zhang, H., Guan, C., Chen, Z., ... & Zheng, T. (2016). Chitinase producing bacteria with direct algicidal activity on marine diatoms. *Scientific reports*, *6*, 21984.

Liaud, M. F., Lichtl, C., Apt, K., Martin, W., & Cerff, R. (2000). Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(2), 213-223.

**Lightbown, J. W., & Jackson, F. L.** (1956). Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. *Biochemical Journal*, 63(1), 130.

Lilly, E. L., Halanych, K. M., & Anderson, D. M. (2005). Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful Algae*, 4(6), 1004-1020.

Lilly, E. L., Kulis, D. M., Gentien, P., & Anderson, D. M. (2002). Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research*, 24(5), 443-452.

Lilly, E. L., Kulis, D. M., Gentien, P., & Anderson, D. M. (2002). Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research*, 24(5), 443-452.

Lim, A. S., Jeong, H. J., Jang, T. Y., Jang, S. H., & Franks, P. J. (2014). Inhibition of growth rate and swimming speed of the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* by diatoms: implications for red tide formation. *Harmful Algae*, *37*, 53-61.

Lim, P. T., & Ogata, T. (2005). Salinity effect on growth and toxin production of four tropical Alexandrium species (Dinophyceae). *Toxicon*, 45(6), 699-710.

Lim, P. T., Leaw, C. P., Usup, G., Kobiyama, A., Koike, K., & Ogata, T. (2006). Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: Alexandrium tamiyavanichii and Alexandrium minutum (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, *42*(4), 786-799.

Lim, P. T., Usup, G., Leaw, C. P., & Ogata, T. (2005). First report of Alexandrium taylori and Alexandrium peruvianum (Dinophyceae) in Malaysia waters. *Harmful Algae*, 4(2), 391-400.

Llewellyn, L. E. (2006). Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural product reports*, 23(2), 200-222.

Llewellyn, L., Negri, A., & Robertson, A. (2006). Paralytic shellfish toxins in tropical oceans. *Toxin Reviews*, 25(2), 159-196.

Lohr, M., & Wilhelm, C. (1999). Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8784-8789.

Lohr, M., & Wilhelm, C. (1999). Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8784-8789.

Long, M., Holland, A., Planquette, H., Santana, D. G., Whitby, H., Soudant, P.& Jolley, D. F. (2019). Effects of copper on the dinoflagellate Alexandrium minutum and its allelochemical potency. *Aquatic Toxicology*, *210*, 251-261.

Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Lambert, C., Le Grand, F., Sarthou, G., ... & Hégaret, H. (2018). A rapid quantitative fluorescence-based bioassay to study allelochemical interactions from Alexandrium minutum. *Environmental Pollution*, 242, 1598-1605. (a)

Long, M., Tallec, K., Soudant, P., Le Grand, F., Donval, A., Lambert, C., ... & Hégaret, H. (2018). Allelochemicals from Alexandrium minutum induce rapid inhibition of metabolism and modify the membranes from Chaetoceros muelleri. *Algal research*, *35*, 508-518. (b)

Long, R. A., Qureshi, A., Faulkner, D. J., & Azam, F. (2003). 2-n-Pentyl-4-quinolinol produced by a marine Alteromonas sp. and its potential ecological and biogeochemical roles. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 568-576.

Lovejoy, C., Bowman, J. P., & Hallegraeff, G. M. (1998). Algicidal effects of a novel marinepseudoalteromonas isolate (Class Proteobacteria, Gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the generachattonella, gymnodinium, andheterosigma. *Appl. Environ. Microbiol.*, *64*(8), 2806-2813.

Lugliè, A., Giacobbe, M. G., Sannio, A., Fiocca, F., & Sechi, N. (2003). First record of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech (Dinophyta), a potential producer of paralytic shellfish poisoning. *Italian waters (Sardinia, Tyrrhenian Sea). Bocconea, 16*(2), 1045-1051.

Lundholm, N., Hansen, P. J., & Kotaki, Y. (2005). Lack of allelopathic effects of the domoic acid-producing marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Marine Ecology Progress Series*, 288, 21-33.

Lyczkowski, E. R., & Karp-Boss, L. (2014). Allelopathic effects of A lexandrium fundyense (D inophyceae) on T halassiosira cf. gravida (B acillariophyceae): a matter of size. *Journal of phycology*, *50*(2), 376-387.

Lyczkowski, E. R., & Karp-Boss, L. (2014). Allelopathic effects of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) on Thalassiosira cf. gravida (Bacillariophyceae): a matter of size. *Journal of phycology*, *50*(2), 376-387

Ma, H., Krock, B., Tillmann, U., & Cembella, A. (2009). Preliminary characterization of extracellular allelochemicals of the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* using a Rhodomonas salina bioassay. *Marine drugs*, 7(4), 497-522.

Ma, H., Krock, B., Tillmann, U., Bickmeyer, U., Graeve, M., & Cembella, A. (2011). Mode of action of membrane-disruptive lytic compounds from the marine dinoflagellate Alexandrium tamarense. *Toxicon*, 58(3), 247-258.

Ma, H., Krock, B., Tillmann, U., Bickmeyer, U., Graeve, M., & Cembella, A. (2011). Mode of action of membrane-disruptive lytic compounds from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon*, 58(3), 247-258.

**Maheswari**, U. (2008). A model for carbohydrate metabolism in the diatom Phaeodactylum tricornutum deduced from comparative whole genome analysis. *PloS one*, 3(1).

Margalef, R. (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta, 1,* 493–509.

Martin, G. W., & Nelson, T. C. (1929). Swarming of dinoflagellates in Delaware Bay, New Jersey. *Botanical Gazette*, 88(2), 218-224.

Martínez, K. A., Lauritano, C., Druka, D., Romano, G., Grohmann, T., Jaspars, M., ... & Ianora, A. (2019). Amphidinol 22, a New Cytotoxic and Antifungal Amphidinol from the Dinoflagellate Amphidinium carterae. *Marine drugs*, 17(7), 385.

Martínez, K. A., Lauritano, C., Druka, D., Romano, G., Grohmann, T., Jaspars, M., ... & Ianora, A. (2019). Amphidinol 22, a New Cytotoxic and Antifungal Amphidinol from the Dinoflagellate Amphidinium carterae. *Marine drugs*, 17(7), 385.

Mashburn-Warren, L., Howe, J., Brandenburg, K., & Whiteley, M. (2009). Structural requirements of the Pseudomonas quinolone signal for membrane vesicle stimulation. *Journal of bacteriology*, *191*(10), 3411-3414.

Mason, C. P., Edwards, K. R., Carlson, R. E., Pignatello, J., Gleason, F. K., & Wood, J. M. (1982). Isolation of chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. *Science*, *215*(4531), 400-402.

Matsumoto, T., Shinozaki, F., Chikuni, T., Yabuki, A., Takishita, K., Kawachi, M., et al. (2011). Greencolored plastids in the dinoflagellate genus Lepidodinium are of core chlorophyte origin. *Protist, 162, 268–276.* Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1788*(8), 1687-1692.

Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, *51*(345), 659-668.

**Maxwell, P.C., & Biggins, J.** (1976). Role of cyclic electron transport in photosynthesis as measured by the photoinduced turnover of  $P_{700}$  in vivo. *Biochemistry, 15*(18), 3975-3981.

McDonald, A. E., Ivanov, A. G., Bode, R., Maxwell, D. P., Rodermel, S. R., & Hüner, N. P. (2011). Flexibility in photosynthetic electron transport: the physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 954-967.

McKnight, S. L., Iglewski, B. H., & Pesci, E. C. (2000). The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of bacteriology*, *182*(10), 2702-2708.

**McLaughlin, J. J. A., & Provasoli, L.** (1957, January). NUTRITIONAL REQUIREMENTS AND TOXICITY OF 2 MARINE AMPHIDINIUM. In *Journal of Protozoology* (Vol. 4, pp. 7-7). 810 E 10TH ST, LAWRENCE, KS 66044: SOC PROTOZOOLOGISTS.

Mehler, A. H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33(1), 65-77.

Meinecke, L., Alawady, A., Schroda, M., Willows, R., Kobayashi, M. C., Niyogi, K. K., ... & Beck, C. F. (2010). Chlorophyll-deficient mutants of Chlamydomonas reinhardtii that accumulate magnesium protoporphyrin IX. *Plant molecular biology*, *72*(6), 643-658.

Meng, Y., Van Wagoner, R. M., Misner, I., Tomas, C., & Wright, J. L. (2010). Structure and biosynthesis of amphidinol 17, a hemolytic compound from Amphidinium carterae. *Journal of natural products*, 73(3), 409-415. Meng, Y., Van Wagoner, R. M., Misner, I., Tomas, C., & Wright, J. L. (2010). Structure and biosynthesis of

amphidinol 17, a hemolytic compound from Amphidinium carterae. Journal of natural products, 73(3), 409-415.

Meyer zu Tittingdorf, J. M., Rexroth, S., Schäfer, E., Schlichting, R., Giersch, C., Dencher, N. A., & Seelert, H. (2004). The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1659*(1), 92-99.

Milici, M., Deng, Z. L., Tomasch, J., Decelle, J., Wos-Oxley, M. L., Wang, H., ... & Wurst, M. (2016). Cooccurrence analysis of microbial taxa in the Atlantic Ocean reveals high connectivity in the free-living bacterioplankton. *Frontiers in microbiology*, 7, 649.

Minagawa, J., & Takahashi, Y. (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its lightharvesting proteins. *Photosynthesis research*, 82(3), 241-263.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, *191*(4784), 144-148.

Mitchell, P. (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. FEBS letters, 59(2), 137-139.

Moestrup, Ø., & Calado, A. J. (2018). Class DINOPHYCEAE. In Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 6-Freshwater Flora of Central Europe, Vol. 6: Dinophyceae (pp. 57-451). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

**Møgelhøj, M. K., Hansen, P. J., Henriksen, P., & Lundholm, N.** (2006). High pH and not allelopathy may be responsible for negative effects of *Nodularia spumigena* on other algae. *Aquatic Microbial Ecology, 43*(1), 43-54. **Molgó, J., Girard, E., & Benoit, E.** (2007). Cyclic imines: an insight into this emerging group of bioactive marine toxins. *Phycotoxins, 18,* 319-335.

Molisch, H. (2001). The influence of one plant on another: allelopathy. Scientific Publishers (India).

Moore, R. E., Cheuk, C., & Patterson, G. M. (1984). Hapalindoles: new alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*. *Journal of the American Chemical Society*, *106*(21), 6456-6457.

Morsy, N., Houdai, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., Adachi, S., Oishi, T., ... & Fujita, T. (2006). Structures of new amphidinols with truncated polyhydroxyl chain and their membrane-permeabilizing activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(19), 6548-6554.

Morsy, N., Konoki, K., Houdai, T., Matsumori, N., Oishi, T., Murata, M., & Aimoto, S. (2008). Roles of integral protein in membrane permeabilization by amphidinols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(6), 1453-1459.

Morsy, N., Konoki, K., Houdai, T., Matsumori, N., Oishi, T., Murata, M., & Aimoto, S. (2008). Roles of integral protein in membrane permeabilization by amphidinols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(6), 1453-1459.

Morsy, N., Matsuoka, S., Houdai, T., Matsumori, N., Adachi, S., Murata, M., ... & Fujita, T. (2005). Isolation and structure elucidation of a new amphidinol with a truncated polyhydroxyl chain from Amphidinium klebsii. *Tetrahedron*, *61*(36), 8606-8610.

**Munday, R.** (2008). Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection,* 581-594.

Murakami, M., Makabe, K., Yamaguchi, K., Konosu, S., & Wälchli, M. R. (1988). Goniodomin A, a novel polyether macrolide from the dinoflagellate *Goniodoma pseudogoniaulax*. *Tetrahedron letters*, *29*(10), 1149-1152.

Murik, O., Tirichine, L., Prihoda, J., Thomas, Y., Araújo, W. L., Allen, A. E., ... & Bowler, C. (2019). Downregulation of mitochondrial alternative oxidase affects chloroplast function, redox status and stress response in a marine diatom. *New Phytologist, 221*(3), 1303-1316.

Murray, S. A., Kohli, G. S., Farrell, H., Spiers, Z. B., Place, A. R., Dorantes-Aranda, J. J., & Ruszczyk, J. (2015). A fish kill associated with a bloom of Amphidinium carterae in a coastal lagoon in Sydney, Australia. *Harmful Algae*, 49, 19-28.

Murray, S., & Patterson, D. J. (2002). The benthic dinoflagellate genus Amphidinium in south-eastern Australian waters, including three new species. *European Journal of Phycology*, *37*(2), 279-298.

**Murray, S., Flø Jørgensen, M., Daugbjerg, N., & Rhodes, L.** (2004). AMPHIDINIUM REVISITED. II. RESOLVING SPECIES BOUNDARIES IN THE AMPHIDINIUM OPERCULATUM SPECIES COMPLEX (DINOPHYCEAE), INCLUDING THE DESCRIPTIONS OF AMPHIDINIUM TRULLA SP. NOV. AND AMPHIDINIUM GIBBOSUM. COMB. NOV. 1. *Journal of Phycology*, *40*(2), 366-382.

Naar, J. P., Flewelling, L. J., Lenzi, A., Abbott, J. P., Granholm, A., Jacocks, H. M., ... & Wolny, J. (2007). Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon*, 50(5), 707-723.

Nagao, R., Kato, K., Suzuki, T., Ifuku, K., Uchiyama, I., Kashino, Y., ... & Akita, F. (2019). Structural basis for energy harvesting and dissipation in a diatom PSII–FCPII supercomplex. *Nature plants*, *5*(8), 890-901.

Naviner, M., Bergé, J. P., Durand, P., & Le Bris, H. (1999). Antibacterial activity of the marine diatom Skeletonema costatum against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174(1-2), 15-24.

Nawrocki, W., Bailleul, B., Picot, D., Cardol, P., Rappaport, F., Wollman, F.A. & Joliot, P. (2019). The mechanism of cyclic electron flow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1860(5), 433-438.

Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), 496.

**Needham, D. M., & Fuhrman, J. A.** (2016). Pronounced daily succession of phytoplankton, archaea and bacteria following a spring bloom. *Nature microbiology*, *l*(4), 1-7.

Nixon, P. J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., & Komenda, J. (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of botany*, *106*(1), 1-16.

Not, F., Siano, R., Kooistra, W. H. C. F., Simon, N., Vaulot, D., & Probert, I. (2012). Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. *Advances in Botanical Research*, 64, 1–53.

Nugent, J. H. (1996). Oxygenic photosynthesis: electron transfer in photosystem I and photosystem II. *European journal of biochemistry*, 237(3), 519-531.

Nuzzo, G., Cutignano, A., Sardo, A., & Fontana, A. (2014). Antifungal amphidinol 18 and its 7-sulfate derivative from the marine dinoflagellate Amphidinium carterae. *Journal of natural products*, 77(6), 1524-1527.

**Oberbeckmann, S., Kreikemeyer, B., & Labrenz, M.** (2018). Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Frontiers in microbiology, 8,* 2709.

**Oberbeckmann, S., Löder, M. G., & Labrenz, M.** (2015). Marine microplastic-associated biofilms-a review. *Environmental Chemistry*, *12*(5), 551-562

**Ochiai, K., Kuppusamy, S., Yasui, Y., Harada, K., Gupta, N. R., Takahashi, Y., ... & Hayashi, Y.** (2016). Total Synthesis of the 7, 10-Epimer of the Proposed Structure of Amphidinolide N, Part II: Synthesis of C17–C29 Subunit and Completion of the Synthesis. *Chemistry–A European Journal*, *22*(10), 3287-3291.

Odum, E. P. (1984). The mesocosm. *BioScience*, 34(9), 558-562.

**Oettmeier, W., Dostatni, R., Majewski, C., Höfle, G., Fecker, T., Kunze, B., & Reichenbach, H.** (1990). The Aurachins, Naturally Occurring Inhibitors of Photosynthetic Electron Flow through Photosystem II and the Cytochrome b6/f-Complex. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *45*(5), 322-328

**Oettmeier, W., Godde, D., Kunze, B., & Höfle, G.** (1985). Stigmatellin. A dual type inhibitor of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 807(2), 216-219.

Ogata, T., & Kodama, M. (1986). Ichthyotoxicity found in cultured media of *Protogonyaulax spp. Marine Biology*, 92(1), 31-34.

**Ogren, W. L., & Bowes, G.** (1971). Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration. *Nature New Biology*, *230*(13), 159-160.

**Ohwada, K.** (1973). Seasonal cycles of vitamin B12, thiamine and biotin in Lake Sagami. Patterns of their distribution and ecological significance. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, *58*(6), 851-871.

**Ohwada, K., & Taga, N.** (1972). Distribution and seasonal variation of vitamin B12, thiamine and biotin in the sea. *Marine Chemistry*, *1*(1), 61-73.

Olaizola, M., La Roche, J., Kolber, Z., & Falkowski, P. G. (1994). Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynthesis Research*, 41(2), 357-370.

Olaizola, M., La Roche, J., Kolber, Z., & Falkowski, P. G. (1994). Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynthesis Research*, 41(2), 357-370.

Olaizola, M., La Roche, J., Kolber, Z., & Falkowski, P. G. (1994). Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynthesis Research*, 41(2), 357-370.

**Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G., & Sauriau, P. G.** (2003). Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial ecology*, 45(3), 237-251.

**Owens, T. G.** (1986). Light-harvesting function in the diatom Phaeodactylum tricornutum: II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiology*, *80*(3), 739-746.

Padmakumar, K. B., Menon, N. R., & Sanjeevan, V. N. (2012). Is occurrence of harmful algal blooms in the exclusive economic zone of India on the rise? *International Journal of Oceanography*, 2012.

**Paerl, H. W., & Scott, J. T.** (2010). Throwing fuel on the fire: synergistic effects of excessive nitrogen inputs and global warming on harmful algal blooms. *Environmental Science & Technology*, 44(20), 7756-7758.

**Pagliara, P., & Caroppo, C.** (2012). Toxicity assessment of Amphidinium carterae, Coolia cfr. monotis and Ostreopsis cfr. ovata (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon*, 60(6), 1203-1214.

**Papageorgiou, G. C.** (Ed.). (2007). *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (Vol. 19). Springer Science & Business Media.

Patil, J. S., & Anil, A. C. (2005). Biofilm diatom community structure: influence of temporal and substratum variability. *Biofouling*, *21*(3-4), 189-206.

**Paul, C., & Pohnert, G.** (2011). Interactions of the algicidal bacterium Kordia algicida with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PloS one*, *6*(6), e21032.

**Paul, C., & Pohnert, G.** (2013). Induction of protease release of the resistant diatom Chaetoceros didymus in response to lytic enzymes from an algicidal bacterium. *PLoS One*, 8(3), e57577.

Paul, G. K., Matsumori, N., Murata, M., & Tachibana, K. (1995). Isolation and chemical structure of amphidinol 2, a potent hemolytic compound from marine dinoflagellate Amphidinium klebsii. *Tetrahedron Letters*, *36*(35), 6279-6282. (a)

Paul, G. K., Matsumori, N., Konoki, K., Murata, M., & Tachibana, K. (1995). Chemical structures of amphidinols 5 and 6 isolated from marine dinoflagellate Amphidinium klebsii and their cholesterol-dependent membrane disruption. *Journal of Marine Biotechnology*, *5*, 124-128. (b)

Paul, G. K., Matsumori, N., Konoki, K., Sasaki, M., Murata, M., & Tachibana, K. (1996). Structure and membrane perturbation of amphidinol 3: strong antifungal metabolites produced by dinoflagellate, Amphidinium klebsii. In *Harmful and Toxic Algal Blooms* (pp. 503-506). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Paul, J. S., & Volcani, B. E. (1976). Photorespiration in diatoms. Archives of microbiology, 110(2-3), 247-252.

Peers, G., & Price, N. M. (2006). Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. *Nature*, 441(7091), 341-344.

Peltier, G., Tolleter, D., Billon, E., & Cournac, L. (2010). Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynthesis Research*, *106*(1-2), 19-31.

**Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H.** (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(20), 11229-11234.

Pessarakli, M. (2016). Handbook of photosynthesis. CRC press.

Petroutsos, D., Kuntz, M. & Finazzi, G. (2016). The water to water cycles in microalgae. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1354-1363.

Pfiester, L. A. (1984). Sexual reproduction. Dinoflagellates, 181-199.

Pfiester, L. A., Anderson, D. M., & Taylor, F. (1987). The biology of dinoflagellates. London: Oxford.

**Pflugmacher, S.** (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology: An International Journal*, *17*(4), 407-413.

Pi, X., Zhao, S., Wang, W., Liu, D., Xu, C., Han, G., ... & Shen, J. R. (2019). The pigment-protein network of a diatom photosystem II–light-harvesting antenna supercomplex. *Science*, *365*(6452), eaax4406.

**Pietsch, J., Bornmann, K., & Schmidt, W.** (2002). Relevance of intra-and extracellular cyanotoxins for drinking water treatment. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, *30*(1), 7-15.

Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S., & Vasconcelos, V. (2013). Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia*, 705(1), 27-42.

**Pistocchi, R., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., ... & Milandri, A.** (2012). Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic Sea—15 years of studies on cultured species. *Marine drugs*, *10*(1), 140-162.

Pitcher, G. C., Cembella, A. D., Joyce, L. B., Larsen, J., Probyn, T. A., & Sebastián, C. R. (2007). The dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Cape Town harbour (South Africa): Bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae*, 6(6), 823-836.

Place, A. R., Bowers, H. A., Bachvaroff, T. R., Adolf, J. E., Deeds, J. R., & Sheng, J. (2012). Karlodinium veneficum—The little dinoflagellate with a big bite. *Harmful Algae, 14,* 179-195.

Poli, M. A., Musser, S. M., Dickey, R. W., Eilers, P. P., & Hall, S. (2000). Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: a case study from Florida. *Toxicon*, 38(7), 981-993.

Pomeroy, L. R., leB. WILLIAMS, P. J., Azam, F., & Hobbie, J. E. (2007). The microbial loop. Oceanography, 20(2), 28-33.

Pomeroy, L. R., Tiaskin, H. H., & Ragotzkie, R. A. (1956). Observations on Dinoflagellate Blooms 1. *Limnology and Oceanography*, 1(1), 54-60.

**Poole, A. M., & Neumann, N.** (2011). Reconciling an archaeal origin of eukaryotes with engulfment: A biologically plausible update of the Eocyte hypothesis. *Research in Microbiology, 162,* 71–76.

Poulin, R. X., Hogan, S., Poulson-Ellestad, K. L., Brown, E., Fernández, F. M., & Kubanek, J. (2018). Karenia brevis allelopathy compromises the lipidome, membrane integrity, and photosynthesis of competitors. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

Poulin, R. X., Hogan, S., Poulson-Ellestad, K. L., Brown, E., Fernández, F. M., & Kubanek, J. (2018). Karenia brevis allelopathy compromises the lipidome, membrane integrity, and photosynthesis of competitors. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

**Poulson-Ellestad, K. L., Jones, C. M., Roy, J., Viant, M. R., Fernández, F. M., Kubanek, J., & Nunn, B. L.** (2014). Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. *Proceedings of the national academy of sciences, 111*(24), 9009-9014.

**Poulson-Ellestad, K. L., Jones, C. M., Roy, J., Viant, M. R., Fernández, F. M., Kubanek, J., & Nunn, B. L.** (2014). Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. *Proceedings of the national academy of sciences*, *111*(24), 9009-9014.

**Prince, E. K., Myers, T. L., & Kubanek, J.** (2008). Effects of harmful algal blooms on competitors: allelopathic mechanisms of the red tide dinoflagellate Karenia brevis. *Limnology and Oceanography*, *53*(2), 531-541.

Prince, E. K., Myers, T. L., & Kubanek, J. (2008). Effects of harmful algal blooms on competitors: allelopathic mechanisms of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Limnology and Oceanography*, *53*(2), 531-541.

Prince, E. K., Poulson, K. L., Myers, T. L., Sieg, R. D., & Kubanek, J. (2010). Characterization of allelopathic compounds from the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae*, *10*(1), 39-48.

**Probert, I., Lewis, J., & Denn, E. L.** (2002). Morphological details of the life history of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Cryptogamie algologie, 23*, 343-355.

**Pyszniak, A. M., & Gibbs, S. P.** (1992). Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthinchlorophylla/c light-harvesting complex in the diatomPhaeodactylum tricornutum. *Protoplasma*, *166*(3-4), 208-217.

Qi, X. M., Yu, B., Huang, X. C., Guo, Y. W., Zhai, Q., & Jin, R. (2007). The cytotoxicity of lingshuiol: A comparative study with amphidinol 2 on membrane permeabilizing activities. *Toxicon*, 50(2), 278-282.

Quilliam, M. A. (1999). Phycotoxins. Journal of aoac international, 82(3), 773-781.

**Radwan, S. S., Al-Hasan, R. H., Salamah, S., & Al-Dabbous, S.** (2002). Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *International biodeterioration & biodegradation, 50*(1), 55-59.

Rasmussen, S. A., Andersen, A. J. C., Andersen, N. G., Nielsen, K. F., Hansen, P. J., & Larsen, T. O. (2016). Chemical diversity, origin, and analysis of phycotoxins. *Journal of natural products*, *79*(3), 662-673.

Reil, E., Höfle, G., Draber, W., & Oettmeier, W. (1997). Quinolones and their N-oxides as inhibitors of mitochondrial complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1318(1-2), 291-298.

**Reil, E., Höfle, G., Draber, W., & Oettmeier, W.** (2001). Quinolones and their N-oxides as inhibitors of photosystem II and the cytochrome b6/f-complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1506(2), 127-132.

**Rein, K. S., & Borrone, J.** (1999). Polyketides from dinoflagellates: origins, pharmacology and biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *124*(2), 117-131

**Rengefors, K., & Legrand, C.** (2001). Toxicity *in Peridinium aciculiferum*—an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? *Limnology and Oceanography*, *46*(8), 1990-1997.

**Ribalet, F., Berges, J. A., Ianora, A., & Casotti, R.** (2007). Growth inhibition of cultured marine phytoplankton by toxic algal-derived polyunsaturated aldehydes. *Aquatic Toxicology*, 85(3), 219-227.

Rice, E. L. (1984). Allelopathy 2nd Ed. Acad. Press. Inc. Orlando, Florida, 422.

**Richardson, K.** (1997). Harmful or exceptional phytoplankton blooms in the marine ecosystem. In *Advances in marine biology* (Vol. 31, pp. 301-385). Academic Press.

**Rival, N.** (2012). Vers la synthèse totale de l'amphidinol 3: contrôle de la stéréoséquence C20-C27 (Doctoral dissertation university ?).

Roach, J. S., LeBlanc, P., Lewis, N. I., Munday, R., Quilliam, M. A., & MacKinnon, S. L. (2009). Characterization of a dispiroketal spirolide subclass from Alexandrium ostenfeldii. *Journal of natural products*, 72(7), 1237-1240.

Rodriguez .,2018 Marea roja de Alexandrium minutum en Galicia (II) FItopassion El mundo las microalgas

Roncalli, V., Turner, J. T., Kulis, D., Anderson, D. M., & Lenz, P. H. (2016). The effect of the toxic dinoflagellate Alexandrium fundyense on the fitness of the calanoid copepod Calanus finmarchicus. *Harmful Algae*, *51*, 56-66.

Rooney-Varga, J. N., Giewat, M. W., Savin, M. C., Sood, S., LeGresley, M., & Martin, J. L. (2005). Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial ecology*, 49(1), 163-175.

Ruban, A., Lavaud, J., Rousseau, B., Guglielmi, G., Horton, P., & Etienne, A. L. (2004). The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynthesis Research*, *82*(2), 165. Ryther, J. H., & Guillard, R. R. L. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: II. Use of Cyclotella nana Hustedt for assays of vitamin B12 in sea water. *Canadian Journal of Microbiology*, *8*(4), 437-445.

**Rzodkiewicz, L.** (2017). Anatoxin-a Fails to Show Allelopathic Activity in the Presence of Cyanobacteria or Green Algae.

**Rzymski, P., & Poniedziałek, B.** (2014). In search of environmental role of cylindrospermopsin: a review on global distribution and ecology of its producers. *Water research*, *66*, 320-337.

Saburova, M., Al-Yamani, F., & Polikarpov, I. (2009). Biodiversity of free-living flagellates in Kuwait's intertidal sediments. *BioRisk*, *3*, 97.

Sacksteder, C. A., Kanazawa, A., Jacoby, M. E., & Kramer, D. M. (2000). The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: a proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(26), 14283-14288.

Sakata, T., Yoshikawa, T., & Nishitarumizu, S. (2011). Algicidal activity and identification of an algicidal substance produced by marine Pseudomonas sp. C55a-2. *Fisheries Science*, 77(3), 397.

Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P. G., Kiefer, D. A., Legendre, L., & Takahashi, M. (1997). Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research*, 19(11), 1637-1670.

Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., & Briand, J. F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental microbiology*, 15(11), 2879-2893.

Sampayo, M. D. M. (1985). Encystment and excystment of a Portuguese isolate of Amphidinium carterae in culture. *Toxic Dinoflagellates, (Eds. DA Anderson, AW White and DG Baden). Elsevier Science*.

Santiago Fr. & Sanchez, F. J. (1979). bloom of Amphidinium sp. in the Ria De Vigo (NW of Spain). Developments in marine biology

Sapp, M., Schwaderer, A. S., Wiltshire, K. H., Hoppe, H. G., Gerdts, G., & Wichels, A. (2007). Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial ecology*, 53(4), 683-699. (a)

Sapp, M., Wichels, A., & Gerdts, G. (2007). Impacts of cultivation of marine diatoms on the associated bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(9), 3117-3120. (b)

Sapp, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H., & Gerdts, G. (2007). Bacterial community dynamics during the winterspring transition in the North Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 622-637. (c)

Satake, M., Cornelio, K., Hanashima, S., Malabed, R., Murata, M., Matsumori, N., ... & Kim, C. H. (2017). Structures of the Largest Amphidinol Homologues from the Dinoflagellate Amphidinium carterae and Structure– Activity Relationships. *Journal of natural products*, 80(11), 2883-2888.

Satake, M., Honma, D., Watanabe, R., & Oshima, Y. (2019). Alexandrolide, a diatom growth inhibitor isolated from the dinoflagellate Alexandrium catenella. *Tetrahedron Letters*, 60(19), 1341-1344.

Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Fujita, T., & Naoki, H. (1991). Amphidinol, a polyhydroxy-polyene antifungal agent with an unprecedented structure, from a marine dinoflagellate, Amphidinium klebsii. *Journal of the American Chemical Society*, 113(26), 9859-9861.

Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Nagai, H.; Naoki, H. 32nd symposium on the chemistry of natural products 1991 (AM1) A.K

Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H., & Muyzer, G. (2002). Genetic diversity of 'satellite'bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(1), 25-35.

Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. Physiologia plantarum, 120(1), 21-26.

Schlegel, I., Doan, N. T., de Chazal, N., & Smith, G. D. (1998). Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, *10*(5), 471.

Schmidt, L. E., & Hansen, P. J. (2001). Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis:* effect of cell concentration, growth phase and pH. *Marine ecology progress series*, *216*, 67-81.

Schnepf, E., & ElbräChter, M. (1988). Cryptophycean-like double membrane-bound plastid chloroplast in the dinoflagellate, Dinophysis Ehrenb.: Evolutionary, phylogenetic and toxicological implications. *Botanica Acta, 101,* 196–203.

Schnepf, E., & ElbräChter, M. (1999). Dinophyte chloroplasts and phylogeny-A review. *Grana*, *38*(2-3), 81-97. Schoefs, B., & Franck, F. (2003). Protochlorophyllide Reduction: Mechanisms and Evolution¶. *Photochemistry and Photobiology*, *78*(6), 543-557.

Schütt, F. (1892). Das Pflanzenleben der Hochsee. Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humboldt-Stiftung I (A): 243-314.

Sedmak, B., & Kosi, G. (1998). The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research*, 20(4), 691-708.

Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H., & Müller, D. J. (2000). Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature*, 405(6785), 418-419.

Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kaspar, H. F., & Yasumoto, T. (1995). Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron letters*, *36*(39), 7093-7096.

Seymour, J. R., Amin, S. A., Raina, J. B., & Stocker, R. (2017). Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. *Nature microbiology*, 2(7), 17065.

Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, *66*(4), 236-248.

Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M. A., Cavalier-Smith, T., Nedreklepp, J. M., Klaveness, D., & Jakobsen, K. S. (2006). Combined heat shock protein 90 and ribosomal RNA sequence phylogeny supports multiple replacements of dinoflagellate plastids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *53*, 217–224.

Sharma, G. M., Michaels, L., & Burkholder, P. R. (1968). Goniodomin, a new antibiotic from a dinoflagellate. *The Journal of antibiotics*, 21(11), 659-664.

Shen, Z. W., Fisinger, U., Poulev, A., Eisenreich, W., Werner, I., Pleiner, E., ... & Zenk, M. H. (2001). Tracer studies with 13C-labeled carbohydrates in cultured plant cells. Retrobiosynthetic analysis of chelidonic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, *57*(1), 33-42.

Shikanai, T. (2007). Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annual review of plant biology*, *58*, 199-217.

Sieburth, J. M., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnology and oceanography*, 23(6), 1256-1263.

Simonsen, S. (1995). Haemolytic activity of *Alexandrium tamarense* cells. *Harmful marine algal blooms*, 513-517.

Singh, D. P., Tyagi, M. B., Kumar, A., Thakur, J. K., & Kumar, A. (2001). Antialgal activity of a hepatotoxinproducing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 15-22.

Skerratt, J. H., Bowman, J. P., Hallegraeff, G., James, S., & Nichols, P. D. (2002). Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 244, 1-15.

Skovgaard, A., & Hansen, P. J. (2003). Food uptake in the harmful alga *Prymnesium parvum* mediated by excreted toxins. *Limnology and Oceanography*, 48(3), 1161-1166.

Skovgaard, A., Legrand, C., Hansen, P. J., & Granéli, E. (2003). Effects of nutrient limitation on food uptake in the toxic haptophyte Prymnesium parvum. *Aquatic Microbial Ecology*, *31*(3), 259-265.

**Slobodkin, L. B.** (1989). The null case of the paradox of the plankton. In *Novel Phytoplankton Blooms* (pp. 341-348). Springer, Berlin, Heidelberg.

Smith, S. R., Gillard, J. T., Kustka, A. B., McCrow, J. P., Badger, J. H., Zheng, H., ... & Allen, A. E. (2016). Transcriptional orchestration of the global cellular response of a model pennate diatom to diel light cycling under iron limitation. *PLoS genetics*, *12*(12).

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental pollution*, 100(1-3), 179-196.

Sonoike, K. (2011). Photoinhibition of photosystem I. Physiologia plantarum, 142(1), 56-64.

Srivastava, A., Jüttner, F., & Strasser, R. J. (1998). Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1364*(3), 326-336.

Srivastava, P. N. (1972). Antagonism between two species of blue-green algae. In International Symposium on Taxonomy and Biology of Bluegreen Algae, 1st, Madras, 1970. Papers.

Srivastava, V. C., Manderson, G. J., & Bhamidimarri, R. (1999). Inhibitory metabolites production by the cyanobacterium Fischerella muscicola. *Microbiological research*, 153(4), 309-317.

Stock, F., Syrpas, M., Graff van Creveld, S., Backx, S., Blommaert, L., Dow, L., ... & Sabbe, K. (2019). N-acyl homoserine lactone derived tetramic acids impair photosynthesis in Phaeodactylum tricornutum. *ACS chemical biology*, *14*(2), 198-203.

Stocker, R., & Seymour, J. R. (2012). Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76(4), 792-812.

Stoecker, D., Tillmann, U., & Granéli, E. (2006). Phagotrophy in harmful algae. In *Ecology of harmful algae* (pp. 177-187). Springer, Berlin, Heidelberg.

Strzepek, R. F., & Harrison, P. J. (2004). Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature*, 431(7009), 689-692.

Su, J. Q., Yang, X. R., Zheng, T. L., Tian, Y., Jiao, N. Z., Cai, L. Z., & Hong, H. S. (2007). Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense. *Harmful Algae*, *6*(6), 799-810.

Sugg, L. M., & VanDolah, F. M. (1999). No evidence for an allelopathic role of okadaic acid among ciguateraassociated dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 35(1), 93-103.

Swasono, R. T., Mouri, R., Morsy, N., Matsumori, N., Oishi, T., & Murata, M. (2010). Sterol effect on interaction between amphidinol 3 and liposomal membrane as evidenced by surface plasmon resonance. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(7), 2215-2218.

Szamosvári, D., & Böttcher, T. (2017). An Unsaturated Quinolone N-Oxide of Pseudomonas aeruginosa Modulates Growth and Virulence of Staphylococcus aureus. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(25), 7271-7275.

Szamosvári, D., & Böttcher, T. (2018). 4-Quinolone N-oxides as bacterial weapons. Synlett, 29(05), 542-547.

Taddei, L., Stella, G. R., Rogato, A., Bailleul, B., Fortunato, A. E., Annunziata, R., ... & Jaubert, M. (2016). Multisignal control of expression of the LHCX protein family in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum. *Journal of experimental botany*, 67(13), 3939-3951.

Takahashi, Y., Kubota, T., & Kobayashi, J. I. (2007). Amphidinolactone A, a new 13-membered macrolide from dinoflagellate Amphidinium sp. *Heterocycles*, *72*, 567-572. (a)

Takahashi, Y., Kubota, T., & Kobayashi, J. I. (2007). Amphidinolactone B, a new 26-membered macrolide from dinoflagellate Amphidinium sp. *The Journal of antibiotics*, 60(6), 376. (b)

Takizawa K, Cruz J.A., Kanazawa, A., & Kramer, D.M. (2007). The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1767*(10), 1233-1244.

Tang, Y. Z., Kong, L., & Holmes, M. J. (2007). Dinoflagellate Alexandrium leei (Dinophyceae) from Singapore coastal waters produces a water-soluble ichthyotoxin. *Marine Biology*, *150*(4), 541-549.

**Taylor, D. L.** (1971). On the symbiosis between Amphidinium klebsii [Dinophyceae] and Amphiscolops langerhansi [Turbellaria: Acoela]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51(2), 301-313.

Taylor, F. J. R. (1980). On dinoflagellate evolution. BioSystems, 13(1-2), 65-108.

Taylor, R. L., Caldwell, G. S., Dunstan, H. J., & Bentley, M. G. (2007). Short-term impacts of polyunsaturated aldehyde-producing diatoms on the harpacticoid copepod, Tisbe holothuriae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 341(1), 60-69.

**Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., ... & Weber, M.** (2012). Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, *336*(6081), 608-611.

**Teitelbaum, J. S., Zatorre, R. J., Carpenter, S., Gendron, D., Evans, A. C., Gjedde, A., & Cashman, N. R.** (1990). Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *New England Journal of Medicine*, *322*(25), 1781-1787.

**Tengs, T., Dahlberg, O. J., Shalchian-Tabrizi, K., Klaveness, D., Rudi, K., Delwiche, C. F., et al.** (2000). Phylogenetic analyses indicate that the 19'hexanoyloxy-fucoxanthincontaining dinoflagellates have tertiary plastids of haptophyte origin. *Molecular Biology and Evolution, 17*, 718–729.

**Terao, K., Ito, E., Murakami, M., & Yamaguchi, K.** (1989). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning—III. Morphological changes in the liver and thymus of male ICR mice induced by goniodomin A, isolated from the dinoflagellate Goniodoma pseudogoniaulax. *Toxicon*, 27(2), 269-271.

Ternon, E., Pavaux, A. S., Marro, S., Thomas, O. P., & Lemée, R. (2018). Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata and a co-occurring diatom. *Harmful algae*, 75, 35-44.

Ternon, E., Pavaux, A. S., Marro, S., Thomas, O. P., & Lemée, R. (2018). Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and a co-occurring diatom. *Harmful Algae*, 75, 35-44.

Thamatrakoln, K., Bailleul, B., Brown, C. M., Gorbunov, M. Y., Kustka, A. B., Frada, M., & Bidle, K. D. (2013). Death-specific protein in a marine diatom regulates photosynthetic responses to iron and light availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(50), 20123-20128.

**Thurberg, F. P., & Sasner, J. J.** (1973). Biological activity of a cell extract from the dinoflagellate, Amphidinium carteri. *Chesapeake Science*, *14*(1), 48-51.

**Tillmann, U.** (2003). Kill and eat your predator: a winning strategy of the planktonic flagellate Prymnesium parvum. *Aquatic Microbial Ecology*, 32(1), 73-84.

Tillmann, U. (2004). Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers 1. *Journal of eukaryotic microbiology*, *51*(2), 156-168.

Tillmann, U., & Hansen, P. J. (2009). Allelopathic effects of *Alexandrium tamarense* on other algae: evidence from mixed growth experiments. *Aquatic Microbial Ecology*, 57(1), 101-112.

**Tillmann, U., & Hansen, P. J.** (2009). Allelopathic effects of *Alexandrium tamarense* on other algae: evidence from mixed growth experiments. *Aquatic Microbial Ecology*, 57(1), 101-112.

Tillmann, U., & John, U. (2002). Toxic effects of *Alexandrium spp*. on heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Marine ecology progress series*, 230, 47-58.

Tillmann, U., Alpermann, T. L., da Purificação, R. C., Krock, B., & Cembella, A. (2009). Intra-population clonal variability in allelochemical potency of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 8(5), 759-769.

Tillmann, U., Alpermann, T., John, U., & Cembella, A. (2008). Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate Alexandrium on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful Algae*, 7(1), 52-64.

**Tillmann, U., John, U., & Cembella, A.** (2007). On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *Journal of plankton research*, 29(6), 527-543.

Tillmann, U., Kremp, A., Tahvanainen, P., & Krock, B. (2014). Characterization of spirolide producing Alexandrium ostenfeldii (Dinophyceae) from the western Arctic. *Harmful Algae*, *39*, 259-270.

Todorova, A. K., Jüttner, F., Linden, A., Pluess, T., & von Philipsborn, W. (1995). Nostocyclamide: a new macrocyclic, thiazole-containing allelochemical from *Nostoc sp.* 31 (cyanobacteria). *The Journal of Organic Chemistry*, 60(24), 7891-7895.

**Todorova, A., & Jüttner, F.** (1996). Ecotoxicological analysis of nostocyclamide, a modified cyclic hexapeptide from *Nostoc. Phycologia*, *35*(sup6), 183-188.

**Torgersen, T., Aasen, J., & Aune, T.** (2005). Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (Cancer pagurus) in Norway. *Toxicon*, 46(5), 572-578.

Toth, G. B., Norén, F., Selander, E., & Pavia, H. (2004). Marine dinoflagellates show induced life-history shifts to escape parasite infection in response to water-borne signals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1540), 733-738.

Toth, G. B., Norén, F., Selander, E., & Pavia, H. (2004). Marine dinoflagellates show induced life-history shifts to escape parasite infection in response to water-borne signals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1540), 733-738.

Triki, H. Z., Laabir, M., Moeller, P., Chomérat, N., & Daly-Yahia, O. K. (2016). First report of goniodomin A production by the dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax* developing in southern Mediterranean (Bizerte Lagoon, Tunisia). *Toxicon*, *111*, 91-99.

Tucker, C. J., Fung, I. Y., Keeling, C. D., & Gammon, R. H. (1986). Relationship between atmospheric CO 2 variations and a satellite-derived vegetation index. *Nature*, *319*(6050), 195-199.

Turki, S., Balti, N., & Ben Jannet, H. (2007). Tunisia: First bloom of dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Bizerte Lagoon (northern Tunisia). *Harmful Algae News*, (35), 7-9.

Uchida, T., Toda, S., Matsuyama, Y., Yamaguchi, M., Kotani, Y., & Honjo, T. (1999). Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(2), 285-299.

Uchida, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, Y., & Honjo, T. (1995). The red-tide dinoflagellate *Heterocapsa sp.* kills *Gyrodinium instriatum* by cell contact. *Marine ecology progress series*. *Oldendorf*, *118*(1), 301-303.

**Uitz, J., Claustre, H., Gentili, B., & Stramski, D.** (2010). Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. *Global Biogeochemical Cycles*, *24*(3). Pages?

Ulitzur, S. (1973). The amphiphatic nature of Prymnesium parvum hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 298(3), 673-679.

Van Amerongen, H., & Van Grondelle, R. (2000). Photosynthetic excitons. World Scientific.

Van de Waal, D. B., Tillmann, U., Martens, H., Krock, B., van Scheppingen, Y., & John, U. (2015). Characterization of multiple isolates from an Alexandrium ostenfeldii bloom in The Netherlands. *Harmful Algae*, 49, 94-104.

Van Donk, E. (2007). Chemical information transfer in freshwater plankton. *Ecological Informatics*, 2(2), 112-120.

Van Tol, H. M., Amin, S. A., & Armbrust, E. V. (2017). Ubiquitous marine bacterium inhibits diatom cell division. *The ISME journal*, 11(1), 31-42.

Van Wagoner, R. M., Misner, I., Tomas, C. R., & Wright, J. L. (2011). Occurrence of 12-methylgymnodimine in a spirolide-producing dinoflagellate Alexandrium peruvianum and the biogenetic implications. *Tetrahedron letters*, *52*(33), 4243-4246.

Varco-Merth, B., Fromme, R., Wang, M., & Fromme, P. (2008). Crystallization of the c14-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(7-8), 605-612.

Vaulot, D., Gall, F. L., Marie, D., Guillou, L., & Partensky, F. (2004). The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia*, 79(1-2), 49-70.

Vial, L., Lépine, F., Milot, S., Groleau, M. C., Dekimpe, V., Woods, D. E., & Déziel, E. (2008). Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis, and B. ambifaria produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of bacteriology*, *190*(15), 5339-5352.

Vila, M., Camp, J., Garcés, E., Masó, M., & Delgado, M. (2001). High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *Journal of plankton research*, 23(5), 497-514.

Vila, M., Garcés, E., Masó, M., & Camp, J. (2001). Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Marine Ecology Progress Series*, 222, 73-83.

Vila, M., Giacobbe, M. G., Masó, M., Gangemi, E., Penna, A., Sampedro, N. & Galluzzi, L. (2005). A comparative study on recurrent blooms of Alexandrium minutum in two Mediterranean coastal areas. *Harmful algae*, 4(4), 673-695.

**Volk, R. B.** (2005). Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology*, *17*(4), 339-347.

Volk, R. B. (2006). Antialgal activity of several cyanobacterial exometabolites. *Journal of applied phycology*, 18(2), 145-151.

Volk, R. B., & Furkert, F. H. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*, *161*(2), 180-186.

Volk, R. B., Girreser, U., Al-Refai, M., & Laatsch, H. (2009). Bromoanaindolone, a novel antimicrobial exometabolite from the cyanobacterium *Anabaena constricta*. *Natural product research*, 23(7), 607-612.

von Stosch, H. V. (1973). Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymondinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *British Phycological Journal*, 8(2), 105-134.

Wang, W., Yu, L. J., Xu, C., Tomizaki, T., Zhao, S., Umena, Y., ... & Han, G. (2019). Structural basis for bluegreen light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science*, *363*(6427), eaav0365.

Wardiatno, Y., Damar, A., & Sumartono, B. (2013). A short review on the recent problem of red tide in Jakarta Bay: effect of red tide on fish and human. *Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*, 11(1), 67-71.

Waring, J., Klenell, M., Bechtold, U., Underwood, G. J., & Baker, N. R. (2010). Light-induced responses of oxygen photoreduction, reactive oxygen species production and scavenging in two diatom species. *Journal of phycology*, 46(6), 1206-1217.

Washida, K., Koyama, T., Yamada, K., Kita, M., & Uemura, D. (2006). Karatungiols A and B, two novel antimicrobial polyol compounds, from the symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium sp. *Tetrahedron letters*, 47(15), 2521-2525.

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21, 319-346.

Weber, R. J., Selander, E., Sommer, U., & Viant, M. R. (2013). A stable-isotope mass spectrometry-based metabolic footprinting approach to analyze exudates from phytoplankton. *Marine drugs*, *11*(11), 4158-4175.

Weissbach, A., Tillmann, U., & Legrand, C. (2010). Allelopathic potential of the dinoflagellate Alexandrium tamarense on marine microbial communities. *Harmful Algae*, 10(1), 9-18

Weissbach, A., Tillmann, U., & Legrand, C. (2010). Allelopathic potential of the dinoflagellate Alexandrium tamarense on marine microbial communities. *Harmful Algae*, 10(1), 9-18.

Wetzel, C. M., Jiang, C. Z., Meehan, L. J., Voytas, D. F., & Rodermel, S. R. (1994). Nuclear—organelle interactions: the immutans variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 6(2), 161-175.

Wheeler, G. L., Tait, K., Taylor, A., Brownlee, C., & Joint, I. A. N. (2006). Acyl-homoserine lactones modulate the settlement rate of zoospores of the marine alga Ulva intestinalis via a novel chemokinetic mechanism. *Plant, cell & environment, 29*(4), 608-618.

Wiese, M., D'agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine drugs*, 8(7), 2185-2211.

Wigglesworth-Cooksey, B., Cooksey, K. E., & Long, R. (2007). Antibiotic from the marine environment with antimicrobial fouling activity. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 22(3), 275-280.

Wilhelm, C., Büchel, C., Fisahn, J., Goss, R., Jakob, T., LaRoche, J., ... & Valentin, K. (2006). The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist*, 157(2), 91-124. Willis, R. J. (2007). *The history of allelopathy*. Springer Science & Business Media.

Windust, A. J., Quilliam, M. A., Wright, J. L., & McLachlan, J. L. (1997). Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Toxicon*, 35(11), 1591-1603.

Windust, A. J., Wright, J. L., & McLachlan, J. L. (1996). The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Marine biology*, *126*(1), 19-25.

Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., & Leegood, R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1517-1529.

Withers, N. W., Goad, L. J., & Goodwin, T. W. (1979). A new sterol,  $4\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -ergosta-8 (14), 24 (28)dien-3 $\beta$ -ol, from the marine dinoflagellate Amphidinium carterae. *Phytochemistry*, 18(5), 899-901.

Withers, N. W., Goad, L. J., & Goodwin, T. W. (1979). A new sterol,  $4\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -ergosta-8 (14), 24 (28)dien-3 $\beta$ -ol, from the marine dinoflagellate Amphidinium carterae. *Phytochemistry*, 18(5), 899-901.

Witt, H. T. (1979). Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods: The central role of the electric field. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 505(3-4), 355-427.

Wolfe-Simon, F., Grzebyk, D., Schofield, O. & Falkowski, P. (2005). The role and evolution of superoxide dismutases in Algae. *Journal of Phycology*, *41*, 453 - 465.

Wolfe-Simon, F., Starovoytov, V., Reinfelder, J. R., Schofield, O., & Falkowski, P. G. (2006). Localization and role of manganese superoxide dismutase in a marine diatom. *Plant physiology*, *142*(4), 1701-1709.

**Wollman, F. A.** (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *The EMBO journal*, *20*(14), 3623-3630.

Wratten, S. J., Wolfe, M. S., Andersen, R. J., & Faulkner, D. J. (1977). Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 11(3), 411-414.

Wright, J. L. C., Boyd, R. K., Freitas, A. D., Falk, M., Foxall, R. A., Jamieson, W. D., ... & Pathak, V. P. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*, 67(3), 481-490.

Wu, J. T., Kuo-Huang, L. L., & Lee, J. (1998). Algicidal effect of *Peridinium bipes* on *Microcystis* aeruginosa. Current Microbiology, 37(4), 257-261.

Wu, Y., & Seyedsayamdost, M. R. (2017). Synergy and target promiscuity drive structural divergence in bacterial alkylquinolone biosynthesis. *Cell chemical biology*, *24*(12), 1437-1444.

Xu, N., Tang, Y. Z., Qin, J., Duan, S., & Gobler, C. J. (2015). Ability of the marine diatoms Pseudo-nitzschia multiseries and P. pungens to inhibit the growth of co-occurring phytoplankton via allelopathy. *Aquatic Microbial Ecology*, *74*(1), 29-41.

Xu, Y. X., Zhang, T., & Zhou, J. (2019). Historical occurrence of algal blooms in the northern Beibu Gulf of China and implications for future trends. *Frontiers in microbiology*, *10*, 451.

Y., Ishibashi, M., Nakamichi, H., Kosaka, T., Ishikawa, T., & Kobayashi, J. I. (1997). Luteophanol A, a new polyhydroxyl compound from symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(12), 3820-3823.iculture pond. *Aquaculture*, 217(1-4), 351-371.

Yamamoto, H. Y., & Bassi, R. (1996). Carotenoids: localization and function. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (pp. 539-563). Springer, Dordrecht.

Yamashita, E., H. Zhang, and W. A. Cramer (2007). "Structure of the cytochrome b6f complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme cn." *Journal of molecular biology* 370.1 (2007) : 39-52.

**Yasumoto**, **T.** (1990). Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. *In Toxic Marine Phytoplankton.*, 436-440.

Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., & Murata, M. (1987). Toxins produced by benthic dinoflagellates. *The Biological Bulletin*, *172*(1), 128-131.

Yin, J., Xie, J., Yang, W., Li, H., & Liu, J. (2010). Effect of *Alexandrium tamarense* on three bloom-forming algae. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28(4), 940-944.

**Yoshida, K., Watanabe, C. K., Terashima, I., & Noguchi, K. O.** (2011). Physiological impact of mitochondrial alternative oxidase on photosynthesis and growth in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*, *34*(11), 1890-1899.

Zehr, J.P. & Kudela, R.M. (2009). Photosynthesis in the open ocean. Science, 326(5955), 945-946.

Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environmental science & technology*, *47*(13), 7137-7146.

Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M., & Aro, E. M. (2009). Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in Synechocystis sp. PCC 6803. *PLoS One*, 4(4).

Zheng, J. W., Li, D. W., Lu, Y., Chen, J., Liang, J. J., Zhang, L. & Li, H. Y. (2016). Molecular exploration of algal interaction between the diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the *dinoflagellate Alexandrium tamarense*. *Algal research*, *17*, 132-141.

Zhukova, N. V. (2004). Changes in the lipid composition of Thalassiosira pseudonana during its life cycle. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(5), 702-707.

Zhukova, N. V. (2004). Changes in the lipid composition of Thalassiosira pseudonana during its life cycle. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(5), 702-707.

Ziesche, L., Bruns, H., Dogs, M., Wolter, L., Mann, F., Wagner-Döbler, I., ... & Schulz, S. (2015). Homoserine lactones, methyl oligohydroxybutyrates, and other extracellular metabolites of macroalgae-associated bacteria of the Roseobacter Clade: Identification and functions. *ChemBioChem*, *16*(14), 2094-2107.

## Résumé

En dépit du rôle central du phytoplancton dans la photosynthèse mondiale et dans les cycles biogéochimiques, notre compréhension des forces qui façonnent la dynamique et la structuration des communautés phytoplanctoniques reste limitée. Un des paramètres majeurs contribuant à la structuration écologique est l'inhibition directe du métabolisme des concurrents grâce à l'utilisation de métabolites secondaires ; c'est le phénomène d'allélopathie. La photosynthèse est une sonde idéale pour étudier les interactions allélopathiques entre microalgues marines, parce qu'elle en est une des cibles principales. Nous avons développé et validé une approche nouvelle permettant de disséquer les activités photosynthétiques de chaque microalgue au sein de mélanges artificiels ou naturels, permettant de dévoiler les interactions allélopathiques affectant la photosynthèse. Cette thèse se concentre sur le plaste des diatomées, qui, au-delà d'être le centre énergétique de la cellule, s'avèrent aussi être la cible des composés allélochimiques libérés par leurs compétiteurs.

Cette approche méthodologique a permis de mettre en évidence l'inhibition de l'activité photosynthétique de la diatomée *Thalassiosira pseudonana* par des composés allélochimiques libérés par le dinoflagellé de marée rouge *Amphidinium carterae*. Cette inhibition implique la dissipation du gradient électrochimique de proton généré à travers les thylacoïdes, probablement par des molécules de type amphidinols formant des pores sur les membranes biologiques. Au cours de deux collaborations, nous avons pu montrer deux autres interactions allélopathiques ciblant le plaste des diatomées : le rôle des alkyl-quinolones libérées par des bactéries, sur les chaînes de transport d'électron photosynthétique et respiratoire de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*, les effets du filtrat du dinoflagellé *Alexandrium minutum* sur les membranes cytoplasmiques et chloroplastiques de la diatomée *Chaetoceros muelleri*.

<u>Mots clés :</u> allélopathie, marée rouge, dinoflagellés, phytoplancton, photosynthèse, diatomées, amphidinols, alkyl-quinolones, Shift électrochromique, effet Stark, compétition biotique

## Abstract

Despite the central role of phytoplankton in global photosynthesis and in the biogeochemical cycles, our understanding of the forces that shape the dynamics and structure of phytoplankton communities remains limited. One of the major parameters contributing to ecological structuring, is the direct inhibition of the metabolism of competitors thanks to the use of secondary metabolites; this is the phenomenon of allelopathy. Photosynthesis is an ideal probe to study allelopathic interactions between marine microalgae, simply because it is one of the main targets. We have developed and validated a new approach allowing to dissect the photosynthetic activities of each microalgae within artificial or natural mixtures, allowing to reveal allelopathic interactions affecting photosynthesis. This thesis focuses on diatoms plastid which, beyond being the energetic center of the cell, also proves to be a specific target of the allelochemical compounds released by their competitors.

This methodological approach made possible to demonstrate the inhibition of the photosynthetic activity of the diatom *Thalassiosira pseudonana* by allelochemical compounds released by the red tide dinoflagellate *Amphidinium carterae*. This inhibition involves the dissipation of the electrochemical proton gradient across the thylakoids, probably by amphidinol-like molecules forming pores on biological membranes. Thanks to two collaborations, we were able to show two other allelopathic interactions targeting the plastid of diatoms: the role of alkyl-quinolones released by bacteria on the photosynthetic and respiratory electron transport chains of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, and the effects of the filtrate of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the cytoplasmic and plastid membranes of the diatom *Chaetoceros muelleri*.

<u>Keywords:</u> allelopathy, red tides, dinoflagellates, phytoplankton, photosynthesis, diatoms, amphidinols, bacteria alkyl-quinolone, Electrochromic-shift, Stark effet, biotic competition