

University of Liège
Faculty of Sciences



O₂

**Dr Jekyll and Mr Hyde in symbiotic dinoflagellates
(*Symbiodinium*) from reef-building corals**

Stéphane Roberty

2012 - 2013

University of Liège
Department of Biology, Ecology and Evolution
Laboratory of Animal Ecology and Ecotoxicology
&
Laboratory of Bioenergetics

**O₂: Dr Jekyll and Mr Hyde in symbiotic dinoflagellates
(*Symbiodinium*) from reef-building corals**

Stéphane Roberty

A thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor of Philosophy in Sciences (Oceanography)

2012-2013

Supervisors: Dr. Fabrice Franck and Dr Mathieu Poulicek

Abstract

Coral reefs are among the most beautiful and complex of all ecosystems on Earth. Although they cover less than 1% of the world's oceans area, this marine ecosystem harbors a huge biodiversity and is vital to human society and industries. The foundation of coral reefs relies on the fragile mutualistic relationship between reef-building corals and their photosynthetic dinoflagellates of the genus *Symbiodinium*. However, this symbiosis is highly sensitive to environmental or anthropogenic disturbances and may be disrupted, thus leading to the coral bleaching phenomenon. It has been reported that the initial steps of this process are linked to photosynthesis and the antioxidant network in *Symbiodinium*. However the nature of the cellular mechanisms leading to the generation of reactive oxygen species and to the disruption of the symbiosis is not completely unraveled. Therefore, this study aimed to highlight the existence of photosynthetic alternative electron flows reducing molecular oxygen and the way by which they can induces an oxidative stress, in four *Symbiodinium* strains belonging to three different clades.

Joint measurements of oxygen evolution, PSI and PSII activities by chlorophyll *a* fluorescence and spectrophotometric measurements allowed us to demonstrate that photoreduction of oxygen by the so-called Mehler reaction is the main electron sink at the onset of photosynthesis and during steady state photosynthesis. When *Symbiodinium* cells were exposed to high light conditions, the Mehler reaction and the ascorbate-glutathione cycle (water-water cycle) acted as a safety valve and drained up to 50% of the electrons from PSII, protecting it from photoinhibition and dissipating rapidly the excess photon energy by downregulation of PSII. As long as the WWC efficiency was maintained in the chloroplasts of *Symbiodinium*, ROS generated as a by-product of the Mehler reaction did not significantly damage target molecules and induced an acclimatory response through up-regulation of enzymes involved in the antioxidant response (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase). Nevertheless, when cells were exposed to light stress and elevated temperature (33°C), the WWC supported 75% of the electrons coming from PSII. This increase generated twice more H₂O₂ than during the treatment at 26°C and resulted in the inactivation of target enzymes of the WWC. Therefore, this means that under these conditions the photoprotective functions of the WWC can no longer be maintained, thus opening the way to ROS accumulation and to the induction of coral bleaching.

We found that the response to oxidative stress differed between and within *Symbiodinium* clades. *Symbiodinium* clade A was less sensitive to the chemical induced oxidative stress than the others investigated strains. These variations are most likely related to their geographic origin, their thermal history, as well as to their physiological adaptations to the local environment. They may contribute to the explanation of why coral colonies and coral species have been found to differ in their susceptibilities to bleach. However, although the antioxidant response differs to some extent, some common traits were conserved. Among them, Diatoxanthin, a xanthophyll pigment involved in the non-photochemical quenching process could also have an antioxidant function. In addition, it seems that the ubiquitin-proteasome pathway is involved in the antioxidant response by eliminating carbonylated protein.

Résumé

Les récifs coralliens font partie des écosystèmes les plus beaux et les plus complexes présents sur Terre. Bien qu'il ne couvre qu'un pourcent de la surface des océans du globe, cet écosystème marin recèle une biodiversité exceptionnelle et constitue une ressource vitale pour une grande partie de la population humaine ainsi que pour de nombreux secteurs industriels. Les fondations des récifs coralliens reposent sur la relation mutualiste entre les coraux constructeurs de récifs et les dinoflagellés photosynthétiques du genre *Symbiodinium*. Cette symbiose est cependant fragile et très sensible aux perturbations environnementales ou anthropiques. Elle peut donc être facilement perturbée, ce qui mène généralement au phénomène de blanchissement corallien. Les résultats de rapports antérieurs tendent à démontrer que les premières étapes de ce processus sont liées aux activités photosynthétiques et au réseau antioxydant chez *Symbiodinium*. Toutefois, la nature des mécanismes cellulaires conduisant à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à la perturbation de la symbiose n'est pas complètement élucidée. Cette étude visait donc à mettre en évidence l'existence de voies alternatives de la photosynthèse réduisant l'oxygène moléculaire et de comprendre comment celles-ci pouvaient induire un stress oxydatif. Les analyses ont été menées sur quatre souches de *Symbiodinium* en culture, appartenant à trois clades différents.

Des analyses conjointes du dégagement de l'oxygène, des activités PSII et PSI par des techniques de fluorimétrie et spectroscopie, nous ont permis de démontrer que la réduction de l'oxygène par la réaction de Mehler est la voie principale par laquelle les électrons sont déviés, que ce soit lors de l'induction de la photosynthèse ou lorsque celle-ci est à l'équilibre. Une fois les cellules exposées à des conditions de fortes intensités lumineuses, la réaction de Mehler et le cycle ascorbate-glutathion (water-water cycle) ont agi comme une soupape de sécurité, drainant jusqu'à 50% des électrons en provenance du PSII. Ce mécanisme prévenant ainsi le phénomène de photoinhibition en dissipant rapidement l'excédent énergétique au niveau du PSII. Tant que l'efficacité du water-water cycle a été maintenue au sein des chloroplastes de *Symbiodinium*, les ROS produites par la réaction Mehler n'ont pas induit de dommages significatifs au niveau de protéines cibles mais ont agi sur la régulation de certaines enzymes impliquées dans la réponse anti-oxydante (superoxyde dismutase, ascorbate peroxydase, glutathion réductase). Cependant, lorsque ces mêmes cellules ont été soumises à un stress combinant à la fois une intensité lumineuse élevée et

une température élevée (33°C), le WWC a pris en charge 75% des électrons en provenance du PSII. Cette augmentation a généré deux fois plus de peroxyde d'hydrogène que durant le traitement à 26°C, et a abouti à l'inactivation d'enzymes cibles du WWC. Par conséquent, cela signifie que dans ces conditions, les fonctions photo-protectrices du WWC ne sont plus maintenues, ouvrant de la sorte la voie à une accumulation de ROS et à l'induction des processus cellulaires pouvant mener au blanchissement corallien.

Durant notre étude, nous avons également pu constater que la réponse face à un stress oxydatif pouvait différer entre et au sein de différents clades de *Symbiodinium*. Parmi ceux-ci, les cellules de *Symbiodinium* appartenant au clade A se sont avérées être moins sensibles à un stress oxydant induit que les autres souches analysées. Ces variations sont probablement liées à l'origine géographique des différentes souches, leur histoire thermique, ainsi que leurs adaptations physiologiques à l'environnement local. Elles peuvent également expliquer, du moins en partie, pourquoi certaines colonies et / ou espèces de coraux présentent des degrés de blanchissement variables. Cependant, bien que la réponse anti-oxydante diffère dans une certaine mesure, certains traits communs ont été conservés. Parmi ceux-ci, la diatoxanthine, un pigment xanthophylle impliqué dans le processus d'extinction non-photochimique, semble présenter une fonction anti-oxydante. En outre, il semble que la voie ubiquitine-protéasome soit impliquée dans la réponse anti-oxydante en éliminant les protéines carbonylées.

Table of contents

Abstract	v
Résumé	vii
Remerciements.....	ix
List of figures	xii
List of tables.....	xv
Abbreviations	xvi
Chapter 1	1
General introduction	1
Coral- <i>Symbiodinium</i> symbiosis.....	1
The diversity of the symbiosis	3
From the free-living state to the symbiosis.....	3
Establishment of the Symbiosis.....	7
Ecology of the symbiosis	14
Photosynthesis	17
The chloroplast structure	17
The light phase of photosynthesis.....	18
The dark phase of photosynthesis.....	21
The alternative electron flows.....	22
The dynamic of photosynthesis.....	25
Reactive oxygen species	27
Major cellular sites of ROS production.....	28
Defense mechanisms.....	29
Consequences of oxidative stress	31
ROS as a signal molecule	32
Coral bleaching	33

Definition and causes.....	33
The underlying cellular mechanisms	33
Consequences of coral bleaching.....	39
Objectives of this project	40
Chapter 2.....	43
Oxygen reduction at the acceptor side of PSI (Mehler reaction) is the main alternative photosynthetic electron pathway in reef-building corals endosymbionts (<i>Symbiodinium</i>)	43
Abstract.....	43
Foreword.....	44
Introduction	47
Material and methods	50
Results and discussion	53
Acknowledgments.....	63
Supplementary data.....	64
Chapter 3.....	71
The water-water cycle is involved in the induction mechanism of coral bleaching.....	71
Abstract.....	71
Introduction	72
Material and methods	75
Results and discussion	78
Acknowledgements.....	84
Chapter 4.....	85
The antioxidant responses differ between <i>Symbiodinium</i> phylotypes of symbiotic cnidarians	85
Abstract.....	85

Introduction.....	86
Material and methods.....	88
Results	95
Discussion	103
Acknowledgments	108
Chapter 5	109
General discussion.....	109
The Mehler reaction is the major AEF in <i>Symbiodinium</i>	109
The dark side of the Mehler reaction	115
Reactive oxygen species as Dr Jekyll	117
Reactive oxygen species as Mr Hyde.....	118
Diversity in stress response	119
The role of the host	122
Conclusions.....	122
Perspectives.....	124
References.....	126