



**HAL**  
open science

# Stress environnementaux chez le corail scléactiniaire *Pocillopora damicornis*: du modèle expérimental à l'identification de marqueurs fonctionnels du stress.

Jeremie Vidal-Dupiol

► **To cite this version:**

Jeremie Vidal-Dupiol. Stress environnementaux chez le corail scléactiniaire *Pocillopora damicornis*: du modèle expérimental à l'identification de marqueurs fonctionnels du stress.. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole pratique des hautes études - EPHE PARIS, 2011. Français. NNT: . tel-00608572

**HAL Id: tel-00608572**

**<https://theses.hal.science/tel-00608572v1>**

Submitted on 13 Jul 2011

**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.

# **Ecole Pratique des Hautes Etudes**

Mention "Systèmes Intégrés, Environnement, Biodiversité"

## **Stress environnementaux chez le corail scléactiniaire *Pocillopora damicornis* : Du modèle expérimental à l'identification de marqueurs fonctionnels du stress**

**Thèse de Doctorat présentée par**

**Jérémie VIDAL-DUPIOL**

sous la direction de

M. Mehdi ADJEROUD, Directeur de Recherche

et de M. Guillaume MITTA, Professeur

### **Jury :**

Mme Paola FURLA, Professeur (rapporteur)

Mme Christine PAILLARD, Chargée de Recherche (rapporteur)

Mme Sylvie TAMBUTTE, Directeur de Recherche (examineur)

Mme Delphine DESTOUMIEUX-GARZON, Chargée de Recherche (examineur)

M. Bruno DELESALLE, Maître de Conférence (examineur)

M. Mehdi ADJEROUD, Directeur de Recherche (directeur de thèse)

M. Guillaume MITTA, Professeur (directeur de thèse)

Mai 2011



Thèse préparée à :

Université de Perpignan Via Domitia

Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne

UMR 5244 CNRS-UPVD-EPHE

52, Avenue Paul Alduy

66860 Perpignan Cedex

*à ceux qui ont compté, qui comptent  
et qui compteront....*

## Résumé

Biodiversité élevée, complexité des réseaux trophiques et des interactions biotiques, forte productivité, source de produits et de richesses, protection du littoral... sont quelques unes des caractéristiques emblématiques des écosystèmes coralliens. Cette prodigieuse diversité est largement liée à la biologie particulière des principaux bioconstructeurs du récif, les coraux hermatypiques et leurs zooxanthelles symbiotiques. Mais depuis quelques décennies, la plupart des récifs sont durement affectés par diverses perturbations d'origine naturelle ou anthropique, dont l'intensité et la fréquence augmentent, en lien avec le changement climatique global pour certaines d'entre elles. Parmi ces perturbations, le blanchissement corallien (perte des zooxanthelles symbiotiques et/ou de leurs pigments photosynthétiques) et les maladies coralliennes ont engendré une mortalité importante, parfois massive, des coraux. Le dernier bilan de l'état de santé des récifs à l'échelle planétaire réalisé en 2008 est particulièrement préoccupant : 19% des récifs sont complètement détruits, 20% présentent tous les symptômes d'une destruction imminente, et 20% sont considérés comme menacés dans les décennies à venir.

Dans ce contexte, l'ambition de ce travail est d'améliorer les connaissances sur les mécanismes physiologiques et transcriptomiques des coraux soumis à des stress thermiques conduisant au blanchissement, et à des stress biotiques d'origine bactérienne. L'objectif est également de fournir des bases solides pour la mise en œuvre de biomarqueurs pertinents pour le suivi de l'état de santé des coraux et la prédiction précoce des perturbations. Ce travail a porté sur le corail sclérectiniaire *Pocillopora damicornis* et la bactérie *Vibrio coralliilyticus*, et a mis en œuvre des expérimentations « écologiquement réalistes » de stress en milieu contrôlé.

Dans une première étude, des colonies de *P. damicornis* ont été confrontées à une montée graduelle de la température (28 à 32°C) sur une période de 15 jours. Les ARNm différentiellement exprimés (entre conditions stressées et non stressées) ont été isolés par hybridation soustractive et les taux de transcription des gènes les plus intéressants ont été quantifiés par RT-PCR-quantitative. Ces approches ont révélé 2 candidats présentant une répression drastique de leur expression 6 jours avant les premiers symptômes visibles du blanchissement. Des expériences de RACE-PCR ont montré que l'un d'entre eux (*PdC-Lectin*) contient un domaine lectine de type C présentant une spécificité de reconnaissance pour le mannose. Les expériences d'immuno-localisation ont démontré que cette protéine hôte était potentiellement le médiateur moléculaire des interactions hôte/symbiote, suggérant un rôle dans l'acquisition ou la séquestration des symbiotes. Le second gène (*Pdcyst-rich*) code une protéine potentiellement impliquée dans les mécanismes de calcification. Sa répression pourrait être le reflet d'un mécanisme de type *trade off* conduisant à l'arrêt de la croissance durant le stress.

La seconde étude a examiné les réponses de *P. damicornis* confronté à son pathogène spécifique *V. coralliilyticus*, dans un état virulent (augmentation de la température) et non virulent (température stable). Le processus infectieux a été examiné par microscopie électronique et RT-PCR-quantitative alors que l'état général des coraux a été évalué par des observations visuelles et des mesures de la densité en zooxanthelles. Les résultats montrent que l'infection ne s'est développée qu'après augmentation de la température. Au sein de nombreuses EST obtenues par hybridations soustractives, 6 gènes candidats ont été sélectionnés pour leur implication potentielle dans les mécanismes de la réponse immunitaire, et leur expression a été mesurée tout au long des cinétiques d'interactions virulentes et avirulentes (RT-PCR-quantitative). Parmi ces gènes, 3 appartiennent à la famille des lectines, 2 codes des protéines fixant des éléments métalliques et le dernier code un inhibiteur de protéase. L'analyse de leurs *patterns* de transcription a permis de mieux comprendre la réponse immunitaire du corail, mais aussi l'impact du *Vibrio* sur son hôte.

Enfin, la dernière étude a spécifiquement porté sur la caractérisation du premier peptide antimicrobien (AMP) de scléactiniaires, la damicornin de *P. damicornis*. Nos résultats montrent que la *damicornin* est constitutivement transcrite dans des cellules granulaires de l'ectoderme oral et stockée sous forme inactive dans les granules. Lors d'un stimulus immun, la damicornin est sécrétée et activée. Nos résultats montrent également que la transcription de la damicornin est réprimée par *V. coralliilyticus* lorsque ce dernier s'installe dans les tissus coralliens, ce qui semble être le premier exemple de répression d'un AMP lors d'une interaction hôte/*Vibrio*.

Finalement, ce sont donc 9 biomarqueurs de stress environnementaux qui ont été identifiés, 2 présentent une répression précoce de leur expression lors d'un stress thermique inducteur de blanchissement et 7 répondent à des stress bactériens. Pour ces derniers, selon l'association de biomarqueurs utilisée il est possible de distinguer des coraux confrontés à des interactions de type avirulente ou virulente. Maintenant que ces biomarqueurs sont identifiés, il apparaît nécessaire de passer aux étapes de validations. Ces dernières auront pour but de quantifier la variabilité d'expression de ces biomarqueurs à différentes échelles, mais aussi de définir une ligne de base, indispensable pour suivre l'état de santé des coraux à l'aide de ces biomarqueurs.

Au terme de ce travail, il apparaît particulièrement judicieux de se pencher sur l'implication des mécanismes épigénétiques dans l'adaptation fonctionnelle des coraux en réponse aux stress environnementaux. L'étude des liens entre l'immunité et la symbiose, marquée ici par les implications différentes d'un même gène (*PdC-Lectin*) dans ces fonctions, nous paraît également une voie de recherche prometteuse. Enfin, il conviendrait d'étudier l'effet d'un stress acide, ce qui serait particulièrement judicieux dans le contexte actuel d'acidification des océans.

**Mots Clefs :** récifs coralliens ; coraux scléactiniaires ; stress thermique; stress bactérien; biomarqueurs fonctionnels ; blanchissement corallien ; maladies coralliennes ; *Pocillopora damicornis* ; *Vibrio coralliilyticus*.

# **Ecole Pratique des Hautes Etudes**

Mention "Systèmes Intégrés, Environnement, Biodiversité"

## **Environmental stress in the scleractinian coral**

*Pocillopora damicornis* :

## **From the experimental model to the identification of functional biomarkers of stress**

**PhD thesis presented by**

**Jérémie VIDAL-DUPIOL**

supervisors

M. Mehdi ADJEROUD, Research Director

et de M. Guillaume MITTA, Professor

### **Jury :**

Mme Paola FURLA, Research Director (main examiner)

Mme Christine PAILLARD, Research Charged (main examiner)

Mme Sylvie TAMBUTTE, Research Director (examiner)

Mme Delphine DESTOUMIEUX-GARZON, Research Charged (examiner)

M. Bruno DELESALLE, Assistant Professor (examiner)

M. Mehdi ADJEROUD, Research Director (supervisor)

M. Guillaume MITTA, Professor (supervisor)

Mai 2011



## Abstract

High biodiversity and productivity, complexity of biotic interactions and trophic networks, wealth and product source, coastal protection are some of the many emblematic characteristics of the coral reef ecosystem. This prodigious diversity is largely due to the particular biology of the principal reef bioconstructors, the hermatypic corals and associated zooxanthellae symbionts. However, over the last decades, most of the reefs have been critically affected by various natural and anthropogenic disturbances which are, at least for some of them, increasing in frequency and intensity in correlation with global climate changes. Among these disturbances, coral bleaching (the loose of zooxanthellae and/or their photosynthetic pigments) and coral diseases have caused high or even massive rates of coral mortality worldwide. Results of the last worldwide coral reefs monitoring programs are particularly alarming and established that 19% of the reefs are completely destroyed, 20% present all symptoms of an imminent threat of collapse, and 20% are at risk for the forthcoming decades.

In this context, the objective of this work was to improve our knowledge of enhanced physiological and transcriptomic mechanisms of corals under thermal stress leading to bleaching and bacterial stress. The objective was also to provide strong bases for the use of relevant biomarkers for coral health monitoring and early detection of these disturbances. This work focused on the scleractinian species *Pocillopora damicornis*, the bacteria *Vibrio coralliilyticus*, and on the implementation of stress experiments in a controlled but ecologically realistic system.

In the first study, *P. damicornis* colonies were confronted to a gradual water temperature increase (28°C to 32°C) over a 15 days period. mRNAs differentially expressed (between control and thermally stressed conditions) were isolated by subtractive hybridization and the transcription rate of the most promising genes were measured by quantitative-RT-PCR. These approaches revealed 2 candidates that displayed a drastic expression decrease 6 days before the occurrence of the first symptoms of bleaching. RACE-PCR experiments showed that one of them (*PdC-Lectin*) contains a C-type lectin domain presenting a specificity for recognition and binding of mannose. Immuno-localization experiments have demonstrated that this protein could be the molecular mediator of host/symbionts interaction, which suggest a putative role in the acquisition or the sequestration of symbionts. The second gene (*Pdcyst-rich*) codes for a protein potentially involved in calcification processes. Its down-regulation could picture a trade-off mechanism leading to calcification failure during thermal stress.

In the second study, responses of *P. damicornis* confronted to its specific pathogen *V. coralliilyticus* in a virulent (temperature increased) or non-virulent (constant low temperature) state were studied. The infectious process was examined by the combination of electronic microscope observations and quantitative-RT-PCR experiments, and coral health status was evaluated by visual observations and zooxanthellae density measures. Results show that infection only occurs after water temperature was increased. Among several ESTs obtained by

subtractive hybridization (between control, bacterially, and thermally plus bacterially conditions), 6 gene candidates were selected for their putative involvement in the immune response, and their transcription rate was measured by quantitative-RT-PCR all long the kinetics of virulent and non-virulent experiments. Among these genes, 3 belong to the lectin family, 2 code for proteins involved in metal binding and the last one codes for a protease inhibitor. Their expression patterns allowed better understanding the immune response of scleractinian corals as well as the impact of *Vibrio* on its host.

The third publication focus on the characterization of the first antimicrobial peptide (AMP) of scleractinian corals, the damicornin of *P. damicornis*. Results showed that the *damicornin* is constitutively transcribed and stocked in an inactive form in ectodermal granular cells. Under immune challenge, damicornin is secreted and activated. Results also showed that after bacterial internalization, *Vibrio* triggers a down-regulation of the *damicornin*. In our knowledge this is the first report of the down-regulation of an AMP in a host/*Vibrio* interaction.

Finally, 9 biomarkers of environmental stress were identified and demonstrated to be early regulated, in response of thermal stress for 2 of them, and of bacterial stress for the 7 others. For the last ones, it is possible to differentiate between corals confronted to virulent or non-virulent interaction. After this identification step, a validation stage appears to be necessary. This should focus on the quantification of expression variability of each biomarker at different scales, but also on the definition of an expression baseline, which is essential for biomarkers use for coral health monitoring.

This work is particularly promising, and opens perspectives in the field of epigenetic mechanisms involvement in functional adaptation of corals to environmental stress. Another interesting perspective would be the study of the links existing between immunity and symbiosis, which have been put to the fore in the present work by the different involvement of a same gene in both functions (*PdC-Lectin*). Finally, studying responses of corals to acidic stress would be particularly relevant in the actual context of ocean acidification.

Key words : coral reefs, scleractinian corals; thermal stress; bacterial stress; functional biomarkers; coral bleaching; coral diseases; *Pocillopora damicornis*; *Vibrio coralliilyticus*.

## Remerciements

Dernière page de cette thèse à l'échelle temporelle et pourtant la troisième sur l'échelle spatiale... page des remerciements seulement ou conclusion personnelle et humaine d'une longue aventure ? Longue c'est certain, difficile parfois, intense tout le temps et tellement enrichissante à tous les niveaux. Que de gens rencontrés, appréciés ou non, mais dont si souvent les écrits, les paroles, les mots et les maux scientifiques, politiques ou humains m'ont apporté une vision alternative des choses. La liste de ces personnes est longue, tellement longue que je crains d'en oublier. Si vous lisez les quelques lignes de cette conclusion personnelle et que malheureusement votre nom n'y est pas, excusez cet oubli et sentez vous concerné par ce grand ; MERCI général !

Comment ne pas commencer par mes deux directeurs de thèse, Guillaume et Mehdi, après trois ans et demie de réflexion j'ai dû me résoudre à tirer à pile ou face pour décider lequel des deux devait être cité en premier. Sans eux rien n'aurait été possible. Ils m'ont accordé leur énergie, leur confiance, leur soutien, leur temps, leurs remarques positives ou négatives, leurs encouragements et parfois remontrances. Ils sont en quelque sorte mes parents scientifiques, à vous deux MERCI !

Je poursuivrai ces remerciements avec les collègues du boulot devenus des amis dans la vie. Céline, toujours présente et de bons conseils, je me remémorerai bien longtemps nos crises de rires ou de dépit. Manu, mon coach de manip, l'as de la pipette, le Lucky Luke de la PCR, l'Aménophis du clonage de grands fragments. Mathias, le penseur grand et quelque chose me dit grand penseur d'ici quelques temps. Lucie, la corallienne bourlingueuse, un jour ici, l'autre là bas, toujours entourée de petites recrues de coraux. Gégé, au tempérament parfaitement explicité par sa chevelure, comment dire, explosive. Ophélie, blonde et belge (pour un Français ça ne s'invente pas!), enthousiaste, espiègle et bosseuse que de bons moments et de crises de nerfs face à ces satanés coraux. Et enfin Laurent, subtil mélange d'un allumé et d'un génie de l'aquario, débordant d'idées, d'énergie et de gentillesse, c'est sans conteste l'une des plus belles rencontres que m'ait offerte cette thèse. A vous sept, MERCI !

Les collègues de mon bureau d'en haut ; Pablo, Joan, Sahra, Barbara, Stéphanie, Joachim, Mohsen, Julie, Kamal, Julien, Mathieu, Chirine, Jessica, Erwan, Thomas, J.O, Aurélie,... et de mon bureau d'en bas ; Julie, Yves, Pauline, Rodrigue, Nico, Sophie, Guillem... Pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur de tous les jours, à tous MERCI !

Les chercheurs et agents du CBETM dont il est certain que de petits morceaux de cerveau jalonnent les quelques pages de cette thèse. Christophe dont les longs moments de silence précédant LA question feraient trembler n'importe qui, Benjamin et David les fous de la protéine, Jérôme le biostatisticien qui vous parle bio plutôt que math, André pour sa vision globale et son ouverture d'esprit, Irma, Diane et Joce gestionnaires de chocs toujours prêtes à rattraper nos boulettes administratives, Rémi, Peter et Jean-Luc sans qui je crois bien mon ordinateur aurait traversé à vitesse mac 2 la salle des étudiants en de nombreuses reprises, J-F et Richard toujours prêts à aider pour une manip qui foire... et tous les autres avec qui j'ai eu moins d'interaction mais dont les bonjours et les encouragements ont toujours fait plaisir, à tous MERCI !

A Bruno qui a, comment dire, un petit peu forcé la main de Michel pour qu'il me prenne en stage de M1 et que je puisse enfin mettre un pied dans ce labo, ainsi que pour sa science de l'écriture. Je me rappelle encore les 17 versions de ma première discussion, quelle patience !!! Et Michel bien sur, je crois bien que c'est en sa compagnie que j'ai appris le plus de choses dans le moins de temps possible. Je me remémore encore souvent les matinées entières de questions / réponses sur tous les sujets possibles et imaginables, les explications sur la délimitation d'espèces chez les coraux, les anecdotes diverses et variées sur ses missions... Enfin que de bons souvenirs, et quel immense respect j'ai pour ce personnage du monde des récifs. Mentor est un mot qui ne correspond pas exactement à mon caractère, mais si un jour on me demande qui serait mon mentor je crois bien que c'est à Michel que je penserai. A vous deux les amis, MERCI !

Mes amis de tous les jours, ceux avec lesquels on décompresse devant les cannes à pêches ou lors de la capture inattendue d'un banc de canettes (d'un genre qui se boit plutôt qu'il se mange), ceux qui vous trainent de force hors du labo et vous obligent à prendre un peu de recul, Julien, Clément, Fanou, Jérôme, Audrey, Sandrine, Jess et Julie, à vous tous MERCI !

Et finalement ma famille, grands-pères et grands-mères qui par leurs mots gentils leur compréhension, leur soutien et leurs bons petits plats m'ont redonné un surcroit de motivation lorsque cette dernière venait à s'atténuer, mon frère, Tanguy étudiant lui aussi qui sait donc mieux que personne les contraintes de cette position, mon père, Michel dont le soutien les encouragements, les félicitations et les remarques toujours justifiées m'ont aidé à avancer, ma mère, Christine dont la bonne humeur et l'énergie inépuisable a pu me servir de béquille lors des moments difficiles, et qui ont su débrouiller avec l'aide de Jeanne et Marguerite mon orthographe quelque peu originale, et enfin Clémence qui a supporté mes absences répétées,

les très nombreux week ends passés au labo, les mauvaises humeurs passagères, et sans laquelle ces trois et quelques années n'auraient pas été aussi géniales, à vous tous un très grand MERCI !

Des mercis et un pardon, un pardon à tous ces coraux, coraux que j'ai chauffé, infecté, plongé vivants dans l'azote liquide, décapés à grand coup de waterpic et j'en oublie... sachez mes chers coraux que vos morts n'auront pas été vaines, et que sans vous cette thèse n'aurait jamais vu le jour, à vous tous PARDON !

## Table des matières

<b>Chapitre I : Introduction générale.....</b>	<b>p 14</b>
I.1 Contexte scientifique.....	p 14
I.1.1 Les récifs coralliens et leurs coraux dans l'ère anthropocène.....	p 14
I.1.2 Impacts des changements globaux et autres perturbations sur les communautés coralliennes.....	p 20
I.1.2.1 Le blanchissement corallien.....	p 25
I.1.2.1 Les maladies coralliennes.....	p 41
I.1.3 Marqueurs de stress chez les scléactiniaires.....	p 51
I.2 Objectifs du programme de recherche doctorale.....	p 55
I.3 Choix des modèles d'étude.....	p 59
I.3.1 <i>Pocillopora damicornis</i> .....	p 59
I.3.2 <i>Vibrio coralliilyticus</i> .....	p 61
<b>Chapitre II : Stress thermique et perturbation physiologique chez <i>Pocillopora damicornis</i>.....</b>	<b>p 65</b>
II.1 Problématique scientifique et objectifs de l'étude.....	p 65
II.2 Approche méthodologique.....	p 66
II.3 Publication n°1.....	p 68
<b>Chapitre III : Vibriose et perturbation physiologique chez <i>Pocillopora damicornis</i>.....</b>	<b>p 98</b>
III.1 Problématique scientifique et objectifs de l'étude.....	p 98
III.2 Approche méthodologique.....	p 99
III.3 Publication n°2.....	p 102
III.4 Publication n°3.....	p 138
<b>Chapitre IV : Discussion et Perspectives.....</b>	<b>p 165</b>
IV.1 Réponse physiologique au stress thermique.....	p 166
IV.2 Transcriptome et stress thermique chez d'autres modèles d'invertébrés marins.....	p 171
IV.3 Blanchissement, adaptation locale et résilience.....	p 175
IV.4 Réponse immunitaire antibactérienne chez les scléactiniaires.....	p 179

IV.5 Virulence et effet de la température chez les <i>Vibrio</i> pathogènes d'invertébrés marins.....	p 189
IV.6 <i>Pocillopora damicornis</i> , future espèce modèle et sentinelle ?.....	p 191
IV.7 Quelles applications pour nos biomarqueurs potentiels ?.....	p 196
<b>Chapitre V : Conclusions.....</b>	<b>p 201</b>
<b>Chapitre VI : Références bibliographiques.....</b>	<b>p 203</b>
<b>Chapitre VII : Annexes.....</b>	<b>p 229</b>
Annexe 1 : Preuve d'acceptation de la publication n°2.....	p 230
Annexe 2 : Publication complémentaire " Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef ".....	p 231
Annexe 3 : Publication complémentaire " Response of coral assemblages to thermal stress: Are bleaching intensity and spatial patterns consistent between events? ".....	p 243
Annexe 4 : Publication complémentaire " Variability of algal endosymbiont density in the reef-building coral <i>Acropora globiceps</i> : a multi-scale approach along environmental gradients around Moorea (French Polynesia)".....	p 262
Annexe 5 : Curriculum Vitae.....	p 278

# Chapitre I :

## Introduction générale

### I.1 Contexte scientifique

#### I.1.1 Les récifs coralliens et leurs coraux dans l'ère anthropocène<sup>1</sup>

Seules structures bioconstruites visibles de l'espace, les récifs coralliens constituent l'un des plus vastes écosystèmes de notre planète (Fig. 1). Situés en zone intertropicale, principalement entre 35° N (Bermudes, Ryukyu, Hawaii) et 32° S (Lord Howe, Rapa), les récifs coralliens se développent dans des eaux chaudes (18-35°C, avec un optimum moyen entre 26 et 28°C) et oligotrophes ( $\text{NO}_3 < 2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{PO}_4 < 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ; (D'Elia & Wiebe 1990; Birkeland 1997a), et ne dépassent que rarement les 70 premiers mètres de la colonne d'eau. Bien qu'il soit difficile d'évaluer la superficie d'un écosystème aussi vaste et complexe, on estime généralement que les récifs coralliens occupent environ 600 000 km<sup>2</sup>, soit environ 0,17% de la surface des océans (Birkeland 1997a)



Figure 1 : photographie satellite de la Grande Barrière de Corail en Australie, qui constitue la plus vaste bioconstruction actuelle

---

<sup>1</sup> L'ère anthropocène : l'ère dans laquelle les activités humaines sont devenues une force majeure déterminant le futur de notre système « Terre » (Zalasiewicz *et al.* 2011).



Souvent symbolisés par l'image d'une oasis dans le désert, les récifs coralliens abritent une biodiversité jamais égalée au niveau marin, et ne sont supplantés, en nombre d'espèces (mais pas de genre), que par la forêt amazonienne. Cette extraordinaire biodiversité est principalement le fruit d'une histoire évolutive longue (au moins 200 millions d'années), d'une structuration spatiale tridimensionnelle complexe et d'une fragmentation écologique importante (Veron 1995). Ces caractéristiques ont conduit à la création d'une multitude de niches écologiques, à des phénomènes d'isolements géographiques très marqués et, par conséquent, à une spéciation extrême quels que soient les taxons étudiés. Cette biodiversité est également le fruit d'une grande diversité et complexité des réseaux trophiques et des interactions biotiques. La biodiversité actuelle des récifs coralliens est ainsi estimée à plus de 950 000 espèces comprenant environ 600 espèces de coraux scléactiniaires, près de 2000 espèces de poissons et 5000 de mollusques (Reaka-Kudla 1997; Veron 2000).

L'image d'une oasis dans le désert fait également référence à la forte productivité de cet écosystème (Hatcher 1998). Par ailleurs, les récifs coralliens abritent environ 30% de la biomasse totale des océans et 50% des carbonates de calcium minéralisés chaque année (Erez 1990).

Outre leur importance écologique fondamentale, les récifs coralliens jouent également un rôle majeur pour les populations humaines (Fig. 2). Une centaine de pays, dont bon nombre sont en voie de développement (PVD), abritent des récifs dans leurs eaux territoriales, et plus de 500 millions de personnes vivent à moins de 100 km de cet écosystème (Hoegh-Guldberg 1999). Les récifs sont le siège d'une pêche de subsistance (Fig 2A), mais aussi source de devises et d'emplois dans le cadre des pêcheries commerciales (25% des poissons pêchés dans les PVD proviennent des récifs coralliens; Bryant *et al.* 1998). "L'industrie du tourisme corallien" est également génératrice de revenus considérables (Fig. 2B). Pour exemple, cette activité sur la Grande Barrière australienne a généré plus de 1,5 milliard de dollar (USD) par an (Done *et al.* 1996), 2,5 milliards pour les récifs de Floride (Birkeland 1997b) et plus de 140 milliards pour les Caraïbes (Jameson *et al.* 1995). En plus de la pêche et du tourisme, des activités de pêche et d'élevage pour le marché aquariophile se développent (Fig 2C). De plus, les récifs coralliens sont une source considérable pour la découverte de nouvelles molécules d'intérêt médical (Fig 2D), cosmétique, ou industriel (Carte 1996). Enfin, les récifs coralliens jouent un rôle majeur dans la protection du trait de côte, en le préservant des assauts de la houle, mais aussi grâce à un apport régulier de matériel minéral, et à une extension de la zone littorale (Hoegh-Guldberg 1999).

Ainsi, les récifs coralliens constituent l'un des écosystèmes les plus précieux en termes écologique et socio-économique, et leur dégradation récente a eu et aura des conséquences dramatiques pour les communautés récifales et humaines (Bryant *et al.* 1998).



Figure 2 : quelques fonctions associées aux récifs coralliens et dont l'humanité tire profit : A) pêche de subsistance ; B) activités touristiques ; C) colonies coralliennes issues d'une ferme d'élevage, destinées au marché aquariophile, ou à la restauration récifale ; D) *Dolabella auricularia*, limace de mer dont la dolastatin, un anticancéreux prometteur, est issu.

### Les Coraux hermatypiques

La bioconstruction des récifs coralliens repose principalement sur un groupe d'organismes faisant partie de l'ordre des scléactiniaires, les coraux zooxanthellés hermatypiques<sup>2</sup>. L'efficacité de cette bioconstruction est largement due à la biologie particulière de ces coraux, et notamment à l'endosymbiose mutualiste de type phototrophe qu'ils forment avec les microalgues de la famille des dinoflagellés et du genre *Symbiodinium* (couramment appelé zooxanthelles). Le couple corail (hôte) / zooxanthelle (symbiote) est couramment appelé holobionte. Cette symbiose permet un apport d'énergie nécessaire à la survie dans un milieu oligotrophe et à la construction d'un exosquelette d'aragonite. Les scléactiniaires appartiennent à l'embranchement des cnidaires, phylum le plus basal des eumétazoaires (Miller *et al.* 2007). Principalement sessile et colonial (bien qu'il y ait quelques exceptions, comme chez le genre *Fungia*), l'individu est le polype, les polypes étant reliés

<sup>2</sup> Hermatypique : contribuant significativement à la construction du récif (Schuhmacher & Zibrovius 1985)

entre eux par le coenosarque (Fig. 3). Diploblastiques, les polypes sont constitués de deux couches tissulaires séparées par une mésoglée acellulaire contenant des cellules circulantes encore mal connues, les amœbocytes (Fig. 3). Faisant face au milieu extérieur marin, se trouve l'ectoderme oral constitué principalement de cellules de chasse et de défense, les cnidocytes, de cellules granulaires productrices de mucus et de cellules ciliées permettant la création du courant muqueux (Fig. 3). Toujours dans la partie orale, l'autre couche cellulaire est appelée gastroderme (ou endoderme ; Fig. 3). Ce tissu fait face au coelenteron qui correspond à la cavité gastrique de l'animal (Fig. 3). Le gastroderme est composé principalement de cellules digestives et de cellules contenant les microalgues symbiotiques hébergées dans des organites intracellulaires appelés symbiosomes (Fig. 3). La partie aborale est également composée d'un ectoderme et d'un endoderme, cependant l'ectoderme fait ici face au squelette et porte le nom d'ectoderme calicoblastique ou ectoderme squelettogénique (Fig. 3). Son rôle est de structurer le squelette via les sécrétions calicoblastiques. Ce tissu est connecté au squelette via les desmocytes. L'endoderme aboral joue le même rôle que son homologue oral, mais contient généralement moins de symbiotes (Fautin & Mariscal 1991; Mullen *et al.* 2004).

Le symbiote va fournir à son hôte jusqu'à 95% de ses photosynthates sous formes diverses : des sucres, des acides aminés ou des peptides (Trench 1979; Muscatine 1990). Cet apport trophique va non seulement répondre en grande partie aux besoins nutritionnels des coraux, mais il va également permettre la constitution de réserves énergétiques, ce qui fait que l'holobionte est quasi autotrophe vis-à-vis du carbone (Muller-Parker & D'Elia 1997; Lesser 2004). L'azote est en grande partie fournie par la consommation de pico-, nano- et microplancton capturés grâce aux cnidocytes ou via le mucus sécrété à la surface des coraux (hétérotrophie). Des composés organiques dissous sont également absorbés, certainement par voie transtégumentaire (Houlbrèque & Ferrier-Pagès 2009). Les scléactiniaires sont donc considérés comme mixotrophes (Houlbrèque & Ferrier-Pagès 2009). Outre cet aspect trophique, la présence du symbiote apporte également d'autres avantages liés à la production photosynthétique, à la photosynthèse ou à son métabolisme. Ainsi, le taux de calcification est plus important lors des phases claires chez les scléactiniaires symbiotiques (phénomène de *light enhanced calcification* Allemand *et al.* 2004), ces coraux ont généralement des taux de fécondité plus élevés, mais bénéficient également de la séquestration d'éléments toxiques par leurs zooxanthelles (Muller-Parker & D'Elia 1997). En contre partie, le corail hôte fournit aux zooxanthelles une protection contre la prédation et les UV, un apport de CO<sub>2</sub> et de nutriments

(déchets métaboliques), un environnement stable en zone euphotique, et une forte densité de population pour un génotype donné (Muller-Parker & D'Elia 1997).

Malgré ses avantages, la symbiose induit également des coûts pour les deux partenaires. L'hôte doit se défendre contre l'hyperoxie générée par la photosynthèse et se protéger des fortes radiations lumineuses nécessaires à la photosynthèse (Muller-Parker & D'Elia 1997). Le symbiote, quant à lui, doit consentir à la translocation d'une quantité significative de ses photosynthates, il est aussi confronté vraisemblablement au système immunitaire inné de son hôte (Baghdasarian & Muscatine 2000) et peut se retrouver limité dans ses apports en CO<sub>2</sub> et nutriments (Muller-Parker & D'Elia 1997).

En résumé, la symbiose corail-zooxanthelles permet à l'holobionte d'être plus performant et compétitif. Ceci a permis aux coraux de coloniser efficacement l'espace en utilisant de façon optimale une source de nourriture partitionnée entre auto- et hétérotrophie (Muller-Parker & D'Elia 1997). En contre partie, l'holobionte doit faire face à des facteurs de stress multiples (Muller-Parker & D'Elia 1997).

Depuis la révolution industrielle et la généralisation de l'utilisation des énergies fossiles, les taux de gaz à effet de serre (principalement le CO<sub>2</sub>) présents dans l'atmosphère sont en augmentation constante, avec des concentrations particulièrement élevées depuis les années 90 (Pachauri 2007). Leur important forçage radiatif a induit une augmentation moyenne des températures des eaux océaniques de plus de 0,6°C lors des 100 dernières années (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). L'augmentation des températures de surface conduit de surcroît à une stratification accrue de la colonne d'eau, ce qui affecte la disponibilité en nutriments pour les producteurs primaires, phénomène ayant déjà conduit à une croissance de 15% de la superficie occupée par les eaux oligotrophes entre 1998 et 2006 (Polovina *et al.* 2008). De plus, cette stratification conduit également à une diminution de la disponibilité en O<sub>2</sub> des eaux les plus profondes (Matear *et al.* 2000; Diaz & Rosenberg 2008). Du point de vue climatique, les gaz à effet de serre augmenteraient la fréquence et l'intensité des phénomènes extrêmes tels que les cyclones, dont la formation est fortement corrélée aux températures de surface (Knutson *et al.* 2010). Différents modèles climatiques confortés par des mesures *in situ*, suggèrent que ces modifications à l'échelle globale accentuent la rythmicité des grands bouleversements océaniques tels que ENSO (El Niño Southern Oscillation), l'Oscillation Atlantique Nord ou l'Oscillation Pacifique décennale (Alheit & Bakun 2010). En plus de cet impact sur le réchauffement planétaire, le CO<sub>2</sub> rejeté par les activités humaines influe également sur le pH des océans. L'absorption par les océans du CO<sub>2</sub> atmosphérique a conduit à une diminution de 0,02 unité de pH par décennies ces trois

dernières décades, et à une perte de 0,1 unité depuis l'ère préindustrielle (Doney *et al.* 2009). Une telle diminution peut sembler minime, mais elle s'accompagne en réalité d'une chute importante de la concentration en ion carbonate et représente une déviation majeure par rapport aux conditions physico-chimiques de l'eau de mer prévalant depuis plusieurs millions d'années (Petit *et al.* 1999; Pelejero *et al.* 2010).

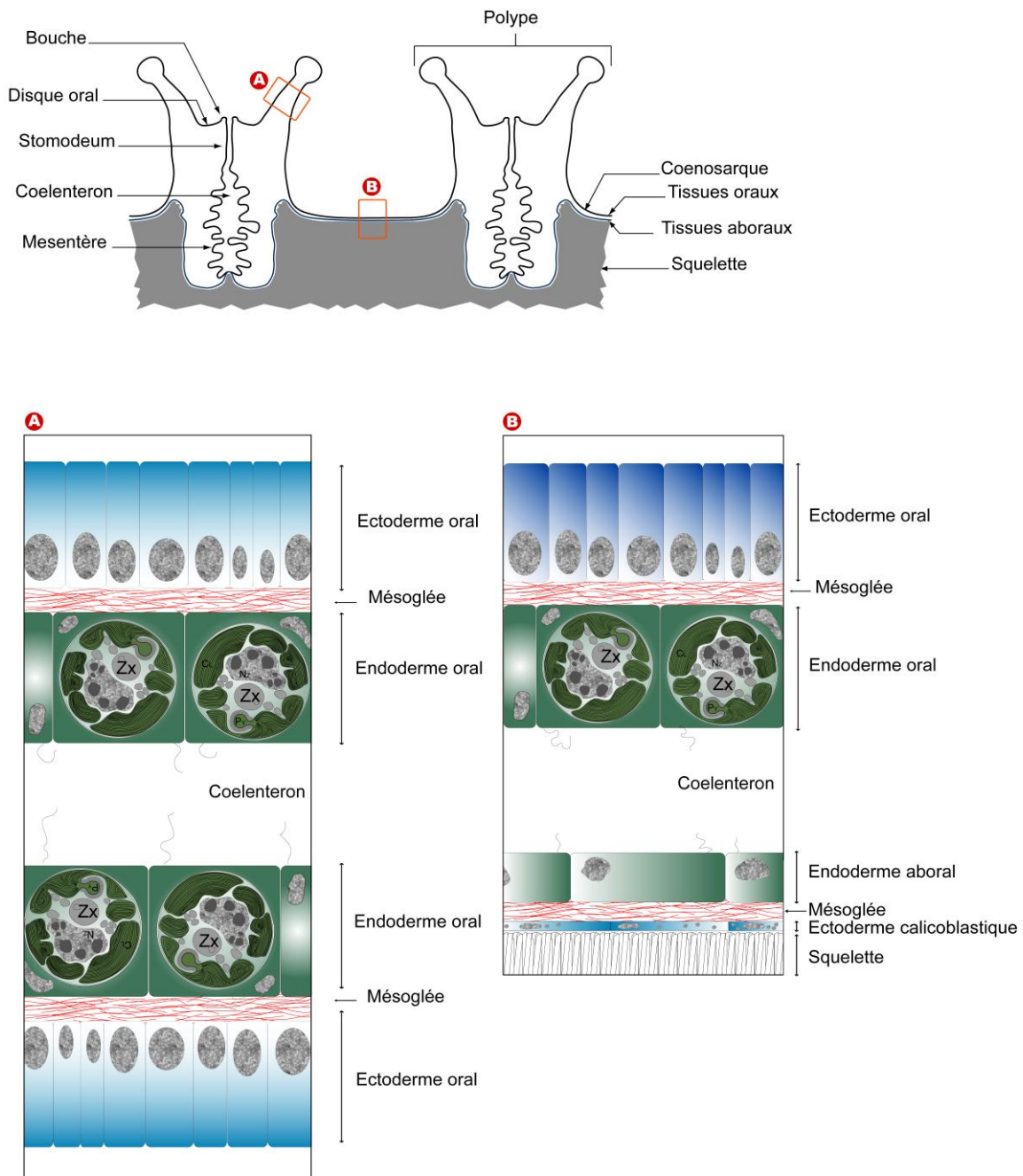


Figure 3 : anatomie et histologie des coraux scléactiniaires. A) Histologie de la partie tentaculaire composée des tissus oraux. B) Histologie du coenosarque composé de tissus oraux et aboraux.

Si à l'échelle globale les gaz à effet de serre et les changements climatiques et océanographiques retiennent beaucoup l'attention, d'autres pressions anthropiques plus localisées ont également un impact majeur sur l'état des récifs coralliens. Avec une démographie galopante, notamment au sein des PVD, les populations humaines exercent une pression croissante sur les écosystèmes et leurs ressources. Dans le cas des récifs coralliens, la surpêche a un impact négatif non seulement sur les stocks de certains groupes fonctionnels clés tels que les herbivores ou les prédateurs au sommet de la chaîne alimentaire, mais également sur les habitats récifaux lorsqu'il s'agit de pêche utilisant des engins destructifs tels que la dynamite (Wilkinson 1999; Jackson *et al.* 2001). Enfin, d'autres sources de perturbations d'origines anthropiques peuvent avoir un impact significatif sur les récifs coralliens et leurs ressources. Il s'agit notamment : i) des constructions littorales et les extractions de matériaux coralliens, qui détruisent les habitats et provoquent l'hypermédimentation ; ii) le rejet des eaux usées non traitées, source d'éléments toxiques et de nutriments qui peuvent induire l'eutrophisation des eaux ; iii) la déforestation de la frange littorale et des bassins versants, qui favorise le lessivage des sols et augmente par conséquent la turbidité et la sédimentation dans les zones récifales adjacentes (Fabricius 2005).

### **I.1.2 Impact des changements globaux et autres perturbations sur les communautés coralliennes**

Parmi les perturbations de grande ampleur affectant les récifs coralliens actuels, l'augmentation des températures de surface occupe une place primordiale, en agissant aussi bien à l'échelle locale qu'à l'échelle globale (Bellwood *et al.* 2004; Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Baker *et al.* 2008). Les coraux scléactiniaires sont des sténothermes qui vivent très proches de leur limite supérieure de tolérance thermique (Jokiel & Coles 1977; Jokiel & Coles 1990). Ainsi, une augmentation de quelques dixièmes de degrés au dessus des températures moyennes en saison chaude pendant plusieurs semaines induit généralement le blanchissement corallien (Jokiel & Coles 1977; Glynn & D'croz 1990; Jokiel & Coles 1990). Physiologiquement, le blanchissement des coraux correspond à la perte des zooxanthelles symbiotiques et/ou de leurs pigments photosynthétiques. Les coraux apparaissent alors blancs, leur squelette calcaire n'étant plus masqué par la pigmentation des symbiotes (Fig. 4 ; Brown 1997; Douglas 2003; Lesser 2004). Si le stress thermique perdure et que la rupture de la symbiose se maintient trop longtemps, les coraux meurent. Toutefois, si le stress est transitoire, la recolonisation symbiotique peut avoir lieu, les coraux récupèrent et reprennent

alors une vie "normale". Cette résilience, en terme de reconstitution des réserves énergétiques et des densités en zooxanthelles, demande entre 6 et 12 mois selon les espèces (Grottoli *et al.* 2004; Grottoli *et al.* 2006; Rodrigues *et al.* 2008a; Rodrigues *et al.* 2008b). L'impact d'un évènement de blanchissement affecte donc significativement des traits de vie tels que la reproduction ou la croissance (De'ath *et al.* 2009; Cantin *et al.* 2010). Avec le réchauffement de certaines régions intertropicales, les évènements de blanchissement risquent d'être de plus en plus fréquents, avec une intensité et une extension géographique plus élevées (Donner *et al.* 2007; Hoegh-Guldberg *et al.* 2007). Certains modèles prédisent même un arrêt de la calcification des coraux à l'horizon 2070, si les températures continuent à croître au même rythme (Cantin *et al.* 2010).



Figure 4 : illustration du phénomène de blanchissement corallien chez *Pocillopora damicornis* : A) colonie saine ; B) après un stress thermique, cette colonie a perdu ses zooxanthelles, et apparaît blanche, le squelette calcaire n'étant plus masqué par la pigmentation des symbiotes.

Depuis quelques décennies, les populations coralliennes doivent également faire face à des épizooties de plus en plus fréquentes, intenses et qui touchent de plus en plus de récifs à l'échelle du globe (Fig. 5A ; Ward & Lafferty 2004; Mydlarz *et al.* 2006; Weil *et al.* 2006; Bourne *et al.* 2009). Les liens de cause à effet entre ces épizooties et le réchauffement des eaux ne sont pas formellement démontrés, mais il semblerait que les températures élevées favorisent le développement de pathologies, par un affaiblissement des défenses immunitaires du corail et/ou par une augmentation de la fitness, de la pathogénicité et de la virulence des agents infectieux (Kushmaro *et al.* 1998; Ben-Haim *et al.* 2003a; Mydlarz *et al.* 2006; Lesser *et al.* 2007; Ward *et al.* 2007; Bourne *et al.* 2009; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009). Contrairement au phénomène de blanchissement, la résilience des colonies coralliennes affectées par ces épizooties est quasi inexistante (Fig 5B ; Mydlarz *et al.* 2009). Les recherches dans ce domaine portent ainsi sur la réponse, la susceptibilité, la résistance et

l'adaptabilité des coraux à ces pathogènes (Rosenberg *et al.* 2007c; Mydlarz *et al.* 2009; Mydlarz *et al.* 2010; Palmer *et al.* 2010).

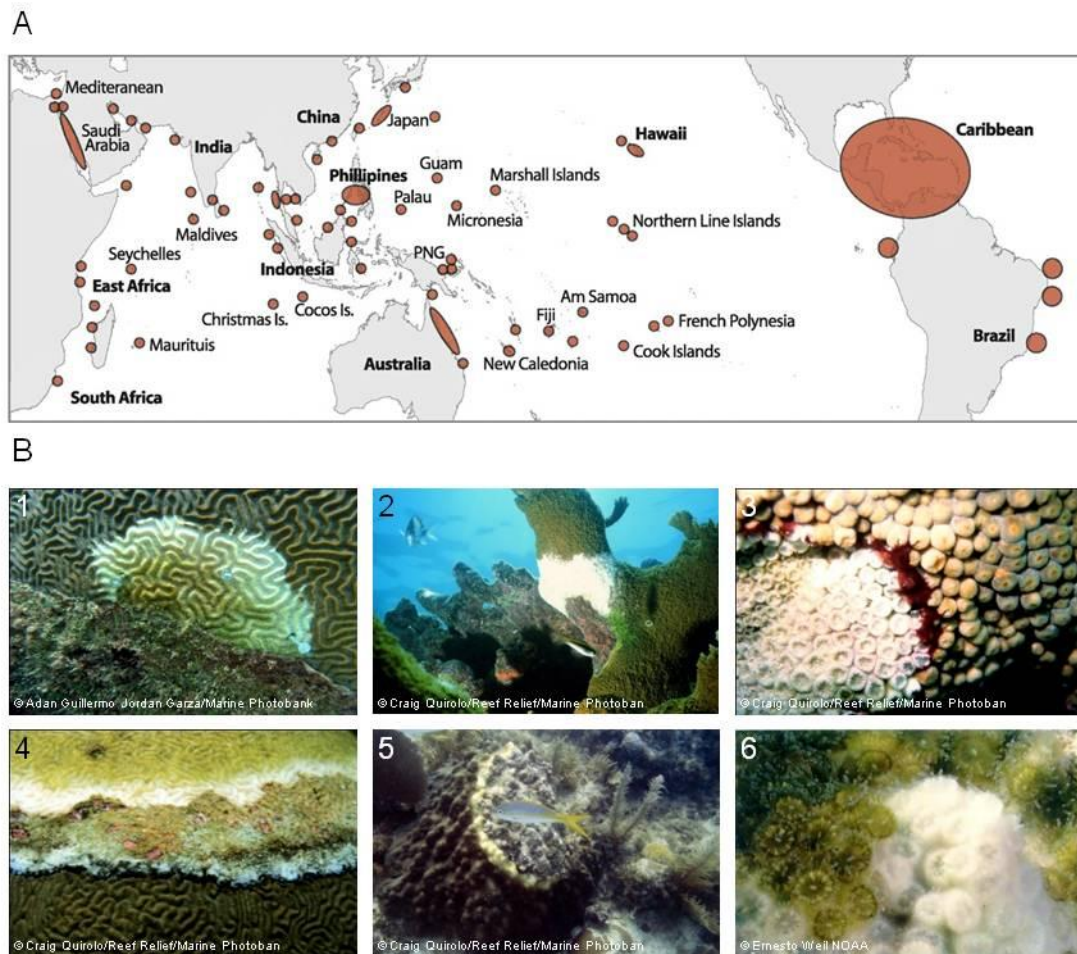


Figure 5 : répartition géographique des principales maladies coralliennes :

A) Les zones en rouge marquent les récifs coralliens pour lesquels des maladies coralliennes (toutes maladies confondues) ont été enregistrées. B) Quelques exemples de maladies coralliennes : 1) maladie de la peste blanche (white plague disease) ; 2) maladie de la bande blanche (white band disease); 3) maladie de la bande rouge (red band diseases); 4) maladie de la bande noire (black band disease) ; 5) maladie de la bande jaune (yellow band disease) ; 6) maladie du blanchissement bactérien d'*Oculina patagonica* (bacterial bleaching disease), seule maladie pour laquelle une résilience a été observée. Modifiée à partir de Bourne *et al.* (2009).

Plus récemment, la concentration croissante du CO<sub>2</sub> atmosphérique et l'acidification des eaux océaniques qui en résulte, apparaît comme une des principales menaces sur les récifs coralliens, comme pour d'autres bioconstructeurs calcifiant (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Le squelette des scléactiniaires est composé essentiellement de cristaux d'aragonite (carbonate de calcium ; CaCO<sub>3</sub>). Cette biocalcification est dépendante de différentes caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer (Kleypas & Langdon 2006). C'est notamment le cas de la concentration en calcium (Ca<sup>2+</sup>), mais surtout



en ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) qui sont largement impliqués dans le maintien du pH de l'eau de mer et dont la concentration est directement liée à celle du  $\text{CO}_2$  atmosphérique (Fig. 6A) (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Les concentrations en calcium et en ions carbonates peuvent être regroupées en un seul terme, la saturation en aragonites notée  $\Omega_{\text{aragonite}}$  ( $\Omega_{\text{aragonite}} = ([\text{Ca}^{2+}] \times [\text{CO}_3^{2-}]) / K_{\text{sp}_{\text{aragonite}}}$ ; ou  $K_{\text{sp}_{\text{aragonite}}}$  est le produit de solubilité de l'aragonite ; Hoegh-Guldberg *et al.* 2007). A l'heure actuelle, à une concentration en  $\text{CO}_2$  atmosphérique de 380 ppm, l'eau de mer a un  $\Omega_{\text{aragonite}}$  de 3,3 ce qui permet une calcification normale du squelette des scléactiniaires, et un bilan nul entre construction/déconstruction (Kleypas *et al.* 1999; Kleypas & Langdon 2006). L'augmentation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique conduit à une consommation des ions  $\text{CO}_3^{2-}$  et, par conséquent, à une baisse de la valeur de  $\Omega_{\text{aragonite}}$  et du pH (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007). En d'autre terme, une acidification des océans accrue engendrerait une baisse du  $\Omega_{\text{aragonite}}$ , le taux d'érosion du récif dépasserait alors celui de la construction, accélérant ainsi la destruction de certains récifs (Fig. 6B ; Hoegh-Guldberg *et al.* 2007).

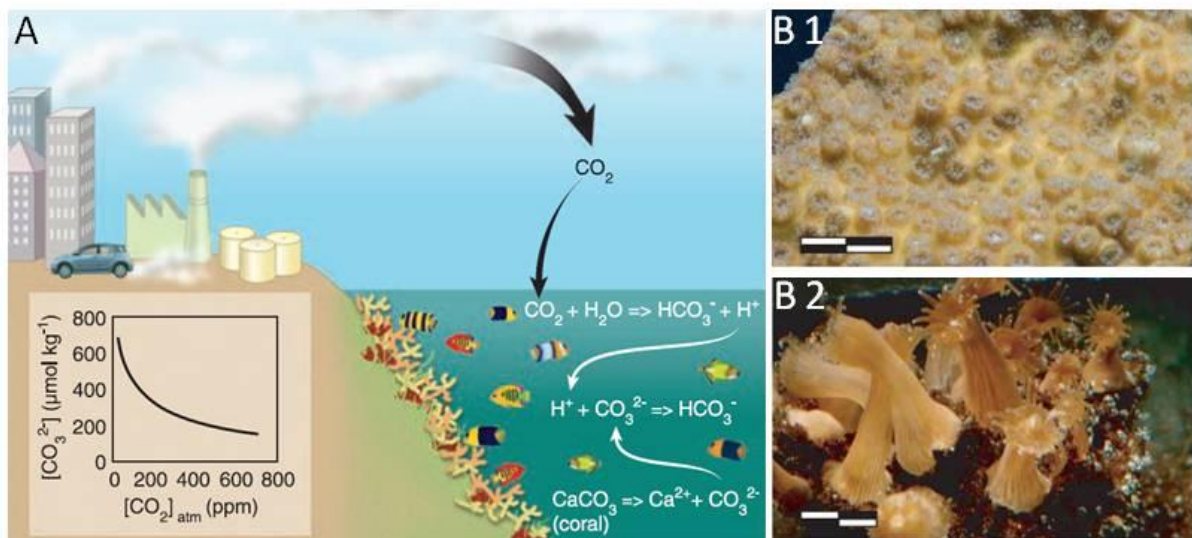


Figure 6 : principaux mécanismes chimiques de l'acidification des eaux océaniques et impact sur les coraux scléactiniaires :

A) Schéma représentant l'ensemble de mécanismes chimiques par lesquels le  $\text{CO}_2$  atmosphérique conduit à une diminution du pH des océans. B) Illustration de l'inversement de la balance construction/déconstruction. B1) Corail maintenu à un pH optimum permettant une bonne calcification. B2) Ce même corail maintenu à un pH très bas, où les taux de calcification sont dépassés par les taux de dissolution du  $\text{CaCO}_3$ , voit son squelette disparaître et ne survit que sous forme de polype. Modifié à partir de Hoegh-Guldberg *et al.* (2010) et Fine & Tchernov (2009).

Si les récifs coralliens ont du faire face aux perturbations naturelles depuis des millénaires, telles que les cyclones ou les explosions démographiques de certains prédateurs, l'augmentation récente de la fréquence et de l'intensité des perturbations d'origine anthropique ne permet plus aux récifs de se rétablir après le passage d'une perturbation, et provoque ainsi des mortalités importantes, parfois massives, des coraux et de nombreux autres organismes du récif (Grigg & Dollar 1990; Adjeroud *et al.* 2002; Bellwood *et al.* 2004; Adjeroud *et al.* 2005). Certaines perturbations physiques conduisent à une dégradation des habitats qui affecte par conséquent la biodiversité générale du récif (Chabanet *et al.* 2005). Enfin, lorsqu'elles sont intenses ou fréquentes, les perturbations naturelles et anthropiques peuvent provoquer une modification de la structure et du fonctionnement des communautés récifales, et conduisent généralement à un déséquilibre de l'écosystème (Done 1992; Knowlton 1992). Ces déséquilibres se manifestent, par exemple, par une transition rapide (en quelques années) d'un écosystème dominé par les coraux à un écosystème dominé par les algues (Fig. 7 ; Hughes 1994; Scheffer *et al.* 2001; Scheffer & Carpenter 2003), ou par des changements radicaux dans les dominances relatives de certaines espèces au sein des groupes fonctionnels clés (Done 1992). A terme, ces déséquilibres entraîneraient une réduction de la productivité et des capacités de résistance et de résilience des récifs (Carr *et al.* 2002; Kiessling 2005; Wooldridge *et al.* 2005).

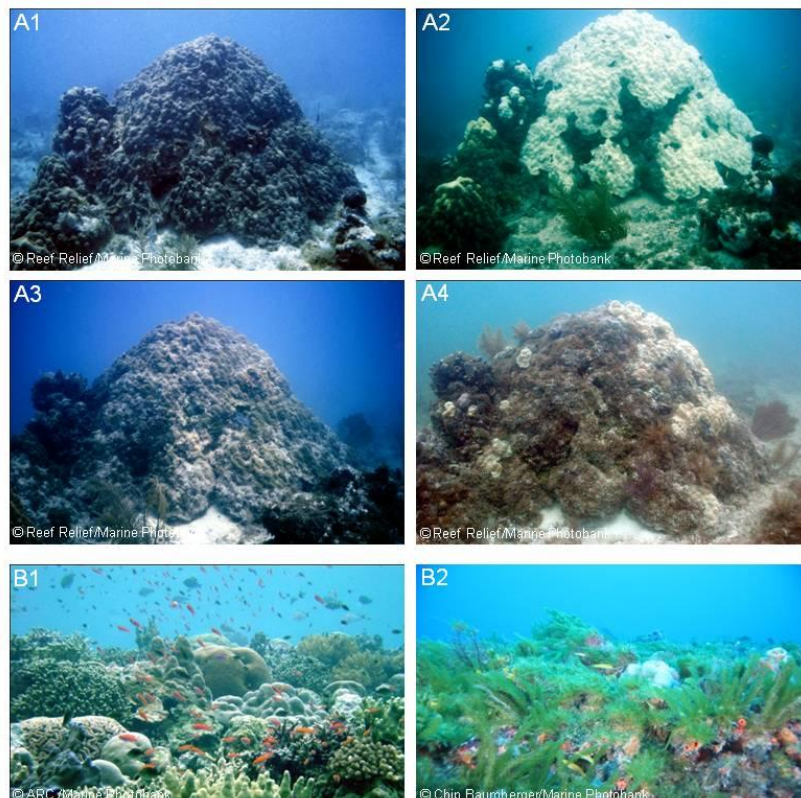


Figure 7 : illustration du phénomène de "changement de phase" (phase shift), qui conduit à un changement dans la dominance des communautés, les coraux étant le plus souvent remplacés par les algues: Série temporelle illustrant un changement dans la dominance des assemblages .A1) en 1996, cette colonie de *Montastraea faveolata*, âgée de plusieurs centaines d'années, est en pleine santé . A2) en 1997, blanchissement complet de la colonie. A3) en 2000, la colonie est partiellement morte suite à l'événement de blanchissement de 1997, l'addition de divers facteurs de stress anthropiques n'a pas permis la recolonisation des parties mortes par les tissus vivants ou par de nouveaux coraux. Les algues commencent à s'installer. A4) en 2005, l'état général de l'écosystème s'est encore dégradé favorisant la compétitivité des algues et réduisant celle des coraux. La colonie de *M. faveolata* est morte, le squelette est maintenant recouvert d'algue. B1) Illustration de l'apparence d'un récif corallien en pleine santé, avec une grande diversité en coraux et en poissons. B2) Illustration d'un récif dont l'équilibre a été modifié, il est maintenant dominé par les algues, la diversité spécifique et fonctionnelle a très largement chuté.

Le dernier bilan de l'état de santé des récifs coralliens à l'échelle mondiale a été publié en 2008, et les résultats sont particulièrement alarmants: 19% des récifs sont irrémédiablement dégradés et ne présentent aucun signe de rétablissement, 20% manifestent tous les symptômes d'une dégradation imminente, et 20% risquent d'être affectés de façon critique dans les décennies à venir (Wilkinson 2008). Cette situation préoccupante est largement due à la récente augmentation de la fréquence et de l'intensité des événements de blanchissement et des épizooties touchant les scléactiniaires (Weil *et al.* 2006; Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Lesser 2007; Knowlton & Jackson 2008; Bourne *et al.* 2009).

#### I.1.2.1 Le blanchissement corallien

Le blanchissement corallien a été évoqué pour la première fois au début du siècle dernier (Vaughan 1914), mais le nombre d'études sur ce phénomène a considérablement augmenté depuis le début des années 80, en relation avec l'augmentation de la fréquence de ces perturbations. Comme défini précédemment, le blanchissement se traduit comme une réponse à un stress environnemental qui induit une série de réponses physiologiques et cellulaires, dont la manifestation la plus significative est la perte des zooxanthelles et/ou de leurs pigments photosynthétiques (Fig. 8 ; Brown 1997; Douglas 2003; Lesser 2004). D'un point de vue quantitatif, il est généralement admis que le blanchissement correspond à une chute d'au moins 50% de la densité en zooxanthelles, chute pour laquelle la dépigmentation devient visible à l'œil nu (Fitt *et al.* 2000).

Cette rupture de la symbiose est une réponse générale à un ou plusieurs stress, qui peuvent être d'origine biotique ou abiotique. Un facteur majeur de blanchissement des coraux est la température. De nombreuses études expérimentales (Hoegh-Guldberg & Smith 1989; Glynn & D'croz 1990; Lesser *et al.* 1990; Iglesia-Prieto *et al.* 1992; Fitt & Warner 1995; Warner *et al.* 1996) ainsi que des observations en milieu naturel (Glynn 1983; Glynn 1984;

Glynn 1993) ont montré que les coraux blanchissent en réponse à des augmentations de température. Néanmoins, des températures anormalement faibles peuvent également conduire au blanchissement. Ces derniers phénomènes ont été observés lors d'événements climatiques exceptionnels ou de marées d'amplitude particulièrement forte (Coles & Fadlallah 1991; Kobluck & Lysenko 1994), et validés par des expériences en milieu contrôlé (Coles & Jokiel 1977; Glynn & D'croz 1990; Muscatine *et al.* 1991; Gates *et al.* 1992). La lumière est également un facteur important dans le déclenchement des phénomènes de blanchissement. Un excès de lumière, que ce soit des rayonnements UV (290-400 nm) ou des intensités excessives (PAR 400-700 nm), peut également induire le blanchissement, comme cela a été démontré lors d'expériences (i) de transplantation de coraux (Fisk & Done 1985; Gleason & Wellington 1993; Brown *et al.* 1994; Gleason & Wellington 1995) ou (ii) en milieu contrôlé (Hoegh-Guldberg & Smith 1989; Lesser 1989; Lesser & Shick 1989; Lesser *et al.* 1990). La salinité peut également être un facteur à l'origine de blanchissement, mais généralement à une échelle locale. Ainsi, lors d'événements cycloniques ou en période de mousson par exemple, la forte chute de la salinité engendrée par des précipitations exceptionnelles associées à ces phénomènes climatiques peut conduire au blanchissement de certaines espèces de coraux (Goreau 1964; Van Woesik *et al.* 1995). La baisse de salinité en tant que facteur inducteur de blanchissement a été validée par des expérimentations en milieu contrôlé (Fang *et al.* 1995). Enfin, d'autres perturbations abiotiques, dont l'impact est généralement plus localisé, peuvent également induire des blanchissements. Citons par exemple l'hypersédimentation, la pollution aux métaux lourds ou à certains composés chimiques retrouvés dans les crèmes solaires (Mous *et al.* 2000; Mitchelmore *et al.* 2002; Mitchelmore *et al.* 2003; Hashimoto *et al.* 2004; Danovaro *et al.* 2008). Concernant les facteurs biotiques, deux bactéries du genre *Vibrio*, *V. shiloi* et *V. coralliilyticus* ont été identifiées comme inductrices du blanchissement des coraux *Oculina patagonica* et *Pocillopora damicornis*, respectivement. Dans les deux cas, un seuil thermique doit être dépassé pour que la virulence bactérienne s'exprime. A noter que l'accession à ce seuil thermique n'est pas à elle seule inductrice de blanchissement (Kushmaro *et al.* 1996; Kushmaro *et al.* 1997; Kushmaro *et al.* 1998; Kushmaro *et al.* 2001; Ben-Haim & Rosenberg 2002; Ben-Haim *et al.* 2003a; Ben-Haim *et al.* 2003b; Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004; Rosenberg 2004; Rosenberg & Falkovitz 2004), c'est donc bien le cumul de la conjonction de ces deux facteurs (bactérie + augmentation de la température) qui est nécessaire pour l'observation des symptômes.

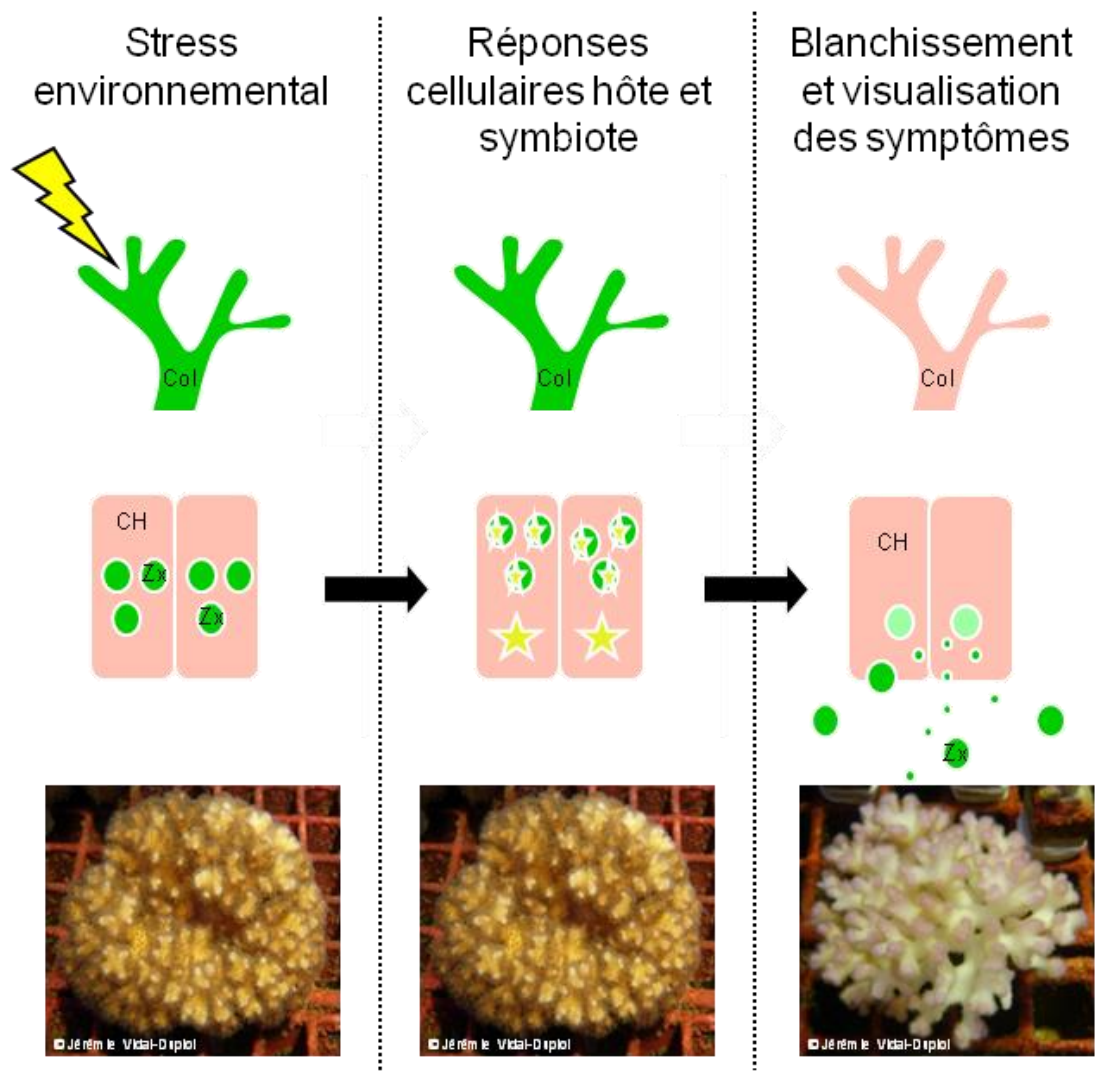


Figure 8 : principales étapes du phénomène de blanchissement chez les coraux scléactiniaires :  
 Le blanchissement peut être fractionné en 3 phases : tout d'abord la colonie est soumise à un stress environnemental (Phase 1), qui va induire des modifications et des réponses au niveau des cellules hôtes et des symbiotes (Phase 2) ; l'ensemble de ces modifications conduit finalement à l'expression des symptômes du blanchissement, la perte des zooxanthelles et/ou de leurs photopigments (Phase 3).

Pour chacun des stress évoqués précédemment, le déclenchement d'un phénomène de blanchissement dépend de l'intensité et de la durée du stress, mais également de toute une série d'évènements antérieurs auxquels l'écosystème a été confronté (Berkelmans 2002; Lesser 2004; Middlebrook *et al.* 2008). Dans ce contexte, plusieurs facteurs de stress peuvent avoir un effet synergique ou additif sur le déclenchement du phénomène de blanchissement. Par exemple, l'effet synergique entre stress thermique et stress lié aux radiations lumineuses a été démontré aussi bien en milieu naturel (Harriott 1985; Brown & Suharsono 1990; Williams & Bunkley-Williams 1990; Brown *et al.* 1995; Mumby *et al.* 2001) qu'en milieu contrôlé (Lesser *et al.* 1990; Glynn *et al.* 1992).

Selon les facteurs de stress impliqués, l'échelle spatiale et les caractéristiques des phénomènes de blanchissement peuvent être très différentes. Ainsi dans le cas d'une bactérie pathogène, la forte spécificité hôte/pathogène induira un blanchissement "ciblé", ne touchant qu'une ou quelques espèces et se limitant généralement à l'échelle d'une portion de récif (échelle locale). En revanche, les pollutions aux métaux lourds et l'hypermédimentation sont beaucoup moins sélectives. Toutes les espèces de la zone concernée sont généralement affectées, mais les blanchissements restent néanmoins localisés aux zones touchées par ce type de stress. Concernant les stress liés aux baisses des températures, de la salinité, ou aux fortes luminosités, les blanchissements induits sont également peu sélectifs, mais peuvent concerner aussi bien l'échelle locale que l'échelle régionale (plusieurs récifs d'une même région). Enfin, le cas extrême concerne l'augmentation des températures saisonnières, capable de déclencher des événements de blanchissement dit "de masse" (*mass bleaching events*), touchant un grand nombre d'espèces et concernant les récifs à une échelle régionale et géographique (globale). Ce fut le cas en 1998, lorsque suite à un phénomène El Niño d'une intensité exceptionnelle, 16% des coraux du globe sont morts (Wilkinson 2000), ou en 2005 quand tous les récifs des Caraïbes furent affectés (Donner *et al.* 2007).

S'il existe de nombreux facteurs de stress qui facilitent ou provoquent des phénomènes de blanchissement corallien, d'autres facteurs abiotiques, en revanche, peuvent atténuer les effets de ces stress, et relever ainsi le seuil de déclenchement des blanchissements. Par exemple, des conditions d'hydrodynamisme fort, en permettant une meilleure évacuation des toxines issues du stress, peuvent atténuer les effets d'un stress thermique, qui seul aurait conduit à un phénomène de blanchissement (Nakamura & van Woesik 2001; Nakamura *et al.* 2005). Un apport en nutriments, qui favorise la nutrition hétérotrophe des coraux, peut dans certains cas permettre une plus grande résistance au blanchissement chez certaines espèces (Grottoli *et al.* 2006). Enfin, il a été démontré que des coraux soumis à des stress mais sans induction de blanchissement devenaient plus résistants, car ces stress provoqueraient l'activation de mécanismes protecteurs qui interviendraient lors d'une réexposition aux mêmes stress (Middlebrook *et al.* 2008). Le déclenchement d'un blanchissement, de même que son intensité et son étendue, dépendra donc de l'intégration d'un ensemble de paramètres qui s'additionnent et se soustraient à différentes échelles comme illustré ci-dessous (Fig 9).

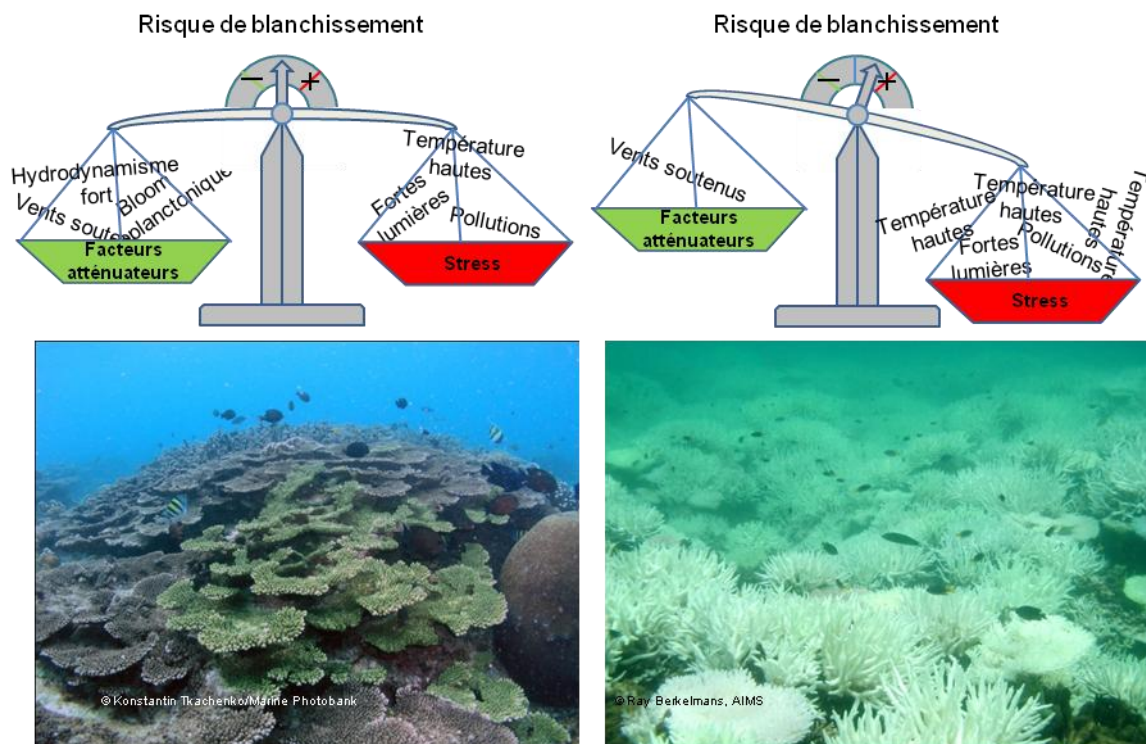


Figure 9 : schématisation de l'équilibre entre facteurs de stress et facteurs atténuateurs dans le déclenchement d'un blanchissement :

Tant que les facteurs atténuateurs sont présents en "quantité" suffisante ou que les facteurs de stress sont trop peu nombreux ou peu intenses, il n'y a pas de blanchissement. En revanche, quand les facteurs de stress sont présents et intenses, et sont « supérieures » aux facteurs atténuateurs, le blanchissement est déclenché.

Les différentes espèces de coraux n'ont pas la même susceptibilité aux facteurs de stress et, par conséquent, présentent des seuils de blanchissement très variables. Loya *et al.* (2001) ont ainsi classé les principaux genres de scléactiniaires en 2 catégories, les "winners" et les "losers". La plupart des coraux de morphologie massive ou encroûtante (*Porites*, *Leptastrea*, *Goniastrea*, *Favites*...; Fig. 10) constitue la première catégorie, celle des espèces plutôt résistantes, alors que la seconde (espèces susceptibles) regroupe principalement les coraux de morphologie branchue (*Pocillopora*, *Stylophora*, *Acropora*...; Fig. 10). Les espèces résistantes sont caractérisées par un blanchissement plus tardif mais également un taux de mortalité plus faible. Cette différence de susceptibilité entre espèces serait principalement liée à l'épaisseur des tissus coralliens. Les espèces résistantes ont des tissus plus épais, permettant une meilleure photo-protection que ceux plus fins des espèces susceptibles (Loya *et al.* 2001). D'autre part, une forme massive ou encroûtante permet un meilleur transfert de masse qu'une forme branchue ou plus complexe, et une meilleure élimination par diffusion des éléments toxiques (Loya *et al.* 2001). La résistance des *winners* pourrait également être liée à une capacité d'hétérotrophie plus importante que celle des *losers*, permettant de mieux supporter l'absence de symbiotes (Grottoli *et al.* 2006). D'autre part, les caractéristiques optiques du

squelette des espèces résistantes conduiraient à une réflexion et à une diffusion de la lumière moins importante que chez les espèces susceptibles, diminuant de fait l'impact synergique des facteurs température et lumière (Enriquez *et al.* 2005; Terán *et al.* 2010; Turzhitsky *et al.* 2010). Enfin, il a été montré que certaines espèces résistantes, investissaient au préalable plus d'énergie dans le maintien d'éléments protecteurs (protéine chaperonne HSP 70 et détoxifiante de type superoxyde dismutase) à des taux relativement élevés (Fitt *et al.* 2009).

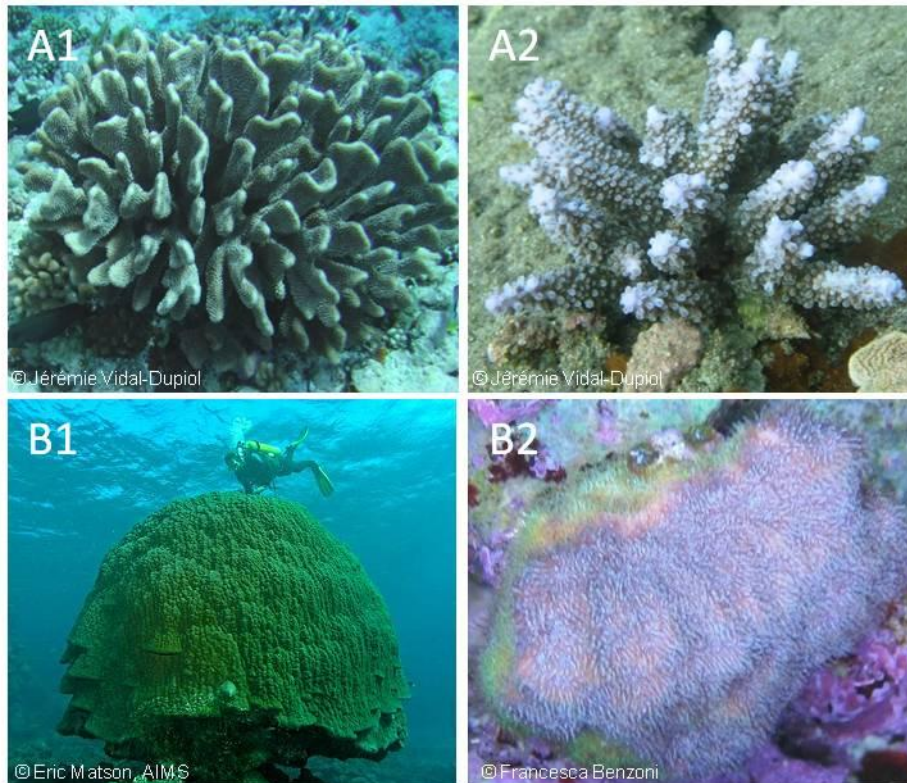


Figure 10 : illustration de quelques coraux résistants ou susceptibles (winners et losers) : *Pocillopora* sp. (A1) et *Acropora* sp. (A2) font partie des coraux susceptibles, alors que *Porites* sp. (B1) et *Psammocora* sp. (B2) sont des coraux résistants aux stress conduisant au blanchissement.

Aux échelles locales et régionales (10 à 1000 km), la susceptibilité des communautés coralliennes au blanchissement semble généralement conservée d'un événement à l'autre. C'est ce que démontre une étude menée sur la Grande Barrière de corail australienne : les secteurs récifaux principalement affectés par le blanchissement de 1998 ont été affectés de manière similaire par l'évènement de 2002, et inversement les secteurs et les coraux épargnés en 1998 n'ont pas été affectés en 2002 (Berkelmans *et al.* 2004). Cependant, cette homogénéité des *patterns* spatiaux de l'impact de blanchissements successifs que l'on rencontre dans certains récifs, ne doit pas être confondue avec l'hétérogénéité spatiale de l'impact d'un événement de blanchissement. En effet, l'impact d'un blanchissement, en termes de colonies affectées et de



mortalité subséquente, peut être très variable à l'échelle locale (entre différentes profondeurs à un même site, ou entre différents sites d'une même localité), en fonction des conditions environnementales locales (Penin *et al.* en révision).

A l'échelle des assemblages d'espèces, des blanchissements récurrents modifient généralement la structure et la composition de ces assemblages, en favorisant la dominance des espèces résistantes (*winner*s) au détriment des espèces sensibles (*loser*s). Ainsi, sur l'île de Moorea en Polynésie française, qui a subi cinq épisodes de blanchissement, deux cyclones et une explosion démographique du corallivore *Acanthaster planci* depuis 1991, les assemblages coralliens anciennement dominés par les genres *Acropora* et *Pocillopora* sont aujourd'hui largement dominés par les coraux du genre *Porites*, particulièrement résistants à ces perturbations (Adjeroud *et al.* 2009).

Lors d'événements de blanchissement, il est fréquemment observé que certaines colonies blanchissent et meurent, alors que d'autres colonies de la même espèce et distantes de quelques mètres seulement ne sont pas affectées (Fig. 11 ; Brown & Suharsono 1990). Par ailleurs, certaines études ont montré que des blanchissements successifs sur un même récif avaient des impacts décroissants sur les coraux, en termes de susceptibilité et de mortalité (Maynard *et al.* 2008). Ces observations sont à l'origine de "l'hypothèse du blanchissement adaptatif" (*Adaptive Bleaching Hypothesis* ; ABH). Sur la base d'approche phylogénétique, l'espèce *Symbiodinium microadriaticum*, symbiote des coraux scléactiniaires, peut être séparée en 8 clades (noté de A à H) puis sous-clades (Rowan & Powers 1991; Pochon *et al.* 2006). Classiquement, les scléactiniaires forment une symbiose avec les zooxanthelles des clades A, B, C et D, bien que des symbiotes appartenant aux clades F et G aient été rencontrés chez quelques coraux hermatypiques (Pochon *et al.* 2006). Outre ces différences génétiques, les différents clades présentent également des différences dans leurs caractéristiques physiologiques (Iglesia-Prieto & Trench 1994; Banaszak & Trench 1995; Baker 2003), notamment vis-à-vis de leur résistance face au stress thermique (Takahashi *et al.* 2009). L'ABH suggère que le blanchissement serait un mécanisme adaptatif de l'hôte, qui lui permettrait de modifier sa population symbiotique pour une meilleure adaptation aux changements environnementaux, et notamment aux stress thermiques (Buddemeier & Fautin 1993; Baker 2001; Buddemeier *et al.* 2004; Fautin & Buddemeier 2004). Cette hypothèse a généré des discussions et des débats enflammés au sein de la communauté scientifique (Hoegh-Guldberg *et al.* 2002). Une étude suggère que seulement 23% des espèces de coraux constructeurs de récifs seraient potentiellement capables d'accepter un autre clade (Goulet 2006), et dans le cas où ils en sont capables, la symbiose semble instable (Coffroth *et al.*

2010). Force est de constater que malgré la redondance des évènements de blanchissement, finalement peu d'exemples de modification des populations symbiotiques ont été publiés (Berkelmans & van Oppen 2006; Jones *et al.* 2008).



Figure 11 : variabilité de la susceptibilité au blanchissement chez des coraux d'un même genre : Sur cette photographie, 3 colonies d'*Acropora* sont présentes : une est complètement saine (à gauche), une a partiellement blanchi (en bas à droite), et une a complètement blanchi (en haut à droite). De telles différences ne sont pas rares, mais ne sont pas encore bien comprises.

#### *Mécanismes cellulaires et moléculaires du blanchissement, du stress aux symptômes*

Il est aujourd'hui bien admis que sous l'action d'un stress lumineux ou thermique, le premier mécanisme moléculaire initié est le stress oxydatif issu de la surproduction de radicaux libres oxygénés (ROS) par les zooxanthelles (Lesser 2006; Venn *et al.* 2008; Weis 2008). Des températures élevées ou un excès de lumière induisent chez les symbiotes un phénomène de photoinhibition généré par des dommages du chloroplaste et de l'appareil photosynthétique. Trois mécanismes intimement liés, sont à l'origine de ces dommages et dysfonctionnements (Lesser 2006; Venn *et al.* 2008; Weis 2008).

1) La protéine D1, constituant du centre réactionnel du photosystème II, est très facilement dénaturée. En temps normal, un système de réparation est présent et permet de maintenir une activité photosynthétique optimale. Cependant sous l'action de hautes températures, la protéine D1 est endommagée, de même que les mécanismes de réparation qui ne peuvent plus assurer pleinement leurs fonctions (Warner *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2004; Takahashi *et al.* 2008). Ces dommages de la protéine D1 induisent un maintien des

photosystèmes II dans leur forme excitée ainsi que leur dysfonctionnement (Warner *et al.* 1999).

2) Il a également été proposé que la phase non-photochimique de la photosynthèse (cycle de Calvin, ou phase sombre) soit affectée, puisque la fixation du carbone diminue lors de stress lumineux ou thermiques (Jones *et al.* 1998). Le site affecté au niveau de cette étape semble être l'enzyme responsable de la fixation du carbone, la ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase ou Rubisco (Lesser 1996). Ce dysfonctionnement résulte d'une diminution de la consommation d'ATP et de NADPH qui sont produits lors de la phase photochimique de la photosynthèse (phase claire), et qui conduit de nouveau à des dysfonctionnements du photosystème II *via* leur maintien dans leur forme excitée (Jones *et al.* 1998; Venn *et al.* 2008).

3) Les stress thermiques et lumineux peuvent également endommager directement la membrane des thylakoïdes (Tchernov *et al.* 2004), causant une rupture dans la chaîne de transport des électrons au sein des deux photosystèmes. Au final, l'appareil photosynthétique continue de générer des électrons mais ne produit plus d'ATP ni de NADPH. Cet excès d'électrons, lié à n'importe lequel de ces 3 mécanismes, conduit au final à la genèse incontrôlée de ROS dans le symbiote. En effet, les électrons en excès vont réduire l'O<sub>2</sub> (au lieu du NADPH) issu de la réaction de Melher et conduire à la production d'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup> ; Tchernov *et al.* 2004). Cet ion pourra alors être réduit par une enzyme de type superoxyde dismutase (SOD), en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) moins réactif mais toujours cytotoxique (Jones *et al.* 1998; Lesser 2006). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut, à son tour, réagir avec un ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>) et produire l'élément oxydant le plus actif, l'ion hydroxyle OH<sup>-</sup>. De plus, les électrons toujours en excès, peuvent de manière photochimique réagir, avec l'oxygène et former l'élément très réactif <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Lesser 2006), ce qui augmentera le stress oxydant en causant à nouveau des dommages de la protéine D1 et des pigments photosynthétiques (Venn *et al.* 2008). L'ensemble de ces phénomènes est synthétisé dans la figure 12.

Ces ROS peuvent bien évidemment être pris en charge par les systèmes de détoxification (ROS scavengers : SOD, peroxydase, ...), cependant les dommages croissants des photosystèmes entraînent une production de ROS qui déborde les systèmes de détoxification de la zooxanthelle et les ROS finissent donc par s'accumuler (Lesser 1996; Franklin *et al.* 2004). Les ROS (notamment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diffusent alors dans les tissus hôtes, où ils induisent de multiples dommages qui combinés, déclenchent le blanchissement (Weis 2008). Si la zooxanthelle est la principale source de ROS, les stress lumineux ou thermiques génèrent également la production d'éléments oxydants directement dans les cellules coralliennes,

notamment au sein de la mitochondrie (Dykens *et al.* 1992; Nii & Muscatine 1997). En réponse, le corail induit une réponse anti-oxydante au travers de diverses enzymes telles que des superoxydes dismutases, des peroxydases ou des catalases, mais aussi via le glutathion (Richier *et al.* 2006; Merle *et al.* 2007; Richier *et al.* 2008). L'induction de ces fonctions de détoxification est généralement insuffisante pour lutter contre ce stress oxydant intense, et les ROS finissent par induire des dommages au niveau de l'ADN (Lesser & Farrell 2004), des protéines, des lipides et des membranes (Richier *et al.* 2005).

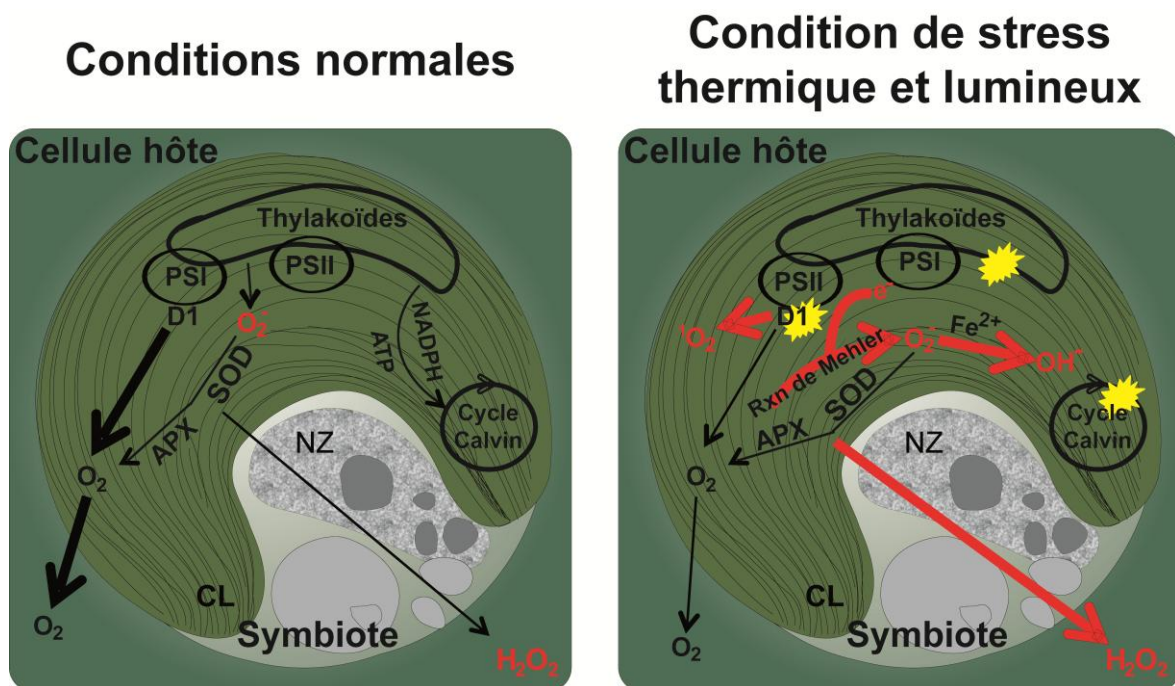


Figure 12 : modifications induites chez le symbiote en condition de stress thermique et lumineux :

Ce schéma représente les voies de production de l'O<sub>2</sub> chez une zooxanthelle contenues dans la cellule hôte, en condition normale (A), et en condition de stress thermique et lumineux (B). En condition normale les systèmes photosynthétiques, photosystème I (PSI) et II (PSII) localisés sur les thylakoïdes, fonctionnent normalement et produisent de grandes quantités d'O<sub>2</sub> qui diffusent dans l'hôte. Des ROS (en rouge sur la figure) sont également produits, mais en quantité suffisamment faible pour pouvoir être quasi intégralement pris en charge et convertis en O<sub>2</sub> par les systèmes de détoxification (Superoxyde Dismutase (SOD) et Ascorbate Peroxydase (APX)). Sous l'action d'un stress thermique et lumineux, l'appareil photosynthétique est endommagé en 3 points ("Flash" jaunes sur la figure) : au niveau de la protéine D1 (D1) du PSII ; au niveau du cycle de Calvin ; et au niveau de la membrane des thylakoïdes. Ces dommages conduisent à une surproduction de ROS (en rouge sur la figure) qui va dépasser les capacités de détoxification des SOD et APX. Finalement, les O<sub>2</sub><sup>-</sup> sont convertis en OH<sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui vont pouvoir diffuser dans les cellules hôtes. Figure adaptée de Weis (2008) et Venn *et al.* (2008).

Pour Down *et al.* (2002), le stress oxydant est le principal déclencheur du blanchissement des coraux : les zooxanthelles génèreraient, sous l'action de stress divers, une quantité telle de ROS que le seul moyen pour les hôtes de survivre serait de se séparer de leurs symbiotes ("hypothèse oxydative du blanchissement corallien" ; Downs *et al.* 2002).

Cette hypothèse est largement étayée par de nombreuses études portant sur la quantification des ROS lors du blanchissement (Lesser *et al.* 1990; Trapido-Rosenthal *et al.* 2001; Downs *et al.* 2002; Trapido-Rosenthal *et al.* 2005; Perez & Weis 2006; Flores-Ramirez & Linan-Cabello 2007) ou sur les régulations transcriptomiques et protéomiques induites par les ROS (Yakovleva *et al.* 2004; Richier *et al.* 2006; Merle *et al.* 2007; Desalvo *et al.* 2008).

A ce jour, ces premières étapes liées au stress oxydant, sont relativement bien caractérisées, et constituent très probablement le déclencheur moléculaire du blanchissement. Les voies ou mécanismes activés par la suite et conduisant à la rupture de la symbiose restent, quant à eux, beaucoup moins connus, et plus hypothétiques. Cependant, des travaux récents (Weis 2008), placent l'oxyde nitrique (NO) au centre du processus moléculaire conduisant à l'expression des symptômes du blanchissement. Les NO peuvent jouer un double rôle au sein d'une cellule : d'une part, leur caractère oxydatif peut induire des dommages cellulaires, mais ils sont également un élément clef des voies de signalisation, notamment lors d'interactions entre hôtes et pathogènes (Fang 2004). Chez l'anémone symbiotique *Aiptasia pallida*, la concentration en NO augmente considérablement sous l'effet d'un stress thermique ou d'un inhibiteur de la photosynthèse bloquant les photosystèmes II (Perez & Weis 2006). De plus, l'ajout de NO dans des anémones maintenues à des températures normales induit un blanchissement (Perez & Weis 2006), expérience confirmant l'implication de cet élément dans les mécanismes du blanchissement. La production de NO est dépendante d'une enzyme, la *nitric oxide synthase* (NOS), qui va, à partir d'arginine, de NADPH et d'O<sub>2</sub>, catalyser la formation de NO (Fang 2004; Weis 2008). L'origine (corail ou zooxanthelle) des NO n'est pas, à ce jour, bien définie et des résultats contradictoires ont été publiés. Perez & Weis (2006) concluent sur une origine purement animale de la production de NO, alors que d'autres travaux ont montré la présence de NO ainsi qu'une activité NOS-like dans des zooxanthelles de culture stressées par des hautes températures ou fraîchement isolées des tissus coralliens semi-blanchis (Trapido-Rosenthal *et al.* 2001; Trapido-Rosenthal *et al.* 2005; Bouchard & Yamasaki 2008). Le processus d'induction de NOS reste hypothétique, mais en ce qui concerne la partie hôte, Weis (2008) lie cette activation à la voie immunitaire NF-κB, connue pour être stimulée notamment par des stress oxydants. A ce jour, la voie de signalisation NF-κB n'a jamais été caractérisée chez les scléactiniaires. Cependant, de nombreuses protéines présentant des similarités pour des protéines connues pour participer à cette voie chez d'autres espèces ont été identifiées *in silico* chez certains cnidaires symbiotiques (Miller *et al.* 2007; Kimura *et al.* 2009) (Souter *et al.* 2010). Par ailleurs, des facteurs classiquement sous le contrôle de la voie NF-κB, tel que le facteur C3 du complément, ont été identifiés chez

*Acropora millepora* (Kvennefors *et al.* 2010). Du côté de la zooxanthelle, la production de NO en condition de stress thermique serait liée aux dysfonctionnements du système photosynthétique, qui induirait une accumulation de nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) au sein du cytoplasme lesquels seraient convertis en NO par une nitrite réductase (Bouchard & Yamasaki 2008). Une origine mitochondriale et chloroplastique, selon le même schéma, a également été avancée (Bouchard & Yamasaki 2008). Les NO diffusant relativement facilement au travers des membranes (Bouchard & Yamasaki 2008; Weis 2008) se retrouvent, dans tous les cas, présents au niveau des cellules hôtes. A partir d'une approche comparative avec d'autres modèles, Perez & Weis (2006) proposent que les NO et les ions  $\text{O}_2^-$  produits par les zooxanthelles, mais aussi les mitochondries hôtes, se combinent pour former l'ion peroxy-nitrite  $\text{ONOO}^-$ , diffusant très facilement au travers des membranes (Pacher *et al.* 2007). Ce dernier induit alors des dommages au niveau des membranes des mitochondries qui, en réponse, relarguent des éléments pro-apoptotique initiant la cascade apoptotique (l'un des mécanismes connu de la perte des zooxanthelles) *via* l'induction de *p53* (Weis 2008).

Si la voie oxydative a été bien documentée au cours des deux dernières décennies, les modifications de l'expression des gènes induites par les blanchissements restent encore mal connues, et les quelques travaux à ce sujet sont très récents. Dans la plupart des cas, il s'agit d'études comparant le transcriptome de coraux stressés ou blanchis à celui de coraux sains et non stressés, ou encore entre celui d'anémones symbiotiques et aposymbiotiques. Dans un premier temps, il a été démontré que des chocs ou des stress thermiques à l'origine de blanchissements expérimentaux conduisaient à l'induction de gènes codant des protéines de la famille des *Heat Shock Protein* (HSP), protéines chaperonnes impliquées notamment dans le maintien de la structure des protéines soumises à des conditions dénaturantes. Ces études menées sur un large panel d'espèces, d'abord ciblées sur certains gènes, (Black *et al.* 1995; Hayes 1995; Sharp & Brown 1997; Tom *et al.* 1999; Chow *et al.* 2009) ont par la suite été confirmées par des approches plus globales chez *P. damicornis* (Hashimoto *et al.* 2004), *Montastraea faveolata* (Desalvo *et al.* 2008) et *Acropora millepora* (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009). Toutes trois ayant été stressées par la température sans qu'il y ait dissociation de la symbiose. Il a été montré par ailleurs que le métabolisme général de la cellule corallienne (métabolisme énergétique, synthèse protéique, transcription) était également affecté par les stress inducteurs de blanchissement (Edge *et al.* 2005; stress : Température, salinité, lumière chez *M. faveolata* ; Desalvo *et al.* 2008; Température chez *A. millepora* ; Voolstra *et al.* 2009; Température chez *M. faveolata*). De la même manière, le stress induit l'arrêt ou le ralentissement de fonctions non essentielles à la survie, telle que la calcification (Desalvo *et*

al. 2008). La chute dans la disponibilité en énergie consécutive à la réponse au stress pourrait être responsable de l'inhibition de ces différentes fonctions "non essentielles à la survie", probablement via un mécanisme de type "trade off". Cependant, la baisse de l'expression de certains gènes potentiellement impliqués dans la fonction immunitaire montre un effet potentiel du blanchissement sur des fonctions importantes pour la survie (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009). En contre-partie et compte tenu du stress oxydant intense subi, les gènes impliqués dans les fonctions de détoxification sont induits comme attendus lors du blanchissement (Desalvo *et al.* 2008; Voolstra *et al.* 2009). Dans une approche transcriptomique utilisant la technologie des puces à ADN et menée sur *Montastraea faveolata*, Desalvo *et al.* (2008) ont mis en évidence une altération en profondeur des voies contrôlant l'homéostasie du  $Ca^{2+}$ . En effet, la répression de plusieurs gènes liés à ces voies a été mise en évidence dans cette étude. Compte tenu du rôle majeur du  $Ca^{2+}$  en tant que messager intracellulaire, cette équipe a proposé le modèle suivant : le stress thermique conduirait à une augmentation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$ , ce qui induirait des modifications dans l'arrangement du cytosquelette, une diminution de l'adhésion cellulaire et l'initiation des voies apoptotiques et nécrotiques (Desalvo *et al.* 2008). A noter que ces 3 dernières fonctions présentent également des modifications dans l'expression de leurs gènes lors du blanchissement (Desalvo *et al.* 2008; Voolstra *et al.* 2009). D'autres études s'intéressant aux mécanismes de régulation de la symbiose ont également permis de conforter certaines des hypothèses émises précédemment. C'est le cas d'un travail portant sur le gène *Sym 32* codant une protéine contenant un domaine fasciclin (Reynolds *et al.* 2000). Ce gène, différenciellement exprimé entre l'état symbiotique et aposymbiotique chez l'anémone *Antopleura elegantissima* (Reynolds *et al.* 2000) code une protéine localisée dans la membrane du symbiosome (Schwarz & Weis 2003) laquelle serait impliquée dans les interactions entre cellules hôtes et symbiotiques (Reynolds *et al.* 2000; Schwarz & Weis 2003). De plus, lors de l'exposition de l'anémone symbiotique à des concentrations croissantes de cadmium (inductrices de blanchissement), le gène *Sym32* est réprimé (Mitchelmore *et al.* 2002).

Un schéma synthétique regroupant les principales modifications accompagnant la photoinhibition et la rupture de la symbiose chez les cnidaires est présenté figure 13. La multiplicité des approches réalisées ces dernières années a donc permis de progresser dans la compréhension des bases moléculaires de ces phénomènes. Malheureusement, ces données restent encore fragmentaires principalement à cause du manque de données de séquence et du manque de connaissances et d'outils permettant d'analyser la fonction des gènes hôtes ou

symbiotes clés de ces phénomènes. Ces limitations devraient rapidement s'estomper compte tenu du lancement récent de nombreuses études transcriptomiques de scléactiniaires (Kortschak *et al.* 2003; Schwarz *et al.* 2008; Meyer *et al.* 2009), d'anémones symbiotiques (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2006a; Sabourault *et al.* 2009) ou de zooxanthelles (Leggat *et al.* 2007b). De même, les séquençages actuels du génome d'*Acropora millepora* et d'un clade de zooxanthelles mettront à disposition de la communauté des outils indispensables à la compréhension des mécanismes évoqués précédemment.

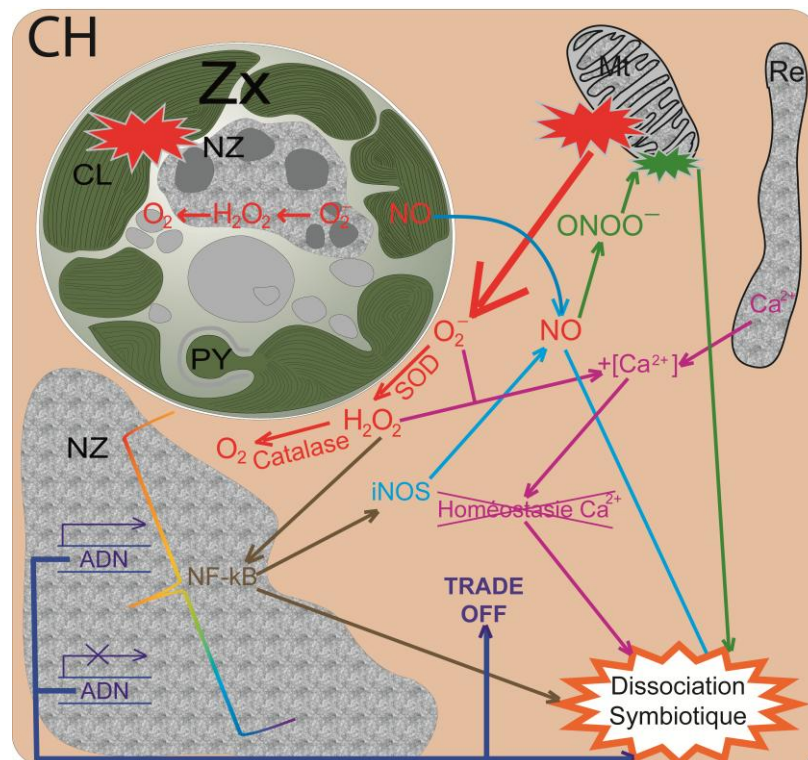


Figure 13 : principaux mécanismes moléculaires induits par le stress oxydant et conduisant à la dissociation de la symbiose chez les coraux :

Suite au dépassement des capacités de détoxification des ROS générées par un stress lumineux et thermique chez les zooxanthelles (Fig. 12) certains ROS (en rouge sur la figure) diffusent dans la cellule hôte. Ces ROS vont pouvoir activer la voie NF-kB qui active à son tour la voie apoptotique et, directement ou indirectement, la voie iNOS qui produit des NO. Via une autre voie, des NO sont produits dans le symbiote et diffusent dans la cellule hôte. Les NO vont ensuite réagir avec d'autres ROS pour former les ions ONOO<sup>-</sup> qui endommagent la membrane de la mitochondrie. Ces dommages vont induire le relargage d'éléments pro-apoptotiques et conduire de concert avec la voie NF-kB à l'activation de l'apoptose, un des mécanismes de la dissociation de la symbiose. Dans le même temps, le stress oxydant va induire un dérèglement de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> dont la concentration va drastiquement augmenter dans le cytoplasme. Cet accroissement va conduire à des modifications de l'adhésion cellulaire et des réarrangements du cytosquelette, tous deux potentiellement impliqués dans les mécanismes de perte des symbiotes. Pris dans leur ensemble, la rupture de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> et le stress oxydant vont induire une très grande diversité de réponses transcriptomiques, avec l'induction de gènes protecteurs (HSP SOD...) et la répression d'autres fonctions (calcification, immunité...), le tout s'articulant certainement autour d'un mécanisme général de type trade off. Figure adaptée à partir de Weis (2008) et de Desalvo *et al.* (2008).



Comme pour d'autres phases du processus du blanchissement, les mécanismes par lesquels s'opère la perte des zooxanthelles sont relativement bien caractérisés. Cette perte peut s'effectuer selon 5 voies principales, non exclusives, et qui sont mises en place en fonction de l'intensité du stress environnemental (Fig. 14 ; Weis 2008).

1) La première voie consiste en une dégradation *in situ* des zooxanthelles. Des observations microscopiques de coraux ou d'anémones blanchis naturellement (Brown *et al.* 1995; Ainsworth & Hoegh-Guldberg 2008) ou expérimentalement (Dunn *et al.* 2004; Franklin *et al.* 2004; Strychar *et al.* 2004) ont montré des symbiotes apparemment dégradés au sein même des cellules hôtes (Fig. 14). Cette dégradation pourrait faire intervenir au moins 2 mécanismes. Le premier serait la mort cellulaire programmée, une voie spécifique des organismes unicellulaires partageant de nombreuses caractéristiques avec l'apoptose des métazoaires. Cette hypothèse a largement été étayée par des observations histologiques (Dunn *et al.* 2002), mais il a également été montré que des stress thermiques sévères déclenchaient un deuxième mécanisme dit de nécrose cellulaire (Dunn *et al.* 2004; Franklin *et al.* 2004; Strychar *et al.* 2004). Ce deuxième mécanisme impliquerait la destruction du symbiote par digestion. Des études récentes portant sur les protéines de la famille Rab GTPase impliquées dans la régulation du trafic des vésicules intra-cytoplasmiques, ont montré que lors d'un stress thermique les lysosomes fusionnaient avec les symbiosomes conduisant à la digestion des symbiotes (Chen *et al.* 2005). De plus, des études récentes ont montré que des stress lumineux ou thermiques pouvaient induire de l'autophagie dirigée contre le symbiosome et conduisant donc à la digestion du symbiote (Dunn *et al.* 2007b; Downs *et al.* 2009). Ce mécanisme a été nommé symbiophagie (Downs *et al.* 2009).

2) La perte des zooxanthelles par exocytose représente un autre mécanisme qui conduit à la rupture de la symbiose chez les anémones et les scléactiniaires (Fig. 14). Des approches microscopiques ont montré non seulement la présence de zooxanthelles libres dans la cavité gastrique mais aussi des figures d'exocytose dans des échantillons blanchis (Steen & Muscatine 1987; Brown *et al.* 1995). De plus, des études du cytosquelette et de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire chez *Acropora grandis* ont montré une grande activité d'exocytose durant le blanchissement (Fang *et al.* 1997; Huang *et al.* 1998).

3) D'autres études ont également montré que le blanchissement pouvait être associé à un détachement complet de l'unité symbiotique, la cellule hôte contenant la zooxanthelle (Fig. 14 ; Gates *et al.* 1992; Brown *et al.* 1995). Ces résultats sont également basés sur des observations histologiques, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas été

identifiés. Il se pourrait toutefois que ce détachement ne soit qu'une conséquence de la mort de la cellule hôte qui conduit à la déstabilisation des tissus (Weis 2008).

4) Par ailleurs, l'apoptose de la cellule hôte est aussi un mécanisme qui pourrait expliquer la perte de zooxanthelles. L'apoptose est connue pour être impliquée dans l'élimination de cellules endommagées ou infectées. Plusieurs études ont montré l'activation de cette voie chez des anémones ou des sclérouctiniaires soumis à des stress lumineux et thermiques (Dunn *et al.* 2004; Lesser & Farrell 2004; Richier *et al.* 2006). Ces études ont mis en évidence une augmentation de l'activité des caspases, de la fragmentation de l'ADN, de la vacuolisation, de la condensation chromatiniennne et du nombre de corps apoptotiques. L'apoptose des cellules contenant les zooxanthelles conduirait à la diminution de la proportion de zooxanthelles associées aux tissus coralliens (Fig. 14).

5) La dernière des 5 voies est la nécrose cellulaire chez l'hôte (Fig. 14). Contrairement à l'apoptose elle est incontrôlée et n'utilise pas de voie moléculaire particulière. A terme, elle conduit généralement à une rupture de l'homéostasie des tissus et à une désagrégation des cellules du corail. Cette nécrose conduit également au rejet des zooxanthelles associées aux cellules hôtes. Il a été démontré, suite à des expériences appliquant différents degrés de stress thermique, que ce mécanisme de nécrose était uniquement présent lors de stress intenses et de longue durée, l'apoptose étant "préférée" lors de stress de moindre intensité (Dunn *et al.* 2004).

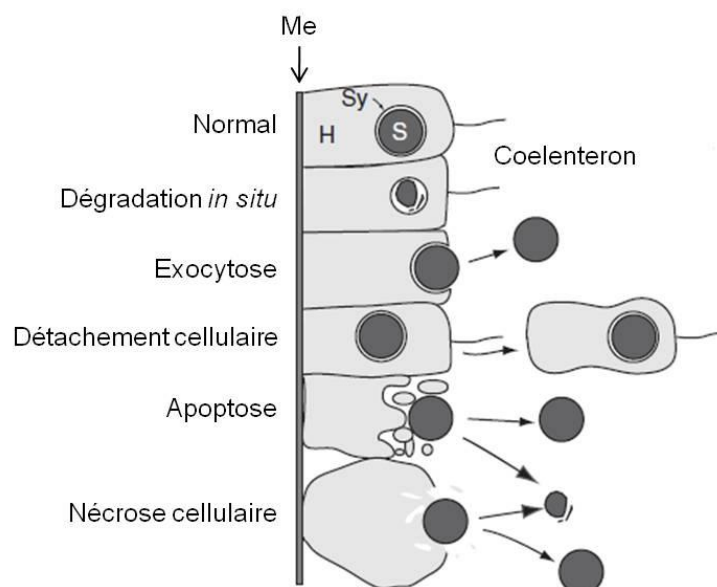


Figure 14 : 5 principaux mécanismes de dissociation de la symbiose identifiés à l'heure actuelle : 1) dégradation *in situ* ; 2) exocytose ; 3) détachement cellulaire ; 4) apoptose ; 5) nécrose cellulaire. Me, mésoglée ; H, cellule hôte ; S, symbiote ; Sy, symbiosome. Adaptée de Weis (2008).

### I.1.2.2 Les maladies coralliennes

Les premières observations de maladies affectant les scléactiniaires ont été publiées au début des années 70 pour les récifs des Caraïbes (Antonius 1973; Garrett & Ducklow 1975), au milieu des années 80 pour ceux de l'Indo-Pacifique (Antonius 1985). Aujourd'hui, l'impact de ces épizooties est un élément majeur pour la dynamique et le maintien des récifs coralliens (Weil *et al.* 2006; Harvell *et al.* 2007; Bourne *et al.* 2009). Cet impact est d'autant plus important qu'il est associé à celui d'autres perturbations majeures affectant l'écosystème corallien, comme les cyclones, les blanchissements ou les explosions démographiques de prédateurs de coraux (Fig. 15). Les recherches sur les maladies coralliennes sont relativement récentes, mais de plus en plus d'équipes se sont consacrées à ce sujet, démontrant une fois de plus l'importance de ces épizooties dans le fonctionnement des récifs coralliens.

Comparativement aux récifs de l'Indo-Pacifique, ceux de l'Atlantique, qui présentent une diversité spécifique en scléactiniaires largement inférieure, ont été les plus touchés (Harvell *et al.* 2007). La prévalence totale (proportion de colonies malades à un instant t, toutes maladies et toutes espèces d'hôtes confondues) est de 20% (Jordan-Dahlgren *et al.* 2005; Ward *et al.* 2006; Weil *et al.* 2006) dans les zones les plus touchées des Caraïbes, contre 8% aux Philippines et moins de 5% en Australie, à Palau ou en Afrique de l'Est (Weil *et al.* 2002; Willis *et al.* 2004; Raymundo *et al.* 2005; Page & Willis 2006).

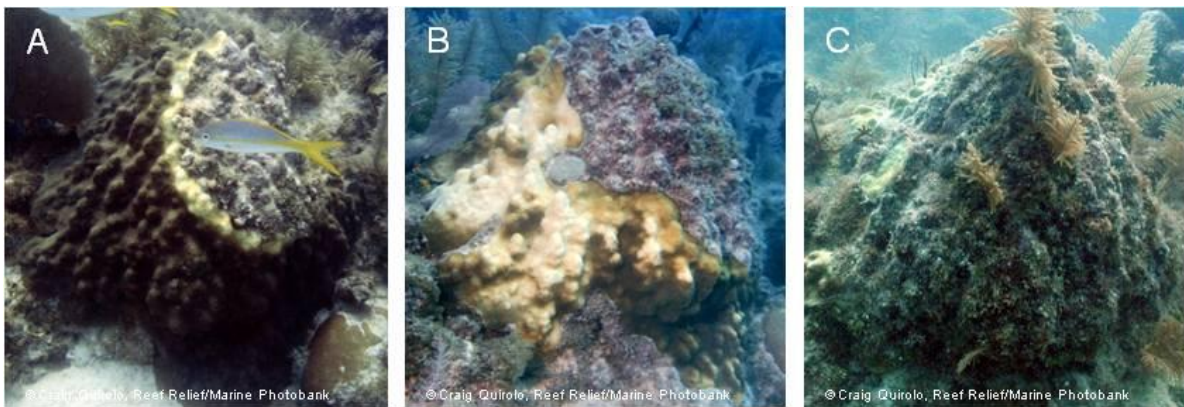


Figure 15 : impact d'une maladie sur l'état de santé d'une colonie corallienne :  
Comme pour d'autres perturbations, les maladies coralliennes peuvent être source de destructions importantes notamment lorsqu'elles touchent des secteurs déjà affaiblis. Cette série temporelle montre l'évolution de la maladie de la bande jaune sur *Montastraea faveolata*. A) en 1994, la colonie de *M. faveolata* présente une mortalité de près de 1/3 de sa surface. B) en 1997, la mortalité s'étend, et touche une grande partie de la surface de la colonie. C) en 2005, la colonie est complètement morte, et sa surface est entièrement recouverte d'algues.

Jusqu'à présent, 18 maladies coralliennes ont été répertoriées. Plus ou moins spécifiques de leurs hôtes, ces maladies sont nommées et identifiées à partir des symptômes observés (Harvell *et al.* 2007). Cette démarche engendre parfois une grande confusion entre les observations, ce qui rend difficile les suivis épidémiologiques (Harvell *et al.* 2007). Sur l'ensemble de ces 18 maladies, 11 touchent les récifs des Caraïbes, 7 les récifs Indo-Pacifiques et 1 maladie concerne les coraux scléactiniaires à zooxanthelles de Méditerranée (Harvell *et al.* 2007). Au total, ce sont 45 espèces des coraux scléactiniaires qui ont été observées affectées par l'une de ces pathologies (Harvell *et al.* 2007). Pour 9 espèces, des agents pathogènes ont été identifiés mais 4 seulement répondent au postulat de Koch<sup>3</sup>. Les agents infectieux identifiés sont principalement des bactéries (toutes GRAM-), dont plus de 50% sont des *Vibrio*, mais des cas d'infection par des ciliés (protozoaire), un trématode digène, un groupe de cyanobactérie, et une algue ont également été répertoriés (Harvell *et al.* 2007). Il est également important de noter qu'au moins 3 des 18 maladies décrites sont issues de polyinfections pouvant impliquer plus de 50 espèces différentes, comme dans le cas de la maladie de la bande noire (Sekar *et al.* 2006). L'état d'avancement des connaissances concernant les 18 maladies coralliennes et leurs agents pathogènes est présenté dans le tableau 1. Outre la caractérisation des agents pathogènes, celle des réservoirs et des vecteurs en est également à ses débuts. Jusqu'à présent, deux réservoirs ont été identifiés. Le premier concerne la maladie de la bande noire, pour laquelle des agrégats bactériens non pathogènes mais caractéristiques de cette maladie ont été retrouvés au sein de biofilms se développant sur les sédiments coralliens (Carlton & Richardson 1995). Le deuxième concerne *Vibrio shiloi*, qui participe au blanchissement bactérien du corail méditerranéen *Oculina patagonica*, et que l'on retrouve dans l'estomac du ver de feu *Hermodices carunculata*. Ce ver joue le rôle de réservoir durant l'hiver et de vecteur l'été (Sussman *et al.* 2003). Autre vecteur identifié, un poisson papillon, *Chaetodon multicolor* qui est l'hôte définitif du trématode *Podocotyloides stenometra* agent pathogène des coraux du genre *Porites* (Aeby & Santavy 2006; Harvell *et al.* 2007).

Au cours des dernières décennies, l'intensité et la fréquence de ces maladies coralliennes ont eu tendance à augmenter, et constituent désormais une sérieuse menace pour le maintien des récifs coralliens. Un suivi des maladies coralliennes mené entre 1999 et 2004 sur 40 sites répartis sur toute la zone Caraïbes, a permis de dégager certaines caractéristiques

---

<sup>3</sup> Le postulat de Koch est la démarche classique permettant de démontrer qu'un microorganisme est responsable d'une maladie donnée. Il comporte trois étapes principales : 1) le microorganisme doit être isolé à partir d'un individu malade ; 2) l'isolat obtenu doit permettre d'infecter un individu sain ; 3) le même microorganisme doit être à nouveau isolé à partir de l'individu nouvellement infecté (Harvell *et al.* 2007).

de ces pathologies (Harvell *et al.* 2007) : 1) la prévalence totale, qui est extrêmement variable spatialement et temporellement, augmente du Nord au Sud ; 2) les infections les plus virulentes (la peste blanche, la maladie des plaques jaunes et celle de la bande blanche) ont une distribution plus étendue que les autres, et touchent significativement les 10 espèces de scléactiniaires les plus représentées dans les Caraïbes ; 3) la plupart des épizooties interviennent durant la saison chaude et conduisent à une diminution significative de la couverture corallienne<sup>4</sup> ; 4) la virulence d'un agent pathogène et/ou la tolérance de son hôte présentent des variations à l'échelle spatiale ; 5) la prévalence des colonies soumises simultanément à plusieurs infections est un phénomène de plus en plus fréquent ; 6) un nouveau pathogène, un cilié (protozoaire) s'étend géographiquement.

Tableau 1 : Synthèse concernant les maladies coralliennes et leurs agents pathogènes. Modifié à partir de Harvell *et al.* (2007) et Bourne *et al.* (2009).

Maladie	Agent pathogène	Règne de l'agent(s) pathogène (s)	Postulat de Koch	Nombre d'espèces infectées	
				Scléactiniaire	Octocoralliaire
<b>Atlantique</b>					
Maladie de la bande noire	<i>Phormidium corallyticum</i> ; <i>Desulfovibrio</i> ; <i>Beggiatoa</i> . sp	Cyanobactérie, Bactérie GRAM-	Non	19	6
Maladie de la bande blanche I	Inconnu (s)	Bactérie GRAM-	Non	2	-
Maladie de la bande blanche II	<i>Vibrio carchariae</i>	Bactérie GRAM-	Oui	2	-
Maladie de la peste blanche I	Inconnu (s)	Bactérie GRAM-	Non	12	-
Maladie de la peste blanche II	<i>Aurantimonas coralicida</i>	Bactérie GRAM-	Oui	41	-
Aspergilliose	<i>Aspergillus sydowii</i>	Champignon	Oui	-	10
Maladie des points blancs	<i>Serratia marcescens</i>	Bactérie GRAM-	Oui	1	-
Maladie des anomalies de croissances	<i>Acrochaete endozoica</i> ; Inconnu (s)	Algue	Non	7	5
Maladie de la bande rouge	<i>Oscillatoria</i> . sp : autre cyanobactérie (s)	Cyanobactérie	Non	13	1
Maladie de la bande jaune	<i>Vibrio</i> sp.	Bactérie GRAM-	Non	11	-
Maladie des points sombre	<i>Vibrio</i> sp.	Bactérie GRAM-	Non	10	-
Maladie de la bande sombre	Inconnu (s)	Inconnu (s)	Non	8	-
<b>Indo-Pacifique - Méditerranée</b>					
Trematodiasis	<i>Podocotyloides stenometra</i>	Trematode	-	4	-
Maladie de la bande érosive du squelette	<i>Halofolliculina corallasia</i>	Cilié (Protozoaire)	Non	2	-
Maladie de la bande marron	Cilié non encore décrit	Cilié (Protozoaire)	Non	2	-
Maladie des points blancs ulcérants	<i>Vibrio</i> sp.	Bactérie GRAM-	Non	14	-
Blanchissement bactérien	<i>Vibrio shiloi</i>	Bactérie GRAM-	Oui	1	-
Blanchissement et lyse bactérienne	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Bactérie GRAM-	Oui	1	-
Maladie de la peste blanche	<i>Thalassomonas loyona</i>	Bactérie GRAM-	Non	5	-

Concernant les récifs Indo-Pacifique, les premiers travaux dédiés aux maladies coralliennes datent des années 2000 (Harvell *et al.* 2007). En ce qui concerne les récifs de la

<sup>4</sup> Couverture corallienne : pourcentage de recouvrement du substrat occupé par des coraux vivants.

Grande Barrière australienne, 7 maladies ont été identifiées et certaines d'entre elles présentent des symptômes similaires à celles associées aux récifs atlantiques (la maladie de la bande noire par exemple). En 2002-2003 la Grande Barrière a été touchée par une épizootie liée à la maladie de la bande blanche, avec une prévalence qui a augmenté de 22 fois avant de revenir à son niveau de base (Selig *et al.* 2006). Aucune publication ne fait état de maladies coralliennes dans les récifs du Pacifique Central et de l'Est. Seuls quelques ouvrages de "littérature grise" en mentionnent la présence, mais de façon anecdotique. La zone Philippine est caractérisée par des pressions anthropiques très importantes, et présente des prévalences globales assez faibles (8%), avec cependant des contrastes très marqués d'une île ou d'un récif à l'autre (Raymundo *et al.* 2005). Ainsi, la maladie des points blancs ulcérants affecte 14 espèces différentes de *Porites* et peut présenter des prévalences allant jusqu'à 72% sur certains sites (Raymundo *et al.* 2005). D'autres maladies, telles que celles des anomalies de croissance, montrent également des pics de prévalence allant jusqu'à 39% (Kaczmarzsky 2006). Très peu d'études ont été menées sur la partie Est de l'Océan Indien. Les blanchissements et les lyses tissulaires de *Pocillopora damicornis* induits par *Vibrio coralliilyticus* ont été identifiés pour la première fois à Zanzibar (Ben-Haim & Rosenberg 2002). Les maladies de la bande noire, de la bande blanche et de la bande jaune ont également été répertoriées, mais cela reste anecdotique (McClanahan 2004). La maladie de la bande marron, des points blancs ulcérants, des anomalies de croissance et des nécroses tissulaires ont également été retrouvés sur la côte du Kenya ainsi qu'à Zanzibar en 2005 (Harvell *et al.* 2007).

Le développement de maladies coralliennes semble largement influencé par certaines conditions environnementales, et plusieurs facteurs sont aujourd'hui bien identifiés comme des éléments favorisant ces épizooties. Il s'agit en premier lieu, de la température. En effet, que ce soit dans l'Océan Atlantique ou dans l'Indo-Pacifique, les épizooties se développent plutôt lors des saisons chaudes, et plus particulièrement au cours d'années anormalement chaudes. Aux îles Vierges par exemple, les apparitions des deux maladies les plus virulentes (la peste blanche et la maladie de la bande jaune) interviennent exclusivement en saison chaude (Miller *et al.* 2006; Rogers & Miller 2006). Ce constat a également été fait sur la Grande Barrière avec des prévalences augmentées jusqu'à 50 fois en saison chaude pour les colonies d'*Acropora* (Willis *et al.* 2004). Il apparaît que des températures plus élevées peuvent favoriser la croissance et augmenter la virulence des pathogènes. Cette hypothèse a été confirmée pour 3 pathogènes : *Vibrio shiloi* et *V. coralliilyticus*, deux pathogènes de corail (Banin *et al.* 2000; Israely *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.* 2003a; Ben-Haim *et al.* 2003b), et

*Aspergillus sydowii*, pathogène de gorgone (Alker *et al.* 2001). Il a également été proposé que les températures plus fortes en période estivale, ainsi que les événements de blanchissement, pourraient diminuer les capacités immunitaires des coraux (Harvell *et al.* 2007; Ward *et al.* 2007; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009). Ce dernier point est toutefois en contradiction avec certaines études (Mydlarz *et al.* 2009). Sur la Grande Barrière australienne, il a été montré que le développement des pathologies était fortement corrélé à la couverture corallienne. Cette étude montre qu'en dessous d'un taux de recouvrement de 50% les épizooties ne se développent pas (Bruno *et al.* 2007). Une sédimentation excessive et un excès en nutriments sont également des facteurs importants dans le développement des maladies coralliennes (Bruno *et al.* 2003), ce qui explique en partie les prévalences plus fortes rencontrées dans les zones où les pressions anthropiques sont importantes. Dans des conditions d'eutrophisation importantes, certains coraux montrent une accélération de la perte tissulaire, associée à la maladie de la bande jaune et de la bande noire (Bruno *et al.* 2003; Voss & Richardson 2006). Concernant la sédimentation, Hodgson (1990) a démontré expérimentalement que des coraux soumis à une hypersédimentation et traités par des antibiotiques présentaient significativement moins de dommage tissulaire que les mêmes coraux non traités. Plus récemment, l'identification de deux agents infectieux, *Aspergillus sydowii* (champignon) et *Serratia marcescens* (bactérie GRAM-), responsables de deux maladies coralliennes dans les Caraïbes a montré qu'ils appartiennent normalement à la flore terrigène (Geiser *et al.* 1998; Patterson *et al.* 2002), témoignant ainsi de l'implication des activités anthropiques terrigènes sur la santé des coraux. D'autre part, la grande quantité de sable du Sahara transporté par les vents vers les Caraïbes pourrait également être une source de spores d'*Aspergillus* (Garrison *et al.* 2003). Certains auteurs vont même jusqu'à proposer que l'intensité et la fréquence des maladies coralliennes de la zone Caraïbe seraient liées à ces apports de sable du Sahara (Harvell *et al.* 2007). En conclusion, le développement de maladies est donc sous l'influence de facteurs extrinsèques liés à l'environnement, et de facteurs intrinsèques liés à l'hôte et au pathogène (Fig. 16).

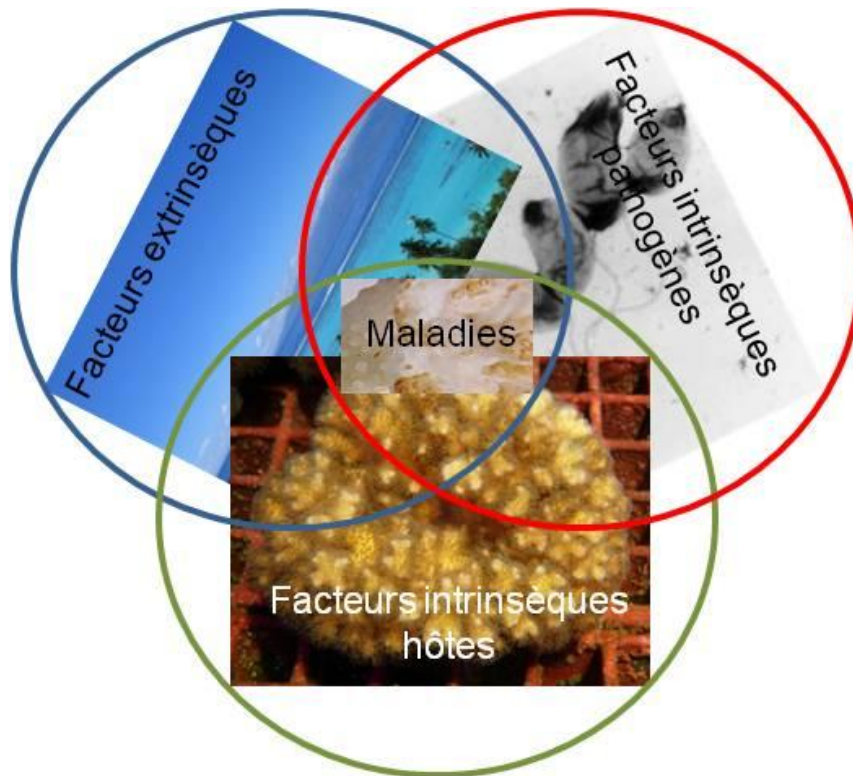


Figure 16 : schématisation des interactions entre facteurs intrinsèques, facteurs extrinsèques et agents pathogènes, à l'origine du développement d'une maladie corallienne.

Les caractéristiques des processus infectieux (mode d'entrée, multiplication dans les tissus hôtes, résistance aux défenses de l'hôte, moyens par lesquels les tissus sont endommagés, facteurs de virulence, etc...) restent peu connus pour la majorité des maladies identifiées. Seule l'interaction entre l'agent pathogène *Vibrio shiloi* et le corail de Méditerranée *Oculina patagonica* a été relativement bien appréhendée (Bourne *et al.* 2009). Dans cette maladie, la bactérie pathogène entraîne la destruction spécifique des zooxanthelles sans affecter les cellules et tissus coraliens. Ainsi les symptômes sont similaires à ceux obtenus lors d'un blanchissement induit par les autres stress déjà évoqués. On parlera ici de blanchissement bactérien par opposition au blanchissement corallien "classique" induit par des facteurs abiotiques (température, par exemple). La première observation de blanchissement bactérien affectant *O. patagonica* a été rapportée en 1993 (Fine & Loya 1995). Une corrélation avec des températures de l'eau anormalement hautes, entre 29 et 31°C selon les sites avait été mise en évidence dans ce même travail. Il faudra attendre quelques années pour que Kushmaro *et al.* (1996; 1997) démontrent l'origine bactérienne de ce blanchissement, et isolent la bactérie responsable. Cette bactérie appartient au genre *Vibrio*, et est nommée *V. shiloi* (Kushmaro *et al.* 2001). Le lien entre températures élevées et développement de la maladie est démontré par des approches en aquarium (Kushmaro *et al.* 1998). Ces expériences



ont montré qu'à des températures de culture des bactéries inférieures à 20°C aucune infection se développe, alors qu'à 28°C, 120 bactéries seulement suffisent à induire le blanchissement bactérien, et ce, quelque soit la température à laquelle les coraux sont maintenus (Kushmaro *et al.* 1998). Les principaux mécanismes de l'interaction *V. shiloi* et *O. patagonica* ont ensuite été étudiés. Tout d'abord, la bactérie est attirée par chimiotactisme vers le mucus du corail, (Banin *et al.* 2001). Cette opération est indépendante de la température (Banin *et al.* 2001). Une fois au contact, la bactérie va adhérer de façon thermo-dépendante au corail via une interaction ligand récepteur impliquant un  $\beta$ -galactoside, (à basse température, l'adhésion n'a pas lieu, alors qu'à haute température celle-ci est rapide et solide ; Toren *et al.* 1998). Le ligand/récepteur est localisé dans le mucus, mais uniquement chez des coraux hébergeant des zooxanthelles photosynthétiquement actives (Banin *et al.* 2001). Après l'adhésion, les bactéries pénètrent dans l'ectoderme du corail où elles se multiplient. Cette étape de pénétration nécessite 24 h au cours desquelles 40 à 50% des bactéries inoculées ont pénétré les tissus coralliens. La prolifération bactérienne commence 24 h après (Banin *et al.* 2000). Une fois internalisées, la physiologie des bactéries est modifiée et les bactéries deviennent non cultivables<sup>5</sup> tout en restant viables. Cependant elles conservent leur capacité infectieuse (Israely *et al.* 2001). Une fois internalisée, *V. shiloi* va sécréter une toxine, un peptide proline-rich appelé toxine P. Cette dernière va former des canaux au sein de la membrane du symbiote induisant (i) une sortie de NH<sub>3</sub>, (ii) une annihilation du gradient de pH transmembranaire et (iii) le blocage de la photosynthèse (Ben-Haim *et al.* 1999; Banin *et al.* 2001). Des toxines de poids moléculaire plus important ont également été isolées et sont capables de lyser des zooxanthelles libres. Elles n'ont cependant pas été caractérisées biochimiquement (Banin *et al.* 2001). La production de superoxyde dismutase bactérienne a également été démontrée (Banin *et al.* 2003; Murali *et al.* 2010) : ceci lui permettrait de lutter contre les ROS produits par le corail. Dernièrement, une étude du génome de *V. shiloi* a permis d'identifier des gènes présents dans les îlots de pathogénicité et potentiellement impliqués dans l'infection (Reshef *et al.* 2008). Parmi les candidats sélectionnés, l'expression de 7 d'entre-eux est fortement affectée par la mise en contact de bactéries libres avec des broyats tissulaires d'*O. patagonica* (Reshef *et al.* 2008). Trois d'entre eux présentent des similarités pour des gènes connus dans d'autres systèmes, où ils codent les pili, une toxine de type zona occludins et une superoxyde dismutase.

---

<sup>5</sup> Stade viable mais non cultivable : une cellule qui est métaboliquement active, mais qui est dans l'incapacité de se diviser sur un milieu de culture normalement propice à la croissance de cette bactérie.

Si la caractérisation d'une maladie passe par une bonne connaissance de l'agent pathogène et du processus infectieux, son impact sur la physiologie de son hôte doit également être abordé. Dans ce cadre, les études portant sur l'immunité des coraux se sont multipliées ces dernières années (Mydlarz *et al.* 2006; Miller *et al.* 2007; Kvennefors *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2008; Kimura *et al.* 2009; Mydlarz *et al.* 2009; Palmer *et al.* 2009; Kvennefors *et al.* 2010; Mydlarz *et al.* 2010; Palmer *et al.* 2010). Comme pour tous les invertébrés, il est probable que la défense des scléactiniaires vis-à-vis des pathogènes fasse appel à des mécanismes immunitaires innés (Mullen *et al.* 2004; Mydlarz *et al.* 2006). L'immunité innée nécessite la reconnaissance du pathogène et la mise en place d'une réponse permettant de l'éliminer. Certains des artisans clés de ces mécanismes ont été identifiés. Ainsi, chez les scléactiniaires, des récepteurs immuns potentiels de type *pattern recognition receptor* (PRR) ont été identifiés (Dunn 2009). Des approches de caractérisation des transcriptomes d'*Acropora millepora* et d'*A. palmata* ont permis la mise en évidence des molécules présentant des similarités pour des Toll-Like Receptors (TLR, Miller *et al.* 2007; Dunn 2009). Par ailleurs, des molécules présentant des similarités pour des éléments présents dans les voies de signalisation activées par les TLR ont également été identifiées. Il s'agit de composants potentiels de la voies NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B inclus; Miller *et al.* 2007; Dunn 2009; Souter *et al.* 2010). Chez les anthozoaires, la fonction de ces candidats n'a pas été étudiée. Concernant les hydraires, ils ne possèdent pas de TLR à proprement dit. En effet, chez ces derniers, les domaines LRR et TIR (contenus dans les TLR "classiques") ne sont pas rassemblés en une seule protéine, ce qui est par contre le cas chez les anthozoaires (Miller *et al.* 2007; Bosch 2008). Chez les deux hydres étudiées, l'induction de la sécrétion de peptides antimicrobiens (AMP) lors d'un stimulus immun est sous le contrôle de ses récepteurs de type TLR. L'activation de la réponse immune passe par l'interaction entre la protéine portant le domaine LRR fixé à l'antigène et la protéine contenant le domaine TIR qui transmettra le signal de reconnaissance du pathogène et initiera la réponse inflammatoire et antimicrobienne (Bosch *et al.* 2009). Toujours parmi les PRR potentiels, une lectine de type C a également été identifiée chez *A. millepora*. Un grand nombre de variants de ce dernier PRR a été mis en évidence mais les mécanismes générateurs de ce polymorphisme n'ont pas été étudiés. Cette lectine est capable de se fixer à des bactéries pathogènes de corail mais aussi aux zooxanthelles (Kvennefors *et al.* 2008). D'autres molécules potentiellement impliquées dans l'immunité innée et notamment dans la cascade du complément, ont récemment été caractérisées. Il s'agit d'un facteur C3 potentiel et d'acteurs de la formation du complexe d'attaque membranaire chez *A. millepora* (Miller *et al.* 2007; Kvennefors *et al.* 2010), mais

aussi de protéines similaires aux MASPs chez l'anémone *N. vectensis* (Kimura *et al.* 2009). La fonction de l'ensemble de ces candidats reste cependant à démontrer. De plus, d'autres processus connus pour être impliqués dans les mécanismes immunitaires innés notamment dans l'inflammation, ont également été mis en évidence. Il s'agit notamment de la mélanisation. En effet, chez *A. millepora*, mais aussi chez la gorgone *Gorgonia ventalina* des tissus infectés montraient une forte activité de l'enzyme phenoloxydase, élément clef dans la cascade d'activation de la voie de mélanisation (Mydlarz *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2009). Cette cascade conduit au final à la mélanisation qui permet la création d'une barrière physique afin d'enrayer l'avancée d'une infection (Mydlarz *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2009). Contrairement à d'autres invertébrés, il n'y a pas de phagocytes spécialisés connus dans la réponse immunitaire des scléactiniaires (Miller *et al.* 2007; Bosch 2008). Des cellules phagocytaires sont cependant présentes, elles constituent le gastroderme. Elles sont impliquées dans la phagocytose des zooxanthelles lors de l'initiation de la symbiose (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2006b). Chez l'anémone *Aptasia pulchera*, ces cellules sont d'ailleurs capables d'effectuer toutes les étapes de la phagocytose : liaison à la particule à phagocyter, englobissement, internalisation et destruction par la formation du phagolysosome (Chen *et al.* 2003; 2004; 2005). Même si des phagocytes spécialisés et mobiles n'ont pas été identifiés, il existe chez les scléactiniaires 3 types de cellules circulantes dans la mésogée qui pourraient jouer ce rôle, les amoebocytes (Mullen *et al.* 2004). Ces dernières apparaissent rondes à ovales, entourées par moment de lacunes. Certaines de ces cellules sont granulaires, et les granules acides ont été considérées comme étant des lysosomes ou des peroxysomes (Mullen *et al.* 2004). Il ressort donc de ces différentes études que même si la capacité phagocytaire et immunitaire de ces amoebocytes n'a pas été observée, elle ne peut être exclue. Par ailleurs, la présence des voies de synthèse de certains éléments participant à la destruction des microorganismes phagocytés a été identifiée. C'est notamment le cas de la NO synthase inductible (iNOS) qui est une enzyme impliquée dans la génération de monoxyde d'azote (Perez & Weis 2006; Weis 2008). Cet élément particulièrement toxique, une fois produit dans le cytoplasme, diffuse dans le phagosome pour participer à la destruction du pathogène. Une autre voie de réponse immunitaire classiquement rencontrée, est celle de l'apoptose. Cette dernière n'a, à ma connaissance, jamais été étudiée dans un contexte d'interaction cnidaire/pathogène, mais l'a fortement été dans le cadre du blanchissement. Ainsi, des caspases mais également d'autres gènes impliqués dans l'apoptose (comme *P53*) ainsi que des observations de symptômes apoptotiques ont été identifiés chez les anthozoaires (Dunn *et al.* 2004; Dunn *et al.* 2006; Richier *et al.* 2006;

Ainsworth & Hoegh-Guldberg 2008; Desalvo *et al.* 2008). Pour finir, les scléactiniaires disposent également de molécules antimicrobiennes dont la sécrétion est inductible ; elles ont été retrouvées dans le mucus mais n'ont jamais été caractérisées (Geffen & Rosenberg 2005; Kelman *et al.* 2006; Gochfeld & Aeby 2008; Geffen *et al.* 2009). Ces dernières ont été proposées comme constituant essentiel des premières barrières de défenses. (Geffen & Rosenberg 2005; Kelman *et al.* 2006; Gochfeld & Aeby 2008; Geffen *et al.* 2009). Il est important de noter que même si de nombreuses voies immunitaires potentielles ont été décrites, il n'a pas été montré qu'elles étaient fonctionnelles. De plus, les connaissances restent fragmentaires et il apparaît de plus en plus urgent de mieux comprendre et caractériser la réponse immunitaire des coraux afin d'appréhender dans son intégralité les impacts potentiels des maladies coralliennes dans le contexte actuel des changements globaux.

Depuis quelque années maintenant, la colonie corallienne n'est plus appréhendée que sous sa forme hôte / symbiote ; et l'ensemble des espèces participant à l'assemblage sont pris en compte (Rosenberg 2004; Reshef *et al.* 2006; Rosenberg *et al.* 2007c; Rosenberg *et al.* 2010; Ainsworth *et al.* 2010). Pour exemple, la composante bactérienne est essentielle et fait partie intégrante de cette interaction. Associée principalement au mucus, cette flore bactérienne des coraux peut être comparée, d'un point de vue fonctionnel, à celle rencontrée aux niveaux des muqueuses et épidermes humains (Reshef *et al.* 2006; Rosenberg *et al.* 2007a; Ainsworth *et al.* 2010). Les connaissances taxonomiques et fonctionnelles de cette flore sont encore fragmentaires, cependant, elles pourraient par exemple avoir des effets probiotiques. Cette hypothèse probiotique est abondamment utilisée par le groupe de Rosenberg pour expliquer la résistance acquise des populations d'*O. patagonica* lesquelles sont devenues résistantes à leur pathogène strict *V. shiloi* depuis 2003 (Reshef *et al.* 2006). Rosenberg propose que les populations bactériennes associées au mucus corallien soient responsables directement ou indirectement de l'acquisition de la résistance *via* l'effet probiotique de ces bactéries (Reshef *et al.* 2006). Par la suite, ce concept d'acquisition de résistance *via* une modification des populations bactériennes associées a été étendu à l'ensemble des perturbations naturelles rencontrées par les scléactiniaires, et fut nommé "théorie évolutive hologénomique" (Rosenberg *et al.* 2007c). Bien que récente, cette théorie a suscité discussions et controverses au sein de la communauté scientifique corallienne (Leggat *et al.* 2007a; Rosenberg *et al.* 2007b).

### I.1.3 Marqueurs de stress chez les scléactiniaires

Face au constat alarmant de dégradation croissante des récifs, un effort a été initié pour la mise en œuvre d'indicateurs permettant de détecter les changements de l'état de santé du récif et l'impact des perturbations (Jameson *et al.* 2001; Brown *et al.* 2004; Adjeroud *et al.* 2005; Chabanet *et al.* 2005; Fichez *et al.* 2005). Des marqueurs de stress, d'un état pathologique, de dégradation, de rétablissement, de contamination... ont ainsi été proposés. Ces marqueurs intègrent des échelles très différentes (temporelles, spatiales, ...) et concernent par exemple les gènes, la cellule, l'organisme, la population ou l'écosystème. Ces marqueurs se basent sur des méthodes de mesure physiques, chimiques ou biologiques (Hagger *et al.* 2006). Parmi les nombreuses catégories de marqueurs, les biomarqueurs sont ceux qui indiquent une variation biochimique, cellulaire, physiologique, ou comportementale sous l'effet d'un ou de plusieurs facteurs de perturbation (Depledge & Fossi 1994).

Concernant les récifs coralliens, les premiers marqueurs proposés dans les années 90 ont concerné le blanchissement corallien en réponse à un stress thermique, principale perturbation prise en compte ces dernières décennies. Ces développements ont cherché à s'intégrer dans le cadre de systèmes de détection précoce de ces perturbations. Bien qu'il soit illusoire de remédier à une augmentation des températures saisonnières à l'échelle régionale, la détection précoce d'un blanchissement corallien permettrait, par exemple, la mise en place de mesures destinées à réduire certains stress locaux (hypersédimentation liée aux travaux de construction littorale, qualité de l'eau, surpêche), afin de réduire leurs effets synergiques, et de faciliter les mécanismes de recolonisation et de résilience faisant suite aux perturbations (Marshall & Schuttenberg 2006).

Ces études ont tout d'abord cherché à déterminer des seuils thermiques inducteurs de blanchissement, en utilisant notamment des données issues de mesures satellitaires. Ainsi, les premiers indicateurs correspondaient à des températures mensuelles moyennes. Une température seuil était alors définie, au dessus de laquelle le blanchissement est très probable (Goreau *et al.* 1993; Brown *et al.* 1996). D'autres études ont affiné ce marqueur, en intégrant le temps d'exposition au stress thermique. Dans l'archipel de la Société en Polynésie française, il a été constaté que des températures supérieures au seuil de 29,2°C durant au moins 6 semaines étaient toujours associées à un événement de blanchissement (Hoegh-Guldberg & Salvat 1995). Des indices cumulatifs de stress thermique ont par la suite été proposés. Le premier indice mis en place à large échelle fut celui défini par Goreau et Hayes (1994). Il s'agit du "Degree Heating Month" (DHM). Cet indice prend en compte la somme

des anomalies de températures moyennes mensuelles supérieures à 1°C (au dessus des moyennes de températures mensuelles "normales", calculées à partir de données recueillies sur une série temporelle longue). Il a aussi été proposé un "Degree Heating Weeks" (DHW) par la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), qui est une version modifiée du précédent indice établi sur une échelle hebdomadaire, cette fois-ci. Ce DHW est aujourd'hui utilisé par la NOAA pour son programme de détection des évènements de blanchissement (Coral Reef Watch program ; Fig. 17). Toujours sur le même principe, le "Degree Day Index" (DDI) a été proposé par Podesta *et al.* (1997). Il prend en compte la somme des différences entre la température moyenne journalière et la température moyenne calculée pour la période chaude de l'année. Cet indice a par la suite été modifié, afin de prendre en compte la durée d'exposition au stress thermique. Le pas de temps initial a été rallongé à 3 jours et, toujours pour plus de précision, les températures maximales ont été intégrées au mode de calcul (Berkelmans 2002; Berkelmans *et al.* 2004). Strong *et al.* (2003) ont développé un indice de type "DHW", mais avec un pas de temps de 12 semaines, et en calculant le nombre de degrés par semaine étant au dessus des températures moyennes chaudes. Ce dernier indice s'est avéré satisfaisant et a été inclus dans le programme Coral Reef Watch de la NOAA. Cependant, ces indices de stress thermiques demeurent assez spécifiques aux régions pour lesquels ils ont été développés, et par conséquent, ne permettent pas une transposition à l'ensemble des récifs du globe (McClanahan *et al.* 2007).

En complément de ces indices, des biomarqueurs ont été développés, dans le but de détecter l'effet sur les coraux et leur dérèglement physiologique au cours du blanchissement. Compte tenu de l'importance de l'altération du processus photosynthétique lors des stress inducteurs de blanchissement, plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation de l'état de la machinerie photosynthétique pour prédire le blanchissement. Cette approche a consisté, dans un premier temps, à mesurer *in situ* l'activité photosynthétique. Ces mesures, réalisées le plus souvent à l'aide d'un PAM (Pulse Amplitude Modulation), permettent de mesurer différents paramètres tels que l'efficacité photosynthétique maximale (EPM), l'efficacité photosynthétique effective, ou le taux de transport d'électrons (ETR). Okamoto *et al.* (2005) ont ainsi montré que lors d'un évènement de blanchissement, les valeurs de EPM et d'ETR chutaient significativement, que ce soit pour des colonies complètement ou partiellement affectées ou des colonies d'apparence saine, en comparaison à des valeurs mesurées sur le même site l'année précédente. Les auteurs ont par conséquent conclu que ces deux descripteurs (EPM et ETR) étaient potentiellement de bons biomarqueurs de populations coralliennes en cours de blanchissement (Okamoto *et al.* 2005). McDougall *et al.* (2006) ont

montré que même sous l'action d'un stress lumineux mineur en milieu naturel, 6 molécules chlorophylle-like étaient induites très rapidement (mesure par HPLC). La répétitivité du phénomène, sa spécificité et sa mise en place rapide en réponse aux stress lumineux ont conduit ces auteurs à les proposer en tant que biomarqueurs potentiels de blanchissement induit par un stress lumineux (McDougall *et al.* 2006). Par ailleurs, Downs *et al.* (2000) ont mis au point une série de biomarqueurs moléculaires spécifiques de l'hôte ou du symbiote, en réponse à un choc thermique ou un stress lumineux.

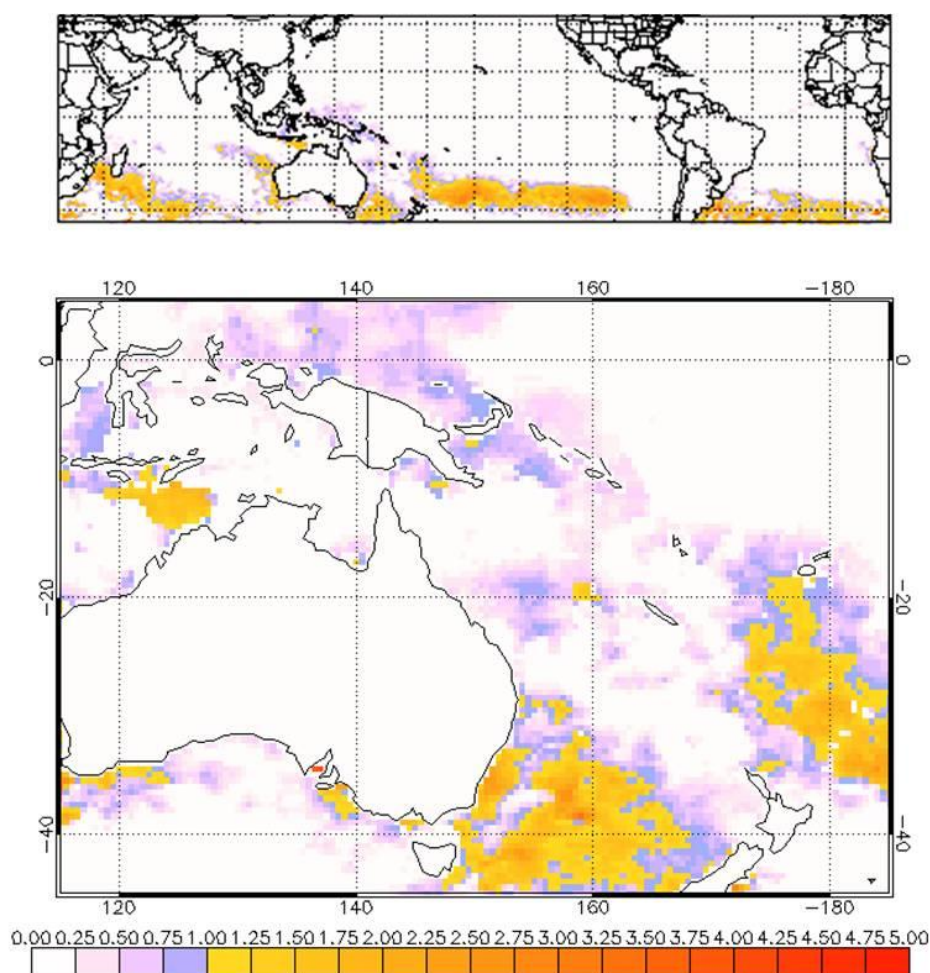


Figure 17 : prédiction des événements de blanchissement corallien à l'échelle régionale, à partir des anomalies de températures. Indice "HotSpot" de la NOAA, visualisation à l'échelle du Pacifique Sud-Ouest. L'échelle colorimétrique correspond à la valeur de "HotSpot" pour la période sélectionnée.

Développé lors d'expérimentations en milieu contrôlé, ces auteurs ont pratiqué des mesures : de la peroxydation des lipides (LPO), de glutathion, des heat shock proteins (HSP) 60 et 70, de l' $\alpha$  B-crystallin-like, des petites HSP chloroplastiques (ChIpsHSP), de l'homologue des sHSP de classes I à IV rencontrées chez les plantes (sHSPs), des superoxydes dismutases dépendantes du manganèse (MnSOD) ou du zinc et du cuivre

(Cu/ZnSOD), et des ubiquitines. Ces biomarqueurs, qui renseignent sur l'état général des cellules, permettent également d'identifier les facteurs de stress. Parmi ces biomarqueurs, 3 sont spécifiques de la réponse de l'hôte : la  $\alpha$  B-crystallin-like, la MnSOD et la Cu/ZnSOD. Les deux premiers n'ont répondu qu'au choc thermique, et sont caractérisés par une augmentation de leur "expression" d'un facteur de 1,2 à 2. La concentration en Cu/ZnSOD a augmenté de 1,7 à 2,3 fois en réponse au choc thermique, au stress lumineux ou au cumul des deux. Deux autres biomarqueurs spécifiques de la réponse du symbiote, ChIpsHSP et sHSPs, sont également induits par chacun des deux traitements, ou par leur cumul. Les 5 biomarqueurs restants, exprimés par les deux partenaires de la symbiose, ont montré des régulations assez contrastées. Ainsi, le niveau de glutathion a chuté lors du choc thermique, mais n'est pas affecté par le stress lumineux. Les HSP 70 et 60 ont montré une induction liée au choc thermique et une absence de réponse lors du stress lumineux. Le taux de LPO a été augmenté par tous les types de traitement, et il en est de même pour la quantité d'ubiquitine. Fort de ces résultats, les auteurs de ces travaux concluent que ce système de biomarqueurs permet de caractériser de manière satisfaisante l'état physiologique des coraux, d'identifier le facteur perturbateur et aussi de prédire, dans certaines conditions, les événements de blanchissement (Downs *et al.* 2000). Cependant, il est important de noter que les conditions expérimentales, appliquées dans cette étude, diffèrent très largement de ce qui est rencontré en milieu naturel. En effet, lors des chocs thermiques expérimentaux, les échantillons étaient soumis à une augmentation de température d'une amplitude de 6°C en 3 heures, ce qui représente un stress "écologiquement" non réaliste. Avec le développement des techniques de quantification des transcrits, une nouvelle génération de biomarqueurs de stress corallien a vu le jour au début des années 2000. Mitchelmore *et al.* (2002) démontrent que *Sym32*, un gène potentiellement impliqué dans la régulation de la symbiose, est réprimé lors d'un stress au cadmium inducteur de blanchissement. Il pourrait donc être un biomarqueur intéressant de la dissociation symbiotique. Edge *et al.* (2005) ont récemment développé une puce à ADN contenant 32 gènes répondant à différents stress naturels et anthropiques. Cette puce a été testée en milieu naturel dans le cadre d'un suivi de l'état de santé d'un récif localisé à proximité d'une décharge semi-immersée, et a permis de montrer que les coraux étaient soumis à des stress oxydants induits par les métaux lourds et la sédimentation (Morgan *et al.* 2005). Il a également été proposé qu'une protéine homologue à la Green Fluorescent Protein (GFP) puisse être un bon biomarqueur de blanchissement induit par un stress thermique (Smith-Keune & Dove 2008). En effet, cette GFP-homologue est réprimée 6 h après une exposition à des températures anormalement élevées (32 et 33°C). De façon intéressante, cette répression



est relativement précoce puisqu'elle intervient avant les dysfonctionnements des photosystèmes II. Ceci étant, aucune mesure en conditions naturelles n'a été menée à ce jour (Smith-Keune & Dove 2008). Des études très récentes du transcriptome corallien par puce à ADN ont également fourni des biomarqueurs potentiels, mais les auteurs ne précisent pas les conditions d'application de ces derniers, et dans la plupart des cas, il s'agit davantage de perspective que de développement réel (Desalvo *et al.* 2008; Voolstra *et al.* 2009). Encore plus récemment, une étude a regroupé 12 gènes candidats connus pour répondre à un stress thermique (Souter *et al.* 2010). Par une approche de PCR quantitative en multiplex (quantification de plusieurs transcrits dans le même milieu réactionnel) et suite à différentes expérimentations en milieu contrôlé, ces auteurs recommandent deux gènes comme biomarqueurs potentiels de stress thermique chez les coraux. L'un code une manganèse superoxyde dismutase, l'autre un homologue du facteur de transcription NF-kB (Souter *et al.* 2010).

En conclusion, ces recherches récentes ont abouti à la mise en évidence de plusieurs biomarqueurs permettant la détection, parfois précoce, du dérèglement physiologique chez des coraux en situation de stress (thermique ou lumineux) inducteur de blanchissement corallien. Mais la plupart de ces études (voir cependant Edge *et al.* 2005; Morgan *et al.* 2005) ont eu lieu en milieu expérimental contrôlé, et n'ont pas testé ces biomarqueurs au sein des populations coralliennes en milieu naturel. De plus, les protocoles de stress sont souvent bien éloignés de la réalité du milieu. Aussi, l'utilisation de ces biomarqueurs dans la gestion et la conservation des récifs, comme par exemple pour le suivi de l'état de santé des coraux, demeure encore hypothétique et incertaine.

## **I.2 Objectifs du programme de recherche doctorale**

Dans le contexte scientifique évoqué précédemment, il apparaît que les mécanismes physiologiques des coraux scléactiniaires en réponse aux principaux facteurs de stress que subissent les récifs restent, malgré de récentes avancées prometteuses, encore largement méconnus. Paradoxalement, il est de plus en plus demandé à la communauté scientifique de mettre en œuvre des outils, comme des biomarqueurs de perturbations, pour une meilleure gestion des récifs coralliens et de leurs ressources. Ce challenge est d'autant plus urgent qu'il s'inscrit dans un contexte de dégradation croissante des récifs, soumis à une augmentation de l'intensité et de la fréquence des perturbations d'origine naturelle ou anthropique. La mise au

point de biomarqueurs de stress va de pair avec l'avancée des connaissances sur les interactions entre le corail, ses microalgues endosymbiotiques, et la communauté bactérienne associée.

Ce programme de recherche doctorale s'inscrit donc dans ce cadre très actuel de la recherche de biomarqueurs précoce de stress chez les coraux. Il a pour principal objectif d'examiner les réponses physiologiques précoce du corail scléactiniaire *Pocillopora damicornis* soumis à des stress biotiques et/ou abiotiques en utilisant des approches moléculaires actuelles tout en prenant en compte au mieux le contexte écologique (Fig. 18).

En effet, l'étude des mécanismes précoces permettra de faire avancer les connaissances sur la réponse physiologique des coraux soumis à des stress thermiques et/ou bactériens (mieux comprendre). Mais dans le même temps, de fournir des biomarqueurs précoces qui permettront de signaler l'arrivée prochaine de l'une des perturbations étudiées (fournir des outils pour peut être mieux gérer). C'est dans la complémentarité entre objectifs fondamentaux et appliqués, dans la focalisation sur les phénomènes initiés précocement et dans les approches méthodologiques novatrices ("stress "écologiquement réaliste") que réside l'essentiel de l'originalité de ce travail.

Dans la première partie de ce travail (Chapitre II), les mécanismes moléculaires mis en place précocement lors d'un stress thermique inducteur de blanchissement ont été appréhendés. Pour ceci, les coraux ont été soumis à des stress "écologiquement réalistes" en milieu contrôlé et une approche de transcriptomique comparative a été réalisée.

La seconde partie de ce travail (chapitre III), s'est attelée à l'étude des réponses physiologiques et transcriptomiques d'un corail soumis à un stress bactérien associé ou non à un stress thermique activateur de la virulence bactérienne. Encore une fois, ces expérimentations ont été développées en aquarium. Le modèle retenu est le couple composé du corail *P. damicornis* et de la bactérie *Vibrio coralliilyticus*. Les différentes étapes du processus infectieux ont été caractérisées, puis l'étude de la réponse corallienne a été appréhendée.

A terme, l'ambition de ce travail est d'améliorer les connaissances sur les réponses physiologiques des coraux soumis à différents types de stress environnementaux, afin de

fournir des bases solides pour la mise en œuvre de biomarqueurs pertinents pour la conservation et la gestion de récifs coralliens. Ceci pourrait permettre non seulement de réaliser un suivi de l'état de santé des coraux mais aussi de prédire précocement (dans une certaine mesure) des perturbations annonciatrices de blanchissement ou d'épizooties des coraux.

# Approche écologiquement réaliste

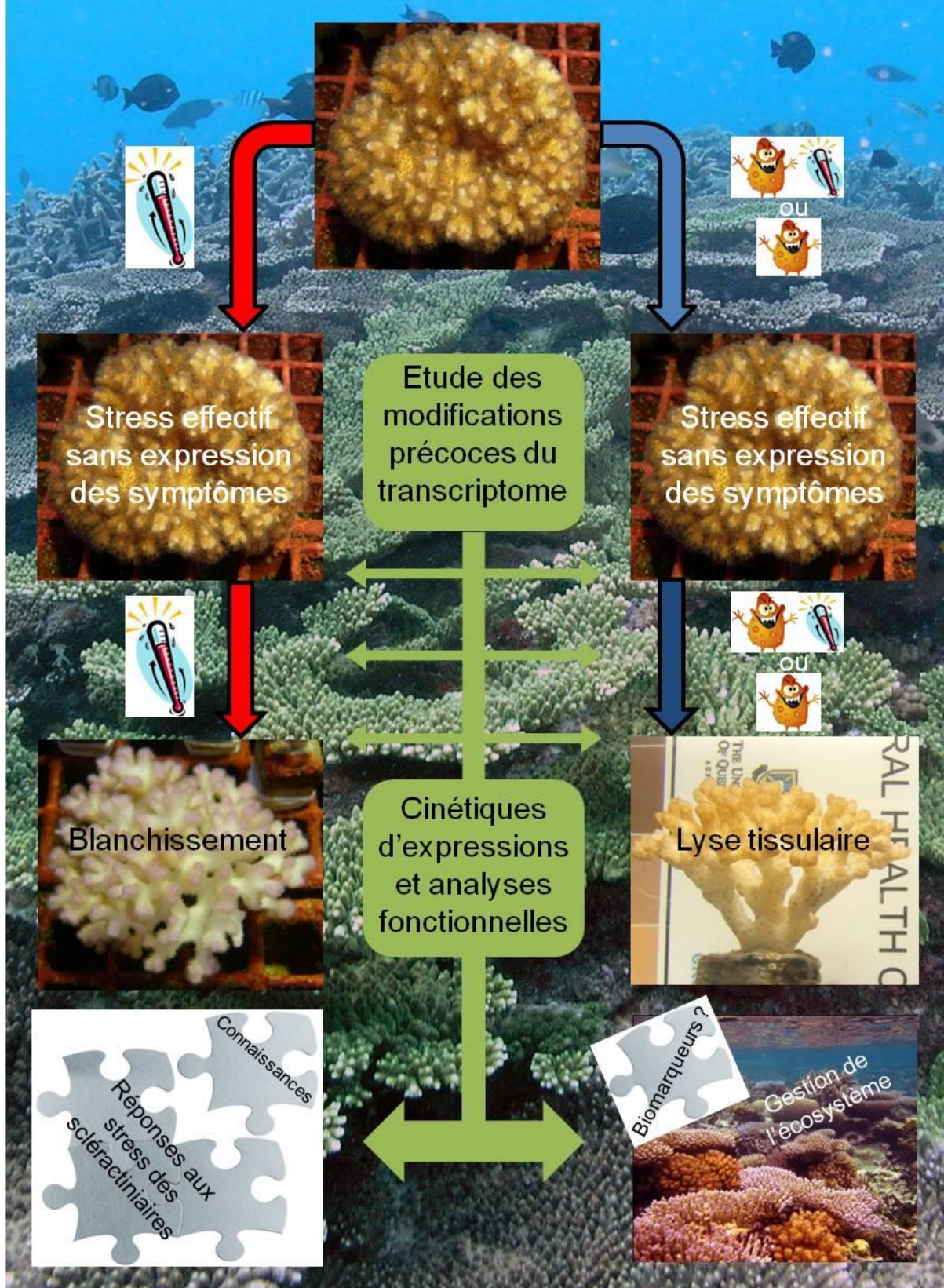


Figure 18 : objectifs scientifiques et approches méthodologiques du programme de recherche doctorale.

### **I.3 Choix des modèles d'étude**

L'étude des réponses physiologiques et transcriptomiques d'un corail soumis à des stress biotiques et/ou abiotiques implique un choix scrupuleux du(es) modèle(s) d'étude. L'objectif de mettre au point des biomarqueurs précoces implique également le choix d'une espèce corallienne sensible aux stress environnementaux, au blanchissement et aux maladies notamment. Disposer d'une espèce de corail dont on connaît l'agent bactérien pathogène et la pathologie constitue un avantage considérable. De plus, afin que ces biomarqueurs puissent être utilisés dans la plupart des récifs du globe, l'espèce de corail doit être la plus répandue et la plus ubiquiste possible (espèce sentinelle). Il est également intéressant de sélectionner une espèce de corail qui puisse être facilement identifiée, notamment par des non spécialistes. Par ailleurs, une espèce dont la biologie et la physiologie sont bien appréhendées est un atout dans ce type d'étude, en permettant notamment de gagner un temps précieux dans la mise au point de certains protocoles expérimentaux.

Enfin, ce travail comportant un grand nombre d'expérimentations en milieu contrôlé, l'espèce corallienne devait également répondre à des critères précis en termes zootechniques, comme une croissance rapide et un bouturage facile, permettant de disposer rapidement d'un grand nombre de mini-colonies.

L'ensemble de ces contraintes a guidé notre choix vers l'espèce *Pocillopora damicornis*, qui satisfait à tous les critères évoqués précédemment.

#### **I.3.1 *Pocillopora damicornis***

*Pocillopora damicornis* appartient à la famille des Pocilloporidae. Caractérisés par des colonies de forme plutôt branchue, les branches sont généralement rondes mais peuvent prendre une forme aplatie chez certaines espèces. Une des caractéristiques de cette famille réside dans des formations squelettiques particulières appelées verrues, qui correspondent à des protubérances de 1 à 5 mm et qui portent plusieurs calices. Chez *P. damicornis*, les corallites sont immergées, la columelle absente ou très légèrement développée. Le coenosteum est la plupart du temps de type granulaire (Veron & Pichon 1976a; Veron 2000).

Les colonies de *P. damicornis* peuvent atteindre des tailles remarquables allant jusqu'à plusieurs mètres de diamètre dans certains récifs (Fig. 19). Cette espèce se trouve plutôt à faible profondeur, et le plus souvent inféodée au milieu lagonaire, et plus particulièrement aux récifs frangeants, directement accolés à la côte. Son aire de répartition est très large, et couvre

l'ensemble des récifs de l'Indo-Pacifique, y compris ceux de Mer Rouge et du Golfe Persique où on la trouve communément (Veron 2000).



Figure 19 : *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) :  
A) Colonie mère cultivée en aquarium. B) Colonie sauvage, ici sur le récif frangeant de l'île de Moorea (Polynésie française).

Le cycle de vie de *P. damicornis* correspond à celui classiquement rencontré chez les scléactiniaires. La reproduction sexuée conduit à l'émission, par les colonies adultes fixées, de gamètes ou de larves nageantes, les planulas. Ces larves constituent la phase pélagique du cycle de vie, puis vont se fixer au substrat et se métamorphoser, c'est le début de la phase benthique fixée. Il faut en moyenne 3 à 4 ans pour que ces jeunes colonies passent au stade adulte, et soient matures sexuellement. Outre la reproduction sexuée, *P. damicornis* peut également se reproduire de façon asexuée ; par fragmentation, par bourgeonnement ou par émission de larves parthénogénétiques (Harrison & Wallace 1990; Yeoh & Dai 2010).

Chez les scléactiniaires, l'acquisition des zooxanthelles peut se faire par transfert horizontal ou vertical. Dans le premier cas, la larve aposymbiotique est infestée par des symbiotes de la colonne d'eau, dans le deuxième, les zooxanthelles maternelles seront transmises à la descendance *via* l'ovocyte (Douglas 1994). C'est cette dernière stratégie qui est le plus généralement rencontrée chez *P. damicornis*, bien qu'un transfert horizontal semble également possible (Stat *et al.* 2008). Concernant les symbiotes, ce sont généralement les *Symbiodinium* des clades A, B, C et D qui sont rencontrés chez *P. damicornis* (Karako-Lampert *et al.* 2004).

Comme la plupart des espèces du genre *Pocillopora*, *P. damicornis* est particulièrement sensible au blanchissement, et c'est l'une des premières espèces à être affectée lors d'un stress thermique (Glynn 1983; Fisk & Done 1985; Salvat 1992; Drollet *et al.* 1994; Loya *et al.* 2001). *P. damicornis* est sans aucun doute le corail hermatypique qui a été

le plus étudié jusqu'à présent, comme en témoigne les nombreux travaux sur sa physiologie (Stimson & Kinzie III 1991; Hidaka *et al.* 1997; Koop *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.* 2003a; Hashimoto *et al.* 2004), la génétique de ses populations (Ulstrup *et al.* 2007; Starger *et al.* 2008; Souter *et al.* 2009) ou ses modes de reproduction (Stoddart & Black 1985; Stat *et al.* 2008; Yeoh & Dai 2010). Il est cependant important de noter que les connaissances transcriptomique et proteomique sur ce modèle restent peu nombreuses.

### I.3.2 *Vibrio coralliilyticus*

*Vibrio coralliilyticus* a été isolé pour la première fois à partir d'échantillons blanchis de *P. damicornis* provenant de Zanzibar (Ben-Haim & Rosenberg 2002). Il s'agit d'une bactérie à GRAM négatif, en forme de vibrion, et mobile grâce à un unique flagelle polaire (Fig. 20). Sur milieu solide, après une incubation de 24 à 48h à une température entre 25°C et 30°C, les colonies bactériennes apparaissent de couleur crème sur Marine Agar, et de couleur jaune sur TCBS (milieu spécifique aux *Vibrio*), les bords sont lisses et réguliers. Les autres caractéristiques phénotypiques et biochimiques ont été appréhendées (Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004).

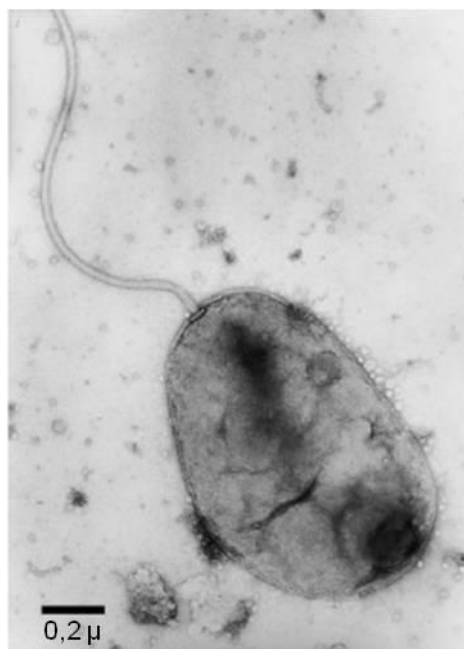


Figure 20 : photographie au microscope électronique à transmission de *Vibrio coralliilyticus*. Reprise de Ben-Haim *et al.* (2002).

*Vibrio coralliilyticus* est un agent étiologique du blanchissement bactérien et de la lyse des tissus chez *P. damicornis* (Ben-Haim *et al.* 2003b). Cet agent pathogène présente la particularité d'avoir une virulence thermo-dépendante. En effet, à des températures inférieures à 24,5°C, la mise en contact de *V. coralliilyticus* et *P. damicornis* ne provoque aucun symptôme notable (Fig. 21A). A contrario, à une température de 24,5 à 25°C, il a été rapporté que l'inoculation de colonies saines de *P. damicornis*, par baignade ou dépôt direct sur les tissus de culture pure de *V. coralliilyticus*, conduisait au blanchissement des coraux (Fig. 21B). Dix jours post-inoculation, les colonies conservent encore leur apparence saine, les premiers symptômes du blanchissement n'apparaissent qu'au 12<sup>ème</sup> jour. Entre le 15<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour, la plupart des colonies inoculées présentent une diminution de leur densité en zooxanthelle d'au moins 50% (Ben-Haim *et al.* 2003b). Au bout de 25 jours, tous les coraux étaient blanchis, sans aucune trace de lyse (Ben-Haim *et al.* 2003b). Au 39<sup>ème</sup> jour post-inoculation, l'état visuel des coraux ne montrait ni rétablissement ni aggravation, l'expérience a ensuite été interrompue. Si la température est augmentée à des seuils de 26 à 29°C, les symptômes associés à l'infection prennent une tout autre forme. En effet, à 29°C et 10 jours après inoculation, la plupart des tissus infectés présentaient des signes de lyse (Fig. 21C), et au bout de 15 jours, tous les coraux étaient morts. Au cours de cette expérience, aucun signe de blanchissement n'a été observé à des températures de 26 à 29°C (Ben-Haim & Rosenberg 2002).



Figure 21 : symptomatologie du corail *Pocillopora damicornis* confronté à *Vibrio coralliilyticus* cultivé à différentes températures : a) température inférieure à 24°C, l'interaction ne donne lieu à aucun symptôme ; b) à 24,5°C les coraux confrontés à *V. coralliilyticus* montrent tous les symptômes d'un blanchissement ; c) à 29°C les tissus sont lysés (sans blanchissement préalable) et le squelette apparaît à nu. D'après Ben-Haim *et al.* (2003).

Concernant les conditions de l'infection par *V. coralliilyticus*, il a été montré que la taille de l'inoculum n'était pas un facteur limitant au développement de la maladie, quelle que soit la température. Une quantité aussi faible que 30 bactéries/mL est suffisante pour induire l'infection. Le seul effet observé de la taille de l'inoculum est la vitesse à laquelle les symptômes apparaissent (Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004). Des expériences



complémentaires ont démontré que *V. coralliilyticus* est spécifique de *P. damicornis* : 13 autres espèces de scléactiniaires ont été mises en contact avec *V. coralliilyticus* et n'ont pas présenté les symptômes de l'infection (Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004).

A la suite des expériences conduisant au blanchissement ou à la lyse de *P. damicornis*, *V. coralliilyticus* a été isolé des spécimens infectés, mais s'est révélé absent des échantillons sains. Des coupes ultra-fines observées en microscopie électronique à transmission, ont montré la présence de *V. coralliilyticus* sous forme d'agrégats bactériens dans les cellules ectodermiques orales des coraux infectés (Fig. 22).

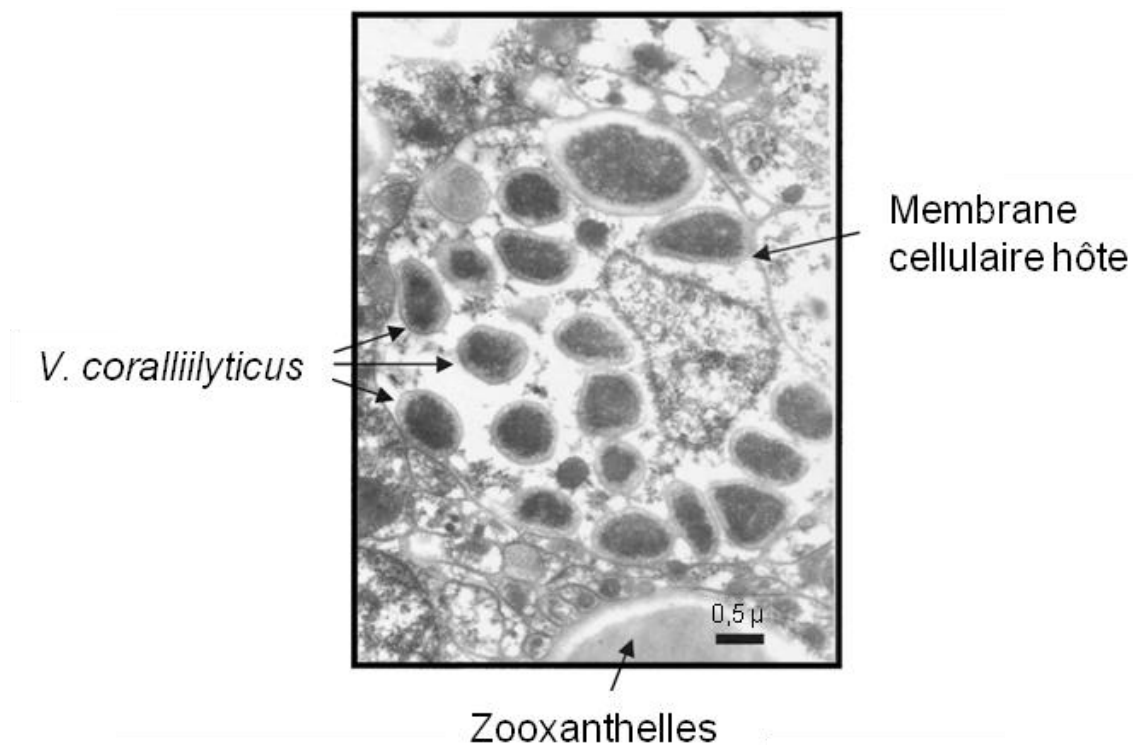


Figure 22 : coupe tissulaire de *P. damicornis* infecté par *V. coralliilyticus* : La coupe observée en microscopie électronique à transmission montre les bactéries internalisées dans les cellules coralliennes.

Les mécanismes de la thermo-dépendance de la virulence chez *V. coralliilyticus* doivent faire l'objet d'investigations complémentaires pour être totalement élucidés. Cependant, il a été montré que plus la température de culture était élevée (dans une gamme de 20 à 29°C), plus la concentration et l'activité d'une protéase extracellulaire était importante (Ben-Haim & Rosenberg 2002; Ben-Haim *et al.* 2003b). Cette protéase a été purifiée par une approche chromatographique sur colonne. Son poids moléculaire est de 36 kDa et ses 17 premiers acides aminés ont été séquencés. La confrontation de cette séquence aux banques de données a montré une forte similarité pour une autre protéase de *Vibrio*,

l'hémagglutinin/protéase de *V. cholerae* (Ben-Haim *et al.* 2003b). Suite à l'inactivation de l'enzyme par l'EDTA, elle est réactivée par 10 mM de Ca<sup>++</sup> ou Zi<sup>++</sup>. Ceci montre son appartenance au groupe des métallo-protéases.

Des travaux récents ont suggéré que la présence du flagelle était indispensable pour que l'infection ait lieu (Meron *et al.* 2009). Des souches de *V. coralliilyticus* dont le gène *fhlA* a été muté (gène impliqué dans la formation du flagelle), n'avaient plus la capacité d'infecter des colonies de *P. damicornis*. Les causes de cette perte d'infectivité ne sont pas encore clairement identifiées et restent controversées. Toutefois, il semblerait que l'absence de flagelle puisse inhiber le chimiotactisme attirant le pathogène vers le mucus, ou altérer l'adhésion de la bactérie au mucus (Meron *et al.* 2009).

Bien que les mécanismes n'ait pas été décrits il a été montré récemment que *V. coralliilyticus* était résistant à de nombreux antibactériens (Vizcaino *et al.* 2010).

Ainsi, les principales caractéristiques de *V. coralliilyticus* évoquées précédemment sont particulièrement intéressantes dans le cadre des objectifs fixés dans ce travail de recherche doctorale, et justifient le choix de *P. damicornis* / *V. coralliilyticus* comme modèle d'étude.

## **Chapitre II :**

### **Stress thermique et perturbation physiologique chez *Pocillopora damicornis***

#### **II.1 Problématique scientifique et objectifs de l'étude**

Au cours des dernières décennies et en lien avec les changements globaux, les épisodes de blanchissement corallien à grande échelle spatiale (*mass bleaching events*) ont significativement augmenté en fréquence, en intensité et ont affecté la plupart des récifs de la planète. Dans ce contexte, les questions actuelles portent sur les capacités de résistance et de résilience de ces récifs perturbés, ainsi que sur les moyens pour remédier à leur dégradation croissante.

Par ailleurs, un effort considérable a été réalisé pour améliorer la prédiction des événements de blanchissement, et pour mieux comprendre les mécanismes associés à ce dérèglement physiologique qui conduit le plus souvent à la rupture de la symbiose. Malgré des avancées significatives sur ces questions réalisées au cours des dernières années, les mécanismes moléculaires et la réponse physiologique des coraux soumis aux stress thermiques restent encore très mal connus, et la mise en œuvre de biomarqueurs pour détecter précisément et précocement les blanchissements reste encore impossible.

Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté dans ce chapitre est double : i) mettre en évidence certains mécanismes moléculaires initiés précocement lors d'un stress thermique ; ii) déterminer si les gènes impliqués peuvent être de bons candidats en tant que biomarqueurs précoces du blanchissement.

Nos principales hypothèses de travail sont les suivantes : i) les mécanismes moléculaires sont obligatoirement initiés avant l'apparition des symptômes visibles du blanchissement ; ii) ces mécanismes sont très certainement liés aux processus de régulation de la symbiose ; iii) seule une approche expérimentale "écologiquement réaliste" permettra d'identifier des biomarqueurs potentiellement utilisables pour la gestion des populations coralliennes en milieu naturel.

## II.2 Approche méthodologique

Notre premier objectif a été de mettre au point un protocole expérimental de stress thermique "écologiquement réaliste", c'est-à-dire le plus proche possible de ce que subissent les coraux en milieu naturel. En effet, la plupart des études précédentes utilisaient plutôt des protocoles de "chocs" thermiques, avec des augmentations de plusieurs °C en quelques heures. Or, les élévations de température en milieu naturel sont plus lentes et s'effectuent sur un laps de temps plus important. Après analyse de séries temporelles de températures sur de nombreux récifs du globe, nous avons retenu un protocole de stress thermique qui comprend une température de départ de 28°C et une température maximale de 32°C. En effet, ces deux valeurs correspondent à celles rencontrées sur de nombreux récifs, 28°C étant représentative des températures moyennes des mois chauds, et 32°C étant souvent la température maximale lors d'épisodes de blanchissement de masse. La deuxième partie de la réflexion a porté sur la vitesse de montée en température. Sur la base d'analyses de séries temporelles de températures associées aux blanchissements de masse, nous avons mis au point une expérimentation afin d'affiner ces augmentations de températures pour notre espèce cible, *P. damicornis*. Ainsi, 40 boutures clonales, issues d'un même pied mère (Fig. 23 A-B), ont été réparties en 2 lots acclimatés pendant 14 jours à 28°C et soumis à une intensité lumineuse de 350  $\mu\text{mol}$  de photon/ $\text{m}^2/\text{s}$  (Fig. 23 C). Les boutures du lot stressé ont ensuite été soumises à une augmentation de température de 1°C par semaine, jusqu'à atteindre le seuil de 32°C. Ce seuil a été maintenu jusqu'au blanchissement, si ce dernier n'était pas intervenu plus tôt. Un échantillonnage aléatoire a été effectué à la fin de chaque palier de température. Ce protocole, s'étalant sur 6 semaines de stress (1 semaine à 28°C, 1 semaine à 29°C... et 2 semaines à 32°C), s'est avéré inadapté, car le temps entre chaque échantillonnage, était trop long et qu'il était impossible d'augmenter le nombre d'échantillonnages compte tenu des exigences en matériel biologique nécessaire aux approches transcriptomiques. Ce premier test a cependant été très instructif car il a permis d'affiner le pas de temps entre chaque montée en température. En effet, l'observation journalière des coraux lors de cette expérience, nous a montré qu'il s'écoulait 3 jours entre un évènement stressant et l'apparition d'un symptôme (la fermeture des polypes, par exemple). De plus, ce pas de temps de 3 jours permet d'étudier convenablement une réponse transcriptomique durable (par opposition à une réponse transcriptomique transitoire). Avec ces résultats expérimentaux, nous avons donc mis en place le protocole de stress thermique suivant : température de départ de 28°C, température maximale de 32°C, et une montée en température de 1°C par palier de 3 jours.

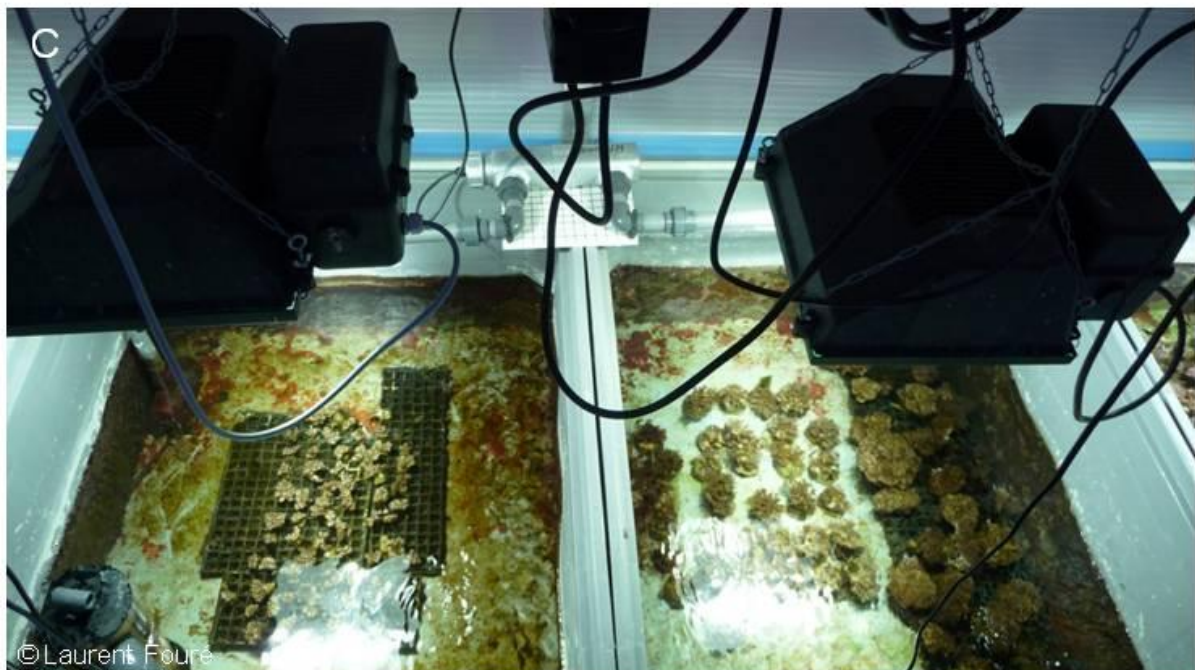
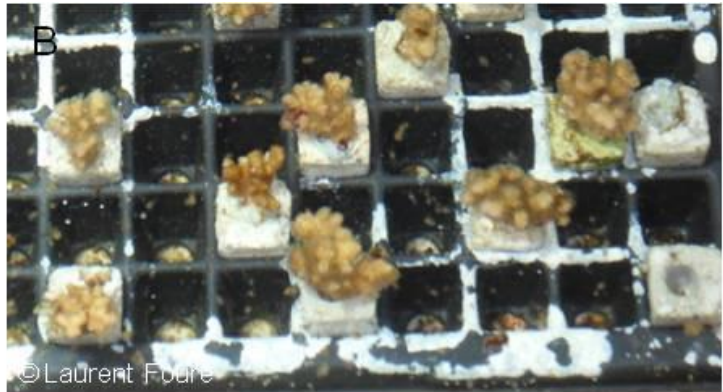


Figure 23 : colonies coralliennes et structures expérimentales :

A) Mini-colonie type (10 g) utilisée tout au long de ce travail. B) Ensemble de mini-colonies en phase d'acclimatation. C) Bassins expérimentaux, mis à disposition par l'Aquarium du Cap d'Agde, comprenant des mini-colonies en phase de cicatrisation post-bouturage (à gauche), et des colonies mères (à droite).

### **II.3 Publication n°1**

Jérémie Vidal-Dupiol, Mehdi Adjeroud, Emmanuel Roger, Laurent Fouré, David Duval, Yves Moné, Christine Ferrier-Pages, Eric Tambutté, Sylvie Tambutté, Didier Zoccola, Denis Allemand & Guillaume Mitta (2009). **Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of hot/symbiont recognition mechanisms.** *BMC Physiology*, 9-14, (doi: 10.1186/1472-6793/9/14).

# **Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms**

**Jeremie Vidal-Dupiol<sup>1</sup>**, Mehdi Adjeroud<sup>1</sup>, Emmanuel Roger<sup>1</sup>, Laurent Foure<sup>2</sup>, David Duval<sup>1</sup>,  
Yves Mone<sup>1</sup>, Christine Ferrier-Pages<sup>3</sup>, Eric Tambutte<sup>3</sup>, Sylvie Tambutte<sup>3</sup>, Didier Zoccola<sup>3</sup>,  
Denis Allemand<sup>3</sup> and Guillaume Mitta<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>UMR 5244, CNRS EPHE UPVD, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

<sup>2</sup>Aquarium du Cap d'Agde, 11 rue des 2 freres, 34300 Cap d'Agde, France

<sup>3</sup>Centre Scientifique de Monaco, Avenue Saint Martin, MC-98000 Monaco-Ville, Principality of Monaco

\*mitta@univ-perp.fr

## **Abstract**

### **Background**

Coral bleaching can be defined as the loss of symbiotic zooxanthellae and/or their photosynthetic pigments from their cnidarian host. This major disturbance of reef ecosystems is principally induced by increases in water temperature. Since the beginning of the 1980s and the onset of global climate change, this phenomenon has been occurring at increasing rates and scales, and with increasing severity. Several studies have been undertaken in the last few years to better understand the cellular and molecular mechanisms of coral bleaching but the jigsaw puzzle is far from being complete, especially concerning the early events leading to symbiosis breakdown. The aim of the present study was to find molecular actors involved early in the mechanism leading to symbiosis collapse.

### **Results**

In our experimental procedure, one set of *Pocillopora damicornis* nubbins was subjected to a gradual increase of water temperature from 28°C to 32°C over 15 days. A second control set kept at constant temperature (28°C). The differentially expressed mRNA between the stressed states (sampled just before the onset of bleaching) and the non stressed states (control) were isolated by Suppression Subtractive Hybridization. Transcription rates of the most interesting genes (considering their putative function) were quantified by Q-RT-PCR, which revealed a significant decrease in transcription of two candidates six days before bleaching. RACE-PCR experiments showed that one of them (*PdC-Lectin*) contained a C-Type-Lectin domain

specific for mannose. Immunolocalisation demonstrated that this host gene mediates molecular interactions between the host and the symbionts suggesting a putative role in zooxanthellae acquisition and/or sequestration. The second gene corresponds to a gene putatively involved in calcification processes (*Pdcyst-rich*). Its down-regulation could reflect a trade-off mechanism leading to the arrest of the mineralization process under stress.

## **Conclusion**

Under thermal stress zooxanthellae photosynthesis leads to intense oxidative stress in the two partners. This endogenous stress can lead to the perception of the symbiont as a toxic partner for the host. Consequently, we propose that the bleaching process is due in part to a decrease in zooxanthellae acquisition and/or sequestration. In addition to a new hypothesis in coral bleaching mechanisms, this study provides promising biomarkers for monitoring coral health.

## **Background**

Coral reefs are fascinating ecosystems, characterized by high levels of biodiversity and ecological complexity, high primary productivity and have significant aesthetic and commercial value, particularly in relation to fisheries, tourism and the aquarium industry. In recent decades coral reefs have been dramatically impacted by large-scale disturbances [1]. Natural disturbances are a routine part of coral reef community dynamics, but they have increased in frequency and severity during the last three decades [1, 2]. In addition to providing multiple sources of anthropogenic disturbance that directly kill coral colonies [3], human activities have likely contributed to the increase in natural disturbances via global warming.

Of the broad range of natural and anthropogenic perturbations that affect coral reefs, coral bleaching is recognised as a major disturbance that has the potential to significantly alter the biological and ecological processes that maintain reef communities [4, 5]. This phenomenon can occur from the colony scale to the geographical scale where it leads to “mass” coral bleaching with occasional high mortality rates. For example, in 1998 a global mass coral bleaching event led to the death of 16% of the worlds corals [6].

Physiologically, this phenomenon is due to the breakdown of the phototrophic mutualistic symbiosis between scleractinian corals and dinoflagellate endosymbionts (genus *Symbiodinium* spp.), commonly referred to as zooxanthellae. This symbiosis breakdown can be the consequence of a large variety of environmental stressors [7-9], but one of the most important for mass coral bleaching is abnormal high sea surface temperatures which can act



synergistically with high solar irradiance [10-12] . At the cellular level, coral bleaching refers to a substantial or partial loss of the endosymbiotic algae from the coral tissues, and/or the loss or reduction of photosynthetic pigment concentrations within zooxanthellae [9].

At the molecular level, the first step of temperature or light induced coral bleaching is the photoinhibition mechanism experienced by the zooxanthellae [13-15]. This often results in the overproduction of reactive oxygen species (ROS) by transport chain electrons [16]. ROS are highly cytotoxic and some of them can easily cross biological membranes leading to severe oxidative stress in both host and symbiotic cells. This oxidative stress can result in the activation of cell necrosis and apoptosis [17, 18], which represent two of the six identified ways of endosymbiotic loss during bleaching [18-23]. The four other ways of symbiont disappearance are: i) *in situ* digestion of zooxanthellae by the coral host [24, 25], ii) expulsion by exocytosis or iii) by pinching off [24, 26], and iv) host cell detachment [22].

The increase in the incidence and magnitude of coral bleaching episodes in recent decades [27] and the present context of global warming [5] strengthens the interest in this research field. Studies on early molecular mechanisms triggering and leading to these different ways of symbiotic loss are necessary to better understand the phenomenon and can provide early molecular markers to monitor coral health. In this context, several comparative molecular studies were undertaken. They compared healthy, semi-bleached and bleached corals or symbiotic *versus* aposymbiotic anemones. These studies revealed different genes involved in the response to the stress as well as genes putatively involved in bleaching mechanism or symbiosis breakdown/onset [28-35]. Some of the genes identified in these different studies are promising candidates to explain bleaching processes but studies on their expression and function are now necessary to validate their putative role. For example, a recent study of Desalvo et al. (2008) evidenced a putative calcium homeostasis disruption that could trigger different cellular processes leading to cell death via apoptosis and necrosis. Concerning symbiosis regulation, *Sym 32*, a fasciclin domain containing protein, was shown to be differentially expressed between symbiotic and aposymbiotic anemones, could be involved in host/symbiont interaction and symbiosis breakdown under cadmium exposure [34, 36, 37].

In the present study, the experiment was specifically designed to identify genes regulated in the early stages of the thermal stress process leading to bleaching. To achieve this aim, we developed a comparative transcriptomic approach (by Suppression Subtractive Hybridization) comparing stressed corals before bleaching symptoms appears *versus* controls. Because our aim was also to develop functional markers that could be used to monitor coral

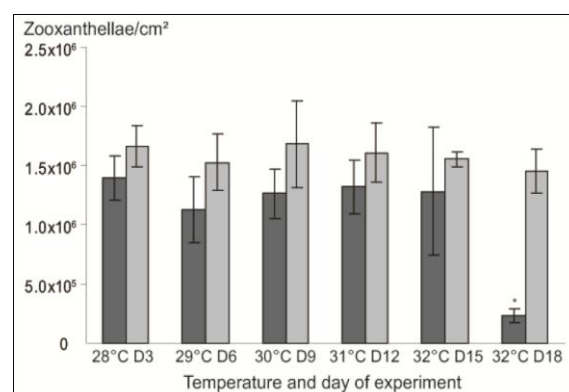
health, we choose *Pocillopora damicornis* as a model species due to its widespread distribution in the Indo-Pacific region [38] and its high sensitivity during mass bleaching events [39-42]. Our SSH approach led to the identification of two genes displaying an important down-regulation just before bleaching. Characterization of their precursors and immunolocalization experiments revealed their putative function and permitted the emergence of new hypotheses on coral bleaching mechanisms. In addition, these two genes constitute promising biomarkers for coral health monitoring.

## Results

### Bleaching monitoring

Zooxanthellae density and statistical tests (Fig. 1) showed that bleaching occurred in the stressed set of corals at 32°C, 15 days after the beginning of the protocol and was complete by the 18<sup>th</sup> day. In the control set, no bleaching or paling was observed throughout the experiment. After 15 days at 32°C, bleaching induced a large increase in the standard deviation (SD) of zooxanthellae density in comparison to the other points of the kinetic, suggesting that symbiosis in some corals was starting to break. Bleaching was well-established 18 days after the beginning of the protocol with a 79.9% reduction in zooxanthellae density.

In order to select genes regulated early during bleaching, we performed the SSH with samples taken at day 12 and 15. This choice was also driven by an experimental constraint whereby stressed and control samples must have similar zooxanthellae densities to avoid false positive transcripts due to a differential representation of zooxanthellae between the two conditions.



**Figure 1: Zooxanthellae density measured during the temperature stress.** Dark grey histograms refer to the stressed set, light grey histograms to the control set. The Kruskal-Wallis H-test shows significant differences in the stressed set ( $P < 0.05$ ). The significant differences ( $P < 0.05$ ) were identified using the Mann-Whitney U-test and indicated by a star.

## **EST sequencing, general characteristics of the BIG and BRG libraries and gene validation and selection**

Two SSH experiments were performed resulting in the construction of four cDNA libraries. The first SSH experiment was the result of the subtractive hybridization between the 31°C (D12) and control sets, and the second experiment between the 32°C (D15) and control sets. One hundred clones from each library were sequenced. To simplify the analysis, putative induced clones and putative repressed clones of the SSH libraries were respectively pooled in two new libraries called “Bleaching Induced Genes” (BIG) and “Bleaching Repressed Genes” (BRG). After sequencing, 147 and 118 high quality cDNA sequences were obtained from the BIG and the BRG libraries, respectively. BIG library ESTs coalesced into 15 contigs and 96 singletons, suggesting that the overall redundancy of the library was about 10.2% (Table 1). The BRG library coalesced into 17 contigs and 70 singletons for an overall redundancy of 14.4% (Table 1). In order to minimize redundancy in the EST database, sequences displaying 100% identity were submitted as a single sequence. ESTs aligning in the same contig but displaying differences in their nucleotidic sequence were submitted individually to the database. A total of 61 and 94 ESTs were submitted to the dbEST section of the NCBI/GenBank database for the BIG and BRG libraries respectively (GenBank: GH706795 to GH706855 and GH706856 to GH706949, for BIG and BRG library respectively). ESTs were subjected to BLASTN and BLASTX searches. Sequence similarities were considered to be significant when the expected value (e value) was less than  $10^{-2}$ . Gene encoding proteins involved in photosynthesis, oxidative detoxification, intracellular signalling pathway, metabolism, cytoskeleton structure, conserved protein domains, calcium homeostasis, cell/cell or cell/ligand interactions, protein degradation, chaperone protein and protein synthesis were selected for further analysis [see additional file 1 for, Top blast, GeneBank accession number and specific primers used for Q-RT-PCR]. Among the tested clusters (data not shown), only clusters 12 and 27 showed a drastic regulation. They display 101 and 10.1 fold transcript decreases under stress, respectively.

Clusters 12 and 27 belong to the functional class of cell/cell or cell/ligand interaction and their putative functions make them promising candidates as key factors of symbiosis breakdown/maintenance. Consequently, we decided to focus the remainder of the present study on these genes.

## Cluster 12 and 27 ORF characterization and protein structure

RACE-PCR experiments were performed to obtain the complete ORF of the two selected genes. The cDNA corresponding to cluster 12 displayed significant similarities (E value =  $3.10^{-7}$ ) with a predicted protein of *Nematostella vectensis*. The precursor displays a cysteine array (InterProScan) shared by snake toxins and some proteins involved in cell adhesion (the uPAR/Ly6/CD59/Snake toxin domain super-family). This gene was named *Pdcyst-rich*, for *Pocillopora damicornis* cystein-rich. The second gene (cluster 27) displayed significant similarities (E value =  $1.10^{-27}$ ) for the Millectin protein, isolated from *Acropora millepora* [43]. Domain analysis using the InterProScan software showed that this protein contained a DC-SIGN domain characteristic for lectins of the C-type. Consequently, this gene was named *PdC-Lectin*.

cDNA corresponding to *Pdcyst-rich* (GenBank: FJ628421) displays an ORF of 441 base pairs corresponding to a precursor of 147 amino acids (AA). The analysis of the primary structure by PSORTII prediction software reveals that it has a secretory protein-like structure with a 23 peptide signal sequence. Between the residue 25 and 133 of the precursor a domain similar to the uPAR/Ly6/CD59/Snake toxin family was identified using the InterProScan software. The size range of this domain is comprised between 70 and 92 AA [44]. This type of domain is present in a large variety of proteins involved in different functions, including T-lymphocyte activation (Ly-6, [45, 46]), fibrinogen formation (uPAR, [47, 48]), inhibition of the complement mediating lysis (CD59, [44]) and snake venom [49]. The principal structural features of this domain are the presence of (i) 8 to 10 cysteine residues involved in di-sulphide bond formation, and (ii) a typical motif “CCXXDXCN” at the C-terminal end of the domain [50]. As the proteins sharing the uPAR/Ly6/CD59/Snake toxin domain are classically N-glycosylated and GPI anchored, the N-glycosylation and GPI anchored status of the *Pdcyst-rich* protein were investigated using NetGlyc and PSORT2 software [51, 52]. The N-glycosylation site was predicted on the 75<sup>th</sup> residue of the precursor and a GPI anchored signal was found at the C-Terminal end of the protein (residues 144-147).

cDNA corresponding to *PdC-Lectin* (GenBank: FJ628422) displayed an ORF of 486 base pairs corresponding to a precursor of 162 amino acids (AA; Fig. 2A). The analysis of the primary structure by PSORTII prediction software revealed that it has a secretory protein-like structure with a 22 AA peptide signal sequence. The following 140 AA corresponded to a C-type lectin-like domain (CTLTD) shared by a large group of extracellular Metazoan proteins [53]. This domain is involved in recognition and binding of carbohydrates in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner [54]. The alignment of *PdC-Lectin* with the most similar CTLTD (Millectin

of *Acropora millepora*, Mermaid-1 of *Laxus oneistus*, CD 23 and DC-SIGN from *Homo sapiens*), showed the presence of highly conserved cysteine residues (Position: 52, 122, 146, and 158 on the precursor; Fig. 2B). These residues are involved in the three dimensional structure by di-sulphide bond formation. C1 (position 52) and C4 (158) link  $\beta 5$  and  $\alpha 1$  (the whole domain loop), and C2 (122) and C3 (146) link  $\beta 3$  and  $\beta 5$  (the long loop region, involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -carbohydrate binding and domain-swapping dimerization) [53]. The “WIGL” motif present between the residues 63 and 68 is involved in the formation of all tree hydrophobic cores and contributes to structure stabilisation [53]. The presence of all conserved motif and key residues underlines the hypothesis that *PdC-Lectin* CTLD is functional [53]. The highly conserved motifs “EPN” and “WND” in the CTLD (Fig. 2A) argue in favour of the specificity for mannose binding in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner [53]. In addition, the MODWEB server [55] was used to perform the homology modelling of PdC-Lectin. It provides a molecular model based on the crystal structure of the human DC-SIGNR carbohydrate recognition domain (CRD) [56] and presented a model-score of 1.00 (a model is predicted to be good when the model score is higher than 0.7).

**A**

```

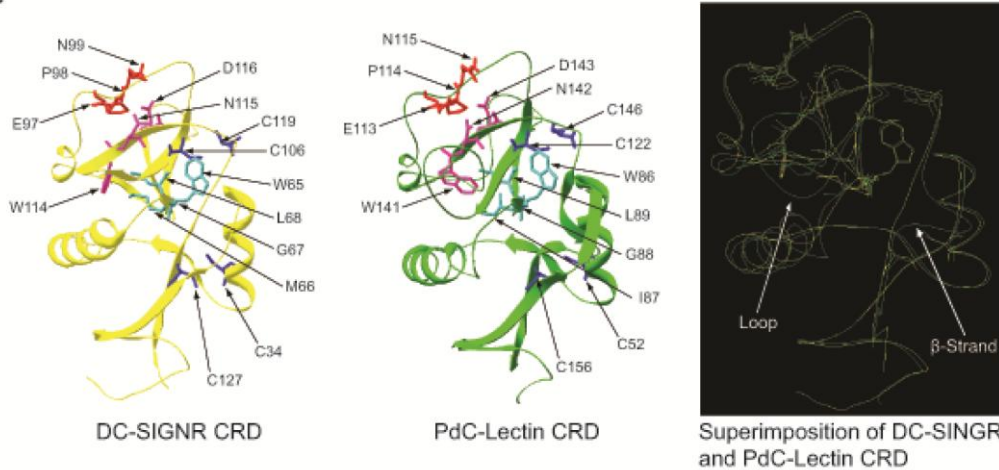
1 AAATACTGATCGTCCATCGATTAGGTGAAGACACTGAGAGTGAAAAAACCTTCAACCTG
61 CTTCAAAACCTTCCACCTCCTTATCAACTGACGAGAACCAGAAatgagaacttacgagatt
1 1 M R T Y A I
121 cttccactttgtatcgtgcttttgtctgctgggctggatgtgttcagcctattgccttgg
7 L P L C I V L L S A A G C V S A Y C P W
181 ggatggaggcagctcgacagcttttgcattatgcaagcagcacatccatgacttggcacc
27 G W R Q L D S F C Y Y A S S T S M T W H
241 caggccaacgattctgtcgaagactgggaggagacctggttaagattaccaatgcgcgg
47 Q A Q R F C R R L G G D L V K I T N A R
301 gaaaacgagtttgcctagccgctcgcgagggaagtctgcaccaacaaggaacaagtgtgg
67 E N E F V L A V A R K S A P T R K Q V W
361 atcggcctgatgtggaccgctaacgacttttactggagtgattactctgttccagctctac
87 I G L M W T A N D F Y W S D Y S V P V Y
421 aaagcctgggctccaaatgaaccgaatgaaaaatcccgggaacctgcagcaacatgtgg
107 K A W A P N E P N G K S R E P C S N M W
481 actgggtatacttccgttctgccaatcagagcaagcgggttactggaatgacatgcctgt
127 T G Y T S V L P I R A S G Y W N D M P C
541 acggtatcatctcactgccccttggcctggtgtgcaaaaagctcgcttgaACTGCTAAC
147 T V S S H V P F G L V C K K L A *
601 GCTGGAATACCAAAATCGACGCTGGAGATTAGAGGCAAAATTTGGTAATGGGATATTT
661 TAAAAAAAATCATAAGATAAATTTAAGGTGTAAGAAATGCTTGTTTTACAATAAAGC
721 TTAGCTTAAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**B**

PdC-Lectin	CVSAYCPGW	RQLDSFCYYA	SSTSMTWHQA	QRFC	RRLGG	DLVKITNARE
Millectin	KAVDPCGDVW	TKFEEYCYHV	GAKIMTEEQA	QYQ	DOEMDA	NLAKINSKEE
Mermaid-1	....CPAGW	URLNRSYKA	DQTIMNWADA	RTAC	.GKLG	DLVKITSEQ
CD23	FVCNTPCEKW	INFQRKCYF	GRGTRQWVHA	RYAC	.DDMEG	QLVSIHSPEE
DC-SIGN	RLCHPCPEW	TFPQNCYFM	SNSQRNWHDS	ITAC	.KEVGA	QLVVIKSAEE
						- C-type lectin domain starts
PdC-Lectin	NEFVLAVARK	SAPTRKQVWI	GLMW	.TA.N	DFYNSDYSVP	VYK...AWAP
Millectin	NNEVLDVAKR	HAPSARKVWI	GMKWENST	.R	NYYWYDYSVP	TFT...NWAP
Mermaid-1	NTEFVYELSRK	QAPSRNRMWI	GLKRNFTTPT	KFEWFDSRP	LYT...KWWT	
CD23	QDFLTKHASH	...TG..SWI	GLRNLDLK	.G	EFINVDGSHV	DYS...NWAP
DC-SIGN	QNFLQLQSSR	...SNRFTM	SLSDLNQE	.G	TWQNVDSGFL	LPSFKQYNNR
PdC-Lectin	NEPNGK.SRE	PCSNMWT...	GYTSVLPIRA	SGYWN	DMPT	VSSHVPFGLV
Millectin	GEPNGK.VKE	PCVAMYI...	QQYELLPVKA	AGYWN	DEVCD	.APHI...AAV
Mermaid-1	GEPNNHGASE	DCGEIYT...	FP...	LPDPR	AKHNN	DLPCD LGKVL
CD23	GEPTSRSQGE	DCVMMRSGSR	.....	.....	WNDA	FCD RKL
DC-SIGN	GEPNNVGE.E	DCAEFGSNG	.....	.....	WNDD	KCN LAK
PdC-Lectin	CKKLA.....	.....	.....	.....	.....	.....
Millectin	CKRL.....	.....	.....	.....	.....	.....
Mermaid-1	CEKSAYNK..	.....	.....	.....	.....	.....
CD23	CDRLATCTFP	ASEGSAESMG	PDSRPD	PDGRL	PTPSA	PLHS
-SIGN	CKKSAASC	SR	DEEQFLSP	APATP	NPP	PA.....

**C**



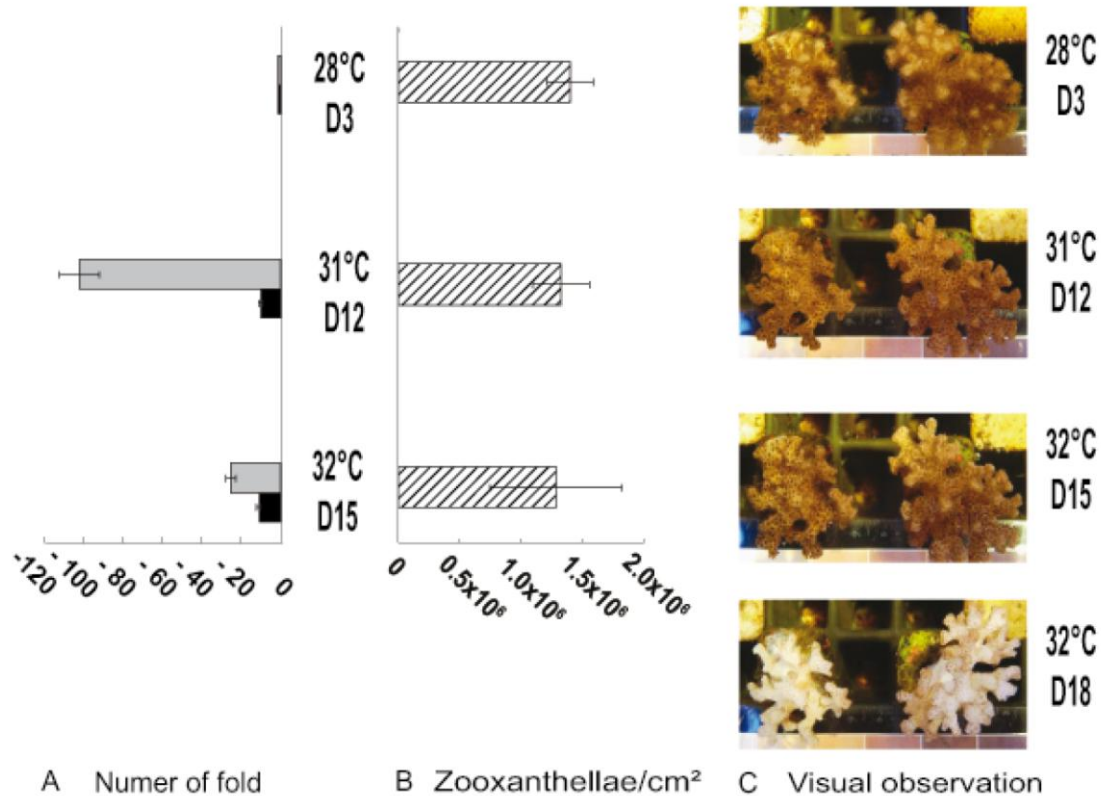
**Figure 2: Sequence and structure analysis of PdC-Lectin gene and protein.** A) cDNA and derived amino acid sequence of PdC-Lectin. Black boxes indicate a predicted signal peptide. Underlined area indicates the sequence span of an identified C-type lectin domain. Grey boxes denote conserved mannose binding motifs in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner. Cysteines belonging to the C-type lectin conserved array are in bold. The WIGL motif is highlighted in grey. B) the alignment of C-type lectin domains of PdC-lectin with different C-type lectin domains contained in several similar proteins identified by Blast searches. Conserved amino acid positions are highlighted. Accession numbers: Millectin (GenBank: EU717895), human CD23 (GenBank: P06734), human DC-SIGN (GenBank: Q9NNX6), Mermaid-1 (GenBank: AY927371). C) the 3D structure of PdC-Lectin CRD. Crystal structure of DC-SIGNR CRD (yellow) and molecular model of PdC-Lectin CRD (green). Superposition of the crystal structure of DC-SIGNR CRD and molecular model of PdC-Lectin CRD (C). All conserved motifs are highlighted; “WIGL” is in clear blue, “EPN” in green, “WND” in pink. The four highly conserved cysteines are in dark blue.

The molecular model (Fig. 2C) revealed that all residues involved in the binding of mannose in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (EPN and WND) are located in similar structures (a long loop region for EPN and a  $\beta$  strand for WND; Fig. 2C). Moreover, the four conserved cysteines and the “WIGL” motif known to be involved in the maintenance of the CTLD fold have a conserved position in the 3D structure (see superimposition of Fig. 2C). The differences (one loop and one  $\beta$ -strand) which can be observed between the template and the molecular model are located in regions of the molecule that are not considered as essential for function (see Fig. 2C).

### **Expression rates of *PdC-Lectin* and *Pdcyst-rich* in comparison to classical indicators of bleaching**

Q-RT-PCR were performed on RNA extracted from coral nubbins sampled at 28°C (D3), 31°C (D12) and 32°C (D15) of the kinetic to follow the transcript variations corresponding to *PdC-Lectin* and *Pdcyst-rich* during the stress protocol (Fig. 3). Transcript amounts were expressed as a relative ratio to the control values obtained at 28°C (D3). For both genes, although zooxanthellae densities were stable until day 15 (Fig. 3B), transcript decreases were observed after 12 days (Fig. 3A). Indeed, 101 and 10.1 fold decreases were measured on the 12<sup>th</sup> day (D12) of the protocol for *Pdcyst-rich* and *PdC-Lectin* genes. At 32°C (D15), the zooxanthellae decrease was non-significant and the levels of *Pdcyst-rich* and *PdC-Lectin* transcripts remained low (25 and 11 fold decreases, respectively compared to control, Fig. 3B).

In conclusion, these two genes were drastically down regulated at least six days before the first usual symptoms of bleaching (visual observation, Fig. 3C and zooxanthellae density decreases, Fig. 3B).



**Figure 3: Transcription rates of PdC-Lectin and Pdcyst-rich in parallel with the classical indicator of bleaching.** Expression rate (A) of PdC-Lectin (Black histogram) and Pdcyst-rich (Grey histogram) and the corresponding zooxanthellae density (B, Hatched histogram) at 28°C (day 3, D3), 31°C (D12) and 32°C (D15). Pictures of coral nubbins at the corresponding stages are shown (C).

### Genes corresponding to PdC-Lectin and Pdcyst-rich are expressed by coral cells

In order to determine the organism (host or symbiont) expressing each candidate gene we developed cross PCR experiments performed on DNA extracted from the holobiont (host plus symbiont, Fig. 4, lane 1) and from pure cultured *Symbiodinium* spp. (isolated from *S. pistillata* and *G. fascicularis*, Fig. 4, lane 2 and 3, respectively). These PCR were performed with oligonucleotides specifically amplifying both genes of interest and *Symbiodinium* spp. specific primers (ss5Z and ss3Z) identified in a previous study [57] and known to amplify small ribosomal subunit RNA. Whereas primers specific to genes encoding PdC-Lectin and Pdcyst-rich proteins only amplified DNA extracted from holobionts (Fig. 4, lane 1), ss5Z and ss3Z primers amplified all DNA tested (Fig. 4, lanes 1, 2 and 3). This last result demonstrated that PdC-Lectin and Pdcyst-rich protein corresponding genes are specific for corals and confirmed similarity results obtained after database comparisons (see above).



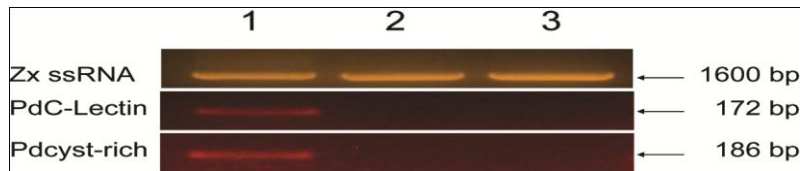


Figure 4: *PdC-Lectin and Pdcyst-rich are expressed by the host.* Presence of *PdC-Lectin* and *Pdcyst-rich* genes and the zooxanthellae small ribosomal subunit RNA (*Zx ssRNA*) corresponding gene are investigated by PCR using specific primers on DNA extracted from holobionts (corals plus zooxanthellae, lane 1) or zooxanthellae isolated from *S. pistillata* and *G. fascicularis* (lanes 2 and 3, respectively).

### Immunolocalization of PdC-Lectin and Pdcyst-rich proteins

In order to further examine the location of PdC-Lectin and Pdcyst-rich proteins within coral tissues, antibodies were raised against synthetic peptides designed from PdC-Lectin and Pdcyst-rich primary structures. Initially, the specificity of the antibodies was tested by Western blot experiments on holobiont extracts which revealed a single band in both cases (data not shown).

In order to help the reader interpret immunolabeling observations, a schematic representation of the anatomy and histology of *P. damicornis* is provided in Fig. 5. *P. damicornis* is a colonial coral characterized by the presence of numerous polyps, linked together by a common tissue usually referred to as the coenosarc (Fig. 5). In the polyps, the tentacles are only composed of oral tissue (Fig. 5A) whereas the coenosarc is composed of oral and the aboral tissues (Fig. 5B). Each of these tissues is composed of an ectoderm separated from the endoderm by an acellular layer of mesoglea (Fig. 5B). The oral endoderm faces the coelenteron (gastric cavity) and contains intracellular symbionts commonly called zooxanthellae. The aboral ectoderm faces the skeleton, is composed of calicoblastic cells and is referred to as the calicoblastic ectoderm or calicodermis.

Immunolabeling with anti-PdC-Lectin and anti-Pdcyst-rich protein antibodies is shown in Fig. 6 (tentacles) and Fig. 7 (coenosarc). Distinct tissues were immunolabeled: anti-PdC-Lectin antibodies labeled the oral endoderm containing intracellular zooxanthellae (Fig. 6A) whereas anti-Pdcyst-rich antibody labeled the aboral ectoderm (Fig. 7A). When tissues were observed at higher magnification, the immunolabeling with anti-PdC-Lectin antibodies showed a peripheral pattern adjacent to or in the cellular membrane of the endoderm in contact with the coelenteron (Fig. 6B, E and F). Immunolabeling appeared clearly associated with the membranes (Fig. 6B) and to granular structures located next to the membranes (Fig.

6F). Additionally, in some cases the labeling was observed at the interface between free zooxanthellae and endodermal host coral cells (Fig. 6C and G).

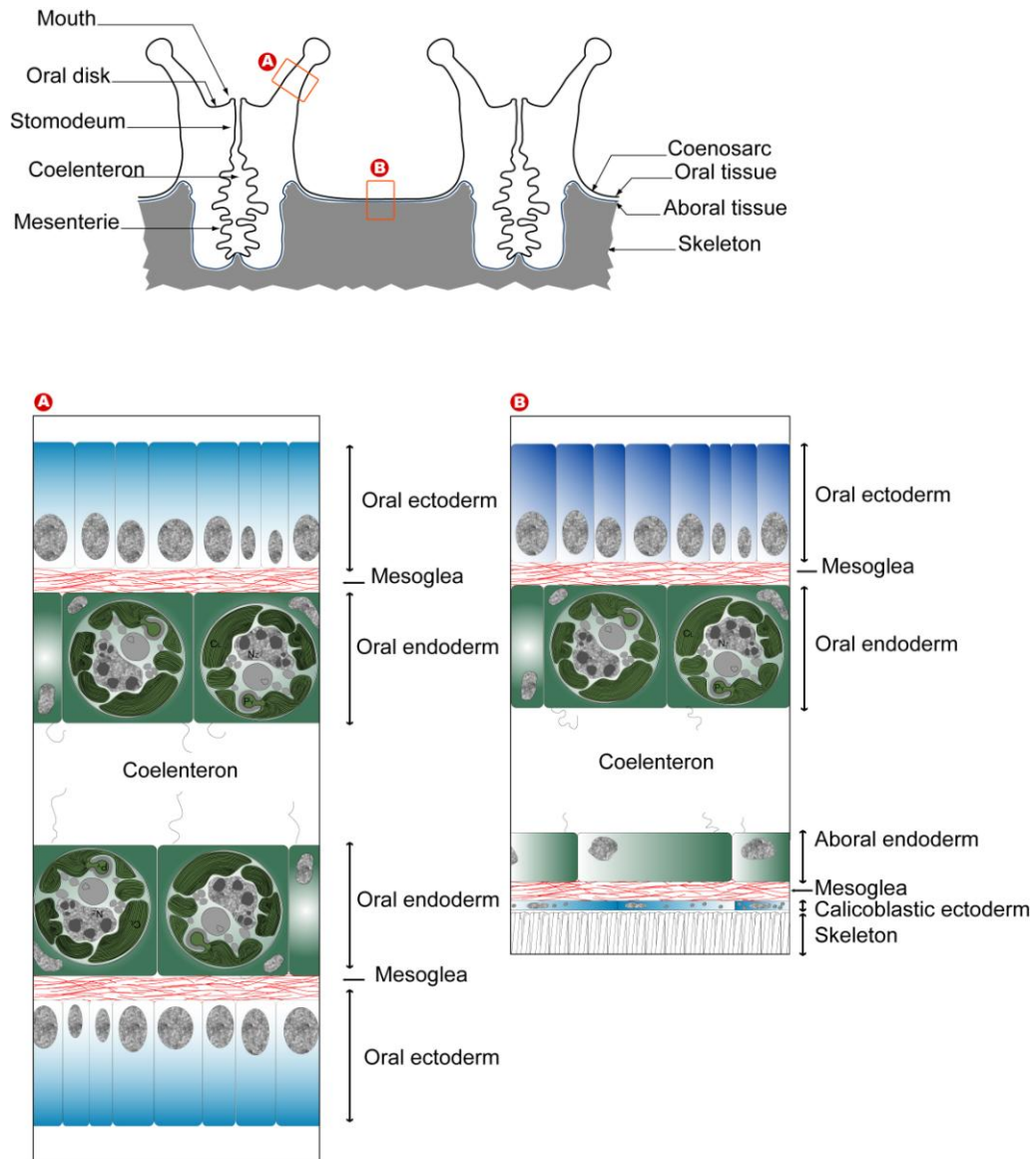
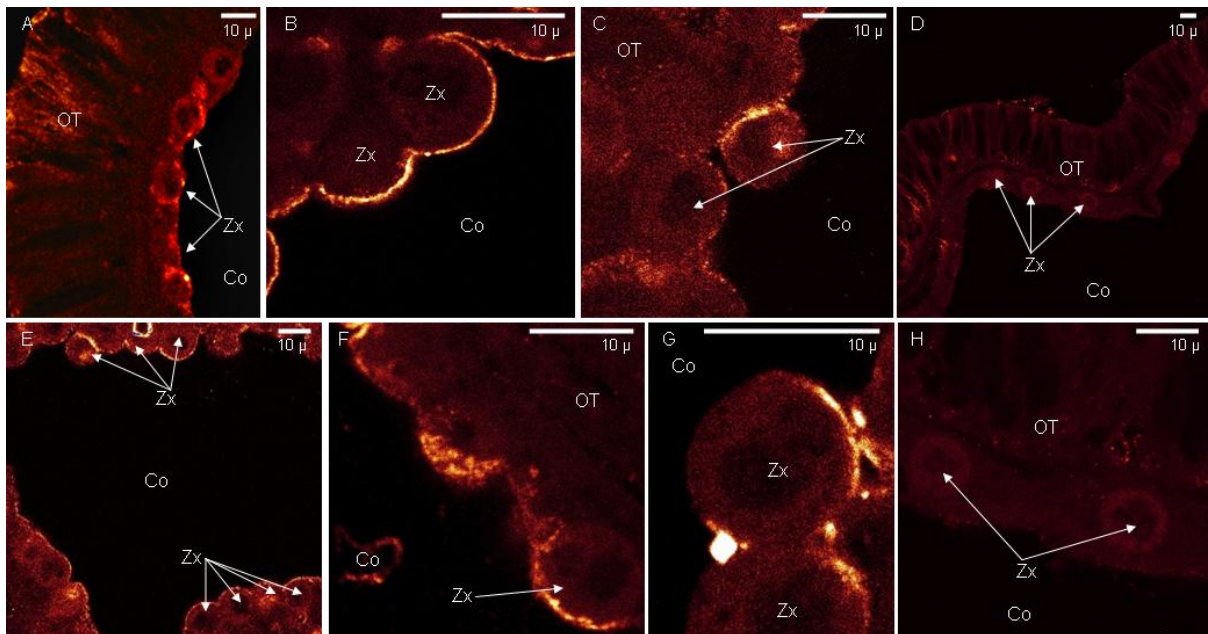


Figure 5: **Schematic representation of the anatomy and histology of *P. damicornis*.** (A) the histology of the tentacle composed of oral tissues and (B) the histology of the coenosarc composed of oral and aboral tissue.

Anti-Pdcyst-rich antibodies labeled the calicoblastic ectoderm (Fig. 7A) which faced the skeleton in calcified samples. At higher magnifications, it appeared that the immunolabeling of calicoblastic cells was granular and intracellular (Fig. 7B, C).

The specificity of the immunolabeling was checked by pre-adsorption of anti-PdC-Lectin and anti-Pdcyst-rich protein IgG with the corresponding synthetic peptides used for

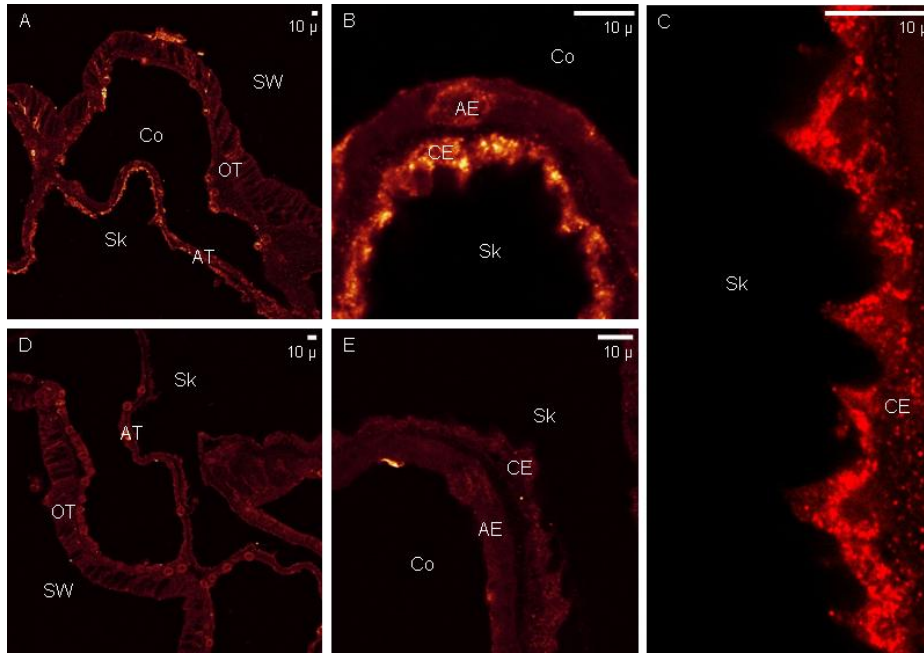
immunizations. After this treatment, sections of tissues were no longer labeled (Fig. 6D, H and Fig. 7D, E) demonstrating the specificity of the immunolabeling.



**Figure 6: PdC-Lectin immunolabeling in endodermal cells of the oral tissue in tentacles.** Anti-PdC-Lectin coupled to Alexafluor 568 is revealed in orange (A), (B), (C), (E), (F) and (G). (D) and (H) represent control experiments performed with anti-PdC-Lectin antibodies pre-adsorbed with the synthetic peptide used for immunization. (A), (D) and (E) are large views of the oral tissue (OT) facing the coelenteron (Co) of coral. (B), (C), (F), (G) and (H) correspond to magnifications of coral cells in contact with the coelenteron (Gastric cavity). Other abbreviations: Zx zooxanthellae.

## Discussion

The aim of the present study was to identify molecular actors involved in the breakdown of the phototrophic mutualistic symbiosis between a scleractinian coral (*Pocillopora damicornis*) and its dinoflagellate endosymbiont (genus *Symbiodinium* spp.) during thermal stress. In contrast to some previous studies, thermal stress conditions used in the present work corresponded to natural conditions in terms of amplitude and rapidity of temperature increase. After SSH and validation steps, two genes belonging to the functional classes of cell/cell or cell/ligand interaction present an important down-regulation. Their down-regulation and putative function make them very promising candidates as key indicators of symbiosis breakdown/onset. Consequently, we decided to focus the remainder of the present study on these genes.



**Figure 7: *Pdcyst-rich* protein immunolabeling in calicoblastic cells.** Anti-*Pdcyst-rich* protein coupled to Alexafluor 568 is revealed in orange (A), (B) and (C). (D) and (E) represents control experiments performed with anti-*Pdcyst-rich* protein antibodies pre-adsorbed with the synthetic peptide used for immunization. (A) and (D) are large views of oral tissue (OT) and aboral tissues (AT) of the coenosarc. (B), (C) and (E) correspond to magnifications of the aboral tissue showing the aboral endoderm (AE), and the calicoblastic ectoderm (CE). Other abbreviations: Co coelenteron, Sk skeleton, SW seawater.

The first gene, *Pdcyst-rich*, displayed significant similarities with a predicted protein of *N. vectensis*. Their complete ORF characterization revealed that its precursor displays a putative signal of secretion and all key features shared by the uPAR/Ly6/CD59/Snake toxin family. As this domain is common to proteins involved in a large variety of functions, structural elements are not sufficient to provide hypotheses about the function of *Pdcyst-rich*. PCR experiments revealed that the corresponding gene is expressed in coral cells and complementary immunolocalization experiments showed that the protein displays a granular location in the calicoblastic ectoderm in contact with the skeleton. As *Pdcyst-rich* proteins are synthesized and stored in granules of this skeletogenic tissue, we investigated the suspected role of proteins of the uPAR/Ly6/CD59/Snake toxin family in mineralization process. Two proteins were interesting in this context: RoBo-1 [58] and HEP21 [59]. The function of these proteins remains elusive but their involvement in mineralization process of bones and eggs was hypothesized [58, 59]. All these data taken together and in particular the granular location of *Pdcyst-rich* proteins in calicoblastic cells, suggests that *Pdcyst-rich* proteins could also play a role in the mineralization process. As it was shown that stress has an immediate effect triggering growth and calcification arrest in scleractinian corals [10, 60-62], the strong decrease of the transcript corresponding to *Pdcyst-rich* protein could reflect the trade-off

mechanism occurring during stress and leading to the arrest of the mineralization process. A recent transcriptomic study analyzing differential gene expression during thermal stress in *M. faveolata* also provides evidence of transcript decreases of genes involved in calcification [29].

The second gene identified in the present study was named *PdC-Lectin*. It contains a putative signal peptide and a C-type lectin-like domain shared by a large group of extracellular Metazoan proteins with diverse functions [53]. This domain is involved in recognition and binding of carbohydrates in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner [54]. Alignments and diverse structural analyses revealed that PdC-Lectin is functional and shares the mannose binding specificity characteristics of the human DC-SIGN CRD. The presence of the highly conserved motif “EPN” and “WND” in the CTLD of PdC-Lectin argues in favour of the specificity for mannose binding in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner [53] and the molecular model obtained using the MODWEB server reveals that all residues involved in this binding specificity are located in similar predicted structures by comparison with the human DC-SIGNR CRD. Moreover, the differences observed between the template (human DC-SIGNR CRD) and the PdC-Lectin molecular model are located in regions of the molecule that are not considered as essential for function. In addition, PdC-Lectin displays high similarities (E value =  $1.10^{-27}$  and see alignment Fig. 2B) for lectins recently characterized from *Acropora millepora* [43]. These lectins, named Millelectin, were isolated by mannose affinity chromatography and were shown to bind to bacterial pathogens as well as coral symbionts, dinoflagellates of the genus *Symbiodinium*. All these elements taken together strengthen the hypothesis that PdC-Lectin is functional and shares the mannose binding specificity of the human DC-SIGN CRD.

Recent work has provided evidence of the key role played by lectin/glycan interactions in symbiosis onset [63, 64]. The Virginia Weis group provided evidence for a recognition mechanism involving lectin/glycan at the onset of symbiosis between aposymbiotic larvae of the coral *Fungia scutaria* and their endosymbiotic zooxanthellae [64]. They showed that algal cell surface glycan ligands, such as  $\alpha$ -mannose/ $\alpha$ -glucose and  $\alpha$ -galactose play a role in recognition during initial contact at the onset of symbiosis [64]. A second study described the role of another lectin, called Mermaid-1 [63]. This protein displayed the same structural features as PdC-Lectin sharing the same DC-SIGN domain. Mermaid-1 mediates symbiotic bacteria acquisition by the marine nematode *Laxus oneistus*. In this thiotrophic symbiosis, a monolayer of symbiotic sulphur-oxidizing bacteria covers the cuticle of the nematode. The

authors showed that this secreted  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mannose-specific lectin is capable of inducing symbiont aggregation and acquisition [63].

The different structural and bibliographic elements described here argue in favour of a putative role for PdC-Lectin in recognition and binding between the host and the symbionts. The putative signal of secretion, the structural similarities with these different proteins sharing the DC-SIGN domain and its mannose binding specificity suggest that PdC-Lectin could interact with zooxanthellae mannose ligands to mediate symbiont acquisition as it was described for the *F. scutaria/ Symbiodinium* model [64]. In order to strengthen this hypothesis we performed expression analysis experiments. We confirmed the expression of *PdC-Lectin* in coral cells but the most interesting finding was obtained using immunolocalization experiments where we found evidence of PdC-Lectin immunoreactivity in coral cells belonging to endodermal tissue. This labeled tissue is in contact with free zooxanthellae that are transitorily present in the coelenteron (gastric cavity). We observed a peripheral immunostaining pattern adjacent to or in the cellular membrane in contact with the coelenteron. In addition, some free zooxanthellae were observed in contact with endodermal cells and interestingly, as shown in Fig. 6C and G, the labeling appears at the interface between zooxanthellae and host coral cells. These data strongly suggest a putative role of PdC-Lectin in zooxanthellae interaction and acquisition.

Finally, our hypothesis is strengthened by the diminution of the *PdC-Lectin* transcript level during stress and during symbiosis breakdown. *PdC-Lectin* transcript concentration decreases just before bleaching occurs and remains low during bleaching process. This means that this gene could be regulated just before symbiosis breakdown. Consequently, and in agreement with the previous data obtained, we propose that bleaching is due in part to a decrease in zooxanthellae acquisition and/or sequestration.

## Conclusion

This novel hypothetical mechanism could appear in conjunction with different cellular events reviewed in a recent paper [65]. In this review, the author examined the cellular events leading to the collapse of symbiosis during heat and light stress. Briefly, ROS is shown to play a central role in both injuries to the partners and to inter-partner communication of a stress response. This review also presented evidence that bleaching is a host innate immune response against symbionts. Finally, the different ways of elimination or removal of the

symbiont tissues are described through a variety of mechanisms including exocytosis, host cell detachment and host cell apoptosis. Our work reveals another interesting hypothesis with the inhibition of zooxanthellae acquisition processes. During heat stress zooxanthellae could be considered as toxic due to the over-production of ROS and therefore eliminated by host immune responses.

Future work focusing on *PdC-Lectin* function has to be conducted to verify our hypothesis. We could study the process of zooxanthellae acquisition during the resilience process following experimental bleaching. Recombinant PdC-Lectin and antibodies directed against recombinant PdC-Lectin could be used to facilitate or inhibit the acquisition process of cultured and labeled zooxanthellae during resilience. This functional validation is necessary to be sure of having an early marker of thermal bleaching.

This marker could be used by coral reef managers to (i) distinguish between different stresses on corals, and (ii) precisely and accurately predict bleaching events in conjunction with temperature anomalies indices such as "Degree Heating Weeks" or "Hotspot" developed by the NOAA. This will help managers in the implementation of policy responses and compensatory measures. In addition, these functional biomarkers of thermal stress may be used to evaluate the health of coral transplants kept in public aquaria, in coral farms and for coral nubbins transplanted during restoration projects as these entities are key factors in coral reef conservation in a sustainable development and global warming context.

## **Methods**

### **Biological material**

The *Pocillopora damicornis* isolate used in the present study was harvested in Lombok (Indonesia, CITES number: 06832/ VI /SATS/ LN /2001) and maintained at the Cap d'Agde Aquarium (France). For our experimental stress, *P. damicornis* nubbins (10 g; 7 cm high; 6 cm in diameter) were propagated by cutting branches from parents and then fixing on a concrete support. To avoid toxicity and to facilitate fixation of the nubbins, the concrete supports were first rinsed and biologically stabilized by immersion in aquaria for two months. The nubbins were used after one month to allow complete cicatrisation and physiological stabilization [66]. During this cicatrisation step, nubbins were maintained at 27°C.

In order to determine which cells (host or symbiont) were expressing the candidate genes, two zooxanthellae isolates were used. The first corresponds to clonal cultures of zooxanthellae (clade A [67]) originally isolated from a Red Sea colony of *Stylophora pistillata* [68]. The second corresponds to clonal cultures of zooxanthellae (clade B) originally isolated from a Red Sea colony of *Galaxea fascicularis* [69]. Both zooxanthellae clades were cultured in 250 mL screw-top polycarbonate Erlenmeyer flasks (Corning®) in modified ASP-8A medium [70] at pH 8.2. The zooxanthellae were grown in an incubator at  $26 \pm 1$  °C under a PAR irradiance of  $150 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $\approx 33 \text{ W m}^{-2}$ ) from Sylvania Gro Lux ® and daylight fluorescent tubes, on a 12:12 h (light:dark) photoperiod. The stock cultures were transferred monthly. Cells were used in stationary phase.

### **Thermal stress protocol**

Forty-six nubbins were randomly distributed between two sets (one stressed set and one control set) contained in two 200 L tanks (110 cm X 90 cm X 20 cm). These colonies were then acclimatized to a temperature of 28°C for two weeks [62]. This temperature corresponds to the sea surface temperature observed during the warmer months in most coral reefs around the world [11, 60, 71-76]. To create stress conditions triggering an *in situ* mass bleaching event, the temperature of the stressed set was increased by about 1°C every three days, until 32°C was achieved (D15). This last temperature corresponds to the maximal temperature observed in different coral reefs during mass bleaching events [11, 60, 71-76]. This temperature threshold was then maintained until bleaching occurred (D18) while the control set was maintained at 28°C (Fig. 8). For each condition (stressed and control), three nubbins were randomly sampled at the end of each step (every three days). Three apices of 0.5 cm were cut from each nubbin for zooxanthellae density measurements. Nubbins and apices were frozen and stored in liquid nitrogen until analysed.

Aquaria temperatures were controlled by connecting an aquarium heater (600W, Schego) to an electronic thermostat (Hobby Biotherm Professional). Aquaria were illuminated by metal halide lamps (Osram Day Light 5200 K, 400W) providing an irradiance of  $350 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (quantum meter: QMSW-SS; by Apogee Instruments Inc.) on a 12:12h (light:dark) photoperiod. All other seawater characteristics (e.g., salinity  $36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.3) were maintained constant and equal for each set. A constant water flow was maintained in each tank using a water pump (Tunze Nanostream 6045, delivery  $4500 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Seawater was continuously recycled at rate of 12 tank volumes per hour by coupling the action of a



biological filter and an Aquavie protein skimmer (model: PS 1200), and refreshed by natural filtered Mediterranean seawater heated to 28°C at a renewal rate of 2.2 tank volumes per hour.

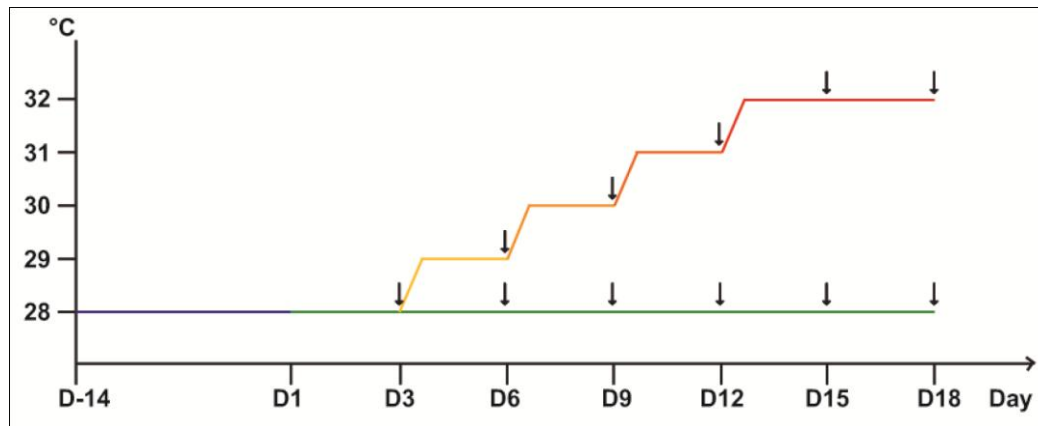


Figure 8: **Schematic representation of the experimental design.** After a 14 days-acclimatization step at 28°C ( D-14 to D1, blue line), the stressed set (yellow to red line) was submitted to a gradual water temperature increase of one degree every 3 days until 32°C was reached (D3, D6, D9, D12, and D15). This last temperature was maintained until corals bleached (D18). In parallel, the control set (green line) was maintained at 28°C all along the experiment. Sampling times are indicated by arrows. Three nubbins were sampled for each time of the kinetic and each treatment.

## Bleaching monitoring

Zooxanthellae density was monitored during the whole experiment in order to follow the bleaching process. Coral tissues were extracted using a Water Pick [77] in 0.5µ of filtered sea water. The slurry was homogenised using a Potter grinder and zooxanthellae were counted using an improved version of the Histolab 5.2.3 image analysis software (Microvision, Evry, France) [78]. Zooxanthellae number was then standardized per skeletal surface area, using the wax protocol described in [79].

The normality of the data set was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. As data was not normally distributed we used non-parametric statistical procedures. The Kruskal-Wallis H-test was used to compare the zooxanthellae density measures within each set. The Mann-Whitney U-test was used to compare the zooxanthellae density measures at each point on the kinetic between the stressed and control sets. All statistical analyses were conducted using GraphPad instat 3 (Kruskal-Wallis) and SPSS 10.0 (Kolmogorov-Smirnov and Mann-Whitney).  $\alpha$  was set at 0.05 for all analyses.

## RNA extraction and mRNA purification

Tissues from three nubbins (sampled for each stress and control conditions) were harvested using a Water Pick in 800ml of 0.5 $\mu$  filtered seawater refrigerated at 4°C. Extracts were pooled and centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. Supernatant was discarded and pellets were homogenized in 15 ml of Trizol (Invitrogen). Total RNA was extracted following manufacturer instructions. mRNAs were purified using the NucleoTrap mRNA mini kit (Macherey-Nagel).

### **Subtractive cDNA library construction**

Forward and reverse libraries were constructed by subtracting mRNA from stressed nubbins with mRNA from control nubbins. Two independent experiments were performed: D12 stressed *versus* control corals and D15 stressed *versus* control corals. SSH libraries were produced using the PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech). Tester and Driver cDNA were prepared using 2  $\mu$ g of poly(A)<sup>+</sup> RNA. Enzyme digestion, adapter ligation, hybridization, and PCR amplification were performed according to protocols provided by the manufacturer (Clontech). PCR products were cloned into pCR4-TOPO cloning vectors using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) and transformed into One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen).

### **DNA Sequencing, sequence analysis and modelling**

For each library, 100 clones were randomly selected and single pass sequenced using a dideoxy-dye-terminator method (CEQ<sup>TM</sup> DTCS-Quick Start Kit, Beckman coulter) and a CEQ<sup>TM</sup> 8000 apparatus (Beckman Coulter). Vector and adaptor sequences were trimmed from all sequences using Sequencher<sup>TM</sup> software (Gene Codes Corporation). High quality ESTs, longer than 150 bp in length, were assembled in clusters or unique sequences from singletons and submitted to database searches using BLASTX and BLASTN programs [80]. Specific domain searches were performed using InterProScan program [81]. EST sequences have been submitted to the dbEST database.

Homology modelling was performed on MODWEB [55] and the protein diagrams constructed on Swiss-PdbViewer 4.0.1 [82]. The three-dimensional (3D) structure comparison between the template and the molecular model was made using Superpose web server [83].

## Real Time PCR

Gene encoding proteins involved in photosynthesis, oxidative detoxification, intracellular signalling pathway, metabolism, cytoskeleton structure, conserved protein domains, calcium homeostasis, cell/cell or cell/ligand interactions, protein degradation, chaperone protein and protein synthesis were selected for quantitative analysis of their transcripts. Real-Time RT-PCR was performed on total RNA extracted from the samples used for SSH. Reverse transcription was performed using the superscript III enzyme (Invitrogen). Specific primers for Q-RT-PCR were edited using the Light Cycler Probe Design Software version 1.0 (Roche Diagnostics) and are provided in Table 2. The following Light Cycler run protocol was used: denaturation program (95°C, 10 min), amplification and quantification programs repeated 40 times (95°C for 15 s, 60°C for 5 s, 72°C for 16 s), melting curve program (60-95°C with a heating rate of 0.1°C per second and continuous fluorescence measurement), and a cooling step to 40°C. Amplification of single highly specific products was verified (melting curve analysis). For each reaction, the crossing point (CP) was determined using the “Fit Point Method” of the Light Cycler Software 3.3 (Roche Diagnostics). PCR reactions were performed in duplicate and the mean values of the CP were calculated.

*Table 1: General characteristics of the BIG and BRG libraries.*

\*  $R = nEST \text{ assembled in cluster} / \text{Total EST}$

	BIG library	BRG library
<b>Sequenced clone</b>	200	200
<b>Analysed cDNA</b>	147	118
<b>Average insert size (bp)</b>	360	429
<b>Average EST size (bp)</b>	310	308
<b>EST contigs</b>	15	17
<b>Singletons</b>	96	70
<b>Redundancy* (%)</b>	10.2	14.4

For each candidate gene, the level of transcription of the target gene (Tg) was normalized using the transcription rate of the reference gene (Rg). The Rg used in the present study is the 28s ribosomal RNA from *Symbiodinium* spp. (GenBank: AJ830930). The transcription ratio (R) was calculated according to the formula:

$$R = (E_{Tg})^{CPTg} / (E_{Rg})^{CPRg}$$

## **Complete Open Reading Frame characterisation of the validated candidates**

RACE PCR experiments were performed to characterize the complete Open Reading Frame (ORF) of the validated genes. Total RNA extraction and polyA<sup>+</sup> purification were conducted on non stressed nubbin tissues (described above). RACE PCR experiments were performed using the SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). The final PCR amplification for the 5' and 3' ends was conducted using the Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech). PCR products were cloned, sequenced, and the sequences analysed as previously described.

## **Determination of the organism (host or symbiont) expressing the candidate genes**

We developed cross PCR experiments performed on DNA extracted from the holobiont (host plus symbiont) and from pure cultured zooxanthellae to determine the organism (host or symbiont) expressing each candidate gene. Holobiont and zooxanthellae DNAs were extracted using DNazol reagent (Invitrogen). Specific primers (see Table 2) were designed for all the validated candidates and the zooxanthellae-specific primers ss5Z (5'-GCAGTTATAATTTATTTGATGGTCACTGCTAC-3') and ss3Z (5'-AGCACTGCGTCAGTCCGAATAATTCACCGG) identified in a previous study [57], were used in the present one. PCR reactions were performed using the Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech). PCR products were loaded on 1% agarose gels.

## **Peptide and antibodies**

BSA-coupled peptides (Genpep, France) were used to immunize New Zealand rabbits as previously described [84]. Peptide sequences used were CAVARKSAPTRKQVWI and CFTMKFSTTPEVTFEM for PdC-Lectin and Pdcyst-rich proteins, respectively. Sera of immunized rabbits were collected and tested for the presence of specific Igs three months after the initial injection using ELISA [85] with uncoupled peptides adsorbed onto Maxisorp plates (Nunc). IgG fraction was purified by affinity chromatography [86] and antibody specificity was tested by Western blot as previously described in [87].

## **Immunolocalization procedures**

Tissues from unstressed colonies *Pocillopora damicornis* were processed following a procedure previously described in [88]. Tissues embedded in Paraplast were cut into thin section (7  $\mu\text{m}$ ), mounted on silane-coated glass slides stored at 4°C in a dry atmosphere.

Immunolocalization on tissue sections was performed according to a protocol previously described in [88]. Briefly, deparaffinized sections were incubated for 1 h at room temperature in saturating medium (1% BSA, 0.2% teleostean gelatine, 0.05% Tween20 in 0.05 mol.L<sup>-1</sup> Phosphate-buffered saline [PBS] pH 7.4). The samples were then incubated overnight at 4°C in a moist chamber with the purified IgG at 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  in the preceding buffer. The primary antibodies surplus was discarded by multiple rinsing in the saturating medium and samples incubated for 1 h at room temperature with biotinylated anti-rabbit antibodies (secondary antibodies) diluted 1:250 in the saturating medium. After incubation, slides were rinsed with PBS pH 7.4, and samples finally stained for 15 min with streptavidin AlexaFluor 568 1:50 diluted (Molecular probes) and 4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI (Sigma, 2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Sections were mounted in Pro-Long antifade medium (Molecular Probes) and observed with a confocal laser-scanning microscope (Leica, TCS4D).

## **Authors' contributions**

JVD and GM conceived and coordinated the study, participated in molecular genetic studies (SSH) and wrote the manuscript. MA and DA participated in the design and the coordination of the study, drafted the manuscript. ER and DD participated in RACE-PCR experiments and DNA sequencing. LF and JVD helped design and conduct the experimental procedures in the aquaria. YM participated in the molecular modelling of PdC-Lectin. CFP participated in the measurements of zooxanthellae density and drafted the manuscript. ST, ET and DZ performed immunolocalization experiments and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). The authors are indebted to Michel Pichon and Christoph Grunau for his help and many helpful

discussions. We thank Alain Pigno from the Cap d'Agde Public Aquarium for his help in the project. We thank Severine Lotto, Jean-François Allienne, Cecile Rottier and Pierre Tisseyre for technical assistance, and Jérôme Bossier for his help in statistical procedure.

## References

1. Hughes T, Baird A, Bellwood D, Card M, Connolly S, Folke C, Grosberg R, Guldberg H, Jackson J, Kleypas J, Lough J, Marshall P, Nyström M, Palumbi S, Pandolfi J, Rosen B, Roughgarden J: **Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs.** *Science* 2003, **301**:929-933.
2. Donner SD, Skirving WJ, Little CM, Oppenheimer M, Hoegh-Guldberg OVE: **Global assessment of coral bleaching and required rates of adaptation under climate change.** *Glob Chang Biol* 2005, **11**:2251-2265.
3. Chabanet P, Adjeroud M, Andréfouët A, Bozec Y, Ferraris J, Garcia-Charton J, Schrimm M: **Human-induced physical disturbances and their indicators on coral reef habitats: A multi-scale approach.** *Aquat Living Resour* 2005, **18**:215-230.
4. Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatzilios ME: **Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification.** *Science* 2007, **318**:1737-1742.
5. Lesser MP: **Coral reef bleaching and global climate change: Can corals survive the next century?** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:5259-5260.
6. Wilkinson C: *Status of Coral Reefs of the world.* Australia: Wilkinson, C; 2000.
7. Brown BE: **Coral bleaching: causes and consequences.** *Coral Reefs* 1997, **16** (supplement):129-138.
8. Douglas AE: **Coral bleaching-how and why?** *Mar Pollut Bull* 2003, **46**:385-392.
9. Lesser MP: **Experimental biology of coral reef ecosystems.** *J Exp Mar Biol Ecol* 2004, **300**:217-252.
10. Coles SL, Jokiel PL: **Synergistic effects of temperature, salinity and light on the hermatypic Coral *Montipora verrucosa*.** *Mar Biol* 1978, **49**:187-195.
11. Glynn PW, D'croz L: **Experimental evidence for high temperature stress as the cause of El Niño-coincident coral mortality.** *Coral Reefs* 1990, **8**:181-191.
12. Richier S, Cottalorda J-M, Guillaume MMM, Fernandez C, Allemand D, Furla P: **Depth-dependant response to light of the reef building coral, *Pocillopora verrucosa*: Implication of oxidative stress.** *J Exp Mar Biol Ecol* 2008, **357**:48-56.
13. Bouchard JN, Yamasaki H: **Heat Stress Stimulates Nitric Oxide Production in *Symbiodinium microadriaticum*: A Possible Linkage between Nitric Oxide and the Coral Bleaching Phenomenon.** *Plant Cell Physiol* 2008, **49**:641-652.
14. Smith DJ, Suggett DJ, Baker NR: **Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals?** *Glob Chang Biol* 2005, **11**:1-11.
15. Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW: **The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae *in hospite* from four different species of reef coral: a novel approach.** *Plant Cell Environ* 1996, **19**:291-299.
16. Lesser MP: **Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology.** *Annu Rev Physiol* 2006, **68**:253-278.
17. Perez S, Weis V: **Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis.** *J Exp Biol* 2006, **209**:2804-2810.
18. Richier S, Sabourault C, Courtiade J, Zucchini N, Allemand D, Furla P: **Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*.** *FEBS J* 2006, **273**:4186-4198.
19. Dunn SR, Bythell JC, Le Tissier MDA, Burnett WJ, Thomason JC: **Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp.** *J Exp Mar Biol Ecol* 2002, **272**:29-53.
20. Dunn SR, Schnitzler CE, Weis VM: **Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose.** *Proc R Soc B Biol Sci* 2007, **274**:3079-3085.
21. Dunn SR, Thomason JC, Le Tissier MDA, Bythell JC: **Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration.** *Cell Death Differ* 2004, **11**:1213-1222.

22. Gates RD, Baghdasarian G, Muscatine L: **Temperature stress caused host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching.** *Biol Bull* 1992, **182**:324-332.
23. Strychar KB, Coates M, Sammarco PW, Piva TJ: **Bleaching as a pathogenic response in scleractinian corals, evidenced by high concentrations of apoptotic and necrotic zooxanthellae.** *J Exp Mar Biol Ecol* 2004, **304**:99-121.
24. Brown BE, Le Tissier MDA, Bythell JC: **Mechanisms of bleaching deduced from histological studies of reef corals sampled during a natural bleaching event.** *Mar Biol* 1995, **122**:655-663.
25. Downs CA, Kramarsky-Winter E, Martinez J, Kushumaro A, Woodley CM, Loya Y, Ostrander GK: **Symbiophagy as a cellular mechanism for coral bleaching.** *Autophagy* 2009, **5**:211-216.
26. Steen RG, Muscatine L: **Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone.** *Biol Bull (Boston)* 1987, **172**:246-263.
27. Hoegh-Guldberg O: **Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs.** *Mar Freshw Res* 1999, **50**:839-866.
28. de Boer ML, Krupp DA, Weis VM: **Proteomic and transcriptional analyses of coral larvae newly engaged in symbiosis with dinoflagellates.** *Comp Biochem Physiol D Genomics Proteomics* 2007, **2**:63-73.
29. Desalvo MK, Woolstra CR, Sunagawa S, Schwarz JA, Stillman JH, Coffroth MA, Szmant AM, Medina M: **Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3952-3971.
30. Edge SE, Morgan MB, Gleason DF, Snell TW: **Development of a coral cDNA array to examine gene expression profiles in *Montastraea faveolata* exposed to environmental stress.** *Mar Pollut Bull* 2005, **51**:507-523.
31. Gilbert AL, Guzmán HM: **Bioindication potential of carbonic anhydrase activity in anemones and corals.** *Mar Pollut Bull* 2001, **42**:742-744.
32. Harithsa S, Raghukumar C: **Stress response of two species in the Kavaratti atoll of the Lakshadweep Archipelago, India.** *Coral Reefs* 2005, **23**:463-474.
33. Hashimoto K, Shibuno T, Murayama-Kayano E, Tanaka H, Kayano T: **Isolation and characterization of stress-responsive genes from the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*.** *Coral Reefs* 2004, **23**:485-491.
34. Reynolds WS, Schwarz JA, Weis VM: **Symbiosis-enhanced gene expression in cnidarian-algal associations: cloning and characterization of a cDNA, sym32, encoding a possible cell adhesion protein.** *Comp Biochem Physiol A Physiol* 2000, **126**:33-44.
35. Weis VM, Reynolds W: **Carbonic anhydrase expression and synthesis in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* are enhanced by the presence of Dinoflagellate symbionts.** *Physiol Biochem Zool* 1999, **72**:307-316.
36. Mitchelmore CL, Schwarz JA, Weis VM: **Development of symbiosis-specific genes as biomarkers for the early detection of cnidarian-algal symbiosis breakdown.** *Mar Environ Res* 2002, **54**:345-349.
37. Schwarz JA, Weis VM: **Localization of a Symbiosis-Related Protein, Sym32, in the *Anthopleura elegantissima*-*Symbiodinium muscatinei* Association.** *Biol Bull (Boston)* 2003, **205**:339-350.
38. Veron JEN: *Corals of the World*. Townsville: Australian Institute of Marine Science; 2000.
39. Drollet JH, Faucon M, Maritorena S, Martin PMV: **A survey of environmental physico-chemical parameters during a minormassbleaching event in Tahiti in 1993.** *Aust J Mar Freshw Res* 1994, **45**:1149-1156.
40. Fisk DA, Done TJ: **Taxonomic and bathymetric patterns of bleaching in corals, Myrmidon Reef.** In *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress; Tahiti*. 1985: 149-154.
41. Glynn PW: **Extensive 'bleaching' and death of reef corals on the pacific coast of Panama.** *Environ Conserv* 1983, **10**:149-154.
42. Salvat B: **Natural bleaching and mortality of scleractinian corals on Moorea Reefs (Society Archipelago) in 1991.** *C r Acad sci Sér 3 Sci vie* 1992, **314**:105-111.
43. Kvennefors ECE, Leggat W, Hoegh-Guldberg O, Degnan BM, Barnes AC: **An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts.** *Dev Comp Immunol* 2008, **32**:1582-1592.
44. Kieffer B, Driscoll PC, Campbell ID, Willis AC, van der Merwe PA, Davis SJ: **Three-dimensional solution structure of the extracellular region of the complement regulatory protein CD59, a new cell-surface protein domain related to snake venom neurotoxins.** *Biochemistry* 1994, **33**:4471-4482.
45. LeCler KP, Palfree RGE, Flood PM, Hämmerling U, Bothwell A: **Isolation of a murine Ly-6 cDNA reveals a new multigene family.** *EMBO J* 1986, **5**:3227-3234.
46. Palfree RG, Sirlin S, Dumont FJ, Hammerling U: **N-terminal and cDNA characterization of murine lymphocyte antigen Ly- 6C.2.** *J Immunol* 1988, **140**:305-310.

47. Palfree RGE: **The urokinase-type plasminogen activator receptor is a member of the Ly-6 superfamily.** *Immunol Today* 1991, **12**:170-171.
48. Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Bhrendt N, Lund LR, Dano K, Appella E, Blasi F: **Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis.** *EMBO J* 1990, **9**:467-474.
49. Fleming TJ, O'HUigin C, Malek TR: **Characterization of two novel Ly-6 genes. Protein sequence and potential structural similarity to alpha-bungarotoxin and other neurotoxins.** *J Immunol* 1993, **150**:5379-5390.
50. Ploug M, Ellis V: **Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom [alpha]-neurotoxins.** *FEBS Lett* 1994, **349**:163-168.
51. **PSORT II Prediction** [<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>]
52. **NetNGlyc** [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>]
53. Zelensky AN, Gready JE: **The C-type lectin-like domain superfamily.** *FEBS J* 2005, **272**:6179-6217.
54. Zelensky AN, Gready JE: **Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTLD).** *Proteins* 2003, **52**:466-477.
55. **ModWeb A Server for Protein Structure Modelling** [<http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20.html/modweb.html>]
56. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI: **Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR.** *Science* 2001, **294**:2163-2166.
57. Rowan R, Powers DA: **Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae).** *Mar Ecol Prog ser* 1991, **71**:65-73.
58. Noel LS, Champion BR, Holley CL, Simmons CJ, Morris DC, Payne JA, Lean JM, Chambers TJ, Zaman G, Lanyon LE, Suva LJ, Miller LR: **RoBo-1, a Novel Member of the Urokinase Plasminogen Activator Receptor/CD59/Ly-6/Snake Toxin Family Selectively Expressed in Rat Bone and Growth Plate Cartilage.** *J Biol Chem* 1998, **273**:3878-3883.
59. Nau F, Guerin-Dubiard C, Desert C, Gautron J, Bouton S, Gribonval J, Lagarrigue S: **Cloning and characterization of HEP21, a new member of the uPAR/Ly6 protein superfamily predominantly expressed in hen egg white.** *Poult Sci* 2003, **82**:242-250.
60. Hudson HJ: **Response of *Montastrea annularis* to environmental change in the Florida Keys.** *Proceeding of the fourth International Coral Reef Congress, Manila* 1981, **2**:229-239.
61. Jokiel PL, Coles SL: **Effects of temperature on the mortality and growth of hawaiian reef corals.** *Mar Biol* 1977, **43**:201-208.
62. Rodolpho-Metalpa R, Richard C, Allemand D, Ferrier-Pagès C: **Growth and photosynthesis of two Mediterranean corals, *Cladocora caespitosa* and *Oculina patagonica*, under normal and elevated temperatures.** *J Exp Biol* 2006, **209**:4546-4556.
63. Bulgheresi S, Schabussova I, Chen T, Mullin NP, Maizels RM, Ott JA: **A new C-Type Lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:2950-2956.
64. Wood-Charlson EM, Hollingsworth LL, Krupp DA, Weis VM: **Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis.** *Cell Microbiol* 2006, **8**:1985-1993.
65. Weis VM: **Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis.** *J Exp Biol* 2008, **211**:3059-3066.
66. Tambutté E, Allemand D, Bourge I, Gattuso JP, Jaubert J: **An improved <sup>45</sup>Ca protocol for investigating physiological mechanisms in coral calcification.** *Mar Biol* 1995, **122**:453-459.
67. LaJeunesse TC: **Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the internal transcribed spacer region: in search of a "species" level marker.** *J Phycol* 2001, **37**:866-880.
68. Banaszak AT, LaJeunesse TC, Trench RK: **The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates.** *J Exp Mar Biol Ecol* 2000, **249**:219-233.
69. Goiran C, Al-Moghrabi S, Allemand D, Jaubert J: **Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral/dinoflagellate association. Photosynthetic performances of symbionts and dependence on sea water bicarbonate.** *J Exp Mar Biol Ecol* 1996, **199**:207-225.
70. Blanck RJ: **Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*.** *Mar Biol* 1987, **94**:143-155.
71. Brown BE, Suharsono: **Damage and recovery of coral reefs affected by El Niño related seawater warming in the Thousand Isand, Indonesia.** *Coral Reefs* 1990, **8**:163-170.
72. Glynn PW: **Widespread coral mortality and the 1982/83 El Niño warming event.** *Environ Conserv* 1984, **11**:133-146.



73. Glynn PW, Cortes J, Guzmán HM, Richmond RH: **El Nino (1982-83) associated coral mortality and relationship to sea surface temperature deviations in the tropical eastern Pacific.** *Proceeding of the 6th International Coral Reef Congress, Australia* 1988, **3**:237-243.
74. Jaap WC: **An epidemic zooxanthellae expulsion during 1983 in the lower florida keys reefs: hyperthermic etiology.** *Proceeding of the fifth International Coral Reef Congress, Tahiti* 1985, **6**:143-148.
75. Lang JC, Wicklund RI, Dill RF: **Depth- and habitat- related bleaching of reef corals near Lee Stocking Island, Bahamas.** In *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium; Townsville, Australia.* 1988: 269-274.
76. Lasker HR, Peters EC, Coffroth MA: **Bleaching of reef coelenterates in the San Blas islands, Panama.** *Coral Reefs* 1984, **3**:183-190.
77. Johannes RE, Wiebe WJ: **Method for determination of coral tissue biomass and composition.** *Limnol Oceanogr* 1970, **15**:822-824.
78. Rodolpho-Metalpa R, Richard C, Allemand D, Nike Bianchi C, Morri C, Ferrier-Pagès C: **Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals *Cladocora caespitosa* and *Oculina patagonica* to elevated temperatures.** *Mar Biol* 2006, **150**:45-55.
79. Grover R, Maguer J, Allemand D, Ferrier-Pagès C: **Urea uptake by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*.** *J Exp Mar Biol Ecol* 2006, **332**:216-225.
80. **Basic Local Alignment Search Tool** [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
81. **InterProScan Sequence Search** [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>]
82. Eswar N, John B, Mirkovic N, Fiser A, Ilyin VA, Pieper U, Stuart AC, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Yerkovich B, Sali A: **Tools for comparative protein structure modeling and analysis.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:3375-3380.
83. Maiti R, Van Domselaar GH, Zhang H, Wishart DS: **SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:W590-594.
84. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT: **A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.** *J Clin Endocrinol Metab* 1971, **33**:988-991.
85. Hancock CD, Evans GI: **Production and characterization of antibodies against synthetic peptides.** In *Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols.* Edited by Manson M, Totowa NJ. USA: Humana Press; 1992: 33-41
86. Porath J, Olin B: **Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions.** *Biochemistry* 1983, **22**:1621-1630.
87. Roger E, Gourbal B, Grunau C, Pierce RJ, Galinier R, Mitta G: **Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*.** *Mol Biochem Parasitol* 2008, **157**:217-227.
88. Puvarel S, Tambutte E, Zoccola D, Domart-Coulon I, Bouchot A, Lotto S, Allemand D, Tambutte S: **Antibodies against the organic matrix in scleractinians: a new tool to study coral biomineralization.** *Coral Reefs* 2005, **24**:149-156.

## Additional files

**Table S1: Top blastx, annotation, GeneBank accession number and specific primers (Q-RT-PCR) of selected ESTs.**

Library/Cluster n°	Annotation	Top blastx : Protein [species] (E-value)	GeneBank accession number	Putative functional class	Primer
BRG cluster 12	<i>Pdcyst-rich</i>	predicted protein [ <i>Nematostella vectensis</i> ] (6e-04)	GH706859	Cell/cell or cell/ligand interaction	F: ACATTCGAGATGAGGAACT R: ATTGGAATCAGGAAACAGC
BRG cluster 26	Putative <i>Flavodoxin</i>	hypothetical protein	GH706874	Photosynthesis	F: AGCATATTCATTTCGTGGT R: CGCTTCGACAGGTCAA

	<i>reductase</i>	[Photorhabdus luminescens] (4e-04)			
BRG cluster 27	<i>Mannose binding lectin-like</i>	mannose-binding lectin [Acropora millepora] (8e-22)	GH706875	Cell/cell or cell/ligand interaction	F: ATTGGCAGAACGGAAG R: GGGAGGAGACCTGGTA
BRG cluster 33	Uncharacterized apicomplexan-specific serine rich low complexity-like	hypothetical protein [Cryptosporidium hominis] (8e-32)	GH706882	Conserved protein domain	F: TTTGAGCTGACCCTCG R: AGTCACCATCCAAGAGT
BRG cluster 36	<i>Arabidopsis thaliana zinc finger protein-like</i>	predicted protein [Populus trichocarpa] (2e-09)	GH706885	Intracellular signalling pathway	F: ATGGTATGTATGGACGAGA R: CCCAGTATTGTTTCATTGGC
BRG cluster 39	<i>Alexandrium fundyense chloroplast ferredoxin-like</i>	chloroplast ferredoxin [Alexandrium fundyense] (3e-25)	GH706888	Photosynthesis	F: GCCATAGTCGAACTGC R: GGAAGGCTTGGGAATTGC
BRG cluster 48	<i>Symbiodinium sp Bact-2</i>	Bact-2 [Symbiodinium sp. C3] (8e-57)	GH706898	Oxidative detoxification	F: TGCGCTACAATCTCATCG R: GCATCACATGGGGCAA
BRG cluster 51	<i>Mitofusin-like</i>	predicted protein [Nematostella vectensis] (2e-10)	GH706902	Cytoskelton structuring	F: ACCTCTGAAGAGTCGC R: AGAGCACGATTGACATCTA
BRG cluster 52	<i>Dipeptidyl-peptidase-like</i>	predicted protein [Nematostella vectensis] (7e-39)	GH706903	Protein degradation	F: TGTGATACTCAACCAAAGT R: GGATGCTCTCAGATCAAG
BRG cluster 59	<i>Alpha tubulin-like protein</i>	Tubulin alpha-1 chain [Lepeophtheirus salmonis] (4e-04)	GH706910	Cytoskelton structuring	F: GTTCTCTGAGGCTCGT R: ACACAGCAGCATGAAT
BRG cluster 60	<i>Putative CUB SUSHI domain</i>	PREDICTED: similar to intrinsic factor-B12 receptor [Ciona intestinalis] (8e-01)	GH706912	Conserved protein domain	F: TGCAAATCGTTGCGCC R: CCATACTGAACGTGACCA
BRG cluster 91	<i>Ependymin-like</i>	hypothetical protein [Branchiostoma floridae] (3e-07)	GH706946	Cell/cell or cell/ligand interaction	F: CGTGACGGTACTGAAA R: AGCAAATCCATTAGCAATGAA
BIG cluster 6	Putative calcium-binding protein	calmodulin III [Euglena gracilis] (1e-02)	GH706850	Calcium Homeostasis	F: AGCATGGTGGACATGAA R: CTCCATCGCTGTTGTGA
BIG cluster 7	Aldo-keto reductase-like protein	aldo-keto oxidoreductase [Thalassiosira pseudonana] (5e-22)	GH706853	Oxidative detoxification	F: CAGCCTGATGTTTGGG R: ATAGGAAAGGCGTGGT
BIG cluster 8	<i>Karlodinium micrum</i> beta-tubulin-like protein	beta tubulin [Dinophyceae sp] (5e-63)	GH706854	Cytoskelton structure	F: TCCTTGCGAACGACAT R: CTTTCACGATACCATTGCT
BIG cluster 9	<i>Karlodinium micrum</i> major basic nuclear protein-like	major basic nuclear protein [Karlodinium micrum] (1e-05)	GH706855	Intracellular signalling pathway	F: ACGGGAAATGCCTTG R: CTGAACACGTTGGCTGA
BIG cluster 11	<i>Symbiodinium</i>	unknown	GH706797	Photosynthesis	F: AACCTTCTCGACTGC

	<i>sp putative carbonic anhydrase</i>	protein [Symbiodinium sp. clade C3] (2e-62)			R: GGAGGCGACTACGTTG
BIG cluster 16	HSP90-like protein	heat shock protein [Toxoplasma gondii] (1e-36)	GH706802	Chaperone protein	F: ACGAGACACGTTCAAGT R: GATTCTGTCTTGCCC
BIG cluster 17	ferritin-like protein	ferritin heavy chain [Branchiostoma lanceolatum] (1e-50)	GH706803	Metabolism	F: GGAACTCGCCCTCAAG R: AGGACGTATTGTGTGG
BIG cluster 19	Nucleolar GTP-binding protein-like	predicted protein [Nematostella vectensis] (1e-19)	GH706805	Protein synthesis	F: CCCGATGAGCCGTA R: TGTCAGCTTCACCTGC
BIG cluster 32	Putative Hypoxia inducible factor	hypothetical protein [Branchiostoma floridae] (3e-05)	GH706820	Intracellular signalling pathway	F: TGGTTGACTGTTGCC R: AGCAAGGAGGAAGCTAT
BIG cluster 33	Coatomer-like protein	hypothetical protein [Trichoplax adhaerens] (1e-16)	GH706821	Cytoskelton structuring	F: AACATAACACAACGCTT R: CCATCAGTTACTGGTCACG
BIG cluster 35	<i>Peridinium limbatum</i> alphanubulin-like	alpha tubulin [Peridinium limbatum] (3e-92)	GH706823	Cytoskelton structuring	F: AATCTCCTCCAGGAACC R: TGAAGTGCACCCCTC
BIG cluster 44	Polyadenylate-binding protein-like	RNA binding protein [Zea mays] (8e-08)	GH706833	Intracellular signalling pathway	F: AAGTTTCTGCATAGCTCC R: CAGGGTCTTGGTTGACA
BIG cluster 45	Zinc finger protein-like	GK18522 gene product [Drosophila willistoni] (1e-01)	GH706834	Intracellular signalling pathway	F: CAAGGAAAAGCCGAAGAC R: GTGGCTCTATGAGTGGT
BIG cluster 48	<i>Symbiodinium sp</i> Peridinin-chlorophyll a-binding protein-like	Peridinin-chlorophyll a-binding protein [Symbiodinium sp] (6e-16)	GH706837	Photosynthesis	F: TTGATTCCAGCTCCC R: AGCAATGTCGCAACTT
BIG cluster 49	<i>Putative thiol-disulfide oxidoreductase</i>	unnamed protein product [Ostreococcus tauri] (9e-02)	GH706838	Oxidative detoxification	F: TCCGCCAATGTTGGAA R: TGCCTTGAGCTACCAG
BIG cluster 53	<i>Variable lymphocyte receptor-like</i>	hypothetical protein [Branchiostoma floridae] (7e-31)	GH706843	Cell/cell or cell/ligand interaction	F: CAGTCTCCAGACAGTG R: GTTGTTCCAGCGCCAAG
BIG cluster 61	<i>Symbiodinium sp. actin-like protein</i>	actin [Symbiodinium sp. clade C] (4e-73)	GH706852	Cytoskelton structuring	F: CGAATATCGACATCGCAC R: CTGCATCTGAGAGCAGT
Housekeeping gene	<i>28S Ribosomal RNA</i>				F: AAGTACCATGAGGGAAAGA R: CGCATCCGCAAATGTG

# Chapitre III :

## Vibriose et perturbation physiologique chez *Pocillopora damicornis*

### III.1 Problématique scientifique et objectifs de l'étude

Comme beaucoup d'autres organismes marins, les coraux scléactiniaires sont soumis à des attaques croissantes de pathogènes, en lien avec les changements globaux. Les augmentations de température et la détérioration de la qualité des eaux réduiraient les capacités immunitaires des coraux, et augmenteraient la virulence et la vitesse de croissance des pathogènes. La pression de ces agents pathogènes peut, dans certains cas, évoluer vers des épizooties conduisant à des mortalités massives de coraux, et à la dégradation des récifs coralliens. Pour exemple, on estime qu'environ 80% des récifs de la zone Caraïbes ont été dégradés, essentiellement par les maladies coralliennes, les blanchissements, la surpêche et la pollution des eaux.

Suite à cette augmentation de la prévalence des maladies coralliennes, les recherches se sont orientées vers des études plus poussées des interactions corail/pathogène. Certaines équipes se sont focalisées sur la caractérisation des agents pathogènes, alors que d'autres se sont orientées vers l'étude des processus immunitaires des scléactiniaires. En revanche, aucune étude n'a spécifiquement porté sur la recherche de biomarqueurs spécifiques aux stress d'origine bactérienne.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux présentés dans ce chapitre est d'examiner la réponse physiologique des coraux soumis à un stress bactérien, et de proposer, à terme, des biomarqueurs de ce type de stress. Ces travaux concernent le modèle *Pocillopora damicornis* / *Vibrio coralliilyticus*, et se basent sur les hypothèses suivantes : i) des mécanismes moléculaires sont très certainement initiés avant l'apparition des premiers symptômes de stress ; ii) ces mécanismes relèvent très certainement de la réponse immunitaire développée par le corail ; iii) la recherche de biomarqueurs hôtes semble plus pertinente que le développement d'outils de diagnostic détectant la présence d'un agent pathogène, car ces biomarqueurs seraient non spécifiques de l'agent infectieux ; iv) hôtes, pathogènes et facteurs environnementaux étant étroitement liés dans le développement des maladies, l'étude des interactions hôtes / pathogènes dans différentes conditions environnementales fournirait un

panel plus complet de biomarqueurs ; v) seule une approche expérimentale "écologiquement réaliste" permettra d'identifier des biomarqueurs potentiellement utilisables pour la gestion des populations coralliennes en milieu naturel.

### **III.2 Approche méthodologique**

Comme pour les travaux présentés précédemment, il nous semblait indispensable de mettre au point un protocole expérimental qui se rapproche le plus des conditions environnementales rencontrées en milieu naturel. Notre choix du modèle d'étude s'est donc porté sur le couple *Pocillopora damicornis* / *Vibrio coralliilyticus*. Ce choix nous a semblé judicieux car l'interaction est spécifique, et que la virulence de la bactérie est, dans un premier temps, activée puis augmentée par une montée en température. Selon la température, il est donc possible d'appréhender une interaction de type avirulente (lorsque les températures sont basses), ou virulente (en saison chaude).

Suite au succès des expérimentations réalisées pour l'étude du stress thermique, nous avons décidé de conserver le pas de temps de 3 jours entre chaque échantillonnage. Le mode d'inoculation choisi fut celui de la baignation, qui se rapproche davantage de ce qui peut être rencontré en milieu naturel. La concentration bactérienne dans l'eau des récifs pouvant varier entre  $10^6$  et  $10^9$  bactéries/ mL, un inoculum de  $10^6$  bactéries/mL d'eau d'aquarium a été choisi. La mise au point s'est ensuite focalisée sur les températures à sélectionner pour analyser les effets des bactéries avirulentes et virulentes. La souche de *V. coralliilyticus* (YB1) que nous avons utilisée est originaire des récifs de Zanzibar, comme pour la plupart des études précédentes. Cette souche a été isolée à partir de colonies sauvages et blanchies de *P. damicornis*. Des études récentes ont montré que *V. coralliilyticus* n'induisait aucune infection à des températures inférieures à 24°C, alors qu'entre 24,5 et 25,5°C il conduisait au blanchissement des colonies, et qu'à des températures supérieures à 25,5°C il induisait la lyse des tissus coralliens. A Zanzibar, les coraux, sur lesquels a été isolée cette même souche de *V. coralliilyticus*, étaient blanchis et non lysés à 29,5°C, ce qui suggère une certaine variabilité dans la réponse corallienne. Elle pourrait être liée au régime thermique auquel les populations pourraient être soumises dans la localité concernée (une hypothèse d'adaptation locale peut être évoquée).

Partant de ces informations, un premier essai a été réalisé avec 2 lots de colonies maintenus à 28°C, dont l'un a été soumis à un ajout tous les 3 jours de  $10^6$  bactéries/mL cultivées à 32°C. Deux autres lots ont été soumis à une augmentation de température de 28 à

32°C, à raison de 1°C/3 jours. L'un de ces lots a en plus été confrontés à un ajout de 10<sup>6</sup> bactéries/mL cultivées à 32°C. Il est important de préciser que pour des raisons d'ordre pratique, ces 4 lots ont été maintenus au sein d'une seule pièce, physiquement séparée en deux zones, dont l'une était équipée d'un stérilisateur d'air afin d'éviter les contaminations entre les deux zones. Trois jours après le premier ajout de bactéries dans un seul des lots (celui dédié au stress bactérien), toutes les colonies coralliennes des deux lots (stress bactérien et contrôle) ont rétracté leurs polypes, puis très rapidement des lyses tissulaires intenses se sont développées sur toutes les colonies. Ces observations nous ont conduit aux constats et hypothèses suivantes : i) cette lyse intense, rapide et généralisée à toutes les boutures (y compris celles des contrôles) est très certainement le fait d'une contamination par *V. coralliilyticus* qui a gagné l'ensemble des zones expérimentales ; ii) malgré toutes les précautions prises, maintenir une zone stérile au sein d'une même pièce s'avère difficile ; iii) la température de culture des bactéries doit absolument être égale à celle de la température de maintien des coraux ; iv) la température de départ doit être abaissée en dessous de 28°C, afin de n'induire qu'au maximum un blanchissement dans les lots maintenus à faible température, et non une lyse tissulaire ; v) la quantité de bactéries ajoutées pourrait être largement diminuée.

Afin de pallier ces problèmes, un nouveau protocole expérimental a été établi de la façon suivante : i) les lots contrôles ("sains") ont été physiquement séparés des lots soumis aux ajouts de bactéries (laboratoires séparés), mais maintenus dans des conditions strictement identiques (Fig. 24) ; ii) les températures de départ ont été diminuées à 25°C, la montée en température et l'ajout de bactéries se font toujours tous les 3 jours, l'amplitude d'augmentation de température est portée à 1,5°C et atteint le seuil de 32,5°C (car il n'y avait plus assez de colonies coralliennes pour maintenir une amplitude de 1°C par palier avec un échantillonnage à chaque palier de température) ; iii) pour les phases de balnéation, la quantité de vibrions ajoutée est réduite à 10<sup>3</sup> bactéries/mL et ces dernières sont cultivées à la même température que celles à laquelle les coraux sont maintenus. Finalement, ces ajustements, qui ont nécessité 6 mois d'efforts, ont été fructueux, et c'est sur la base de ce protocole expérimental que les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés.



*Figure 24 : structures expérimentales dédiées à l'étude des stress biotiques sur la physiologie des coraux : Compte tenu des risques de contaminations par *V. coralliilyticus* lors des étapes de stress biotiques, des structures expérimentales ont été spécialement mises au point pour réaliser les expériences au BETM (pour la partie avec bactéries). Les contrôles sans bactéries ont été réalisés dans les mêmes structures à l'Aquarium du Cap d'Agde.*

### **III.3 Publication n°2 :**

Jérémie Vidal-Dupiol, Ophélie Ladrière, Anne-Leila Meistertzheim, Laurent Fouré, Mehdi Adjeroud & Guillaume Mitta (2011). **Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus***. *Journal of Experimental Biology*, (sous presse).

Le mail qui atteste du statut "sous presse" de cette publication est fourni en annexe 1.



# Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*

Jérémie Vidal-Dupiol<sup>1</sup>, Ophélie Ladrière<sup>2</sup>, Anne-Leila Meistertzheim<sup>1</sup>, Laurent Fouré<sup>3</sup>  
Mehdi Adjeroud<sup>4</sup>, Guillaume Mitta<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>UMR 5244, CNRS UPVD EPHE, Université de Perpignan Via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

<sup>2</sup> Unité d'écologie marine, Laboratoire d'écologie animale et ecotoxicologie, Université de Liège, Allée du 6 août, 15, Bat. B6C, 4000 Liege, Belgium

<sup>3</sup> Aquarium du Cap d'Agde, 11 rue des 2 frères, 34300 Cap d'Agde, France

<sup>4</sup> Institut de Recherche pour le Développement, Unité 227 CoRéUs2 "Biocomplexité des écosystèmes coralliens de l'Indo-Pacifique", BP A5, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

\*Corresponding author: mitta@univ-perp.fr

Nb: The authors declare that J. Vidal-Dupiol and O. Ladriere made an equal contribution to this work

## Summary

As the effects of climate change have become increasingly visible over the past three decades, coral reefs have suffered from a number of natural and anthropogenic disturbances that have caused a critical decline in coral populations. Among these disturbances are coral diseases, which have appeared with increasing frequency and severity, often in correlation with water temperature increases. While the crucial role played by *Vibrio* species in coral disease has been widely documented, the scientific community does not yet fully understand the infection process of *Vibrio* and especially its impact on coral physiology and immunology. Here, we investigated the physiological and transcriptomic responses of a major reef-building coral, *Pocillopora damicornis*, when exposed to a specific pathogen (*Vibrio coralliilyticus*) under virulent (increasing water temperature) and non-virulent (low constant temperature)

conditions. The infection process was examined by electron microscopy and q-RT-PCR, and coral health was monitored by visual observations and measurements of zooxanthellar density. The results obtained suggest that coral tissue invasion occurs upon increasing water temperature only. Transcriptomic variations were investigated using a suppression-subtractive-hybridization approach, and the expression levels of six candidate immune-related genes were examined during bacterial exposure. These genes correspond to 3 lectin-like molecules putatively involved in the recognition of pathogens, 2 metal-binding proteins putatively involved in antibacterial response, and 1 cysteine protease inhibitor. The transcription patterns of these selected genes provide new insights into the responses of coral colonies to virulent versus non-virulent bacteria.

## **Introduction**

Coral reefs ecosystems are among the most biologically diverse and complex marine ecosystems worldwide. In addition to their biological and ecological importance, coral reefs support major economic and physical functions (e.g. food production, tourism, biotechnology development and coast protection) that are essential for many countries (Lesser, 2004). These ecosystems are principally supported by small, colonial and calcifying organisms, the hermatypic scleractinian corals, which enter into mutualistic symbiosis with microalgae of the genus *Symbiodinium*, a dinoflagellate that is also referred to as zooxanthellae (Lesser, 2004).

Due to global climate change and anthropogenic pressure, coral reef ecosystems have been increasingly confronted with severe natural and anthropogenic disturbances over the past three decades (Hughes et al., 2003; Ward and Lafferty, 2004; Donner et al., 2005; Hoegh-Guldberg et al., 2007; Bourne et al., 2009). A recent global assessment of coral reef health showed that approximately 19% of coral reefs were irretrievably degraded with no sign of recovery, 15% presented symptoms of an imminent risk of collapse, and another 20% were at risk of becoming critically affected in the next few decades (Wilkinson 2008). Coral diseases are among the major factors in coral reef degradation; their impacts have severely increased in recent decades, in apparent association with global climate change (Weil et al., 2006; Bourne et al., 2009). Indeed, it has been suggested that high temperatures influence the outcome of bacterial infections by lowering the disease resistance of coral and/or increasing pathogen growth, virulence and infectivity (Ward et al., 2007; Rodriguez-Lanetty et al., 2009).

To date, 18 coral diseases have been identified (Sutherland et al., 2004; Willis et al., 2004; Harvell et al., 2007). Among the well-characterized coral infectious diseases, several

have been shown to be caused by members of the Vibrionaceae family (Kushmaro et al., 2001; Ben-Haim et al., 2003a; Sussman et al., 2008). Bacteria belonging to the genus *Vibrio* are ubiquitously distributed in aquatic environments worldwide ranging from brackish water to deep-sea environments. Kushmaro et al. (1996; 1997; 1998; 2001) demonstrated that the bacteria, *Vibrio shiloi*, infects and triggers bleaching of the coral, *Oculina patagonica*. The same research group showed that the infectivity of this bacteria is temperature-dependent and occurs only after an increase in seawater temperature (Kushmaro et al., 1998). A similar temperature-dependent virulence was observed in interactions between *Vibrio coralliilyticus* and the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis* (Ben-Haim et al., 2003b), and the involvement of *Vibrio* species has been suggested in two other coral diseases: yellow blotch/band disease (Cervino et al., 2004; 2008) and rapid tissue necrosis (Luna et al., 2007). Among these *Vibrio*-related diseases, the bleaching disease of *Oculina patagonica* caused by the infection of *V. shiloi* has been characterized to the greatest degree (for review see Rosenberg, 2004). In brief, *V. shiloi* is attracted by chemotaxis and adheres to  $\beta$ -galactoside-containing receptors on coral cells. This adhesion process is specific and dependent on temperature: no adhesion occurs at low temperatures (16-20°C), whereas *V. shiloi* actively adhere to their target at temperatures between 25 and 30°C. After contact, the bacteria penetrate and multiply within the coral cells, and begin producing two sets of factors: extracellular proline-rich toxins (referred to as toxin P; Banin et al., 2001) that block photosynthesis, and enzymes that trigger the lysis of zooxanthellae.

However, although *Vibrio* species have been shown to play crucial roles in several coral diseases, our knowledge of the effects of *Vibrio* infection on coral physiology remains incomplete. Accordingly, the present study used a global transcriptomic approach to examine the physiological responses of coral colonies when confronted with bacterial stress and/or infection in a realistic ecological context. The interaction between the coral, *P. damicornis*, and its specific pathogenic bacteria, *V. coralliilyticus*, was studied.

*P. damicornis* has a widespread distribution in the Indo-Pacific region (Veron, 2000), is highly sensitive to a wide range of natural and anthropogenic disturbances, and is a good sentinel species for use in monitoring coral reef health (Gates et al., 1992; Ben-Haim and Rosenberg, 2002; Stimson et al., 2002; Hashimoto et al., 2004; Vidal-Dupiol et al., 2009). *V. coralliilyticus* is a specific pathogen of *P. damicornis*, and its virulence is temperature-dependent; the bacterium has been shown to trigger coral bleaching at moderate temperatures (24-25°C) and coral tissue lysis at higher temperatures (26-29°C) (Ben-Haim Rozenblat and

Rosenberg 2004). Consequently, the *P. damicornis*/*V. coralliilyticus* model allows us to compare coral responses to virulent and non-virulent bacteria.

Here, we exposed coral to a consistent supply of bacteria at either 25°C (non-virulent), or under conditions of a gradual temperature increase (from 25°C to 32.5°C; induction of virulence) and examined transcriptomic modifications using subtractive hybridization. The differentially regulated genes identified through this approach included several thought to be involved in immune processes. Quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction (q-RT-PCR) was used to follow the expression levels of a number of selected genes at various time points after the onset of bacterial stress or infection.

## Material and Methods

### *Biological materials*

The *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) isolate used in this study was harvested in Lombok, Indonesia (CITES number: 06832/VI/SATS/LN/2001) and maintained at the Cap d'Agde Aquarium, France. For experimental procedures, nubbins (10 g; 7 cm in height, 6 cm in diameter) were propagated by cutting branches from the parent colony and physiologically stabilizing them for a period of 2 months at 25°C.

The coral pathogen, *Vibrio coralliilyticus* strain *YB1* (Ben-Haim et al. 2003a; CIP 107925, Institut Pasteur, Paris, France), was used to challenge or infect *P. damicornis* (Ben-Haim and Rosenberg, 2002). *V. coralliilyticus* was cultured in 2216 Marine Broth medium (279110; Bd-Difco), under aerobic conditions with shaking (150 rpm) at 30°C for routine use, or at the temperature in the coral-containing tank for the Tb and Cb group (see below, “Experimental infection”).

Experiments aimed at determining which cells (host or symbiont) expressed the candidate genes (see below, “Identification of host or symbiont genes”) utilized three zooxanthellar isolates corresponding to clonal cultures of zooxanthellae from the B, C and D clades (BURR Culture Collection, University of Buffalo; Culture IDs Flap3, Pd44b, and MF2.2b, respectively). The representative zooxanthellae were cultured in 250 mL screw-top polycarbonate cell-culture flasks (Corning) in filtered seawater (pore size, 0.2 µm) enriched with 1X Guillard’s (F/2) marine water enrichment solution (Sigma-Aldrich) and supplemented with 1X antibiotic/antimycotic stabilized suspension (Sigma-Aldrich). The zooxanthellae were grown at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  under an irradiance of  $70 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

provided by daylight fluorescent tubes (Sylvania) set to a 12:12 h (light:dark) photoperiod. Stock cultures were transferred monthly, and cells were used in the stationary phase.

### ***Experimental infection***

Bacterial challenge was induced by constantly supplying *V. coralliilyticus* at a relatively low temperature (25°C; non-virulent), whereas infection was induced by constantly supplying the bacteria and systematically increasing the water temperature from 25°C to 32.5°C (thereby activating bacterial virulence).

Bacterial challenge, bacterial infection and their respective controls were established in four independent tanks: i) constant low temperature (25°C) and bacterial supply (Cb); ii) regular bacterial supply and a gradual temperature increase from 25°C to 32.5°C (Tb); iii) constant low temperature without bacteria (C); and iv) a gradual temperature increase in the absence of bacteria (T). For experiments, nubbins of *P. damicornis* were randomly placed in 120 L tanks (n = 27 per tank) After a 14-day acclimatization at 25°C, C and Cb were maintained at this temperature, while the temperatures of T and Tb were gradually increased by 1.5°C every 3 days until the water temperature reached 32.5°C (D3, D6, D9, D12, and D15). This higher temperature was maintained until the corals bleached or lysed. In Cb and Tb, bacteria (10<sup>3</sup> cells/ml of tank water) were supplied by balneation (Ben-Haim Rozenblat and Rosenberg 2004). The first bacterial supply was initiated on D1 and repeated every 3 days (D1, D4, D7, D10, D13, D16, D19). The utilized cultures of *V. coralliilyticus* were prepared at 25°C for Cb and at the temperature corresponding to the tank temperature for Tb. For the Tb and T groups, beginning on D3 the temperature was increased by + 1.5°C every 3 days until it reached 32.5°C.

Three nubbins were randomly sampled from each tank every 3 days (D0, D3, D9, D12, D15, D18). Five 0.5-cm apices were cut from each nubbin; three were immediately frozen and stored in liquid nitrogen for later measurement of zooxanthellar density, while two were fixed directly in 2.5% glutaraldehyde and subjected to electron microscopy.

The tank temperature was controlled using an aquarium heater (600 W, Schego) connected to an electronic thermostat (Hobby Biotherm Professional). Illumination was supplied at an irradiance of 250  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (quantum meter; QMSW-SS, Apogee Instruments Inc.) by metal halide lamps (Iwasaki 6500 Kelvin, 400W) set to a 12:12 h light:dark photoperiod. All other seawater parameters (salinity 36, pH 8.3...) were maintained constant over time and between tanks. A constant water flow was maintained within each tank using a water pump (IDRA, 1300 l/h). Seawater was continuously recycled at a rate of 10.8

tank volumes per hour by coupling the action of a biological filter and an Aquavie protein skimmer (EPS 600), and the water was renewed (2% tank volume per day) with natural filtered Mediterranean seawater heated to 25°. To avoid the growth of bacterial blooms, the water was continuously treated using a UVC filter (JBL: AquaCristal Series II, 5 W). During bacterial balneation, all equipment known to remove or kill bacteria (e.g., the protein skimmer and UVC filter) were inactivated for the first 4 h after treatment, allowing the bacteria to adhere to the coral tissues.

In order to follow coral health, physiological (e.g. zooxanthellar density measure) and visual (e.g coral color, tissue lysis appearance, opened or closed polyps...) monitorings were performed all along the experiments. Zooxanthellar density was used as a measurement of coral health and the stability/breakdown of symbiosis. Coral tissues were extracted using a water pick (Johannes and Wiebe, 1970) in 50 mL of filtered seawater (pore size, 0.2 µm), homogenized with a Potter grinder, and fixed with 2% formaldehyde. Zooxanthellae were counted under a light microscope using a hemocytometer, and algal densities were standardized per skeletal surface area, using the previously described protocol (Stimson and Kinzie III, 1991). Every day, two colonies per tank (the same colonies each day) were photographed using a consistent camera set up, and both bleaching and lytic events were thoroughly examined.

### ***Bacteria and the infectious process***

In order to follow the infectious process in *P. damicornis* tissues, the presence of *V. coralliilyticus* was investigated by transmission electron microscopy (TEM). Two ultrathin slices were prepared from coral fragments fixed in 2.5% glutaraldehyde in filtered seawater (pore size, 0.2 µm). Sections were prepared as described in Ladrière et al. (2008), and observed with a Jeol JEM 100-SX transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Q-RT-PCR was used to quantify the amount of *V. coralliilyticus* present in *P. damicornis* tissues. Total RNA was extracted from each sample (see “Subtractive cDNA library construction”), and 100 ng of total RNA were reverse transcribed using hexamer primers and a RevertAid<sup>TM</sup> kit (Fermentas International Inc). Q-RT-PCR was performed with 4 µL cDNA (1/100 dilution) in a total volume of 10 µL using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics), as described below (see “Real-time analysis”). Oligonucleotide primers were designed based on the aligned sequences from eight different *V. coralliilyticus* 16S

rRNAs (GenBank accession numbers EF094886, DQ079633, GQ406805.1, GQ406804.1, GQ406802.1, GQ406801.1, GQ406800.1, GQ406798.1; National Center for Biotechnology Information database ) and the 28S rRNA of *P. damicornis* (Vidal-Dupiol et al., 2009) (Table 1). RNA extracted from the *V. coralliilyticus* culture used for infection was taken as the positive control. The q-RT-PCR products were cloned and sequenced (see “DNA sequencing and sequence analysis”).

Gene name	Forward primer (5'→ 3')	Reverse primer (5'→ 3')
Concanavalin	CATCTCCGTCCCAAAC	CAACTGCATAATGAACCCA
Cystatin B	ATGGCCTTCCTTCTTTG	AGGTGTATGTGGGTGAC
Ferritin	AGAATATGCGGGGAGG	CCTGGACCAACACGAG
Major basic nuclear protein	GGTACAGCAAACCTGCG	TTGGAAACGTCCGACC
PdC-lectin	ATTGGCAGAACGGAAG	GGGAGGAGACCTGGTA
P-selectin	CAATGTTATCATTACCGACCC	GTCTGTTCCAGTCCAGG
Selenium binding protein	TACGCCTTCCGGTAAC	GTTCTACCCTGACCTGG
60S ribosomal protein L40A	CGACTGAGAGGAGGAGC	CTCATTGGACATTCCCCT
60S ribosomal protein L22	TGATGTGTCCATTGATCGTC	CATAAGTAGTTTGTGCAGAGG
60S acidic ribosomal phosphoprotein P0	GCTACTGTTGGGTAGCC	CTCTCCATTCTCGTATGGT
<i>V.c</i> 16SrRNA	TTAAGTAGACCGCCTGGG	GATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTC
<i>P.d</i> 28SrRNA	CGGGTGAGAATCCTGT	CTGAAGGCCATCCTCAA

Table 1: Combinations of forward and reverse primers used in real time PCR expression analysis.

### ***Subtractive cDNA library construction***

Visual and physiological monitoring was used to select early bacterially stressed or infected samples, and subtractive hybridization was used to identify genes that were differentially expressed under the non-virulent and virulent conditions. For each set of three nubbins, tissues were extracted with a water pick in 800 mL of filtered seawater (pore size, 0.2 µm), and both total RNA and mRNA were purified (Vidal-Dupiol et al., 2009). Forward and reverse suppression-subtractive-hybridization (SSH) libraries were constructed using the PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech). Tester and Driver cDNA were prepared using 2 µg of Poly(A)+ RNA, and enzyme digestion, adaptor ligation, hybridization, and PCR amplification were performed according to the manufacturer’s instructions (Clontech). The resulting PCR products were cloned into pCR4-TOPO using a TOPO TA cloning kit

(Invitrogen) and transformed into One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen).

### ***DNA sequencing and sequence analysis***

For each library, 384 clones were randomly selected and single-pass sequenced by GATC Biotech, using an ABI 3730xl apparatus. Vector and adaptor sequences were trimmed from all sequences using the Sequencher™ software (Gene Codes Corp.). High-quality ESTs (>100 bp) were assembled into clusters or identified as unique sequences, and used for database searches with the BLASTX and BLASTN programs. Specific domain searches were performed using the InterProscan software. ESTs displaying significant similarities with a gene of known function were assigned to the appropriate functional class. The various EST sequences have been submitted to the dbEST database; in an effort to minimize redundancy, sequences displaying 100% identity with one another were submitted as a single sequence.

### ***Quantitative-RT-PCR analyses***

Q-RT-PCR was used to analyze the expression profiles of selected genes. Total RNA was extracted, and this total RNA (2.5 µg) was reverse transcribed using oligo dT primers and the Superscript II enzyme (Invitrogen). The resulting cDNA products were purified using a Nucleotrap Gel Extraction Trial kit (Clontech), and q-RT-PCR was performed with 2.5 µL of purified cDNA (diluted 1:50 in water) in a total volume of 10 µL containing 1X LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics) and 70 nM of each primer. The primers, which were designed using the Light Cycler Probe Design Software, version 1.0 (Roche Diagnostics), are presented in Table 1. Amplification was performed using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) and the following reaction conditions: activation of the ThermoStart® DNA polymerase at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Melting curve profiles (95°C to 70°C decreasing by 0.5°C every 10 sec) were assayed to ensure that we were looking at a single product. Each run included a positive cDNA control that was sampled at the beginning of the experiment (D0) and also from each amplification plate; this positive control was also used as the calibrator sample, and blank controls (water) were included for each primer pair. The PCR products were resolved by electrophoresis, the bands were isolated directly from agarose gels, and DNA was extracted using the Gel Extraction PCR Purification System V (Promega). The resulting q-RT-PCR products were single-pass sequenced as described above.



For each reaction, the crossing point ( $C_p$ ) was determined using the “second derivative max method” applied by the Light Cycler Software, version 3.3 (Roche Diagnostics). The PCR efficiency ( $E$ ) of each primer pair was calculated by determining the slope of standard curves obtained from serial-dilution analysis of cDNAs pooled from all experimental samples, as described by Yuan *et al.* (2006). The individual q-RT-PCR efficiencies ( $E$ ) for the target or reference genes were calculated using the formula:  $E=10^{(-1/\text{slope})}$ . For each candidate gene, the level of transcription was normalized using the mean geometric transcription rate of three reference sequences encoding ribosomal protein genes from the host, *P. damicornis*: *60S ribosomal protein L22*, *60S ribosomal protein L40A* and *60S acidic ribosomal phosphoprotein P0* (GenBank: HO112261, HO112283, and HO112666, respectively). The normalized relative quantities (NRQs) were calculated as described by Hellemans (2007), using the equation:

$$NRQ = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_p, \text{target}}}{\sqrt[3]{\prod_{i=1}^3 E_{\text{ref}_i}^{\Delta C_p, \text{ref}_i}}}$$

where  $E_{\text{target}}$  is the amplification efficiency of the gene of interest;  $E_{\text{ref}}$  is the amplification efficiency of the reference gene;  $\Delta C_p, \text{ref} = C_{p_{\text{ref}}}(\text{calibrator}) - C_{p_{\text{ref}}}(\text{sample})$ ; and  $\Delta C_p, \text{target} = C_{p_{\text{target}}}(\text{calibrator}) - C_{p_{\text{target}}}(\text{sample})$ .

### ***Identification of host or symbiont genes***

To determine which organism (host or symbiont) expressed the candidate genes, cross-PCR experiments were performed on DNA and RNA extracted from the holobiont (host plus symbiont) and from pure cultured zooxanthellae, as previously described by Vidal-Dupiol *et al.* (2009). Briefly, PCR amplifications were performed with oligonucleotides amplifying the targets, the gene encoding the small ribosomal subunit RNA *Symbiodinium* spp. (Rowan and Powers, 1991), and the cDNA encoding the major basic nuclear protein (MBNP) of *Symbiodinium* spp. (Table 1).

### ***Statistical analysis***

Since conditions of normality and homoscedasticity were not satisfied, within-set variations in zooxanthellar density were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test (KW), as applied by the GraphPad InStat 3. Variations in gene expression over time were analyzed using a maximum normed residual test (Grubbs, 1969; Stefansky, 1972), as applied by the JMP software (SAS Institute, Inc.). Analyses were performed on q-RT-PCR results

obtained for a double-passed pool of three nubbins from the same treatment at each sampling date. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### *Coral health and infection status*

In order to investigate the effect of bacterial challenge and/or infection, we designed two sets of experiments. The first set examined the effects of non-virulent bacterial challenge by *V. coralliilyticus*. A constant temperature of 25°C was used, as exposure of *P. damicornis* to *V. coralliilyticus* at this temperature was previously shown to trigger bleaching without tissue lysis (Ben-Haim Rozenblat and Rosenberg 2004). Tanks were maintained at 25°C with (Cb) and without (C) bacteria ( $10^3$  bacteria/mL). In the second set of experiments, which examined the effects of infection by virulent bacteria, a similar setup was used, except that the tanks with (Tb) and without (T) bacteria were subjected to a gradual temperature increase from 25°C to 32.5°C. At each time point, the bacteria added to Tb were cultured at the tank temperature.

Coral health and the stability/breakdown of symbiosis were examined by analysis of zooxanthellar density and visual monitoring. For C and Cb, the zooxanthellar densities (cell/cm<sup>2</sup> of skeleton) remained stable throughout the experiment (average: C =  $1.07 \cdot 10^6 \pm 2.35 \cdot 10^5$  and Cb =  $5.18 \cdot 10^5 \pm 2.89 \cdot 10^5$ ). There was no significant difference in zooxanthellar density between C and Cb (KW,  $p > 0.05$ ), indicating that bleaching did not occur under these experimental conditions. For T and Tb, the zooxanthellar densities remained stable over the first 15 days (average: T =  $6.21 \cdot 10^5 \pm 1.61 \cdot 10^5$  and Tb =  $4.36 \cdot 10^5 \pm 1.69 \cdot 10^5$ ), but dropped (to  $6.26 \cdot 10^3 \pm 5.05 \cdot 10^3$  and  $1.72 \cdot 10^5 \pm 6.23 \cdot 10^4$ , respectively) by D18. This represented a decrease in both cases (KW;  $p = 0.0535$  and  $p = 0.0147$  for T and Tb, respectively).

Visual monitoring was used to follow the occurrence of symptoms such as tissue lysis and/or bleaching. In the C and Cb groups, the nubbins appeared healthy throughout the duration of the experiment (Fig. 1). In the tank subjected to only increased temperature (T tank), polyps were closed at D15, bleaching became visible in the upper portion of nubbins at D16, and bleaching was complete by D18 (Fig. 1). These bleached corals were pale but still alive; when the tank temperature was returned to 25°C, the polyps reopened (Fig. 2). In the Tb group, however, tissue lysis was first observed on D12; lytic plaques were observed in the coral tissues and calcified skeletons (seen at the beginning as small white spots) became evident on the nubbins (Fig. 2). This effect continued until lysis was complete (Fig. 1; D21).

In order to confirm that coral subjected to bacterial infection were dead, tank temperature was returned to 25°C. After several days at this temperature, polyps did not reopened and the skeleton began to be colonized by algae.

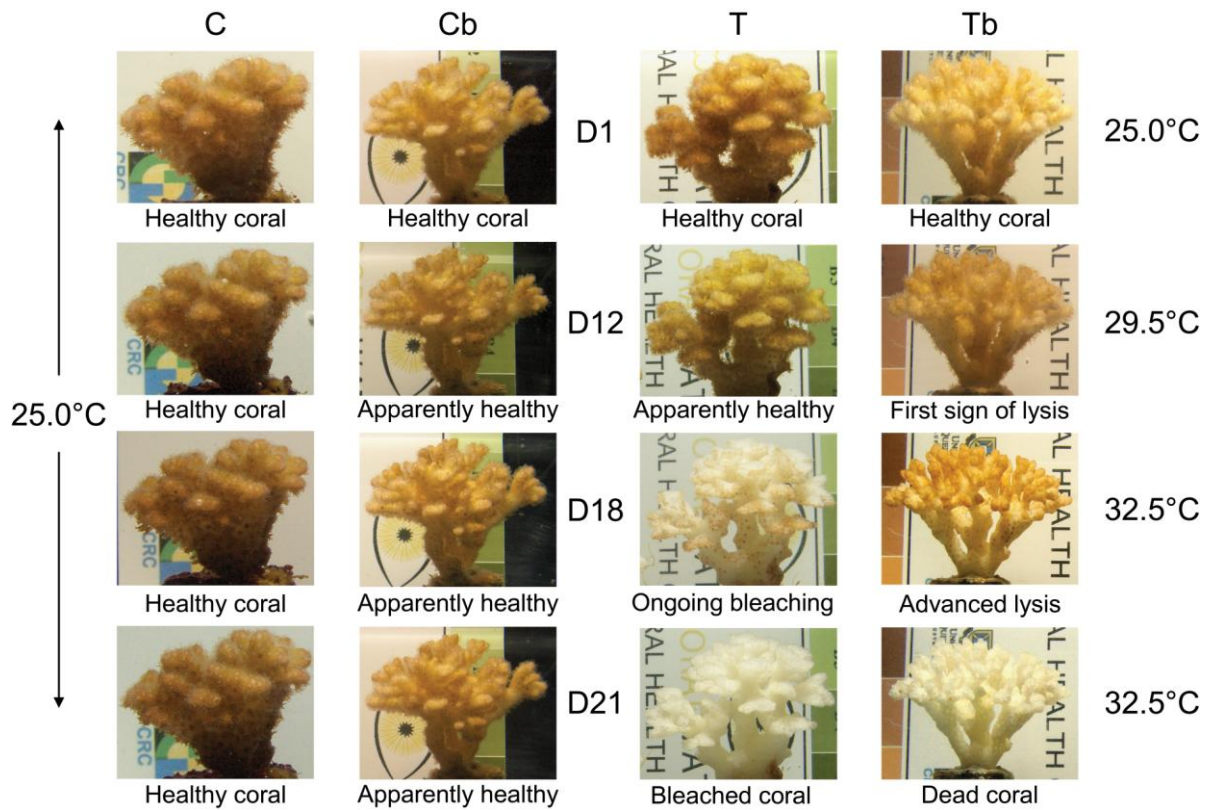
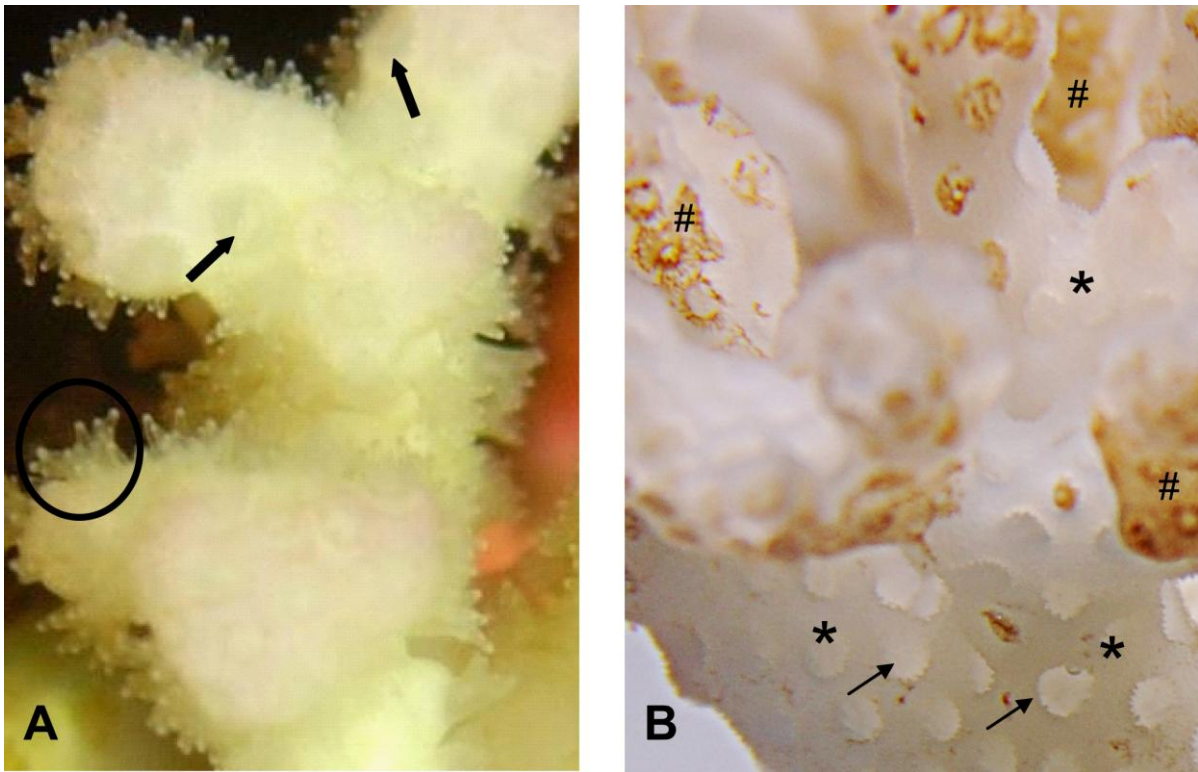


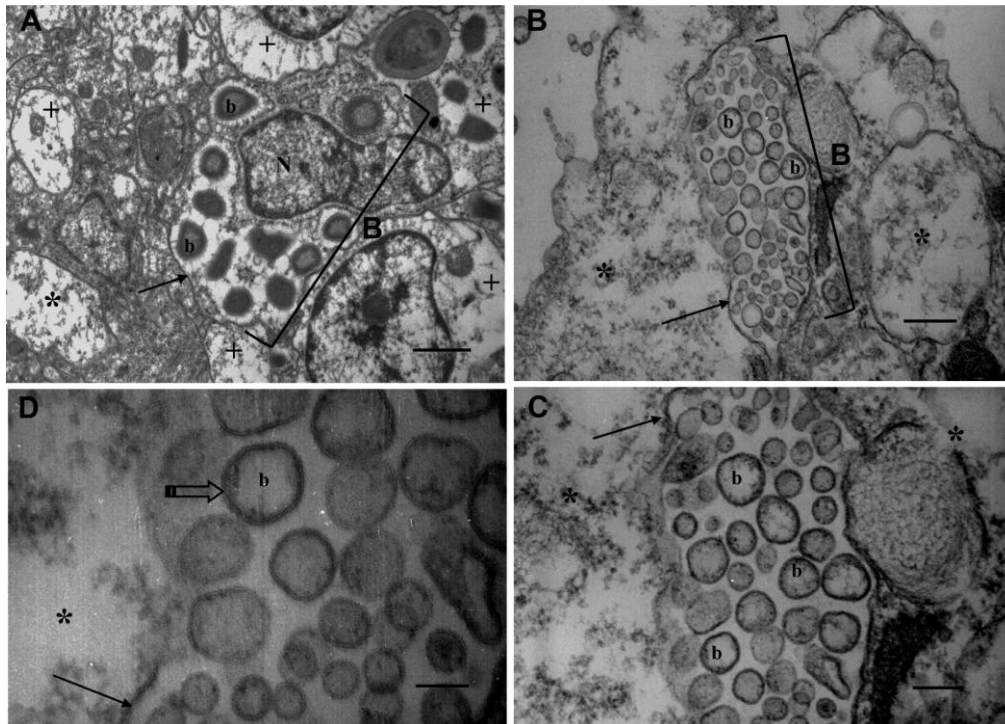
Figure 1. **Visual monitoring.** Pictures of coral nubbins taken at various time points during the experiment from groups C (25°C without bacterial balneation), Cb (25°C with bacterial balneation), T (temperature increasing from 25°C to 32.5°C without bacterial balneation) and Tb (temperature increasing from 25°C to 32.5°C with bacterial balneation).

In order to substantiate that *V. coralliilyticus* was responsible for the observed symptoms, three randomly chosen samples were harvested from each tank at each time point, and the presence/amount of bacteria was investigated using electron microscopy and q-RT-PCR. Tb samples showed no bacteria during the first six days. On D9, bacterial aggregates (bacteriocyte-like structures) were first detected inside the ectodermal host cells (Fig. 3A). Similar aggregates were reported by Ben-Haim et al. (2003b) when sections of *P. damicornis* infected by *V. coralliilyticus* YB1 were analyzed using the same methodology. This suggests that the bacteria multiply inside the ectoderm before tissue lysis becomes visible to the naked eye. Three days later (D12, 29.5°C, Fig. 3B-D), the tissues surrounding the bacteriocyte-like structures were disorganized and most cellular organelles were lysed (Fig. 3B, C). In contrast, identically treated and processed samples from the other groups (C, Cb, and T) failed to show any bacterial aggregates and lytic events during the experimental period.



**Figure 2. Comparison between bleached and lysed corals.** Enlargement of pictures of coral nubbins submitted to thermal-bleaching (T condition, A) or bacterial-lysis (Tb condition, B). A) picture of nubbins 3 days after the end of the T experiment (D24). Water temperature was decreased at a temperature of 25°C (D21). This temperature decrease leads the polyps to reopen (D24). A bleached open polyp is shown (surrounded by a circle). Corallites (e.g skeleton structure containing a polyp) are indicated by bold arrows. B) picture of nubbins at D20 after Tb experiment, when coral tissues were quasi-totally lysed. Empty corallite are indicated by arrows. Stars mark a portion of bare skeleton; Sharps indicates tissue rests undergoing lysis.

To confirm that the observed bacteria were not opportunistic bacteria of another species, we used q-RT-PCR to quantify the levels of the *V. coralliilyticus* 16S rRNA in the tissue samples. *V. coralliilyticus*-specific primers were designed and used for amplification of cDNA, and the levels of *V. coralliilyticus* 16S rRNA were compared to that of the *P. damicornis* 28S rRNA. *V. coralliilyticus* 16S rRNA corresponding amplicons were cloned and 40 randomly picked clones were sequenced. All sequences obtained corresponded to the *V. coralliilyticus* 16S rRNA. Consistent with the above results, q-RT-PCR showed that the relative amount of *V. coralliilyticus* 16S rRNA increased significantly by D6 and remained higher than the control until the end of the protocol (Fig. 4). By comparison, no such increase was observed in Cb group (Fig. 4). This strongly suggests that coral tissue invasion occurs upon increasing water temperature only.



**Figure 3. Electron microscopic monitoring.** A: Thin section of *P. damicornis* sampled from set Tb on D9. B: Thin section of *P. damicornis* sampled from set Tb on D12. C: Enlargement of photo B. D: enlargement of photo C. Abbreviations: B, bacterial aggregate; b, bacteria; arrows, host cell membrane; cross, tissue disorganization; star, area of strong tissue disorganization and lysis; empty arrow, double membrane (bacterial cell wall and cytoplasmic membrane). Scale bars: (A) 1  $\mu$ m, (B) 500 nm, (C) 250 nm, (D) 125 nm.

### ***EST sequencing, general features, and functional classification of the BI, BR, TBI and TBR libraries***

Two SSH experiments were performed to monitor the coral response to bacterial challenge or infection. The first was conducted using pooled samples (D12 and D15) from Cb versus C, while the second was conducted using pooled samples (D9-15) from Tb versus T. This yielded four cDNA libraries: the bacteria-induced (BI) library and bacteria-repressed (BR) library, which corresponded to the subtractive hybridization of Cb versus C, and the thermo-bacteria-induced (TBI) and thermo-bacteria-repressed (TBR) libraries, which corresponded to the subtractive hybridization of Tb versus T. The “induced” libraries contained transcripts putatively induced by bacterial stress or infection, while the “repressed” libraries contained gene putatively down-regulated under the experimental conditions.

The general features of each library are given in Table 2. Three hundred and eighty-four clones were sequenced from each library, yielding 279, 276, 275 and 229 high-quality cDNA sequences (>100 base pairs (bp)) from BI, BR, TBI and TBR, respectively (Table 2). The ESTs from BI coalesced into 63 contigs and 123 singletons, suggesting that the overall redundancy of the library was about 56%. The BR, TBI and TBR ESTs distributed to 59, 38

and 23 contigs and 149, 184 and 166 singletons, for overall redundancies of 46%, 33%, and 28%, respectively (Table 2).

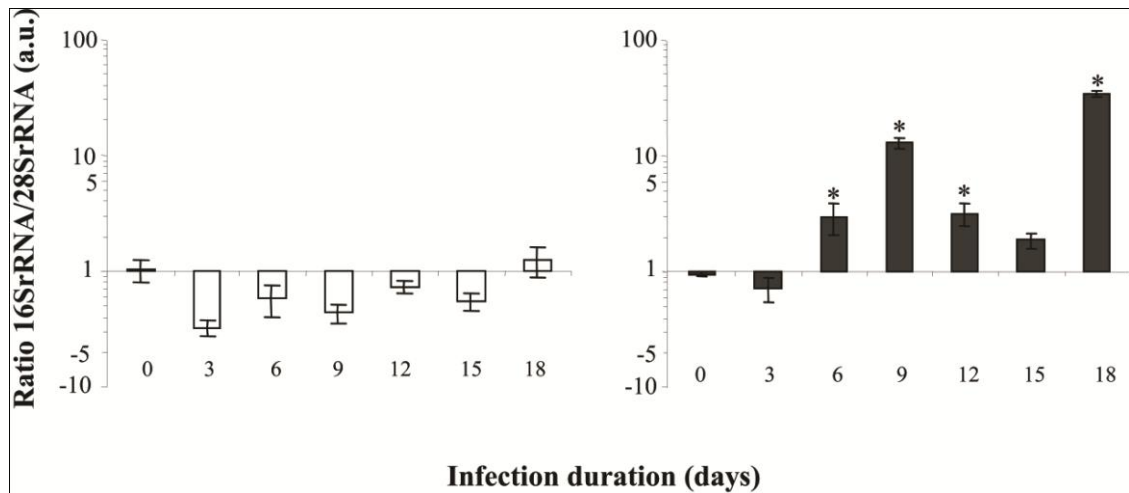


Figure 4. *Q-RT-PCR quantitation of V. coralliilyticus in corals tissues.* The relative expression of *V. coralliilyticus* 16SrRNA was normalized with respect to that of *P. damicornis* 28SrRNA. White and black histograms correspond to the non-virulent and virulent experiments, respectively.

Singleton and consensus clusters were subjected to BLASTN and BLASTX searches, and classified into three groups: unknown genes, genes of unknown function, and genes of known function (Fig. 5). Most of the sequences of known gene function presented similarities to predicted proteins from the genomes of *Nematostella vectensis* (an aposymbiotic cnidaria) and *Branchiostoma floridae* (a cephalochordata), both of which have recently been sequenced (Putnam et al., 2007; Putnam et al., 2008). The putative functions of these sequences were deduced by domain analysis using the InterProscan program. The identified genes clustered into the following 13 functional categories: apoptosis, cellular homeostasis, cellular metabolism, chromatin remodeling, cytoskeletal organization, immune responses, intracellular protein transport, photosynthetic processes, protein metabolism, stress responses, RNA metabolism, signal transduction, and system development (Fig. 5 and Supplementary Table S1).

### ***Expression patterns of genes putatively involved in immune processes during Vibrio challenge***

To investigate the response of coral to virulent and non-virulent bacterial challenges, five candidate genes were selected from the SSH libraries, and their transcription levels at various post-challenge time points were measured by q-RT-PCR (Fig. 6A2 to A6). Three were selected because of their putative involvements in antibacterial responses; these comprised a ferritin-like protein from the TBI library (similar to *Periserrula leucophryna* ferritin;  $E$ -value =  $2.10^{-66}$ ), a selenium-binding-protein-like protein from the BI library (similar to *Mus musculus* selenium binding protein;  $E$ -value =  $2.10^{-25}$ ) and a cystatin B-like protein from the BR library (similar to *Danio rerio* cystatin B;  $E$ -value =  $4.10^{-7}$ ). The other two selected genes, both lectin-like molecules, were selected based on the importance of lectins in invertebrate immunity. They included a P-selectin-like protein from the TBR library (similar to *Homo sapiens* P-selectin;  $E$ -value =  $6.10^{-28}$ ) and a concanavalin A lectin/glucanase-like protein from the TBI library (similar to *Synechococcus sp* thrombospondin N-terminal-like domain-containing protein;  $E$ -value =  $2.10^{-9}$ ). These candidates were classified as lectins because the InterProscan analysis of their translated amino-acid sequences revealed the presence of a concanavalin A-like lectin/glucanase domain (InterProscan accession number: [SSF49899](#)) and a P-selectin-like domain (InterProscan accession number: [PR00343](#)), both of which contain carbohydrate-binding sites. Following our recent discovery in an previous study of another lectin from *P. damicornis*, PdC-lectin (Vidal-Dupiol et al., 2009), we further investigated the transcript variation of this third lectin under the same experimental conditions (Fig. 6A1). To verify that the observed variations were linked to the targeted physiological effects and not to profound bacteria-induced disturbances, we also examined the expression levels of three other genes implicated in general cellular processes (*P. damicornis*: 60S ribosomal protein L22, 60S ribosomal protein L40A and 60S acidic ribosomal phosphoprotein P0; GenBank: HO112261, HO112283, and HO112666, respectively) for comparison (Fig. 6B1-3).

In order to verify that all of the selected candidates (including the reference genes) were expressed by the coral cells rather than their symbionts, we performed cross-PCR experiments using DNA and cDNA extracted from the holobiont (host plus symbiont) and from pure cultured representatives of *Symbiodinium* spp. clades B, C and D (Fig. 7). The utilized primers included candidate-gene-specific oligonucleotides; primers ss5Z and ss3Z, which amplified the *Symbiodinium* spp. small ribosomal subunit (Rowan and Powers, 1991); and primers specific for the cDNA of the major basic nuclear protein (MBNP) of

*Symbiodinium* spp. The results revealed that the candidate genes could be amplified only from DNA and cDNA extracted from holobionts (Fig. 7), whereas the ss5Z / ss3Z and *MBNP* primers amplified all tested DNA and cDNA samples, respectively. This result shows that all of the selected candidate genes were specifically expressed by coral cells. In addition, results of this experiment for the *ferritin-like protein* and the *selenium-binding-protein-like protein* encoding genes show higher amplicon size when the matrix used was genomic DNA (Fig. 7). This is probably due to the presence of intronic sequences in both genes.

Table 2: General characteristics of the BI, BR, TBI and TBR libraries.

\*  $R = nEST \text{ assembled in cluster} / \text{Total EST}$

	BI library	BR library	TBI library	TBR library
<b>Sequenced clone</b>	384	384	384	384
<b>Analysed cDNA</b>	279	276	275	229
<b>Average EST size (bp)</b>	335.9	332.1	367.3	302.7
<b>Contigs</b>	63	59	38	23
<b>EST in contigs</b>	156	127	91	63
<b>Singletons</b>	123	149	184	166
<b>Redundancy* (%)</b>	55.9	46.0	33.1	27.5

Two of the three selected lectins (concanavalin A-like protein and PdC-lectin) displayed similar transcriptional profiles (Fig. 6A1 and 6A2). Exposure to non-virulent bacteria triggered significant down-regulation of *concanavalin A-like protein* and *PdC-lectin* at D9 (more than 4- and 8-fold for *PdC-lectin* and *concanavalin A-like protein*, respectively), followed by up-regulation at D18 (only significant for *PdC-lectin*; 3.6 fold,  $p < 0.05$ , Fig. 6A1). In contrast, samples exposed to the virulent conditions showed significant up-regulation of both genes from D6 (2.9- and 3.3-fold for *PdC-lectin* and *concanavalin A-like protein*, respectively) to D15, with a dramatic decrease seen on D18. The maximum increase was observed on D12 (7.7- and 9.3-fold for *PdC-lectin* and *concanavalin A-like protein*, respectively). The remaining lectin, *P-selectin-like protein*, differed from the other two; its expression decreased at all tested time points more than 3.2-fold during the two experiments (Fig. 6A3).



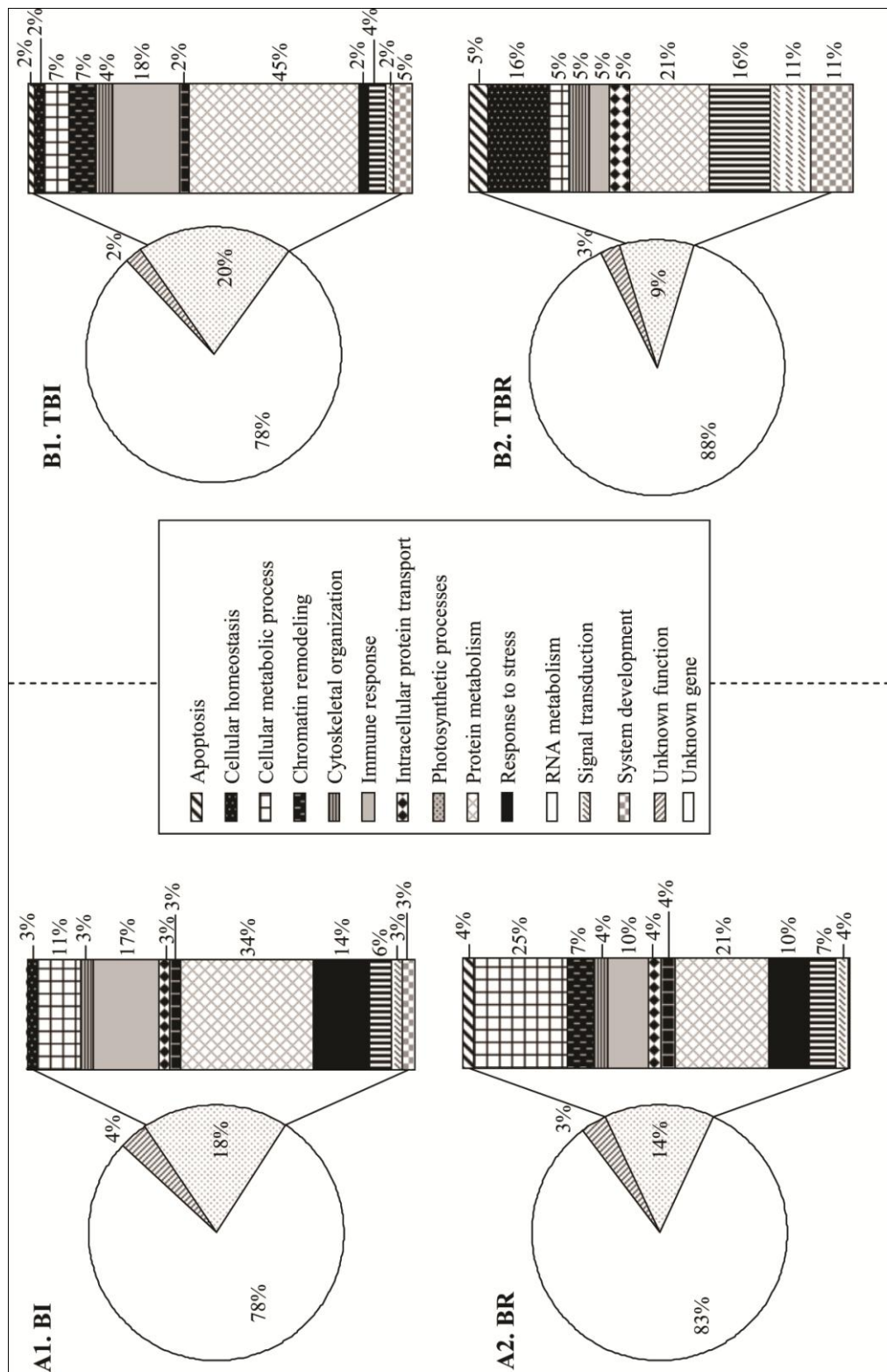
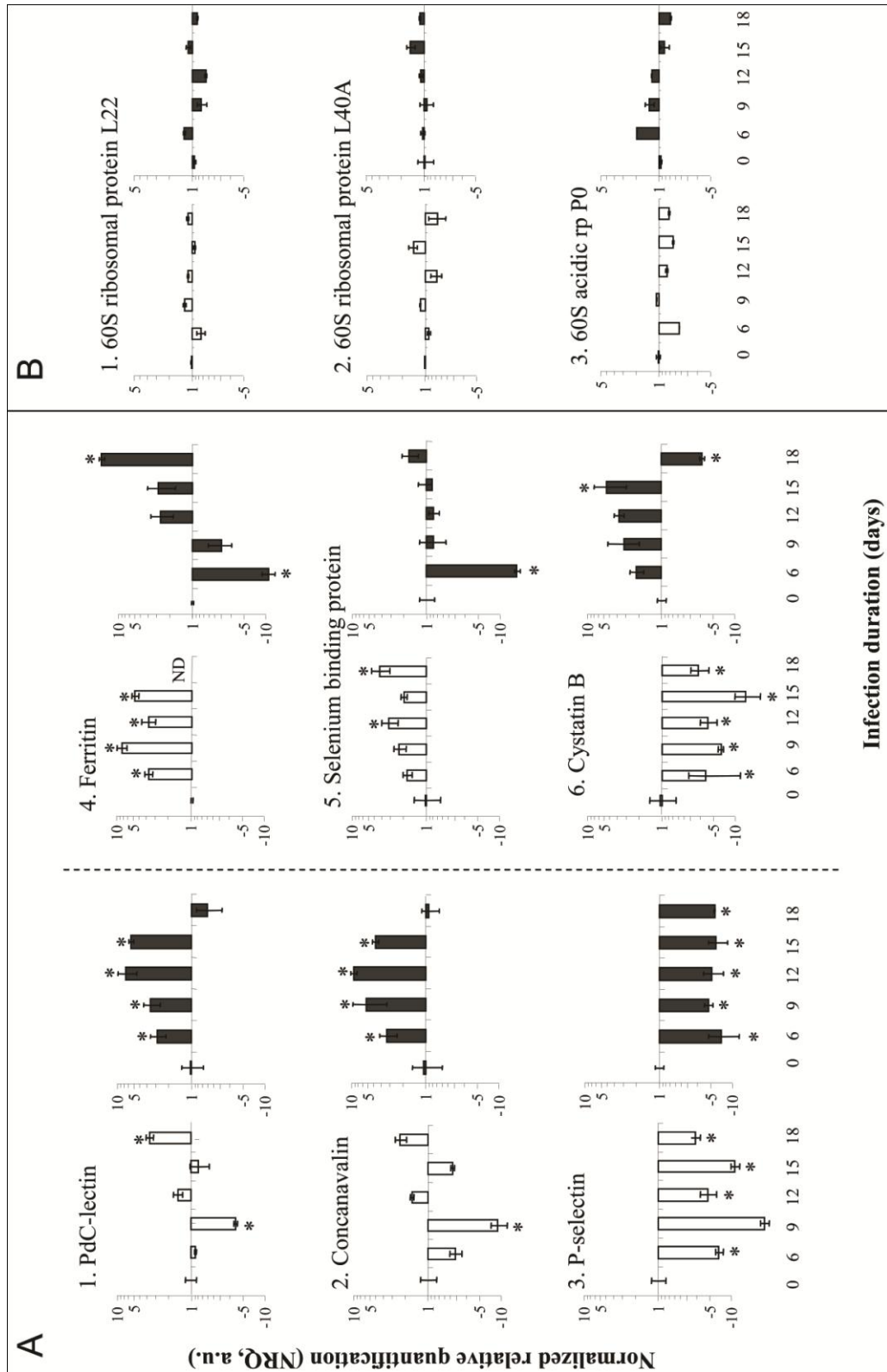


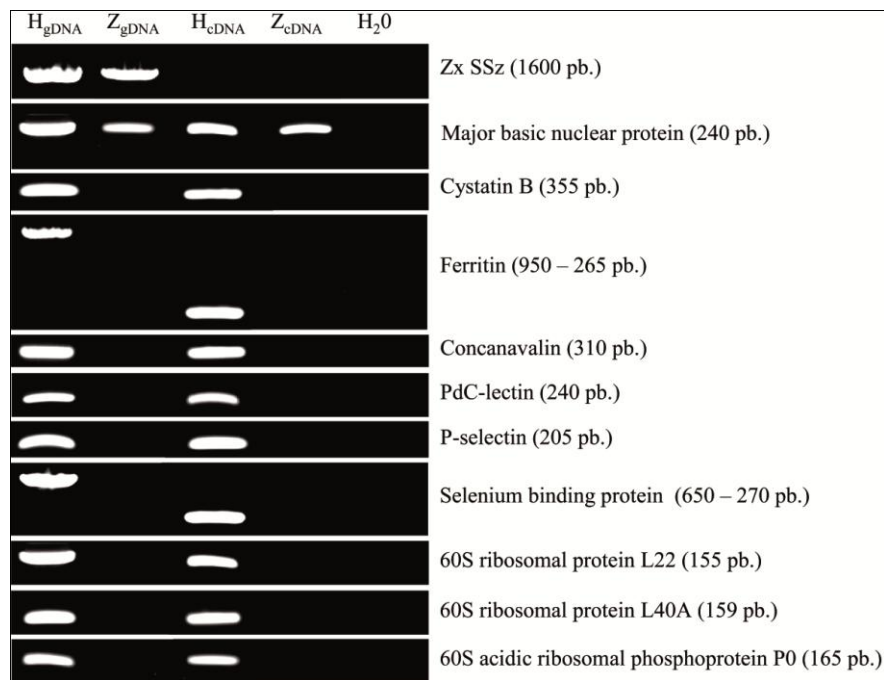
Figure 5. **Functional classification of the sequences obtained from the BI, BR, TBI and TBR libraries.** ESTs presenting similarities with gene of known function were clustered into 13 categories according to their putative biological functions. A: Genes putatively up-regulated (A1) or down-regulated (A2) in coral exposed to *V. coralliilyticus* at a constant low temperature. B: Genes putatively up-regulated (B1) or down-regulated (B2) in coral exposed to *V. coralliilyticus* under increasing seawater temperature (which triggers virulence).



**Figure 6. Temporal expression patterns of selected candidate and reference genes.** A: Q-RT-PCR was used to measure the expression levels of six selected candidates from the non-virulent and virulent experiments on D0, D6, D9, D12, D15 and D18. Relative expression levels were normalized with respect to the geometric mean of three reference genes (Normalized Relative Quantity, NRQ). B: Expression levels of the three reference genes normalized with respect to the expression of *P. damicornis* 28SrRNA. White and black histograms represent the results from the non-virulent and virulent experiments, respectively. Bars represent the mean of replicates, while the error bars correspond to the SEM. \*  $p < 0.05$  indicates a significant difference within the same groups.

The transcription patterns for *ferritin-like protein* and the *selenium-binding-protein-like protein* were very similar. In samples exposed to the non-virulent treatment, significant up-regulation was observed across most of the tested time points (Fig. 6A4 and A5). In samples exposed to the virulent treatment, expression of *ferritin-like protein* was strongly down-regulated at D6 (10.2-fold), and then significantly up-regulated at the end of the experiment (by more than 16.1-fold on D18; Fig. 6A4). The gene encoding the selenium-binding-protein-like protein displayed a very similar profile (Fig. 6A5). Finally, *cystatin B-like protein* was down-regulated at all tested time points in response to the non-virulent treatment (more than 3.1-fold; Fig. 6A6), whereas under the virulent treatment, it was significantly up-regulated at D15 and then down-regulated at D18 (more than 3.5-fold; Fig. 6A6).

In our system, no significant expressional variation was observed among the general cellular process corresponding to reference genes (Fig. 6B1-3).



**Figure 7: The selected genes are expressed by the coral host.** The presence of the selected candidate genes and those encoding the gene for the zooxanthellar small ribosomal subunit RNA (*Zx ssRNA*) and the cDNA of the zooxanthellar major basic nuclear protein were investigated by PCR amplification of DNA/cDNA extracted from holobionts (corals plus zooxanthellae) or from pools of pure cultured zooxanthellae representing clades B, C and D. Abbreviations: HgDNA, holobiont genomic DNA; ZgDNA, zooxanthellar genomic DNA; HcDNA, holobiont cDNA; ZcDNA, zooxanthellar cDNA.

## Discussion

This work represents the first transcriptomic study investigating the physiological response of a scleractinian coral (*P. damicornis*) to its specific and temperature-sensitive pathogen, *V. coralliilyticus* YB1. More specifically, subtractive hybridization of mRNA from the holobiont submitted to balneation with bacteria at a constant (25°C) or increasing (25° to 32.5°C) temperature was used to identify immunity-related genes that appeared to be associated with bacterial stress or infection.

Although a previous study showed that bleaching was triggered by balneation of *P. damicornis* with *V. coralliilyticus* YB1 at 25°C (Ben-Haim Rozenblat and Rosenberg 2004), we surprisingly failed to observe bleaching under these conditions. However, this difference may be due to between-study differences in the utilized holobiont populations that are known to display genetic variability (Pinzon and LaJeunesse 2010). Eugene Rosenberg's group used an isolate of *P. damicornis* from Eilat in the Gulf of Aquaba (Red Sea, 29.30°N), where seawater temperatures range from 20.5 to 27.3°C (Ben-Haim Rozenblat and Rosenberg 2004; Loya 2004). In contrast, we used clones of an isolate of *P. damicornis* from Lombok Island (Indonesia, 8°S), where seawater temperatures range from 26.8 to 29.4°C (IGOSS satellite data). Thus these holobiont populations may have adapted to their local thermal conditions, as has been well documented in other species, including *Drosophila melanogaster*, *Podosphaera plantaginis*, *Scottolana canadensis*, *Daphnia magna*, and various crustaceans (Lonsdale and Levinton, 1985; Whiteley et al., 1997; Mitchell and Lampert, 2000; Ayrinhac et al., 2004; Laine, 2008). In addition, differential responses under similar experimental conditions may arise through the actions of the mucus-associated bacterial community, as proposed in the hologenome theory of evolution (Rosenberg et al., 2007b). Although still under some debate, this theory contends that changes in the mucus-associated bacterial population can cause the coral holobiont to adapt to changes in the environment, including the presence of pathogens (Leggat et al., 2007; Rosenberg et al., 2007a; Rosenberg et al., 2007b).

In the context of temperature-dependent virulence, no lytic symptoms were observed at the low temperature (as expected). The first lytic events that could be observed by visual monitoring were noted on D12 (29.5°C) in the Tb group. Microscopic analysis revealed that these visible lytic events were preceded by the development of bacterial aggregates inside ectodermal cells (first observed on D9; Fig. 3A). In addition, the tissues surrounding the bacteria aggregates were disorganized, and the cellular organelles were mostly lysed (Fig.

3C). Similar aggregates were observed in a previous study by Ben-Haim et al. (2003b), in which sections of *P. damicornis* infected by *V. coralliilyticus* YB1 were analyzed using the same microscopic approach. Although *Vibrio* species are usually considered as extra cellular pathogen, several studies reported intracellular and viable *Vibrio*. This was evidenced for another coral pathogen, *Vibrio shiloi* invading *Oculina patagonica* epithelial cells (Banin et al., 2000), and for *Vibrio cholerae* that can colonize amoebas (Abd et al., 2007) and phagocytes (Ma and Mekalanos, 2010). These results suggest that the applied temperature increase allowed infection by *V. coralliilyticus*, and that this infection was responsible for the lytic events leading to coral death.

To address the possibility that the detected aggregates could represent another bacterial species present in coral tissues, we quantified the amount of *V. coralliilyticus* in tissue samples from Cb and Tb groups at all time points. Our results revealed that the amount of *V. coralliilyticus* 16S rRNA in the *P. damicornis* tissues increased significantly by D6 and remained high at the end of the experimental period. Collectively, these results suggest that *V. coralliilyticus* penetrates coral tissues, multiplies inside the ectodermal cells, and triggers the lysis of organelles, cells and coral tissues.

In terms of transcriptomics, our SSH and EST analyses identified several interesting innate-immunity-related genes as potentially being involved in the bacterial challenge. Six of them were chosen and used to monitor the response of coral to bacterial stress or infection.

Three of the chosen candidates corresponded to lectin-like molecules, which are known to play key roles in the pathogen-recognition processes of various invertebrates (Iwanaga and Lee, 2005; Schulenburg et al., 2008; Dunn, 2009). The first selected lectin-like molecule was similar to a mammalian P-selectin (Ley, 2003). The second selected lectin-like molecule displays similarities for concanavalin A-like (Rudenko et al., 1999; Grishkovskaya et al., 2000; Tisi et al., 2000; Buschiazzo et al., 2002). The third chosen lectin, PdC-lectin is likely to play a crucial role in the acquisition of zooxanthellae by coral cells (Vidal-Dupiol et al., 2009). Indeed, PdC-lectin is highly similar to another mannose binding lectin, the Millectin of *Acropora millepora*, which was shown to bind to both zooxanthellae and *V. coralliilyticus* (Kvennefors et al., 2008).

We found that the *PdC-lectin* and *concanavalin A-like* transcripts displayed similar expression patterns in non-virulent and virulent experiments. Their levels were up-regulated in the virulent experiment from D6 to D12, plateaued on D15 (when the tank temperature reached 32.5°C) and then returned to the control level by D18 (Fig. 6A1 and 6A2). This transcriptional induction is not surprising, as lectin-like genes have been found to be induced

in a large set of studies on experimental infections of invertebrate species (O'Rourke et al., 2006; Huang et al., 2007; Gowda et al., 2008; Soonthornchai et al., 2010; Zhang et al., 2010). The D18 decrease is more surprising, but many coral cells were undergoing necrosis at this stage (Fig. 1). Consequently, we can hypothesize that this D18 decrease illustrates the physiological collapse of the coral, which could lead to a general decrease in the transcription levels of the genes responsible for a variety of functions. A general transcriptional decrease under extreme physiological conditions (lethal stress) has been observed previously in other species (Wang et al., 2006; Su et al., 2009).

In coral subjected to the non-virulent treatment, we observed a drastic transient decrease in the transcriptional expression levels of *PdC-lectin* and *concanavalin A-like protein* (Fig. 6A1 and A2). This transient decrease peaked on D9 and the transcripts had returned to control levels by D12. This observation is curious because no symptoms of infection were observed in this group. However, a similar down-regulation of *PdC-lectin* was previously observed in *P. damicornis* nubbins confronted with thermal stress (Vidal-Dupiol et al., 2009), and occurred just prior to the dissociation of symbiosis and the onset of bleaching. Based on the putative role of PdC-lectin in the process of zooxanthellar acquisition, we previously hypothesized that this down-regulation could lead to bleaching (Vidal-Dupiol et al., 2009). As corals have been reported to bleach under a wide variety of stress conditions, including high and low seawater temperature, increased heavy metal concentrations, decreased salinity... (Brown, 1997; Douglas, 2003), we herein hypothesize that down-regulation of *PdC-lectin* and *concanavalin A-like protein* could be induced by various stresses that lead to bleaching. The transient down-regulation of these transcripts observed in the Cb group could be the result of stress induced by bacterial balneation. Although we did not observe any decrease in zooxanthellar density among these samples, it is possible that there may have been a temporary “bleaching-like effects” without the appearance of visible symptoms. The further observation that the transcription levels of these genes returned to control levels allows us to hypothesize that the corals may have responded to the bacterial stress by reallocating their resources to prepare for an antibacterial response (e.g., the induction of ferritin expression; see below). Then, when the bacterial threat was gone, their allocations returned to “business as usual”.

The third lectin, the *P-selectin-like protein*, was strongly down-regulated after the initial addition of bacteria in both treatment groups, and this decrease was maintained for the duration of the experiments. The P-selectins have been well studied in vertebrate models, where they are known to be involved in various immune processes. However, their function in

invertebrates is not yet known, making it somewhat difficult to interpret our present results. Interestingly, however, the P-selectins are known to be involved in adhesion processes (Rudenko et al., 1999; Grishkovskaya et al., 2000; Tisi et al., 2000; Buschiazzo et al., 2002), and studies have shown that some virulence factors present in the excretion-secretion (ES) products of marine *Vibrios* reduced the adhesive properties of invertebrate hemocytes (Choquet et al., 2003; Allam and Ford, 2006; Labreuche et al., 2006a; Labreuche et al., 2006b; Mateo et al., 2009). Hemocyte-like cells have not yet been identified in scleractinians, but endodermal and circulating granular and agranular cells may have phagocytic properties (Mullen et al., 2004). Consequently, it may be useful in the future to explore the potential effect of *V. coralliilyticus* on the adhesive properties of *P. damicornis* phagocytes.

The three other candidates chosen to monitor the effect of *V. coralliilyticus* on the physiology of *P. damicornis* were a *cystatin B-like protein*, a *ferritin-like protein* and a *selenium-binding-protein-like protein*. Cystatin B is a cytoplasmic protein that reversibly inhibits the cysteine proteases to affect protein turnover, and also plays a role in antibacterial defense (Zavasnik-Bergant, 2008). In vertebrates, *cystatin B* is up-regulated in monocytes exposed to lipopolysaccharide (LPS) challenge and treatment with immune enhancers (e.g., NO) (see Zavasnik-Bergant, 2008). In invertebrates, *cystatin B* is reportedly up-regulated in response to bacterial challenge (Lefebvre et al., 2004) and parasitic infection (Kang et al., 2006). Our present results are in agreement with the previous findings, in that the transcriptional expression of the *cystatin B-like protein* increased when corals were infected by bacteria (virulent treatment). This induction peaked at D15 and then sharply decreased by D18. This drastic decrease could also be explained by the physiological collapse described above. Down-regulation of *cystatin B-like protein* transcript levels was also observed in *P. damicornis* exposed to non virulent bacteria, perhaps due to the existence of a trade-off mechanism allowing the coral to maximize its energy re-allocation to “external defenses” (i.e., the production of antibacterial compounds for release into the mucus). This phenomenon has been described for several invertebrate species in response to stress (Agell et al., 2004; Brulle et al., 2007; Lourenco et al., 2009).

The other putative immune effectors considered in the present study are 2 metal-binding proteins, a ferritin-like and a selenium-binding-protein-like. Ferritins, which can sequester iron, play dual roles in detoxification and iron storage (Arosio et al., 2009; Arosio and Levi, 2010), and the selenium-binding protein covalently binds selenium (Bansal et al., 1989; Jeong et al., 2009). Interestingly, iron appears to be essential for bacterial growth (Doherty, 2007), especially for *Vibrio* species (Wright et al., 1981; Tolmasky and Crosa,

1991; Wyckoff et al., 2007), and selenium is a trace element crucial for the survival of all living organisms through the formation of selenocysteine, a modified amino acid largely implicated in anti-oxidant defense (e.g. glutathione peroxidase, thioredoxin reductase) (Burk et al., 2003; Stadtman, 1996). Up-regulation of ferritin and selenium-binding-protein by infected host cells, can trigger iron and selenium sequestration, thereby reducing the amount of these essential trace elements both necessary for bacterial growth. Infection-induced iron and selenium sequestration by ferritin and selenium-binding-protein have been observed in several other invertebrate/bacteria interactions (Beck et al., 2002; Altincicek et al., 2008; Li et al., 2008; Kong et al., 2010; Simão et al., 2010; Song et al., 2006), and the crucial role of ferritin in antibacterial defense was recently demonstrated in a study showing that the injection of recombinant ferritin into *Vibrio harveyi*-infected shrimp (*Peneaus monodon*) increased the host survival rate (Maiti et al., 2010).

Under non virulent condition, both *ferritin-like* and *selenium-binding-protein-like* were up-regulated, perhaps reflecting that bacteria have been detected and the coral is preparing its defenses by sequestering iron and selenium. Under our virulent experimental conditions, the expression of *ferritin-like* and *selenium-binding-protein-like* corresponding genes was significantly down-regulated during the early stage of infection, but up-regulated near the end of the infection. This could illustrate that *V. coralliilyticus* is able to inhibit the intracellular immune response during the initial stages of infection. A similar phenomenon was observed in abalone following infection by *V. harveyi* (Travers et al., 2009). The up-regulation of *ferritin-like* and *selenium-binding-protein-like* genes later in the process of infection could limit bacterial infection by sequestering iron and selenium. In addition, zooxanthellae under thermal stress have been shown to suffer photo-inhibition leading to ROS over-production (Weis, 2008). Thus, the overexpression of a ferritin and a selenium-binding-protein might also participate in ROS detoxification. Nevertheless, this late increase seems insufficient to overcome the *Vibrio* infection process, at least under our experimental conditions.

In conclusion, the present study represents the first molecular examination of the response evoked by a scleractinian coral when confronted by its pathogenic *Vibrio* (*V. coralliilyticus*). Several genes that appeared to be involved in the coral immune response were identified, and their expression patterns were studied in corals exposed to virulent and non-virulent bacteria. The results revealed clear differences for some of the candidate genes, which could prove useful as functional biomarkers for measuring coral health and immunity in monitoring programs and public aquariums. Future studies will be required to fully



examine the molecular and cellular mechanisms involved in this process, but our present study also suggests several new hypotheses concerning the effect of *V. coralliilyticus* on the physiology of *P. damicornis*.

## Acknowledgements

This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). O Ladrrière is PhD student of the National Fund for Scientific Research (FNRS-Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). The authors are indebted to Marc Manetti for his help with the experimental procedures, Céline Cosseau for many helpful discussions, and Andrew Carroll for English proofreading and helpful discussions. We thank Alain Pigno and Boris Rota from the Cap d'Agde Public Aquarium for their help with the project, and Jérôme Bossier for helping with the statistical analyses. We also thank the Department of Environmental Sciences and Management (Prof. JP Thome) and the Dean of the Faculty of Sciences (Prof. JM Bouquegneau), both of the University of Liege, for financial support. Finally, the authors thank Mary-Alice Coffroth for allowing us to use cultures from the BURR Culture Collection.

## References

- IGOSS Time series SST, from 1981 to 2002, vol. 2010.
- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G. B. and Sandström, G.** (2007). *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 33-39.
- Agell, G., Turon, X., De Caralt, S., López-Legentil, S. and Uriz, M. J.** (2004). Molecular and organism biomarkers of copper pollution in the ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Mar. Pollut. Bull.* **48**, 759-767.
- Allam, B. and Ford, S. E.** (2006). Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **20**, 374-383.
- Altincicek, B., Knorr, E. and Vilcinskis, A.** (2008). Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 585-595.
- Arosio, P., Ingrassia, R. and Cavadini, P.** (2009). Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta (BBA). Gen Sub.* **1790**, 589-599.
- Arosio, P. and Levi, S.** (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta (BBA). Gen Sub.* **1800**, 783-792.

- Ayrinhac, A., Debat, V., Gibert, P., Kister, A.-G., Legout, H., Moreteau, B., Vergilino, R. and David, J. R.** (2004). Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Funct. Ecol.* **18**, 700-706.
- Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E. and Rosenberg, E.** (2000). Penetration of the Coral-Bleaching Bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3031-3036.
- Banin, E., Sanjay, K. H., Naider, F. and Rosenberg, E.** (2001). A proline rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1536-1541.
- Bansal, M. P., Oborn, C. J., Danielson, K. G. and Medina, D.** (1989). Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* **10**, 541-546.
- Beck, G., Ellis, T. W., Habicht, G. S., Schluter, S. F. and Marchalonis, J. J.** (2002). Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 11-26.
- Ben-Haim Rozenblat, Y. and Rosenberg, E.** (2004). Temperature-regulated bleaching and tissue lysis of *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. In *Coral health and disease*, eds. E. Rosenberg and Y. Loya ), pp. 301-324. New-York: Spinger-Verlag.
- Ben-Haim, Y. and Rosenberg, E.** (2002). A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol* **141**, 47-55.
- Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J. and Rosenberg, E.** (2003a). *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 309-315.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M. and Rosenberg, E.** (2003b). Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4236-4242.
- Bourne, D. G., Garren, M., Work, T. M., Rosenberg, E., Smith, G. W. and Harvell, C. D.** (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol.* **17**, 554-562.
- Brown, B. E.** (1997). Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* **16** (supplement), 129-138.
- Brulle, F., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A. and Vandenbulcke, F.** (2007). The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* **144**, 334-341.
- Burk, R. F., Hill, K. E. and Motley, A. K.** (2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J. Nutr.* **133**, 1517-1520.
- Buschiazzo, A., Amaya, M. F., Cremona, M. L., Frasc, A. C. and Alzari, P. M.** (2002). The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. *Mol. Cell* **10**, 757-768.
- Cervino, J. M., Hayes, R. L., Polson, S. W., Polson, S. C., Goreau, T. J., Martinez, R. J. and Smith, G. W.** (2004). Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6855-6864.
- Cervino, J. M., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Lorence, E. A., Goreau, T. J., Hayes, M. L., Winiarski-Cervino, K. B., Smith, D. J., Hughen, K. and Bartels, E.** (2008).

The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1658-1671.

**Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L. and Paillard, C.** (2003). Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* **57**, 109-116.

**Doherty, C. P.** (2007). Host-pathogen interactions: the role of iron. *J. Nutr.* **137**, 1341-1344.

**Donner, S. D., Skirving, W. J., Little, C. M., Oppenheimer, M. and Hoegh-Guldberg, O. V. E.** (2005). Global assessment of coral bleaching and required rates of adaptation under climate change. *Glob. chang. biol.* **11**, 2251-2265.

**Douglas, A. E.** (2003). Coral bleaching-how and why? *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 385-392.

**Dunn, S. R.** (2009). Immunorecognition and immunoreceptors in the Cnidaria. *Inv. Surv. Jour.* **6**, 7-14.

**Gates, R. D., Baghdasarian, G. and Muscatine, L.** (1992). Temperature stress caused host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biol. Bull.* **182**, 324-332.

**Gowda, N. M., Goswami, U. and Islam Khan, M.** (2008). T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* **99**, 141-145.

**Grishkovskaya, I., Avvakumov, G. V., Sklenar, G., Dales, D., Hammond, G. L. and Muller, Y. A.** (2000). Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J.* **19**, 504-512.

**Grubbs, F. E.** (1969). Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* **11**, 1-21.

**Harvell, D., Jordán-Dahlgren, E., Merkel, S., Rosenberg, E., Raymundo, L., Smith, G., Weil, E. and Willis, B.** (2007). Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography.* **20**, 172-195.

**Hashimoto, K., Shibuno, T., Murayama-Kayano, E., Tanaka, H. and Kayano, T.** (2004). Isolation and characterization of stress-responsive genes from the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs* **23**, 485-491.

**Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J.** (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19.

**Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K. et al.** (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* **318**, 1737-1742.

**Huang, G., Liu, H., Han, Y., Fan, L., Zhang, Q., Liu, J., Yu, X., Zhang, L., Chen, S., Dong, M. et al.** (2007). Profile of acute immune response in Chinese amphioxus upon *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 1013-1023.

**Hughes, T., Baird, A., Bellwood, D., Card, M., Connolly, S., Folke, C., Grosberg, R., Guldberg, H., Jackson, J., Kleypas, J. et al.** (2003). Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* **301**, 929-933.

**Iwanaga, S. and Lee, B. R.** (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 128-150.

**Jeong, J.-Y., Wang, Y. and Sytkowski, A. J.** (2009). Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 583-588.

**Johannes, R. E. and Wiebe, W. J.** (1970). Method for determination of coral tissue biomass and composition. *Limnol. Oceanogr.* **15**, 822-824.

- Kang, Y.-S., Kim, Y.-M., Park, K.-I., Kim Cho, S., Choi, K.-S. and Cho, M.** (2006). Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 1119-1131.
- Kong, P., Wang, L., Zhang, H., Zhou, Z., Qiu, L., Gai, Y. and Song, L.** (2010). Two novel secreted ferritins involved in immune defense of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* **28**, 604-612.
- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E. and Rosenberg, E.** (2001). *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1383-1388.
- Kushmaro, A., Loya, Y., Fine, M. and Rosenberg, E.** (1996). Bacterial infection and bleaching. *Nature*, 380-396.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., Ben Haim, H. and Loya, Y.** (1998). Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **171**, 131-137.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M. and Loya, Y.** (1997). Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **147**, 159-165.
- Kvennefors, E. C. E., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O., Degnan, B. M. and Barnes, A. C.** (2008). An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 1582-1592.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. and Nicolas, J.-L.** (2006a). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* **8**, 2715-2724.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C. and Nicolas, J.-L.** (2006b). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 367-379.
- Ladrière, O., Compère, P., Decloux, N., Vandewalle, P. and Poulicek, M.** (2008). Morphological alterations of zooxanthellae in bleached cnidarian hosts. *Cah. Biol. Mar.* **49**, 215-227.
- Laine, A.-L.** (2008). Temperature-mediated patterns of local adaptation in a natural plant pathogen metapopulation. *Ecol. Lett.* **11**, 327-337.
- Lefebvre, C., Cocquerelle, C., Vandenbulcke, F., Hot, D., Huot, L., Lemoine, Y. and Salzet, M.** (2004). Transcriptomic analysis in the leech *Theromyzon tessulatum*: involvement of cystatin B in innate immunity. *Biochem. J.* **380**, 617-625.
- Leggat, W., Ainsworth, T., Bythell, J., Dove, S., Gates, R., Hoegh-Guldberg, O., Iglesias-Prieto, R. and Yellowlees, D.** (2007). The hologenome theory disregards the coral holobiont. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**.
- Lesser, M. P.** (2004). Experimental biology of coral reef ecosystems. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **300**, 217-252.
- Ley, K.** (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* **9**, 263-268.
- Li, M., Saren, G. and Zhang, S.** (2008). Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **150**, 263-270.
- Lonsdale, D. J. and Levinton, J. S.** (1985). Latitudinal differentiation in copepod growth: an adaptation to temperature. *Ecology* **66**, 1397-1407.

- Lourenco, A. P., Martins, J. R., Bitondi, M. M. G. and Simoes, Z. L. P.** (2009). Trade-off between immune stimulation and expression of storage protein genes *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **71**, 70-87.
- Loya , Y.** (2004). The coral reefs of Eilat - past, present and future: three decades of coral community structure studies. In *Coral health and disease*, eds. E. Rosenberg and Y. Loya ), pp. 1-29. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Luna, G. M., Biavasco, F. and Danovaro, R.** (2007). Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. *Environ. Microbiol.* **9**, 1851-1857.
- Ma, A. T. and Mekalanos, J. J.** (2010). In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 4365-4370.
- Maiti, B., Khushiramani, R., Tyagi, A., Karunasagar, I. and Karunasagar, I.** (2010). Recombinant ferritin protein protects *Penaeus monodon* infected by pathogenic *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* **88**, 99-105.
- Mateo, D. R., Siah, A., Araya, M. T., Berthe, F. C. J., Johnson, G. R. and Greenwood, S. J.** (2009). Differential in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. *J. Invertebr. Pathol.* **102**, 50-56.
- Mitchell, S. E. and Lampert, W.** (2000). Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankton, *Daphnia magna*. *J. Evol. Biol.* **13**, 371-382.
- Mullen, K. M., Peters , E. C. and Harvell, C. D.** (2004). Coral resistance to disease. In *Coral health and disease*, eds. E. Rosenberg and Y. Loya ), pp. 377-399. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- O'Rourke, D., Baban, D., Demidova, M., Mott, R. and Hodgkin, J.** (2006). Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Res.* **16**, 1005-1016.
- Pinzon, H and LaJeunesse, T. C.** (2010). Species delimitation of common reef corals in the genus *Pocillopora* using nucleotide sequence phylogenies, population genetics and symbiosis ecology. *Mol. Ecol.* **20**, 311-325
- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.-K. et al.** (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453**, 1064-1071.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V. et al.** (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **317**, 86-94.
- Rodriguez-Lanetty, M., Harii, S. and Hoegh-Guldberg, O.** (2009). Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress. *Mol. Ecol.* **18**, 5101-5114.
- Rosenberg , E.** (2004). The bacterial disease hypothesis of coral bleaching. In *Coral health and disease*, eds. E. Rosenberg and Y. Loya ), pp. 377-399. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. and Zilber-Rosenberg, I.** (2007a). The hologenome theory disregards the coral holobiont: reply from Rosenberg et al. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. and Zilber-Rosenberg, I.** (2007b). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Micro* **5**, 355-362.
- Rowan, R. and Powers, D. A.** (1991). Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **71**, 65-73.

- Rudenko, G., Nguyen, T., Chelliah, Y., Südhof, T. C. and Deisenhofer, J.** (1999). Regulation of LNS domain function by alternative splicing: The structure of the ligand-binding domain of Neurexin I  $\beta$ . *Cell* **99**, 93-101.
- Schulenburg, H., Hoepfner, M. P., Weiner, J. r. and Bornberg-Bauer, E.** (2008). Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLD) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology* **213**, 237-250.
- Simão, M., Leite, R., Rocha, C. and Cancela, M.** (2010). Changes in bioturbation of iron biogeochemistry and in molecular response of the clam *Ruditapes decussates* upon *Perkinsus olseni* infection. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **59**, 433-443.
- Song, L., Zou, H., Chang, Y., Xu, W. and Wu, L.** (2006). The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 265-273.
- Soonthornchai, W., Rungrasamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Söderhäll, K. and Jiravanichpaisal, P.** (2010). Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 19-28.
- Stadtman, T. C.** (1996). Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 83-100.
- Stefansky, W.** (1972). Rejecting outliers in factorial designs. *Technometrics* **14**, 469-479.
- Stimson, J. and Kinzie III, R. A.** (1991). The temporal pattern and rate of release of zooxanthellae from the reef coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus) under nitrogen-enrichment and control conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **153**, 63-74.
- Stimson, J., Sakai, K. and Sembali, H.** (2002). Interspecific comparison of the symbiotic relationship in corals with high and low rates of bleaching-induced mortality. *Coral Reefs* **V21**, 409-421.
- Su, J., Yang, C., Xiong, F., Wang, Y. and Zhu, Z.** (2009). Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 33-39.
- Sussman, M., Willis, B. L., Victor, S. and Bourne, D. G.** (2008). Coral pathogens identified for white syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. *Plos One* **3**, e2393.
- Sutherland, K. P., Porter, J. W. and Torres, C.** (2004). Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **266**, 273-302.
- Tisi, D., Talts, J. F., Timpl, R. and Hohenester, E.** (2000). Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin  $\alpha$ 2 chain harbouring binding sites for  $\alpha$ -dystroglycan and heparin. *EMBO J.* **19**, 1432-1440.
- Tolmasky, M. E. and Crosa, J. H.** (1991). Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biometals* **4**, 33-35.
- Travers, M. A., Le Bouffant, R., Friedman, C. S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M. and Paillard, C.** (2009). Pathogenic *Vibrio harveyi* in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J. Cell. Biochem.* **106**, 152-160.
- Veron, J. E. N.** (2000). Corals of the World. Townsville: Australian Institute of Marine Science.
- Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Roger, E., Foure, L., Duval, D., Mone, Y., Ferrier-Pages, C., Tambutte, E., Tambutte, S., Zoccola, D. et al.** (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC Physiol.* **9**, 14.
- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C. and Xiang, J.** (2006). Discovery of the genes in response to White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Mar. Biotechnol.* **8**, 491-500.

**Ward, J., R , Kim, K. and Harvell, C., D** (2007). Temperature affects coral disease resistance and pathogen growth. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **329**, 115-121.

**Ward, J. R. and Lafferty, K. D.** (2004). The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing? *PLoS Biology* **2**, e120.

**Weil, E., Smith, G. W. and Gil-Agudelo, D., L. .** (2006). Status and progress in coral reef disease research. *Dis. Aquat. Org.* **69**, 1-7.

**Weis, V. M.** (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* **211**, 3059-3066.

**Whiteley, N. M., Taylor, E. W. and El Haj, A. J.** (1997). Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. *J. Therm. Biol* **22**, 419-427.

**Wilkinson , C.** (2008). Status of coral reefs of the world. In *Status of Coral Reefs of the World*, (ed. C. Wilkinson ), pp. 296. Townsville: Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest research Center

**Willis, B. L., Page, C. A. and Dinsdale, E. A.** (2004). Coral diseases on the great barrier reef. In *Coral health and disease.*, eds. E. Rosenberg and Y. Loya ), pp. 69-104. New York: Springer-Verlag.

**Wright, A. C., Simpson, L. M. and Oliver, J. D.** (1981). Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* **34**, 503-507.

**Wyckoff, E., Mey, A. and Payne, S.** (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals* **20**, 405-416.

**Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. and Stewart, C. N., Jr.** (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**, 85-97.

**Zavasnik-Bergant, T.** (2008). Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Front. Biosci.* **13**, 4625-4637.

**Zhang, H., Kong, P., Wang, L., Zhou, Z., Yang, J., Zhang, Y., Qiu, L. and Song, L.** (2010). Cflec-5, a pattern recognition receptor in scallop *Chlamys farreri* agglutinating yeast *Pichia pastoris*. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 149-156.

## Supplementary file

*Table S1: Annotated cluster summary. annotation, Top blastx, Top Blast Functional similarity, functional classification and GeneBank accession number*

Library Cluster n°	Annotation	Top BlastX Protein [species]	Evalue	Top Blast Functional similarity Protein [species]	Evalue	Functional classification	Gene BanK Accession number
B-I-146	Putative spore formation protein K	spore formation protein K [Bacillus clausii KSM-K16]	8.10 <sup>-20</sup>			Cellular metabolic process	HO112242
B-I-147	Actin	actin [Stylophora pistillata]	3.10 <sup>-74</sup>			Cytoskeleton organization	HO112243
B-I-148	Arylsulfatase	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-12</sup>	similar to arylsulfatase J [Gallus gallus]	1.10 <sup>-9</sup>	Cellular metabolic process	HO112244
B-I-149	ATP-dependent RNA helicase, eIF4A related	ATP-dependent RNA helicase, eIF4A related [Schizosaccharomyces pombe 972h-]	6.10 <sup>-4</sup>			RNA metabolic process	HO112245
B-I-150	Carbonic anhydrase	carbonic anhydrase [Desulfovibrio vulgaris str. Miyazaki F]	2.10 <sup>-4</sup>			Response to stress	HO112247
B-I-151	CCAAT/Enhancer binding protein beta	predicted protein [Nematostella vectensis]	6.10 <sup>-20</sup>	CCAAT/Enhancer binding protein beta [Paralichthys olivaceus]	1.10 <sup>-19</sup>	Immune response	HO112248
B-I-153	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 [Hydra magnipapillata]	4.10 <sup>-4</sup>			Response to stress	HO112250
B-I-156	Proline-rich transmembrane protein I	hypothetical protein BRAFLDRAFT_74660 [Branchiostoma floridae]	7.10 <sup>-14</sup>	proline-rich transmembrane protein I [Porphyromonas endodontalis ATCC 35406]	5.10 <sup>-7</sup>	Immune response	HO112253
B-I-159	Epsilon subunit of ATP synthetase	hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]	4.10 <sup>-8</sup>	epsilon subunit of ATP synthetase [Hydroides elegans]	2.10 <sup>-6</sup>	Cellular metabolic process	HO112256
B-I-160	Putative lysyl-tRNA synthetase	lysyl-tRNA synthetase, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	7.10 <sup>-19</sup>			Protein metabolic process	HO112258
B-I-161	Antho-RFamide neuropeptides	Antho-RFamide Precursor [Callinectes parasitica]	6.10 <sup>-41</sup>			Signal transduction	HO112259
B-I-162	NOD3 protein	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-30</sup>	NOD3 protein, isoform CRA_d [Homo sapiens]	1.10 <sup>-29</sup>	Immune response	HO112260

B-I-163	60S ribosomal protein L22	predicted protein [Nematostella vectensis]	9.10 <sup>-24</sup>	60S ribosomal protein L22, putative [Pediculus humanus corporis]	3.10 <sup>-21</sup>	Protein metabolic process	HO112261
B-I-164	60S ribosomal protein, Rpl7A	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-25</sup>	60S ribosomal protein, Rpl7A [Seculamonas ecuadoriensis]	1.10 <sup>-24</sup>	Protein metabolic process	HO112262
B-I-165	Ribosomal protein S10	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-17</sup>	ribosomal protein S10 [Crassostrea gigas]	1.10 <sup>-8</sup>	Protein metabolic process	HO112263
B-I-166	Ribosomal protein S19	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-15</sup>	ribosomal protein S19, isoform CRA_b [Homo sapiens]	3.10 <sup>-14</sup>	Protein metabolic process	HO112264
B-I-167	Similar to Zinc finger RNA-binding protein	similar to Zinc finger RNA-binding protein [Bos taurus]	1.10 <sup>-9</sup>			RNA metabolic process	HO112265
B-I-168	Peridinin chlorophyll-a binding protein apoprotein precursor	peridinin chlorophyll-a binding protein apoprotein precursor [Symbiodinium kawagutii]	1.10 <sup>-15</sup>			Photosynthetic process	HO112266
B-I-169	Peroxiredoxin 6	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-43</sup>	peroxiredoxin 6 [Haliotis discus discus]	1.10 <sup>-41</sup>	Response to stress	HO112267
B-I-170	Symbiot Polyubiquitin	polyubiquitin [Symbiodinium sp. C3]	7.10 <sup>-24</sup>			Protein metabolic process	HO112269
B-I-172	similar to Solute carrier family 30	predicted protein [Nematostella vectensis]	5.10 <sup>-20</sup>	similar to Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 5 [Strongylocentrotus purpuratus]	6.10 <sup>-11</sup>	Cellular homeostasis	HO112271
B-I-173	Ornithine decarboxylase antizyme 2	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-14</sup>	ornithine decarboxylase antizyme 2 [Danio rerio]	2.10 <sup>-8</sup>	Cellular metabolic process	HO112272
B-I-174	Peptidyl-dipeptidase A	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-9</sup>	peptidyl-dipeptidase A [Acidobacteria bacterium Ellin345]	7.10 <sup>-8</sup>	Response to stress	HO112273
B-I-175	Similar to placenta-specific 8	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-20</sup>	PREDICTED: similar to placenta-specific 8 [Ciona intestinalis]	8.10 <sup>-7</sup>	Immune response	HO112274
B-I-176	Putative Sec61 protein translocation complex beta-subunit	hypothetical protein BRAFLDRAFT_284448 [Branchiostoma floridae]	1.10 <sup>-12</sup>	Sec61 protein translocation complex beta-subunit, putative [Ixodes scapularis]	1.10 <sup>-10</sup>	Intracellular protein transport	HO112275
B-I-177	Similar to Pema-SRCR protein	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-6</sup>	PREDICTED: similar to Pema-SRCR protein [Strongylocentrotus purpuratus]	5.10 <sup>-5</sup>	Immune response	HO112276
B-I-181	Similar to 40S ribosomal protein S2	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S2 [Gallus gallus]	7.10 <sup>-24</sup>			Protein metabolic process	HO112281
B-I-182	Ribosomal protein L11	ribosomal protein L11 [Lysiphlebus testaceipes]	5.10 <sup>-78</sup>			Protein metabolic process	HO112282
B-I-183	60S ribosomal protein L40A	60S ribosomal protein L40A [Lycosa singoriensis]	4.10 <sup>-21</sup>			Protein metabolic process	HO112283
B-I-184	Ribosomal protein rps12	ribosomal protein rps12 [Eurythoe complanata]	3.10 <sup>-61</sup>			Protein metabolic process	HO112284
B-I-185	Putative 60S ribosomal protein RPL10	predicted protein [Nematostella vectensis]	5.10 <sup>-103</sup>	putative 60S ribosomal protein RPL10 [Phoronis muelleri]	1.10 <sup>-98</sup>	Protein metabolic process	HO112285
B-I-186	Serotransferrin	serotransferrin [Gillichthys mirabilis]	1.10 <sup>-4</sup>			System development	HO112286
B-I-188	small heat shock protein	small heat shock protein [uncultured cnidarian]	6.10 <sup>-10</sup>			Response to stress	HO112288
B-I-190	Selenium binding protein 1	selenium binding protein 1 [Mus musculus]	4.10 <sup>-30</sup>			Immune response	HO112291
B-R-160	Adaptor complexes medium subunit	adaptor complexes medium subunit Domain containing protein, putative [Toxoplasma gondii VEG]	1.10 <sup>-9</sup>			Protein metabolic process	HO112447
B-R-161	Beta-tubulin	beta-tubulin [Pythium sp. quercum]	1.10 <sup>-16</sup>			Cytoskeleton organization	HO112448
B-R-162	Chloroplast phosphoglycerate kinase precursor	chloroplast phosphoglycerate kinase precursor [Euglena gracilis]	2.10 <sup>-33</sup>			Cellular metabolic process	HO112449
B-R-163	Cystathionine beta-lyase	cystathionine beta-lyase [Flavobacteriales bacterium HTCC2170]	9.10 <sup>-6</sup>			Apoptosis	HO112450
B-R-164	Cystatin B	predicted protein [Nematostella vectensis]	7.10 <sup>-8</sup>	cystatin B [Danio rerio]	7.10 <sup>-8</sup>	Immune response	HO112451
B-R-166	Myeloid differentiation response protein 88	hypothetical protein BRAFLDRAFT_81544 [Branchiostoma floridae]	5.10 <sup>-6</sup>	myeloid differentiation response protein 88 [Ictalurus punctatus]	2.10 <sup>-4</sup>	Signal transduction	HO112453
B-R-169	Putative krp3	krp3, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	3.10 <sup>-4</sup>			Cellular metabolic process	HO112456
B-R-170	major basic nuclear protein	major basic nuclear protein [Karlodinium micrum]	1.10 <sup>-13</sup>			Chromatin remodelling	HO112458
B-R-171	major basic nuclear protein	major basic nuclear protein [Karlodinium micrum]	8.10 <sup>-7</sup>			Chromatin remodelling	HO112459
B-R-172	Mitochondrial phosphate carrier	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	2.10 <sup>-9</sup>	mitochondrial phosphate carrier [Saccharomyces cerevisiae YJM789]	9.10 <sup>-6</sup>	Cellular metabolic process	HO112460
B-R-173	Peridinin chlorophyll-a binding protein apoprotein precursor	peridinin chlorophyll-a binding protein apoprotein precursor [Symbiodinium kawagutii]	1.10 <sup>-16</sup>			Photosynthetic process	HO112461
B-R-174	1-cys peroxiredoxin	GA15914 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	9.10 <sup>-18</sup>	1-cys peroxiredoxin DPx-6005 [Drosophila melanogaster]	1.10 <sup>-16</sup>	Response to stress	HO112462
B-R-176	Trypsin	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-30</sup>	trypsin [Marsupenaeus japonicus]	1.10 <sup>-13</sup>	Cellular metabolic process	HO112464
B-R-177	Peptidyl-	hypothetical protein	3.10 <sup>-8</sup>	peptidyl-dipeptidase A	1.10 <sup>-6</sup>	Response to stress	HO112465



	dipeptidase A	BRAFLDRAFT_129715 [Branchiostoma floridae]		[Acidobacteria bacterium Ellin345]			
B-R-180	Transcriptional adaptor 2	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-40</sup>	transcriptional adaptor 2 [Mus musculus]	8.10 <sup>-16</sup>	Protein metabolic process	HO112469
B-R-181	2-oxoglutarate dehydrogenase	predicted protein [Nematostella vectensis]	4.10 <sup>-17</sup>	2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (e1 component of oxoglutarate dehydrogenase complex) [Schizosaccharomyces pombe]	1.10 <sup>-11</sup>	Cellular metabolic process	HO112470
B-R-183	Similar to damage specific DNA binding protein 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	4.10 <sup>-13</sup>	similar to damage specific DNA binding protein 1 [Strongylocentrotus purpuratus]	8.10 <sup>-5</sup>	Response to stress	HO112472
B-R-184	Ribosomal protein S26	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-15</sup>	ribosomal protein S26 [Branchiostoma belcheri]	7.10 <sup>-15</sup>	Protein metabolic process	HO112473
B-R-185	Putative zinc finger protein	PREDICTED: similar to MGC83605 protein [Hydra magnipapillata]	7.10 <sup>-8</sup>	putative zinc finger protein [Euprymna scolopes]	6.10 <sup>-5</sup>	RNA metabolic process	HO112474
B-R-188	60S ribosomal protein L4	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-47</sup>	60S ribosomal protein L4 [Chlamydomonas sp. HS-5]	9.10 <sup>-35</sup>	Protein metabolic process	HO112476
B-R-189	Putative ribosomal protein S21	putative ribosomal protein S21 [Barentsia elongata]	5.10 <sup>-7</sup>			Protein metabolic process	HO112477
B-R-190	Similar to Rab10 isoform 2	predicted protein [Nematostella vectensis]	7.10 <sup>-64</sup>	PREDICTED: similar to Rab10 isoform 2 [Pan troglodytes]	1.10 <sup>-49</sup>	Intracellular protein transport	HO112479
B-R-191	RNA-binding protein	RNA-binding protein [Karlodinium micrum]	3.10 <sup>-13</sup>			RNA metabolic process	HO112480
B-R-194	Thioredoxin domain containing 16	PREDICTED: thioredoxin domain containing 16 [Taeniopygia guttata]	1.10 <sup>-3</sup>			Response to stress	HO112482
B-R-195	Ubiquitin-conjugating enzyme e2-16kda, ubiquitin protein ligase	ubiquitin-conjugating enzyme e2-16kda, ubiquitin protein ligase [Thalassiosira pseudonana CCMP1335]	3.10 <sup>-29</sup>			Protein metabolic process	HO112483
TB-I-172	60S acidic ribosomal phosphoprotein P0	60S acidic ribosomal phosphoprotein P0 [Stylophora pistillata]	3.10 <sup>-53</sup>			Protein metabolic process	HO112666
TB-I-173	Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit [Pongo abelii]	9.10 <sup>-44</sup>			Protein metabolic process	HO112667
TB-I-175	Calmodulin	Full Calmodulin [Alexandrium fundyense]	1.10 <sup>-78</sup>			Cellular homeostasis	HO112669
TB-I-177	Cytochrome c oxidase subunit I	cytochrome c oxidase subunit I [Stylophora pistillata]	1.10 <sup>-46</sup>			Cellular metabolic process	HO112671
TB-I-178	Ferritin	ferritin heavy chain polypeptide 1 [Branchiostoma lanceolatum]	1.10 <sup>-51</sup>			Immune response	HO112672
TB-I-179	Ferritin	ferritin [Boophilus microplus]	2.10 <sup>-13</sup>			Immune response	HO112673
TB-I-181	Similar to ARP5 actin-related protein 5	hypothetical protein BRAFLDRAFT_118261 [Branchiostoma floridae]	4.10 <sup>-38</sup>	PREDICTED: similar to ARP5 actin-related protein 5 homolog [Macaca mulatta]	9.10 <sup>-27</sup>	Chromatin remodelling	HO112676
TB-I-182	Twinstar	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-11</sup>	twinstar [Drosophila melanogaster]	1.10 <sup>-6</sup>	Cytoskeleton organization	HO112677
TB-I-183	Fibrous sheath CABYR binding protein	hypothetical protein CLOBOL_07325 [Clostridium boleae ATCC BAA-613]	5.10 <sup>-13</sup>	fibrous sheath CABYR binding protein [Homo sapiens]	6.10 <sup>-9</sup>	Protein metabolic process	HO112678
TB-I-184	Similar to poly (ADP-ribose) polymerase	hypothetical protein NEMVEDRAFT_v1g141705 [Nematostella vectensis]	4.10 <sup>-13</sup>	PREDICTED: similar to poly (ADP-ribose) polymerase family, member 15 [Macaca mulatta]	5.10 <sup>-11</sup>	RNA metabolic process	HO112679
TB-I-185	Similar to katanin p80	hypothetical protein OsJ_16629 [Oryza sativa Japonica Group]	2.10 <sup>-4</sup>	PREDICTED: similar to katanin p80 (WD40-containing) subunit B 1 [Apis mellifera]	5.10 <sup>-4</sup>	Cytoskeleton organization	HO112680
TB-I-186	TLD domain containing protein	TLD domain containing protein [Plasmodium knowlesi strain H]	5.10 <sup>-4</sup>			System development	HO112681
TB-I-188	Similar to Zinc finger RNA-binding protein	PREDICTED: similar to Zinc finger RNA-binding protein [Bos taurus]	6.10 <sup>-8</sup>			RNA metabolic process	HO112683
TB-I-192	Putative isocitrate dehydrogenase NAD subunit beta	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-14</sup>	isocitrate dehydrogenase NAD subunit beta, putative [Pediculus humanus corporis]	3.10 <sup>-10</sup>	Cellular metabolic process	HO112688
TB-I-193	Major basic nuclear protein	major basic nuclear protein [Karlodinium micrum]	1.10 <sup>-9</sup>			Chromatin remodelling	HO112689
TB-I-194	Major basic nuclear protein	major basic nuclear protein [Karlodinium micrum]	3.10 <sup>-16</sup>			Chromatin remodelling	HO112690
TB-I-195	Precursor of mutase superoxide dismutase [Fe/Mn]	precursor of mutase superoxide dismutase [Fe/Mn] [Phaeodactylum tricorutum CCAP 1055/1]	2.10 <sup>-25</sup>			Response to stress	HO112691
TB-I-196	Putative netrin receptor unc5	netrin receptor unc5, putative [Schistosoma mansoni]	1.10 <sup>-3</sup>			Apoptosis	HO112692
TB-I-198	Peridinin chlorophyll-a binding protein apoprotein precursor	peridinin chlorophyll-a binding protein apoprotein precursor [Symbiodinium kawagutii]	2.10 <sup>-23</sup>			Photosynthetic process	HO112694
TB-I-199	Similar to Transmembrane protein 173	predicted protein [Nematostella vectensis]	7.10 <sup>-6</sup>	similar to Transmembrane protein 173 [Danio rerio]	8.10 <sup>-4</sup>	Immune response	HO112695
TB-I-201	CEBPB (CCAAT/Enhancer binding protein beta) protein	predicted protein [Nematostella vectensis]	5.10 <sup>-14</sup>	CEBPB (CCAAT/Enhancer binding protein beta) protein [Homo sapiens]	4.10 <sup>-4</sup>	Immune response	HO112699
TB-I-204	Hairy A protein	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-24</sup>	hairy A protein [Branchiostoma floridae]	1.10 <sup>-22</sup>	Signal transduction	HO112702
TB-I-205	Concanavalin	predicted protein [Nematostella]	2.10 <sup>-45</sup>	thrombospondin N-terminal-	2.10 <sup>-4</sup>	Immune response	HO112703

		vectensis]		like domain-containing protein [Synchococcus sp]			
TB-I-206	collagen, type II, alpha 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-14</sup>	collagen, type II, alpha 1 [Xenopus laevis]	4.10 <sup>-9</sup>	System development	HOI12704
TB-I-207	TRM1 tRNA methyltransferase	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-42</sup>	TRM1 tRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae) [Bos taurus]	1.10 <sup>-33</sup>	Protein metabolic process	HOI12705
TB-I-208	Similar to microfibrillar-associated protein 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-18</sup>	PREDICTED: similar to microfibrillar-associated protein 1 [Tribolium castaneum]		Immune response	HOI12706
TB-I-209	40S ribosomal protein S4	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-42</sup>	40S ribosomal protein S4 [Epinephelus coioides]	3.10 <sup>-25</sup>	Protein metabolic process	HOI12707
TB-I-210	Ribosomal protein L19	predicted protein [Nematostella vectensis]	7.10 <sup>-33</sup>	ribosomal protein L19 [Suberites domuncula]	4.10 <sup>-30</sup>	Protein metabolic process	HOI12709
TB-I-211	Putative 40S ribosomal protein RPS30	predicted protein [Nematostella vectensis]	5.10 <sup>-26</sup>	putative 40S ribosomal protein RPS30 [Flustra foliacea]	2.10 <sup>-24</sup>	Protein metabolic process	HOI12710
TB-I-212	Putative ribosomal protein L18	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-59</sup>	putative ribosomal protein L18 [Barentsia elongata]	6.10 <sup>-59</sup>	Protein metabolic process	HOI12711
TB-I-213	Similar to ribosomal protein L35A isoform 2	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-47</sup>	PREDICTED: similar to ribosomal protein L35A isoform 2 [Hydra magnipapillata]	2.10 <sup>-42</sup>	Protein metabolic process	HOI12712
TB-I-214	Ribosomal protein S6	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-10</sup>	ribosomal protein S6 [Aedes albopictus]	6.10 <sup>-7</sup>	Protein metabolic process	HOI12713
TB-I-215	Argonaute 2	predicted protein [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-13</sup>	argonaute 2 [Oikopleura dioica]	1.10 <sup>-12</sup>	Immune response	HOI12714
TB-I-216	Putative 60S ribosomal protein RPL13	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-18</sup>	putative 60S ribosomal protein RPL13 [Novocrania anomala]	1.10 <sup>-16</sup>	Protein metabolic process	HOI12715
TB-I-217	40S ribosomal protein SA	40S ribosomal protein SA [Nematostella vectensis]	7.10 <sup>-53</sup>			Protein metabolic process	HOI12716
TB-I-218	Similar to 60S ribosomal protein L28 isoform 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-44</sup>	PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L28 isoform 1 [Ciona intestinalis]	3.10 <sup>-30</sup>	Protein metabolic process	HOI12717
TB-I-219	60S ribosomal protein L13a	predicted protein [Nematostella vectensis]	3.10 <sup>-6</sup>	60S ribosomal protein L13a [Ornithoctonus huwena]	3.10 <sup>-5</sup>	Protein metabolic process	HOI12718
TB-I-220	Putative 60S ribosomal protein L38 isoform 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	9.10 <sup>-19</sup>	TPA: putative 60S ribosomal protein L38 isoform 1 [Spadella cephaloptera]	3.10 <sup>-18</sup>	Protein metabolic process	HOI12720
TB-I-221	Similar to ribosomal protein S6	predicted protein [Nematostella vectensis]	4.10 <sup>-28</sup>	similar to ribosomal protein S6 [Taeniopygia guttata]	2.10 <sup>-27</sup>	Protein metabolic process	HOI12721
TB-I-222	Transcript antisense to ribosomal RNA protein 1	hypothetical protein NEMVEDRAFT_v1g155353 [Nematostella vectensis]	4.10 <sup>-24</sup>	Transcript antisense to ribosomal RNA protein 1 [Saccharomyces cerevisiae]	2.10 <sup>-10</sup>	Protein metabolic process	HOI12722
TB-I-223	Ribosomal protein 4	ribosomal protein 4 [Lonomia obliqua]	6.10 <sup>-15</sup>			Protein metabolic process	HOI12723
TB-I-224	Ribosomal protein L13a	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-23</sup>	ribosomal protein L13a [Suberites domuncula]	3.10 <sup>-21</sup>	Protein metabolic process	HOI12724
TB-I-225	Similar to ribosomal protein L34	predicted protein [Nematostella vectensis]	9.10 <sup>-11</sup>	PREDICTED: similar to ribosomal protein L34 [Hydra magnipapillata]	8.10 <sup>-7</sup>	Protein metabolic process	HOI12725
TB-I-227	Succinyl-CoA ligase beta subunit	succinyl-CoA ligase beta subunit [Arabidopsis thaliana]	6.10 <sup>-3</sup>			Cellular metabolic process	HOI12727
TB-R-149	Acetyl coenzyme A-transferase	acetyl coenzyme A-transferase [Artemia franciscana]	2.10 <sup>-17</sup>			Cellular metabolic process	HOI12868
TB-R-151	Calmodulin	calmodulin [Toxoplasma gondii ME49]	7.10 <sup>-70</sup>			Cellular homeostasis	HOI12871
TB-R-153	Pdcysteine-rich protein	Pdcysteine-rich protein [Pocillopora damicornis]	3.10 <sup>-25</sup>			System development	HOI12873
TB-R-158	RNase NGR3	hypothetical protein [Monosiga brevicollis MX1]	4.10 <sup>-17</sup>	RNase NGR3 [Nicotiana glutinosa]	4.10 <sup>-9</sup>	Immune response	HOI12878
TB-R-159	Putative FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein	predicted protein [Nematostella vectensis]	2.10 <sup>-20</sup>	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein, putative [Pediculus humanus corporis]	2.10 <sup>-10</sup>	Signal transduction	HOI12879
TB-R-160	Similar to 60S ribosomal protein L28 isoform 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-32</sup>	PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L28 isoform 1 [Ciona intestinalis]	3.10 <sup>-25</sup>	Protein metabolic process	HOI12881
TB-R-161	Secreted signalling factor wnt-A	secreted signalling factor wnt-A [Nematostella vectensis]	1.10 <sup>-4</sup>			Signal transduction	HOI12882
TB-R-162	Defender against cell death 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-18</sup>	defender against cell death 1 [Xenopus (Silurana) tropicalis]	9.10 <sup>-18</sup>	Apoptosis	HOI12883
TB-R-163	Similar to Collagen alpha-1(XI) chain precursor isoform 1	predicted protein [Nematostella vectensis]	5.10 <sup>-41</sup>	PREDICTED: similar to Collagen alpha-1(XI) chain precursor isoform 1 [Apis mellifera]	3.10 <sup>-21</sup>	System development	HOI12884
TB-R-165	Similar to selectin P	hypothetical protein BRAFLDRAFT_108141 [Branchiostoma floridae]	4.10 <sup>-10</sup>	PREDICTED: similar to selectin P [Taeniopygia guttata]	3.10 <sup>-7</sup>	Immune response	HOI12886
TB-R-166	Protein TAR1	predicted protein [Nematostella vectensis]	8.10 <sup>-24</sup>	RecName: Full=Protein TAR1 [Saccharomyces cerevisiae S288c]	5.10 <sup>-10</sup>	RNA metabolic process	HOI12887
TB-R-167	Putative translation factor Sui1	translation factor Sui1, putative [Ixodes scapularis]	1.10 <sup>-4</sup>			Protein metabolic process	HOI12888
TB-R-169	RNA-binding protein	RNA-binding protein [Karlodinium micrum]	6.10 <sup>-15</sup>			RNA metabolic process	HOI12890
TB-R-170	S30-ubiquitin-like	S30-ubiquitin-like [Suberites domuncula]	5.10 <sup>-10</sup>			Protein metabolic process	HOI12892
TB-R-171	Subunit of the signal recognition particle	subunit of the signal recognition particle [Chlamydomonas reinhardtii]	9.10 <sup>-3</sup>			Intracellular protein transport	HOI12893
TB-R-173	Putative tubulin alpha chain	tubulin alpha chain, putative [Schistosoma mansoni]	1.10 <sup>-3</sup>			Cytoskeleton organization	HOI12895

TB-R-174	Ubiquitin ligase 1	ubiquitin ligase 1 [Symbiodinium sp. C3]	$4.10^{-21}$			Protein metabolic process	HO112896
TB-R-188	Ribosomal protein L23a	hypothetical protein BRAFLDRAFT_121811 [Branchiostoma floridae]	$9.10^{-14}$	ribosomal protein L23a [Branchiostoma belcheri]	$9.10^{-14}$	Protein metabolic process	HO112909

### **III.4 Publication n°3**

Jeremie Vidal-Dupiol, Ophélie Ladrière, Delphine Destoumieux-Garzon, Pierre-Eric Sautière, Anne-Leila Meistertzheim, Eric Tambutté, Sylvie Tambutté, David Duval, Laurent Fouré, Mehdi Adjeroud & Guillaume Mitta (en révision). **Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis.** *The Journal of Biological Chemistry*

## Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis

Jeremie Vidal-Dupiol<sup>1</sup>, Ophélie Ladrière<sup>2</sup>, Delphine Destoumieux-Garzon<sup>3</sup>, Pierre-Eric Sautière<sup>4</sup>, Anne-Leila Meistertzheim<sup>1</sup>, Eric Tambutté<sup>5</sup>, Sylvie Tambutté<sup>5</sup>, David Duval<sup>1</sup>, Laurent Fouré<sup>6</sup>, Mehdi Adjeroud<sup>1,7</sup>, Guillaume Mitta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR 5244, CNRS UPVD EPHE, Université de Perpignan Via Domitia, France.

<sup>2</sup> Unité d'écologie marine, Laboratoire d'écologie animale et écotoxicologie, Université de Liège, Belgium. <sup>3</sup> Ecosystèmes Lagunaires, CNRS, Ifremer, Université Montpellier II, UMR 5119, France.

<sup>4</sup> Université Lille Nord de France, Université Lille1- Sciences et Technologies ; CNRS FRE 3249, IFR 147, France.

<sup>5</sup> Centre Scientifique de Monaco, Principality of Monaco. <sup>6</sup> Aquarium du Cap d'Agde, France.

<sup>7</sup> Institut de Recherche pour le Développement, Unité 227 CoRéUs2 "Biocomplexité des écosystèmes coralliens de l'Indo-Pacifique", New Caledonia

Address correspondance to: Guillaume Mitta, UMR 5244 CNRS UPVD EPHE, Université de Perpignan Via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France. Fax: 00 334 68 66 22 81 Email: [mitta@univ-perp.fr](mailto:mitta@univ-perp.fr)

### Abstract

The most basal eumetazoan taxon, the scleractinian coral, is the framework of one of the most diverse ecosystem throughout the world, the coral reefs. Over the past three decades, in correlation with climate change, these phototrophic symbiotic organisms have faced increasingly frequent and severe diseases from various origins, which are now geographical widespread and are a major threat for this ecosystem. In this context, coral immunity is increasingly studied but the knowledge remains fragmentary especially with respect to their antimicrobial response. The present study reports the characterization of the first scleractinian antimicrobial peptide (AMP), the damicornin from *Pocillopora damicornis*. We show that the precursor displays a segmented organisation with a signal peptide followed by an acidic proregion and the C-terminal AMP. This 40 residues-AMP is cationic, C-terminal amidated and characterized by the presence of 6 cysteines engaged in 3 intramolecular disulfide bridges. Its cystein array is common to another AMP and to toxins from cnidarians, suggesting the existence of a common ancestor, as also proposed for AMPs and toxins from arthropods. *In vitro*, damicornin was essentially active against Gram positive bacteria and the fungus *Fusarium oxysporum*. Finally, damicornin expression was studied by a combination of immunohistochemistry, RP-HPLC and q-RT-PCR. Our data show that damicornin is constitutively transcribed in ectodermal granular cells, in which it is stored and further

released upon a non pathogenic immune challenge. Very interestingly, damicornin gene expression was repressed by the specific coral pathogen, *Vibrio coralliilyticus*. To our knowledge, this is the first evidence of an AMP gene repression in a host-*Vibrio* interaction.

## Introduction

Scleractinian coral constitute the biological, ecological and physical framework of one of the most diverse ecosystem throughout the world, the tropical coral reef. Such ecosystems are often localized around developing countries and support major industry like food production, tourisms, biotechnology development... However in the actual context of global change and anthropogenic pressure, this ecosystem is endangered and faced numerous natural and anthropogenic disturbances that occur with increasing rate and severity (1-6). The reasons of this alarming status are multiple: water temperature increase leading to symbiosis disruption (coral bleaching), anthropogenic pressure, but also coral diseases which appear with increasing frequency and severity (1,7). This last phenomenon seems to be aggravated by global warming. Indeed, it has been suggested that high temperatures influence the outcome of bacterial infections by lowering the resistance of the coral to disease and/or increasing the pathogen growth, infectivity or virulence (8,9). This virulence increase was shown for two *Vibrio* species, *V. coralliilyticus* leading to the bleaching and tissue lysis of *Pocillopora damicornis* (10) and *V. shiloi* the causative agent of the bleaching of *Oculina patagonica* (11). Indeed it was shown that temperature increase triggers bacteria adhesion, toxin and enzyme production (12,13).

Although the crucial role played by *Vibrio* species in several coral diseases has been widely documented, knowledge on the effects of *Vibrio* infection on coral physiology/immunity remains largely unknown. One of the reasons for this knowledge gap is the paucity of information in the field of coral immunology, particularly with respect to defences against infectious agents (1,14). As for all invertebrates, coral immunity is thought to rely on innate mechanisms which require essential components like pattern recognition receptors (PRR), cellular and humoral responses directed against infectious agents. Several recent works are in agreement with this view (14-22).

So far, almost nothing is known on the antimicrobial response of scleractinians. However, several recent studies have evidenced the existence of antibacterials. First, the mucus of several species of scleractinians was shown to have antibacterial properties (23-26).

Second, in a recent study on the transcriptomic response of *P. damicornis* to its specific pathogenic bacteria *V. coralliilyticus* (27), we have identified an mRNA corresponding to a putative antimicrobial peptide (AMP).

We report here the isolation and characterization of the first AMP from scleractinian coral, which was called damicornin. We describe damicornin precursor structure, and localization in coral tissues. We present its spectrum of activity established against a panel of microorganisms including its specific pathogenic bacteria *V. coralliilyticus*. Finally, we present its expression in corals confronted to virulent and non-virulent bacteria. Altogether, our data show (i) that damicornin displays a cystein array common to other cnidarian AMPs and toxins, (ii) that it is expressed and released from ectodermal cells in corals exposed to a non-pathogenic stimulus, and (iii) its gene expression is repressed concomitantly with the entry of the coral pathogen *V. coralliilyticus* into its host ectodermal cells.

## Experimental Procedures

### ***Biological material***

The *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) isolate used in this study was harvested in Lombok, Indonesia (CITES number: 06832/VI/SATS/LN/2001), propagated and maintained in aquarium as previously described (22).

The filamentous fungus, *Fusarium oxysporum* and bacteria strains the Gram positive *Micrococcus luteus* (A270), *Bacillus megaterium* (IBMC), *Staphylococcus aureus* (SG511), *Brevibacterium stationis* (CIP 101282), *Mycrobacterium maritpicum* (CIP 105733T) and the Gram negative *Escherichia coli* (SBS 363), *Vibrio aesturianus* (CIP 109791), *Vibrio splendidus* (CIP 107715) were used in a previous study (28). *Vibrio shiloi* (CIP 107136), and *V. coralliilyticus* strain YB1 (CIP 107925) were purchased from the Pasteur Institute (Collection de l'institut Pasteur). The coral pathogen *V. coralliilyticus* was used for biotic stress and infection of *P. damicornis* (29). *V. coralliilyticus* was cultured in 2216 Marine Broth medium (BD-DIFCO 279110), in aerobic condition with shaking (150 rpm), at 30°C for routine use, and at the temperature of coral maintenance during experimental procedures (see below).

Experiments aimed at determining which cells (host or symbiont) expressed the candidate genes used three zooxanthellae isolates whose origin and culture conditions were already described (22).

### ***Stress protocol***

Our experimental design aims to study the coral response to bacterial challenge, (bacterial stress and bacterial infection). Bacterial stress was induced by the supply of *V. coralliilyticus* at constant and low temperature (25°C), whereas bacterial infection was induced with an increase of water temperature activating bacterial virulence (from 25°C to 32.5°C). We showed recently that bacteria become virulent at a temperature of 28°C (27).

Bacterial stress, bacterial infection and their respective controls were established in four independent tanks: i) constant low temperature (25°C) and bacterial supply (Cb); ii) regular bacterial supply and a gradual temperature increase from 25°C to 32.5°C (Tb); iii) constant low temperature without bacteria (C); and iv) a gradual temperature increase in the absence of bacteria (T). For experiments, nubbins of *P. damicornis* (pieces of coral of 10 g approximately) were randomly placed in 120 L tanks (n = 40 per tank) and acclimatized at 25°C for a period of two weeks. Bacteria were supplied to the Cb and Tb groups every 3 days by balneation (12). Briefly, bacteria were twice washed in filtered sea water (0.22µm) and added to the tank to reach the concentration of 10<sup>3</sup> cells/ml of tank water. Water motion allowed homogenous repartition of bacteria in the tank. The utilized cultures of *V. coralliilyticus* were prepared at 25°C for Cb and at the temperature corresponding to the tank temperature for Tb. For the Tb and T groups, beginning on D3 the temperature was increased by + 1.5°C every 3 days until it reached 32.5°C. Three nubbins were randomly sampled from each tank every 3 days (D0, D3, D9, D12, D15, D18).

The tank temperature was controlled using an aquarium heater (600 W, Schego) connected to an electronic thermostat (Hobby Biotherm Professional). Illumination was supplied at an irradiance of 250 µmol photon/m<sup>2</sup>/s (quantum meter; QMSW-SS, Apogee Instruments Inc.) by metal halide lamps (Iwasaki 6500 Kelvin, 400 W) set to a 12:12 hour light:dark photoperiod. All other seawater parameters (salinity 36, pH 8.3...) were maintained constant over time and between tanks. A constant water flow was maintained within each tank using a water pump (IDRA, 1300 l/h). Seawater was continuously recycled at a rate of 10.8 tank volumes per hour by coupling the action of a biological filter and an Aquavie protein skimmer (EPS 600), and the water was renewed (2% tank volume per day) with natural filtered Mediterranean seawater heated to 25°C. To avoid the growth of bacterial blooms, the



water was continuously treated using a UVC filter (JBL: AquaCristal Series II, 5 W). During bacterial balneation, all equipment known to remove or kill bacteria (e.g., the protein skimmer and UVC filter) were inactivated for the first 4 hours after treatment, allowing the bacteria to adhere to the coral tissues.

### ***RNA extraction and complete Open Reading Frame characterisation of the suspected AMP***

RACE PCR experiments were performed to characterize the complete Open Reading Frame (ORF) of the suspected AMP. Tissue extraction, total RNA extraction, polyA+ purification and RACE PCR were conducted on non challenged nubbin tissues as previously describe (22).

### ***Quantitative-RT-PCR (q-RT-PCR) analyses***

Q-RT-PCR was used to analyze the expression profile of the suspected AMP. Total RNA was extracted, and this total RNA (2.5 µg) was reverse transcribed using oligo dT primers and the Superscript II enzyme (Invitrogen). The resulting cDNA products were purified using a Nucleotrap Gel Extraction Trial kit (Clontech), and q-RT-PCR was performed with 2.5 µL of purified cDNA (diluted 1:50 in water) in a total volume of 10 µL containing 1X LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics) and 70 nM of each primer. The primers, which were designed using the Light Cycler Probe Design Software, version 1.0 (Roche Diagnostics), are presented in Table 1. Amplification was performed using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) and the following reaction conditions: activation of the Thermo-Start® DNA polymerase at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Melting curve profiles were assayed to ensure that we were looking at a single product. Each run included a positive cDNA control that was sampled at the beginning of the experiment (D0) and also from each amplification plate; this positive control was also used as the calibrator sample, and blank controls (water) were included for each primer pair. The PCR products were resolved by electrophoresis, the bands were isolated directly from agarose gels, and DNA was extracted using the Gel Extraction PCR Purification System V (Promega). The resulting q-RT-PCR products were single-pass sequenced as described above.

For each reaction, the crossing point ( $C_p$ ) was determined using the “second derivative max method” applied by the Light Cycler Software, version 3.3 (Roche Diagnostics). The PCR efficiency ( $E$ ) of each primer pair was calculated by determining the slope of standard curves obtained from serial-dilution analysis of cDNAs pooled from all experimental samples,

as previously described (30). The individual q-RT-PCR efficiencies ( $E$ ) for the target or reference genes were calculated using the formula:  $E=10^{(-1/\text{slope})}$ . The transcription level of the suspected AMP was normalized using the mean geometric transcription rate of three reference genes encoding ribosomal proteins from the host, *P. damicornis*: 60S ribosomal protein L22, 60S ribosomal protein L40A and 60S acidic ribosomal phosphoprotein P0 (GenBank: HO112261, HO112283, and HO112666, respectively). The stable expression status of these 3 genes during biotic and abiotic stress was recently tested (Vidal-Dupiol *et al.*, submitted<sup>a</sup>). The normalized relative quantities (NRQs) were calculated as previously described (31), using the equation:

$$NRQ = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_p, \text{target}}}{\sqrt[3]{\prod_{i=1}^3 E_{\text{ref}_i}^{\Delta C_p, \text{ref}_i}}}$$

where  $E_{\text{target}}$  is the amplification efficiency of the gene of interest;  $E_{\text{ref}}$  is the amplification efficiency of the reference gene;  $\Delta C_p, \text{ref} = C_{p, \text{ref}}(\text{calibrator}) - C_{p, \text{ref}}(\text{sample})$ ; and  $\Delta C_p, \text{target} = C_{p, \text{target}}(\text{calibrator}) - C_{p, \text{target}}(\text{sample})$ .

Table 1: Combinations of forward and reverse primers used in real time PCR expression analysis.

Gene name	Forward primer (5'→ 3')	Reverse primer (5'→ 3')
Preprodamicornin	AGTCCCAGAAAAGCGG	GTGGGTAACATCGCGT
Major basic nuclear protein	GGTACAGCAAAGTGGC	TTGGAAACGTCCGACC
60S ribosomal protein L22	TGATGTGTCCATTGATCGTC	CATAAGTAGTTTGTGCAGAGG
60S ribosomal protein L40A	CGACTGAGAGGAGGAGC	CTCATTGGACATTCCCGT
60S acidic ribosomal phosphoprotein P0	GCTACTGTTGGGTAGCC	CTCTCCATTCTCGTATGGT

### Identification of the organism expressing the suspected AMP

To determine which organism (host or symbiont) expressed the suspected AMP gene, cross-PCR experiments were performed on DNA and RNA extracted from the holobiont (host plus symbiont) and from pure cultured zooxanthellae, as previously described (22). Briefly, PCR amplifications were performed with oligonucleotides amplifying the AMP, the housekeeping genes, the gene encoding the small ribosomal subunit RNA *Symbiodinium* spp. (32), and the cDNA encoding the major basic nuclear protein (genebank accession number: HO112459) of *Symbiodinium* spp. (Table 1).

### ***Synthetic peptide production and antibodies***

Five milligrams of the suspected peptide (ACADLRGKTFCLFKSYCDKKGIRGLMRDKCS-YSCGCR-NH<sub>2</sub>) were chemically synthesized by the company GENEPEP (Saint-Clément de Rivière, France). The synthetic version was C-terminally amidated and the folding of the three disulphide bonds was performed. The HPLC purity of the peptide was 96%.

This synthetic peptide was produced to analyze the antimicrobial activity of the suspected AMP and to immunize New Zealand rabbits as previously described (33). Sera of immunized rabbits were collected and tested for the presence of specific Igs (antibody or IgG) 70 days after the initial injection using ELISA (34) with uncoupled synthetic peptides adsorbed onto maxiSorp<sup>TM</sup> plates (Nunc).

### ***Immunolocalization experiments***

Tissues of *P. damicornis* from unstressed coral colonies or from coral colonies stressed with non-virulent bacteria were processed following a procedure previously described (35). Tissues embedded in Paraplast were cut into thin sections (7 µm), mounted on silane-coated glass slides and stored at 4°C in a dry atmosphere. Then, deparaffinized sections were incubated for 1 hour at room temperature (RT) in saturating medium (2% BSA, 0.2% teleostean gelatine, 0.05% Tween20, 0.5% donkey serum in 0.05 mol/L Phosphate-buffered saline [PBS] pH 7.4). The samples were then incubated overnight at 4°C in a moist chamber with the purified antibodies raised against synthetic damicornin (concentration 85 µg/mL in saturating medium) or with the depleted purified antibodies raised against synthetic damicornin (depletion was performed by pre-incubating the purified antibodies during 1 hour at RT with the synthetic damicornin). The antibodies surplus was discarded by multiple rinsing and samples were then incubated for 1 hour at RT with biotinylated anti-rabbit antibodies (secondary antibodies, Amersham RPN1004) diluted 1:250 in the saturating medium. After incubation, slides were rinsed with PBS pH 7.4, and samples finally stained for 15 min with streptavidin AlexaFluor 568 (Molecular probes, S11226) 1:50 diluted in PBS and 4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI (Sigma, D9542, 2 µg/mL). Sections were mounted in Pro-Long antifade medium (Molecular Probes, P7481) and observed with a confocal laser-scanning microscope (Leica, TCSSP5).

### ***Analysis of P. damicornis tissues by RP-HPLC and MALDI-TOF MS:***

In order to find the native antimicrobial peptide in coral, tissues from 9 nubbins (sampled in Cb and C conditions) were harvested using a Water Pick in 800 ml of 0.2 µm filtered seawater refrigerated at 4°C. Extracts were centrifuged at 3 000 g for 10 min at 4°C. Supernatant were discarded and pellets were resuspended in 10 volumes of acetic acid 2 M and homogenised (15 strokes) using a Dounce apparatus (100 µm). Immediately after, extracts were placed in an ice cold water bath and submitted to sonication (Vibra-cell™ 75185 apparatus, medium power, 3 pulses of 30 seconds). Afterwards, the homogenate was stirred over night at 4°C, and finally centrifuged at 10 000 g for 20 min at 4°C in order to remove cellular fragments, supernatant were immediately collected and submitted to prefractionation.

Prefractionation was performed using Sep-Pak C18 Vac cartridge (Sep-Pac Vac 12cc, Waters Corporation). Briefly, the Sep-Pak column was washed using acidified water (TFA 0.05%). After washes, three successive elutions were performed with 10, 60 and 80% acetonitrile acidified water. The fractions obtained were lyophilised and reconstituted with 1 mL of acidified water (0.05% TFA). Finally, extracts were centrifuged 20 min at maximum speed and 4°C, and tested for antimicrobial activity as describe below.

All HPLC purification steps were performed using a Waters Breeze system (Waters 1525, Binary HPLC pump) equipped with a UV detector (Waters 2487, Dual λ Absorbance detector). Column effluent was monitored by UV absorption at 224 and 280 nm. Fractions were hand-collected and treated for antimicrobial activity.

Aliquots of 150 µL of active Sep-Pak fractions were subjected to reverse-phase HPLC on a Symmetry C18 column (250 mm×4.6 mm, Waters). Elution was performed with a linear gradient of 15–85% acetonitrile in acidified water over 70 min at a flow rate of 1 mL/min. Fractions corresponding to absorbance peaks were collected in polypropylene tubes, freeze dried, reconstituted in 0.1 mL of acidified ultra pure water (UPW), and tested for antimicrobial activity as described below. Finally, the active fraction was further loaded on a Symmetry C8 column (150 mm × 2.1 mm, Waters). Elution was performed with a linear gradient of 45–55% acetonitrile in acidified water over 60 min at a flow rate of 0.3 mL/min. Fractions corresponding to absorbance peaks were collected in polypropylene tubes, freeze dried, reconstituted in 0.03 mL of acidified ultra pure water (UPW), and tested for antimicrobial activity or submitted to MS analysis.

Dried active fraction or 20 µg of synthetic peptide were resuspended in 10 µL of pure water (ULC/MS, Biosolve).

MALDI-TOF mass measurements were carried out on an Ultraflex™ TOF/TOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). This instrument was used at a maximum accelerating potential of 25 kV in positive mode and was operated either in linear or reflectron mode. One  $\mu\text{L}$  of each sample was co-crystallized on stainless steel MALDI targets with 1  $\mu\text{L}$  of 4-hydroxycinnamic acid (4HCCA, 10 mg/ml of acetonitrile/aqueous 0.1% TFA (7:3, v/v)) using the dried-droplet method of matrix crystallization.

The external calibration of MALDI mass spectra was carried out using singly charged monoisotopic peaks of a Pepmix calibration standard (Bruker Daltonics, Wissembourg, France)

The same molecules were also submitted to tryptic digest before MALDI-TOF MS. The tryptic digestion was conducted directly on stainless steel MALDI target. One  $\mu\text{L}$  of sample was first reduce in 1  $\mu\text{L}$  of a 2X DTT solution (20 mM in  $\text{NH}_4\text{HCOO}_3$ , 50 mM) for 30 min at 55°C in a moist chamber. Alkylation was then performed at room temperature by adding 1  $\mu\text{L}$  of 2X Iodoacetamide solution (110 mM, in  $\text{NH}_4\text{HCOO}_3$ , 50 mM) for 30 min in the dark, in the moist chamber. The protein samples were then digest with 2  $\mu\text{L}$  of a trypsin (sequence grade, Promega, Charbonniere France) solution (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  reconstituted in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCOO}_3$  just prior to use) over night at 37°C in a moist chamber. For MALDI-MS analysis, 1  $\mu\text{L}$  of 4HCCA was spotted on the digest and dried.

### ***Antimicrobial assays***

*Antibacterial activity of HPLC fraction.* After each HPLC purification step, antibacterial activity was monitored by a liquid growth inhibition assay (36). Briefly, 10  $\mu\text{L}$  aliquots from each resuspended fraction were incubated in microtiter plates with both 100  $\mu\text{L}$  of a *M. luteus* suspension (starting  $\text{OD}_{600}$  of 0.001) and 100  $\mu\text{L}$  of an *E. coli* suspension (starting  $\text{OD}_{600}$  of 0.001) in Luria-Bertani broth medium (LB). Bacterial growth was assayed by measurement of  $\text{OD}_{600}$  after 12 hours incubation at 30°C for *M. luteus* strain and 37°C for *E. coli* strain.

*Determination of minimal bactericidal concentrations (MBCs).* Antibacterial activity was assayed against several bacteria. The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined as previously used (37). Synthetic peptide was dissolved in a solution containing 0.01% acetic acid and 0.2% bovine serum albumin (BSA), and then serial doubling dilutions of the stock solution were made in 0.01% acetic acid, 0.2% BSA. Ten  $\mu\text{L}$  aliquots from each test dilution were incubated in sterile 96 well polypropylene microtiter plates with 100  $\mu\text{L}$  of a suspension of bacteria at a starting  $\text{OD}_{600}$  of 0.001 in Poor Broth (bactotryptone 1%) or in

PB supplemented with NaCl (15 g/L) for marine bacteria, or in Marine Broth 2216 for *Vibrio* species. Bacterial growth was checked after 18 hours incubation under agitation at 30°C, except for *V. shiloi* and *V. coralliilyticus* tests which were also incubated at 23°C. The MBC was determined by plating the contents of the first three wells with no visible growth of bacteria on Luria-Bertani (LB) agar plates and incubating at 30°C for 18 hours. The lowest concentration of synthetic peptide that prevented any residual colony formation corresponded to the MBC.

*Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs).* The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the liquid growth inhibition assay based on the procedure previously described (38). Marine Broth 2216 was used for *Vibrio sp.*, PB-NaCl (bactotryptone 1%; NaCl 0.5%; w/v) for other marine bacteria and PB for the last microorganisms. Briefly, 10 µL aliquots from serial synthetic peptide dilutions were incubated in microtiter plates with both 100 µL of a suspension of bacteria at a starting OD<sub>600</sub> of 0.001. MICs Bacterial growth was assayed by measurement of OD<sub>600</sub> after 18 hours incubation at 30°C except for *V. shiloi* and *V. coralliilyticus* tests which were also incubated at 23°C.

*Bactericidal assay.* Synthetic peptide (10 µL at a concentration 10 times higher than the MIC (12.5 µM)) was mixed with 90 µL of an exponential phase culture of *M. luteus* (starting OD<sub>600</sub> of 0.01) in PB and incubated at 30°C. Aliquots of 10 µL were plated after 0, 1, 3, 10 and 30 min, 2, 6 and 24 hours of incubation on LB agar and number of colony-forming units was counted after overnight incubation at 30°C. Controls consisted in bacterial culture incubated with 10 µL of sterile water.

*Antifungal assay.* Antifungal activity was monitored against *Fusarium oxysporum* by a liquid growth inhibition assay as previously described (39).

*Haemolytical assay.* Synthetic peptide was dissolved in a solution containing 0.01% acetic acid and 0.2% BSA in order to reach a concentration of 400 µM. Serial doubling dilutions was made from this peptide stock solution in 0.01% acetic acid and 0.2% BSA. Twenty µL of each dilution was added to 180 µL of a solution containing 5% v/v of a sheep erythrocytes suspension in PBS (pH 7.4). As positive control of haemolysis, 20 µL of a 10% Triton X-100 in PBS was used instead of peptide dilution. The negative control consists of 20 µL of a 0.01% acetic acid and 0.2% BSA solution. The tests were then incubated for 2 hours at 37°C and centrifuged for 3 min at 10 000g. The supernatants were finally collected and their absorbance measured at 570 nm (AD340, Beckman Coulter). The haemolytic percentage was calculated as follow:

% hemolysis = (A<sub>570</sub> sample – A<sub>570</sub> negative control) / (A<sub>570</sub> positive control – A<sub>570</sub> negative control) x 100

### Statistical analysis

Variations in gene expression over time were analyzed using a maximum normed residual test (40,41), as applied by the JMP software (SAS Institute, Inc.). Analyses were performed on q-RT-PCR results obtained for a double-passed pool of three nubbins from the same treatment at each sampling date. Differences were considered statistically significant at p<0.05.

## Results

### Characterization of damicornin precursor

In a study of the transcriptomic response of *P. damicornis* confronted to bacterial stress or infection (Vidal-Dupiol *et al.*, submitted<sup>a</sup>), we identified an EST displaying amino acid sequence similarities for the prepro-aurelin gene (GenBank accession number, DQ837210), which encodes the precursor of an antimicrobial peptide (AMP) from the jellyfish *Aurelia aurita* (BLASTX, E-value=1.4, amino acid alignment shown in Fig. 1).

Damicornin	-----KRRACADLRGKTF	<b>CRLFKSY</b>	---	<b>CDKKGIRGLMRDK</b>	---	<b>CSYS</b>	<b>CG</b>	---	<b>CRG</b>				
Aurelin	AACSDRAHGHI	<b>CE</b>	<b>SFKSF</b>	---	<b>CKDSGRNGVKLRAN</b>	---	<b>CKKT</b>	<b>CG</b>	<b>LC</b>				
ShK	RS	<b>C</b>	<b>IDTIPKSR</b>	<b>CTAF</b>	---	<b>Q</b>	---	<b>CKHS</b>	---	<b>MKYRLSFCRKT</b>	<b>CGTC</b>		
HmK	RT	<b>C</b>	<b>CKDLMPVSEC</b>	<b>TDIR</b>	---	<b>CRTS</b>	---	<b>MKYRLNLCRKT</b>	<b>CGSC</b>				
BgK	-	<b>V</b>	<b>CRDWFKETAC</b>	<b>RHA</b>	<b>SLGN</b>	<b>CRTS</b>	---	<b>Q</b>	---	<b>KYRAN</b>	---	<b>CAKT</b>	<b>CEL</b>

**Figure 1: Damicornin, aurelin and anemonia toxins share the same cysteine array.** Suspected cleavage site is localized by a double-ended arrow. Conserved amino acids are highlighted in grey. The conserved cysteine array is in bold highlighted in grey and outlined in black. Anemonia toxins ShK, BgK and HmK are produced by *Stichodactyla helianthus*, *Bunodosoma granulifera* and *Heteractis magnifica* anemones, respectively. The essential dyad for toxins blocking voltage-gated K<sup>+</sup> channels activity are underlined.

The complete cDNA was obtained by RACE-PCR (Fig. 2). Consisting of 751 nucleotides, it contains an open reading frame (ORF) encoding a 107 amino acid (AA) precursor sequence. This sequence shows the canonical prepropeptide organisation of many AMP precursors. It consists of a 22 AA N-terminal sequence (Met1-Ala22), which is highly hydrophobic and corresponds to a putative signal peptide (prepeptide), as predicted by the Signal3.0 software. Then comes a 45 AA highly acidic sequence (Ala23-Arg67) showing a calculated pI of 3.56. Anionic AA (Asp and Glu) were found at 16 positions in this proregion,

which ends with a dibasic motif (Arg66-Arg67) consistent with a putative cleavage. Finally, the C-terminal sequence (Ala68-Gly107) corresponds to the putative AMP. It shows an identical cysteine array and 37.3% AA sequence identity with aurelin from *A. aurita* (Fig. 1). This putative AMP of *P. damicornis* shows several features of eukaryotic AMPs: it has (i) a high content in basic AA (pI of 9.64), (ii) 6 Cys residues putatively involved in disulphide bond formation, and (iii) a C-terminal Gly residue that could be a signal of amidation (42). This putative AMP was termed damicornin after the name of *P. damicornis*, the complete cDNA sequence was submitted to GeneBank (GenBank accession number, HQ825099).

```

1  acatggggactgaacactggagagtggaccgatgacaatctggtttgagt
51  tctcccagtttacaagtgggtcaacgcgaggtgaaaaacatattatatttga
101 ttaaacaaaaatatttgtattatataatcatacaagaacacttctgacaT
151 tataccttaagtcaactcgtccaccagaggcagaactagacgcagaagaag
201 acttgcctcaagtggtgagatggcctcAATGAAAGTATTAGTTATACTCTT
1                               M K V L V I L F
251 TGGGGCAATGCTGGTGCTGATGGAGTTCCAGAAGGCATCCGCAGCTACCT
9  G A M L V L M E F Q K A S A A T L
301 TGTTAGAGGATTTTGACGATGATGATGACCTTCTTGATGACGGCGGTGAC
26 L E D F D D D D D L L D D G G D
351 TTTGATTTGGAAGCGAATTCGGATGCATCAAGTGGCAACGGCAACGATTC
42 F D L E A N S D A S S G N G N D S
401 AAACGACGCAGTCCCAGAAAAGCGGAGAGCCTGCGCAGATTTACGCGGGA
59 N D A V P E K R R A C A D L R G K
451 AGACTTTTTGCCGTCTCTTCAAAAAGTTATTGTGATAAAAAAGGCATCAGA
76 T F C R L F K S Y C D K K G I R
501 GGTCGGCTAATGAGAGACAAGTGTCTTATTCTTGTGGATGCCGGGGTTG
92 G R L M R D K C S Y S C G C R G *
551 agatctccagatacgaagattaagacgcgatgttaccacaaaaatgat
601 gattcaagatttcaagagacaagagttaaatatagcttgaaaaatattcc
651 gtattcttcgaggggtactactgtttatattattctgttgtaaacattgcc
701 ctaaagatgctaaaataaactatgatagcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

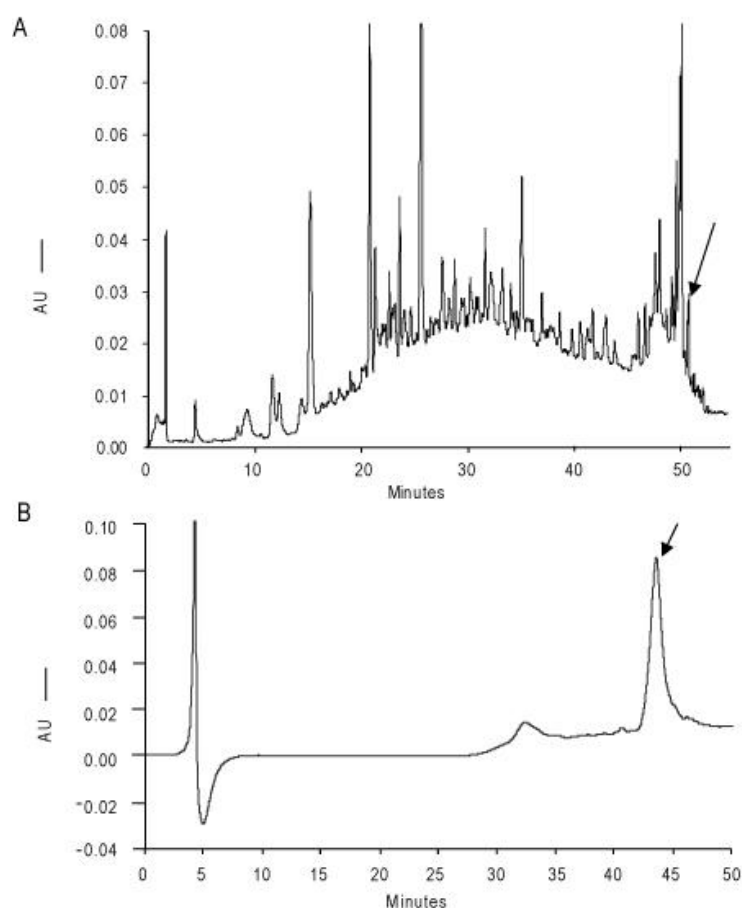
**Figure 2: cDNA and deduced amino acid sequences of preprodamicornin.** The ORF sequence is in capital letters. The EST obtained from SSH library is highlighted in grey. The deduced amino acid sequence of the ORF is indicated above the nucleotide sequence. Asterisk indicates the stop codon. The arrow position the cleavage site of the signal peptide. The dibasic cleavage site between the acidic N-terminal proregion and the cationic C-terminal region is outlined in black. The damicornin active peptide is underlined in black. Cysteine residues and glycine amidation signal are in bold.

### **Isolation and biochemical characterization of native damicornin**

To show the presence of damicornin in coral tissues, we prepared an acidic extract from corals that had been maintained at 25°C and exposed for 9 days to *V. coralliilyticus*. Unchallenged controls were also prepared. After a first prefractionation step of both acidic extracts on Sep-Pak cartridges (see Section on Materials and Methods), only the 60% acetonitrile fraction of the *V. coralliilyticus*-exposed corals extracts displayed antibacterial activity. This 60% eluat was submitted to reversed phase (RP)-HPLC separation. All fractions were tested for their activity against the sensitive bacteria *M. luteus* A270 (as a Gram positive



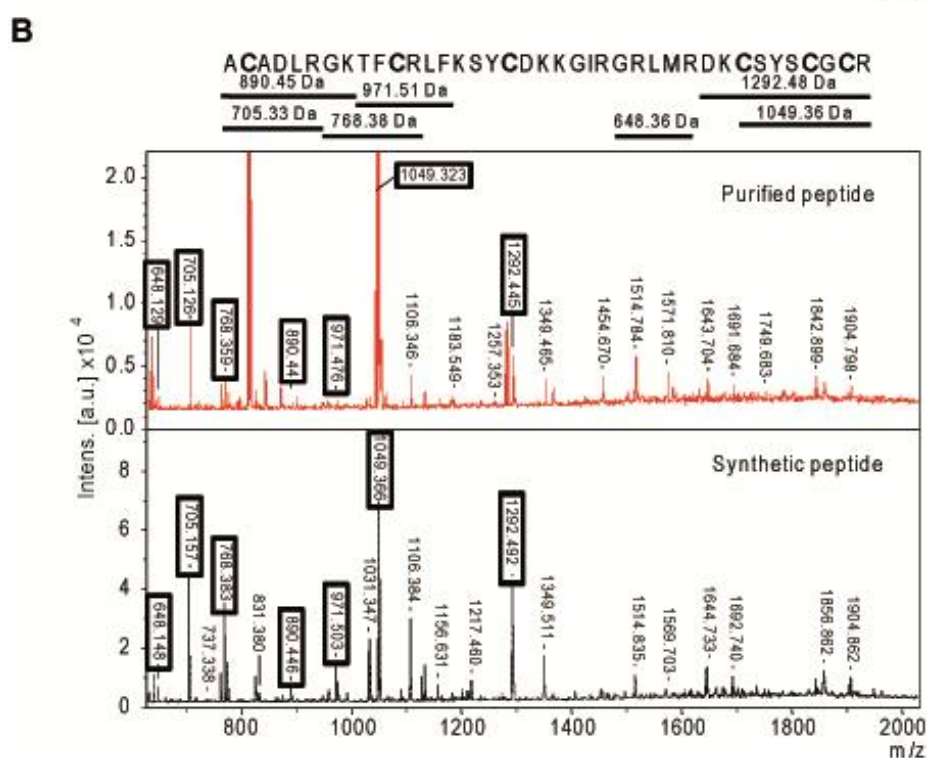
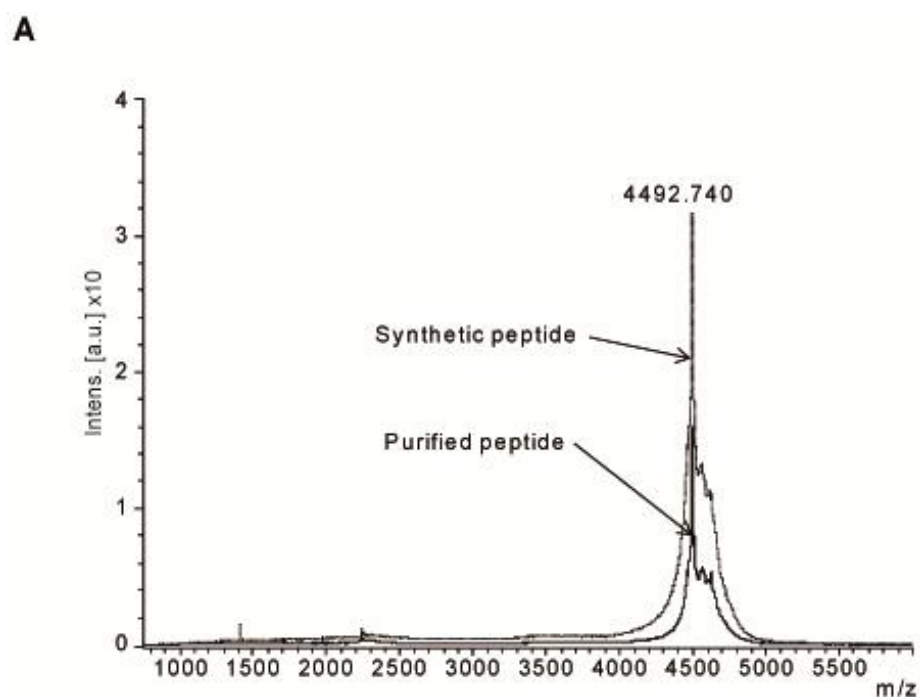
strain) and *E. coli* SBS 363 (as a Gram negative strain). Only one active fraction was identified after the first round of RP-HPLC (Fig. 3A). This fraction, which eluted at 51% acetonitrile, was only active against *M. luteus*. After one additional RP-HPLC purification step, one fraction was active against *M. luteus* (Fig. 3B). The MALDI mass spectrum of the fraction (acquired in a positive linear mode) showed a major ion at  $m/z = 4492.740$  (Fig. 4A).



**Figure 3: Purification of damicornin from acidic extracts obtained from challenged coral tissue.** A: After prepurification by solid phase extraction, the material present in the fraction eluted with 60% acetonitrile was loaded onto a  $C_{18}$  column. Elution for this HPLC step was performed with a linear gradient from 15 to 85% acetonitrile over 60 min at a flow rate of 1 mL/min. Absorbance peaks were monitored at 224 nm. The fraction containing the antimicrobial activity is indicated by an arrow. B: Chromatogram from last reverse-phase purification on  $C_8$  column of damicornin, the arrow indicates the fraction containing the purified antimicrobial peptide of interest.

This mass corresponds to the calculated average mass of damicornin (4492.35 Da) starting by an alanine (residue at position 68 following the preprosequence numbering), ending by a C-terminal amidated arginine residue resulting from Gly107 elimination, and displaying oxidized cysteines. A peptide corresponding to this mature sequence was obtained by chemical synthesis. It showed the exact same mass of the active peptide by MALDI-TOF-MS (Fig. 4A). Finally, both the active peptide from *P. damicornis* and synthetic damicornin

were subjected to tryptic digestion and mass spectrometry analysis. The molecular mass fingerprints of both tryptic digests presented a similar pattern with 7 common peptides identified and corresponding to damicornin (Fig. 4B). Altogether, these data show that damicornin is expressed in coral tissues and is processed as hypothesized above. It contains 6 cysteine residues involved in three intramolecular disulphide bonds and is C-terminally amidated by elimination of the C-terminal glycine.



**Figure 4:** Damicornin identification using mass spectrometry analysis: A: Linear mode MALDI mass spectra superimposition of the purified damicornin and synthetic peptide exhibiting a major peak at 4492.740 Da. B: Tryptic digestion analysis by MALDI-TOF MS of purified peptide and synthetic peptide. Peptide identified by MS analysis in both tryptic digestion are underlined on the given damicornin sequence. Their theoretical mass is given and the corresponding m/z ratio are boxed on both MS spectra.

#### Antimicrobial activities of damicornin

Due to the low amounts of purified native damicornin, the synthetic peptide was used in antimicrobial assays. In liquid growth inhibition assays, damicornin showed potent antifungal activity against the filamentous fungus *F. oxysporum* with an MIC of 1.25  $\mu$ M (Table 2). It was also active against Gram-positive bacteria.

**Table 2: Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration of damicornin**

Microorganisms	MIC ( $\mu$ M)	MBC ( $\mu$ M)
Gram-positive bacteria		
<i>B. megaterium</i> (souchier IBMC)	20	>20
<i>S. aureus</i> (SG511)	5	>20
<i>M. luteus</i> (A270)	1.25	2.5
<b><i>B. stationis</i> (CIP 101282)</b>	10	10
<b><i>M. maritpicum</i> (CIP 105733T)</b>	20	>20
Gram-negative bacteria		
<i>E. coli</i> (SBS 363)	10	20
<b><i>V. aesturianus</i> (CIP 109791)</b>	>20	>20
<b><i>V. shilonii</i> (CIP 107136)*</b>	>20	>20
<b><i>V. coralliilyticus strainYB1</i> (CIP 107925)*</b>	>20	>20
<b><i>V. splendidus</i> (CIP 107715)</b>	>20	>20
Fungi		
<i>F. oxysporum</i>	1.25	ND

MBC were determined by testing different concentrations of synthetic peptide in liquid growth inhibition assays against different bacterial strains according to Hancock method. MBC values are expressed in  $\mu$ M. ND is used for Not Done. Marine bacteria are indicated in bold.\* Indicate that for this strains the MIC and MBC were test either at 23 and 30°C, results were the same at both temperature.

The MBC was 2.5  $\mu$ M against *Micrococcus luteus* and varied from 5 to 20  $\mu$ M against the other Gram-positive bacteria. However, no activity was observed against the Gram-negative bacteria at the highest concentration tested of 20  $\mu$ M with the exception of *E. coli* SBS 363 (MBC = 20  $\mu$ M).

The bactericidal effect of synthetic damicornin against Gram positive bacteria was tested in kinetic experiments. Thus, damicornin was incubated with *M. luteus* at a concentration 10 times higher than the MIC and the loss of bacterial culturability was monitored over time. After 6 hours, *M. luteus* had lost the ability to grow on a LB agar plate (Table 3). We therefore concluded that damicornin was bactericidal against *M. luteus*.

We finally tested damicornin hemolytical activity against sheep red blood cells. Red blood cells were not affected by the damicornin at concentrations as high as 80  $\mu\text{M}$ , for an incubation time as long as 24 hours (data not shown). This showed that damicornin is devoid of hemolytic activity.

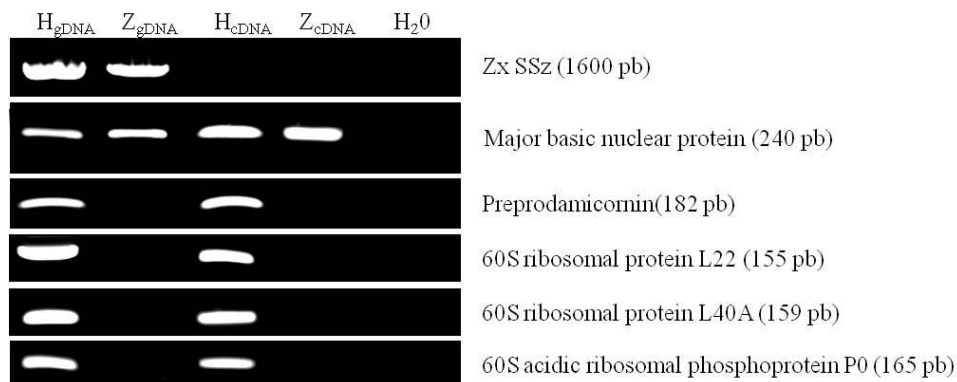
*Table 3: Bacteriolytic effect of damicornin on M. luteus*

Time of incubation	Control	AMP
	$10^4 \text{ CFU.mL}^{-1}$	
0 min	2.40	2.46
1 min	2.94	2.86
3 min	2.96	2.89
10 min	3.68	2.58
30 min	3.81	1.95
2 h	3.86	1.30
6 h	9.60	0.00
24 h	22.40	0.00

### ***Damicornin localization in holobiont tissues***

The sequence similarities between damicornin and the jellyfish aurelin argue in favour of a cnidarian origin for the damicornin. Nevertheless, in order to verify that the preprodamicornin encoding gene is actually expressed by coral cells, we developed cross PCR experiments performed on DNA and cDNA extracted from the holobiont (host plus symbiont) on the one hand, and from pure cultures of *Symbiodinium* spp, clade B, C and D on the other hand (Fig. 5). PCR were performed with primers amplifying (i) the damicornin gene (ii) housekeeping genes (iii) small ribosomal subunit RNA genes from *Symbiodinium* spp. (32), and (iv) the major basic nuclear protein gene (MBNP) of *Symbiodinium* spp. The damicornin-specific primers gave amplicons for DNA and cDNA from holobionts only (Fig. 5). On the contrary, small ribosomal subunit RNA and MBNP primers amplified DNA and cDNA from both holobionts and symbiont cultures. Finally, like the damicornin gene, the three qRT-PCR reference genes (encoding the ribosomal proteins L22, L40A and P0) were found to be

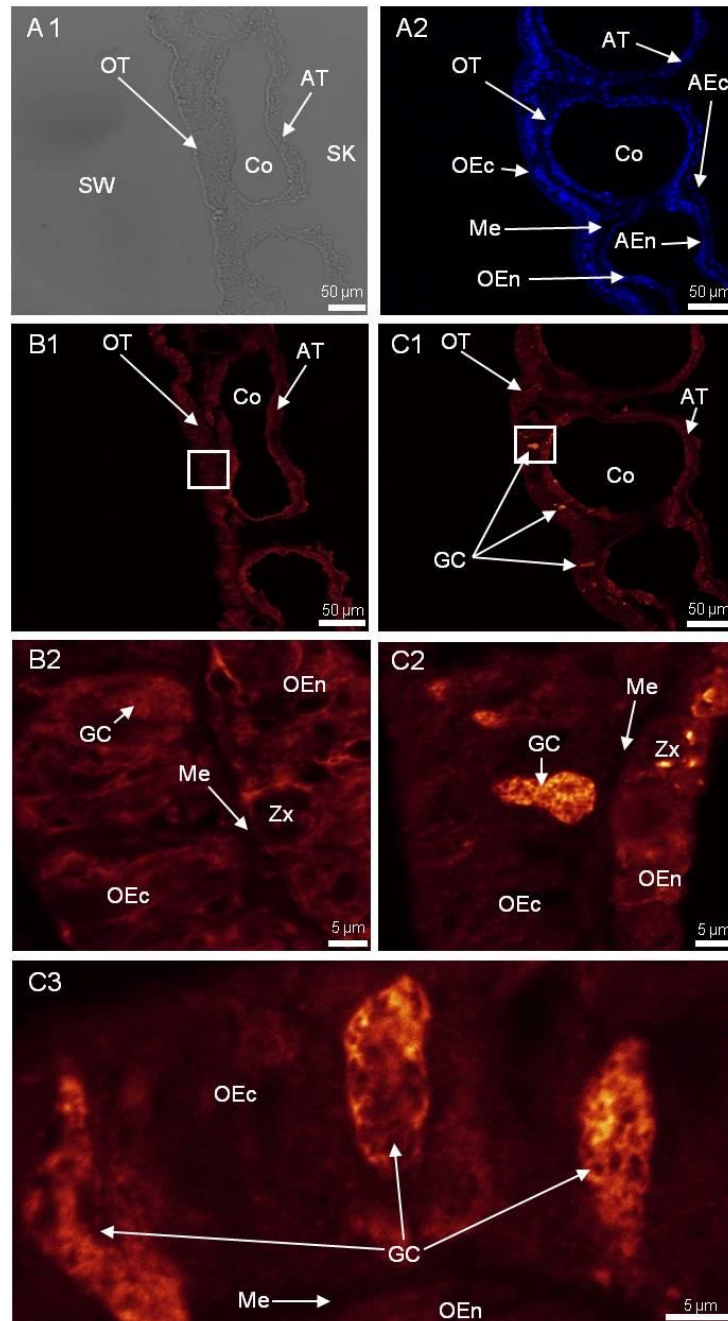
expressed only in coral cell-containing samples. This indicates that damicornin and reference genes are expressed by coral cells.



**Figure 5: Preprodamicornin gene is expressed by the coral host.** Presence of the preprodamicornin, reference gene for q-RT-PCR, zooxanthellae small ribosomal subunit RNA (*Zx ssRNA*) and zooxanthellae major basic nuclear protein corresponding gene are investigated by PCR using specific primers on DNA and cDNA extracted from holobionts (corals plus zooxanthellae) or from pool of pure cultured zooxanthellae clade B, C and D. HgDNA: Holobiont genomic DNA; ZgDNA: Zooxanthellae genomic DNA; HcDNA: Holobiont cDNA; ZcDNA: Zooxanthellae cDNA

Damicornin expression was monitored in coral tissue sections using antibodies raised against the synthetic peptide. Because antibacterial activity was detected in bacteria stressed coral tissue fractionated by a RP-HPLC procedure, the localization of damicornin was investigated in bacteria-stressed and unstressed animals. This would allow visualizing different localization or concentration of damicornin between the two different immune status. For bacterial stress, corals were exposed to the non-virulent *V. coralliilyticus* during 9 days before tissues fixation. Similar results were obtained under both conditions. Corals are diploblastic animals composed of two kind of tissues : the oral tissue and the aboral tissue (Fig. 6 A1). Tissue section stained with DAPI are presented figure 6 A2. The reduced background obtained with this bleu staining of the nucleus highlight the two cellular layers constituting each tissue. The 4 different layers/epithelia can be easily distinguished. Briefly, the oral layer is composed of the oral ectoderm (facing the seawater) and the oral endoderm (facing the coelenteron; e.g gastric cavity) . The aboral layer is composed of the aboral endoderm (facing the coelenteron) and the aboral ectoderm (facing the skeleton) also referred as the skeletogenic tissue. both oral and aboral ectoderms and endoderm are separated by an acellular layer the mesoglea. Damicornin-specific antibodies showed a specific labelling of cells in the oral ectoderm (Fig. 6 C1), which at higher magnification, was shown to be associated to cells containing intracellular granules (Fig. 6 C2 and C3). Controls performed

with the depleted antibodies (*i.e.* antibodies preincubated with synthetic damicornin) showed a faint autofluorescence of the tissues but no specific labelling (Fig. 6 B1 and B2), showing that the staining of the ectodermal granular cells was specific.

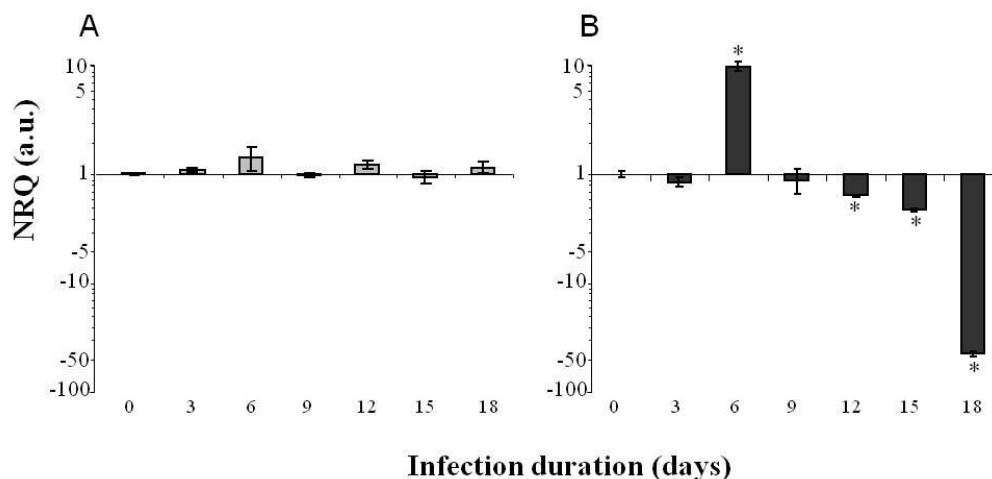


**Figure 6: Damicornin immunolabeling of the coral tissues.** (A1) Bright field transmitted light image of the oral tissue facing the seawater and the aboral tissue facing the skeleton with the coeleteron (e.g. gastric cavity) in between them. (A2) DAPI staining of the nuclei shows the four cell layers with the oral ectoderm facing the seawater and the aboral ectoderm facing the skeleton. Damicornin labelling appears in bright orange and is revealed with anti-damicornin coupled to secondary antibody conjugated to Alexafluor 568 (C1), (C2), (C3). (B1) and (B2) represent control experiments performed with anti-damicornin antibodies pre-adsorbed with the synthetic peptide used for immunization. (B2) and (C2) correspond to magnifications of (B1) and (C1) respectively. Both show granular ectodermal cells (GC), with labelling for (C2) and without labelling in the control experiment (B2). (C3) shows another area of the oral ectoderm (OEc), with 3 labelled granular cells.

Other abbreviations: OT, oral tissues; AT, aboral tissues; OEn, oral endoderm; AEc, aboral ectoderm; AEn aboral endoderm; Me, mesoglea; Zx, zooxanthellae.

### **Damicornin gene expression after a bacterial challenge**

The regulation of damicornin gene expression was studied in response to an exposure to the non-virulent *V. coralliilyticus* and to the virulent *V. coralliilyticus*. We analysed by qRT-PCR the relative amount of preprodamicornin transcripts in coral tissues 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 days after bacteria challenge. Interestingly, whereas no significant variation of the transcript abundance was evidenced after challenge with non-virulent bacteria (Fig. 7 A), high variations were measured with the virulent *V. coralliilyticus* (Fig. 7 B). Indeed, damicornin transcripts strongly increased at day 6 (by 9.6 fold) and then significantly dropped from day 12 to the end of the experiment (more than 44.5 fold at day 18 as compared to day 0; Fig. 7 B). This strongly suggested that the coral pathogen *V. coralliilyticus* alters the gene expression of damicornin.



**Figure 7: Disturbance of preprodamicornin expression under infection by virulent bacteria.** Transcription rate of the preprodamicornin measured by q-RT-PCR on samples from the non-virulent (A) and the virulent experiment (B), at D0, D3, D6, D9, D12, D15 and D18. Relative expression were normalized with geometric mean of three reference genes (Normalized Relative Quantity). Grey and black histograms represent the relative expression of the coral damicornin gene in the non-virulent and virulent experiment, respectively. Bars represent the mean of replicates and the error bars correspond to SEM. \*  $P < 0.05$  indicates significant difference within the same experiment.

## **Discussion**

This study reports for the first time the characterisation, purification and expression analysis of an antimicrobial peptide (AMP) from a scleractinian coral. To our knowledge it represents the most basal eumetazoan AMP characterized to date, and the only antimicrobial

agent identified in scleractinian coral. This AMP was called damicornin after the name of the coral *Pocillopora damicornis*. Damicornin is essentially antimicrobial against Gram positive bacteria and the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. However, it is barely active against Gram negative bacteria including *Vibrio coralliilyticus*, a specific pathogen of *P. damicornis*.

RACE-PCR experiments and MS-MS characterization of native damicornin showed that it is a 39 residue cationic AMP (theoretical pI = 9.64), which contains 11 basic residues. Its measured molecular mass ( $m/z = 4492.740$ ) indicates that damicornin is folded by 3 intramolecular disulfide bridges, in which the 6 cysteine residues from its sequence are engaged, and that it carries a C-terminal amidation, which results from the elimination of its final glycine residue. AMPs folded by 3 intra-molecular disulfide bridges were reported in many invertebrate and vertebrate species and often belong to the defensin super family (43). According to the cysteine pairing, animal defensins are classified into four subfamilies, namely the vertebrate  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\theta$ -defensins, and the invertebrate defensins. None of these families seem to include damicornin because of its specific cysteine array. This is also true for other AMPs from marine invertebrates (*e.g.* penaeidins) that contain 3 disulfide bridges, but like damicornin, have a cysteine array that differs from that of invertebrate defensins (44). Despite this difference, damicornin shares several features found in invertebrate defensins. Damicornin is, like invertebrate defensins, particularly active against Gram positive bacteria and filamentous fungi, with a rather limited activity against Gram negative bacteria. Damicornin is also characterized, like invertebrate defensins, by the lack of haemolytic activity (43). In terms of common structural features, invertebrate defensins can also carry C-terminal amidation (45,46). Those are actually frequently found in cationic AMPs, making them more resistant to proteolysis and rising their positive net charge (44,47-51).

From the complete CDS obtained in the present study, damicornin is generated from a 107 residue-precursor, which we called preprodamicornin and which sequentially includes a putative signal peptide (22 amino acids), an anionic proregion (45 amino acids), and the cationic damicornin sequence in C-terminal position (40 amino acids). Thus, from the structure of its precursor, mature damicornin is likely generated as follows: i) the signal peptide addresses preprodamicornin to the lumen of the rough endoplasmic reticulum, and is cleaved off by a signal peptidase; ii) then the anionic proregion of predamicornin is eliminated by proteolytic cleavage of the Arg67-Ala68 bond by a processing enzyme that recognises the dibasic motif (Arg-Arg) located ahead of the observed cleavage site; iii) finally the C-terminal glycine extended peptide substrate is hydroxylated by a peptidylglycine- $\alpha$ -hydroxylating mono-oxygenase, and the intermediate is cleaved by a peptidyl- $\alpha$ -



hydroxyglycine- $\alpha$ -amidating lyase leading to the formation of the mature  $\alpha$ -amidated damicornin and to the release of a glyoxylate. The two first steps of the processing mechanism are frequently encountered in maturation processes of AMP precursors (52-55). The mechanism occurring during the third step was described by Kolhekar *et al.* (56) and found in the processing of different AMPs (44,45).

In conclusion, damicornin shares several key features of invertebrate defensins: i) it contains 6 cysteine residues involved in intra-molecular disulphide bonds; ii) it is mainly active against Gram positive bacteria and filamentous fungi; iii) it displays no haemolytic activity; iv) it displays a classical precursor structure with a segmented organisation containing a signal peptide followed by an anionic proregion and then the cationic active peptide; v) its precursor is submitted to classical processing mechanisms found for other defensin precursors; and vi) it carries a C-terminal amidation found in several invertebrate defensins and other AMPs from animal origin. However, damicornin is more similar (cysteine array and sequence similarities) to aurelin from the jelly fish *A. aurita* (57). Interestingly, like invertebrate defensins have the same cysteine array (the so-called CS $\alpha\beta$  motif) as scorpion toxins (58,59), damicornin and aurelin have a common cysteine array with anemonia toxins (Fig. 1). Aurelin displays additional structural similarities with anemonia toxins: it has a Lys residue at position 28 followed by an essential hydrophobic residue, both of which were shown to be crucial for toxin activity, blocking voltage-gated K<sup>+</sup> channels (57,60-62). This essential dyad is not present in the damicornin (Fig. 1). Besides, only damicornin displays a C-terminal amidation. Altogether, this suggests that disulfide-containing antimicrobial peptides (damicornin, aurelin) and toxins from cnidarians originated from the same molecular ancestor but have evolved independently to acquire specific molecular features and function.

In addition, analysis of damicornin expression revealed that this AMP is expressed by oral ectodermal coral cells and located within intracellular granules. AMP expression in granular epithelial cells has been reported in both vertebrates (63-65) and invertebrates (66-68) where it allows the apical release of AMP in mucus, participating to the mucosal defence and preventing pathogen invasion. Our data suggest that similarly, the release of damicornin could be part of the coral epithelial defence. Whereas mature and active damicornin was isolated from corals challenged with non-virulent bacteria, no anti-bacterial activity could be detected in unchallenged controls. However, damicornin is expressed in both sets of animals as evidenced by (i) similar transcription levels, and (ii) similar immunostaining of ectodermal cell granules. Altogether, this suggests that the inactive damicornin precursor is stored in

ectodermal cells and activated by post-translational processing upon release triggered by an immune challenge. Alternatively, mature damicornin could be stored in the granules of ectodermal cells together with its anionic proregion, which could inactivate it by electrostatic interactions in trans (69). As in the previous hypothesis, mature (active) damicornin would then be released upon bacteria-promoted ectodermal cell degranulation. That active damicornin is released in response to external signals is strengthened by previous studies, which showed the release of antibacterial molecules immediately after injury in *P. damicornis* and *Stylophora pistillata* (23,24).

One major result from this study was that the expression of damicornin was overall repressed in *P. damicornis* exposed to its virulent specific pathogen *V. coralliilyticus*. Indeed, after a transient increase in damicornin transcript abundance (by 10 fold) observed over the first 6 days after infection, a dramatic decrease, by 50 fold, was observed from day 9 to day 18. In contrast, no transcriptional modifications were evidenced when *P. damicornis* was exposed to the non-virulent bacteria. Interestingly, in a recent study of *V. coralliilyticus* infectious process (27), we showed that bacteria enter coral tissues 6 days after challenge. This suggests that in a first phase, bacterial recognition by host cells triggers a non-specific inflammatory response that activates damicornin gene transcription and that in a second phase, after bacterial entry, the pathogenic *Vibrio* suppresses damicornin transcription. Such mechanisms of immune suppression have been reported in several intracellular bacteria such as *Shigella flexneri* which suppresses the transcription of several genes encoding AMPs after entry in intestinal cells (70). While not reported to directly affect AMP expression, several marine *Vibrio* species were also shown to suppress or modulate host immune defences (71-75).

In conclusion, this study reports the first characterization of a scleractinian AMP, the damicornin that displays several features of invertebrate defensins and shares a specific cysteine array found in other cnidarian AMPs (aurelin from *A. aurita*) and toxins produced by species from the same phylum (anemonia). Structural similarities between AMPs and toxins were also described for defensin and toxin of arthropods. This strongly suggests that AMPs and toxins have probably evolved from common molecular ancestors in diverse phyla. Damicornin was shown to be expressed and released from coral ectodermal cells in animals exposed to a non-pathogenic stimulus. Conversely, damicornin gene expression was repressed concomitantly with the entry of the coral pathogen *V. coralliilyticus* into its host ectodermal cells. To our knowledge, this is the first evidence of an AMP gene repression in a host-*Vibrio*

interaction. Future studies will tell how far this immune suppression accounts for the success of the coral disease.

**Acknowledgements.** *This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). O Ladrière is a PhD student of the National Fund for Scientific Research (FNRS-Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). The authors are indebted to Nathalie Techer and Natacha Segonds from the Centre Scientifique de Monaco for their technical help in the immunochemistry experiments and Marc Manetti for his help with the experimental procedures. Authors thank Philippe Bulet for critical reading of the manuscript and Céline Cosseau for many helpful discussions. We thank Alain Pigno and Boris Rota from the Cap d'Agde Public Aquarium for their help with the project, and Jérôme Bossier for helping with the statistical analyses. Finally, the authors thank Mary-Alice Coffroth for allowing us to use cultures from the BURR Culture Collection.*

## REFERENCES

1. Bourne, D. G., Garren, M., Work, T. M., Rosenberg, E., Smith, G. W., and Harvell, C. D. (2009) *Trends Microbiol.* **17**(12), 554-562
2. Donner, S. D., Skirving, W. J., Little, C. M., Oppenheimer, M., and Hoegh-Guldberg, O. V. E. (2005) *Glob. chang. biol.* **11**(12), 2251-2265
3. Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A., and Hatzios, M. E. (2007) *Science* **318**(5857), 1737-1742
4. Hughes, T., Baird, A., Bellwood, D., Card, M., Connolly, S., Folke, C., Grosberg, R., Guldberg, H., Jackson, J., Kleypas, J., Lough, J., Marshall, P., Nyström, M., Palumbi, S., Pandolfi, J., Rosen, B., and Roughgarden, J. (2003) *Science* **301**, 929-933
5. Lesser, M. P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(13), 5259-5260
6. Ward, J. R., and Lafferty, K. D. (2004) *PLoS Biology* **2**(4), e120
7. Weil, E., Smith, G. W., and Gil-Agudelo, D., L. . (2006) *Dis. Aquat. Org.* **69**(1), 1-7
8. Rodriguez-Lanetty, M., Harii, S., and Hoegh-Guldberg, O. (2009) *Mol. Ecol.* **18**(24), 5101-5114
9. Ward, J., R , Kim, K., and Harvell, C., D (2007) *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **329**, 115-121
10. Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J., and Rosenberg, E. (2003) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(1), 309-315
11. Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., Ben Haim, H., and Loya, Y. (1998) *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **171**, 131-137
12. Ben-Haim Rozenblat, Y., and Rosenberg , E. (2004) Temperature-regulated bleaching and tissue lysis of *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. In: Rosenberg , E., and Loya , Y. (eds). *Coral health and disease*, Springer-Verlag, New-York

13. Rosenberg , E. (2004) The bacterial disease hypothesis of coral bleaching. In: Rosenberg , E., and Loya , Y. (eds). *Coral health and disease*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
14. Mydlarz, L. D., Jones, L. E., and Harvell, C. D. (2006) *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **37**, 251-288
15. Kvennefors, E. C. E., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O., Degnan, B. M., and Barnes, A. C. (2008) *Dev. Comp. Immunol.* **32**(12), 1582-1592
16. Kvennefors, E. C. E., Leggat, W., Kerr, C. C., Ainsworth, T. D., Hoegh-Guldberg, O., and Barnes, A. C. (2010) *Dev. Comp. Immunol.* **34**(11), 1219-1229
17. Mullen, K. M., Peters , E. C., and Harvell, C. D. (2004) Coral resistance to disease. In: Rosenberg , E., and Loya , Y. (eds). *Coral health and disease*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
18. Mydlarz, L. D., Couch, C. S., Weil, E., Smith, G., and Harvell, C. D. (2009) *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **87**(1-2), 67-78
19. Palmer, C. V., Bythell, J. C., and Willis, B. L. (2010) *The FASEB Journal* **24**(6), 1935-1946
20. Palmer, C. V., Modi, C. K., and Mydlarz, L. D. (2009) *Plos One* **4**(10), e7298
21. Palmer, C. V., Mydlarz, L. D., and Willis, B. L. (2008) *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **275**(1652), 2687-2693
22. Vidal-Dupiol, J., Adjéroud, M., Roger, E., Foure, L., Duval, D., Mone, Y., Ferrier-Pages, C., Tambutte, E., Tambutte, S., Zoccola, D., Allemand, D., and Mitta, G. (2009) *BMC Physiol.* **9**, 14
23. Geffen, Y., Ron, E. Z., and Rosenberg , E. (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* **295**(103-109)
24. Geffen, Y., and Rosenberg, E. (2005) *Mar. Biol* **146**, 931-935
25. Gochfeld, D. J., and Aeby, G. S. (2008) *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **362**, 119-128
26. Kelman, D., Kashman, Y., Rosenberg, E., Kushmaro, A., and Loya, Y. (2006) *Mar. Biol* **149**(2), 357-363
27. Vidal-Dupiol , J., Ladrière, O., Meistertzheim, A. L., Fouré, L., Adjéroud , M., and Mitta, G. (2011) *J. Exp. Biol.* **In press**
28. Schmitt, P., Wilmes, M., Pugnière, M., Aumelas, A., Bachère, E., Sahl, H.-G., Schneider, T., and Destoumieux-Garzon, D. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**(38), 29208-29216
29. Ben-Haim, Y., and Rosenberg, E. (2002) *Mar. Biol* **141**, 47-55
30. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, C. N. (2006) *BMC. Bioinfo* **7**, 85-97
31. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007) *Genome Biol.* **8**(2), R19
32. Rowan, R., and Powers, D. A. (1991) *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **71**, 65-73
33. Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieschlag, E., and Ross, G. T. (1971) *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **33**, 988-991
34. Hancock, C. D., and Evans, G. I. (1992) Production and characterization of antibodies against synthetic peptides. In: Manson, M., and Totowa, N. J. (eds). *Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols*, Humana Press, USA
35. Puvarel, S., Tambutte, E., Zoccola, D., Domart-Coulon, I., Bouchot, A., Lotto, S., Allemand, D., and Tambutte, S. (2005) *Coral Reefs* **24**, 149-156
36. Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J. L., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1991) *The journal of Biological Chemistry* **266**(36), 24520-24525

37. Destoumieux-Garzón, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A.-M., Letellier, L., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**(4), 1031-1041
38. Hetru, C., and Bulet, P. (1997) Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. In: Shafer, W. M. (ed). *Antibacterial peptide protocols*, Humana press, Totowa
39. Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**(52), 33159-33163
40. Grubbs, F. E. (1969) *Technometrics* **11**, 1-21
41. Stefansky, W. (1972) *Technometrics* **14**, 469-479
42. Murthy, A. S., Mains, R. E., and Eipper, B. A. (1986) *The journal of Biological Chemistry* **261**(4), 1815-1822
43. Bulet, P., Stöcklin, R., and Menin, L. (2004) *Immunological Reviews* **198**(1), 169-184
44. Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., and Bachère, E. (1997) *The journal of Biological Chemistry* **272**(45), 28398-28406
45. Kludiny, J., Albert, S., Bachanová, K., Kopernický, J., and Simúth, J. (2005) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**(1), 11-22
46. Rees, J. A., Moniatte, M., and Bulet, P. (1997) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**(5), 413-422
47. Baumann, T., Kämpfer, U., Schürch, S., Schaller, J., Largiadèr, C., Nentwig, W., and Kuhn-Nentwig, L. (2010) *Cell. Mol. Life Sci.* **In press**
48. Herbinière, J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J.-M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., and Martin, G. (2005) *Dev. Comp. Immunol.* **29**(6), 489-499
49. Lorenzini, D. M., da Silva, P. I., Fogaça, A. C., Bulet, P., and Daffre, S. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* **27**(9), 781-791
50. Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., and Shimonishi, Y. (1988) *The Journal of Biological Chemistry* **263**(32), 16709-16713
51. Silva, P. I., Daffre, S., and Bulet, P. (2000) *The Journal of Biological Chemistry* **275**(43), 33464-33470
52. Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodova, M., Beverley, S. M., Spath, G., Brun, R., Pesson, B., and Bulet, P. (2004) *Infect. Immun.* **72**(12), 7140-7146
53. De Zoysa, M., Whang, I., Lee, Y., Lee, S., Lee, J.-S., and Lee, J. (2010) *Fish Shellfish Immunol.* **28**(2), 261-266
54. Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jorgensen, T. Ø., and Stensvåg, K. (2008) *Dev. Comp. Immunol.* **32**(12), 1430-1440
55. Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., and Roch, P. (1999) *European Journal of Biochemistry* **265**(1), 71-78
56. Kolhekar, A. S., Roberts, M. S., Jiang, N., Johnson, R. C., Mains, R. E., Eipper, B. A., and Taghert, P. H. (1997) *The Journal of Neuroscience* **17**(4), 1363-1376
57. Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A. V., and Kokryakov, V. N. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**(2), 514-523
58. Bontems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljansky, Y., Menez, A., and Toma, F. (1991) *Eur. J. Biochem.* **196**(1), 19-28
59. Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A., and Toma, F. (1991) *Science* **254**(5037), 1521-1523

60. Alessandri-Haber, N., Lecoq, A., Gasparini, S., Grangier-Macmath, G., Jacquet, G., Harvey, A. L., de Medeiros, C., Rowan, E. G., Gola, M., Menez, A., and Crest, M. (1999) *The journal of Biological Chemistry* **274**(50), 35653-35661
61. Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C. L. C., Rowan, E. G., Harvey, A. L., and Ménez, A. (1997) *The journal of Biological Chemistry* **272**(7), 4302-4309
62. Rauer, H., Pennington, M., Cahalan, M., and Chandy, K. G. (1999) *The journal of Biological Chemistry* **274**(31), 21885-21892
63. Cole, A. M., Weis, P., and Diamond, G. (1997) *The journal of Biological Chemistry* **272**(18), 12008-12013
64. Karlsson, J., Putsep, K., Chu, H., Kays, R., Bevins, C., and Andersson, M. (2008) *BMC Immunology* **9**(1), 37
65. Wehkamp, J., Chu, H., Shen, B., Feathers, R. W., Kays, R. J., Lee, S. K., and Bevins, C. L. (2006) *FEBS Lett.* **580**(22), 5344-5350
66. Bosch, T. C. G., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Fraune, S., Hemmrich, G., Zill, H., Rosenstiel, P., Jacobs, G., Schreiber, S., Leippe, M., Stanisak, M., Grötzinger, J., Jung, S., Podschun, R., Bartels, J., Harder, J., and Schröder, J.-M. (2009) *Dev. Comp. Immunol.* **33**(4), 559-569
67. Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M. C., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1998) *EMBO J.* **17**(5), 1217-1227
68. Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., and Roch, P. (1999) *Journal of Cell Science* **112**(23), 4233-4242
69. Valore, E. V., Martin, E., Harwig, S. S., and Ganz, T. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**(7), 1624-1629
70. Sperandio, B., Regnault, B. a., Guo, J., Zhang, Z., Stanley, S. L., Sansonetti, P. J., and PÃ©ron, T. (2008) *The Journal of Experimental Medicine* **205**(5), 1121-1132
71. Allam, B., and Ford, S. E. (2006) *Fish Shellfish Immunol.* **20**(3), 374-383
72. Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., and Paillard, C. (2003) *Dis. Aquat. Org.* **57**(1-2), 109-116
73. Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., and Nicolas, J.-L. (2006) *Microbes Infect.* **8**(12-13), 2715-2724
74. Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., and Nicolas, J.-L. (2006) *Dev. Comp. Immunol.* **30**(4), 367-379
75. Mateo, D. R., Siah, A., Araya, M. T., Berthe, F. C. J., Johnson, G. R., and Greenwood, S. J. (2009) *J. Invertebr. Pathol.* **102**(1), 50-56

## Chapitre IV: Discussion et Perspectives

Ce travail de thèse avait pour principal objectif d'étudier la réponse physiologique d'un corail scléactiniaire soumis à des stress abiotique (température) et biotique (bactérie), et de mettre en évidence d'éventuels biomarqueurs précoces des dérèglements physiologiques associés. Ce travail a permis la mise au point de protocoles expérimentaux permettant l'étude de stress "écologiquement réalistes", c'est-à-dire se rapprochant le plus des conditions rencontrées en milieu naturel. Des approches transcriptomiques comparatives ont été mises en œuvre pour répondre aux objectifs fixés. Ces approches ont permis de mettre en évidence que sous l'action d'un stress thermique, 2 gènes, *PdC-Lectin* et *Pdcyst-rich*, sont réprimés bien avant l'apparition des symptômes du blanchissement (diminution de la densité en zooxanthelles et décoloration de la colonie). L'analyse des séquences a permis de montrer que la PdC-Lectin appartenait à la famille des lectines de type C avec une spécificité de reconnaissance pour le mannose. *Pdcyst-rich* présente quant à elle, un arrangement de cystéines caractéristique des protéines de la famille uPAR/Ly6/CD59/Toxine de serpent. Par la suite, l'analyse de la localisation de ces protéines dans les tissus coralliens par immunohistochimie a montré que la PdC-Lectin était localisée au sein de granules des cellules endodermiques et à l'interface entre des zooxanthelles libres et l'endoderme. *Pdcyst-rich* présente, quant à elle, une localisation granulaire dans l'ectoderme calicoblastique. Les approches de transcriptomiques comparatives effectuées sur les coraux confrontés aux bactéries, ont révélé 7 gènes très probablement impliqués dans la réponse immunitaire du corail, et dont l'expression est modulée différemment selon le type d'interaction (bactéries avirulentes ou virulentes) tout au long d'une cinétique d'exposition. Parmi ces gènes, 3 codent pour des protéines de la famille des lectines (PdC-Lectin, concanavalin A-like, selectin-P-like), 2 pour des protéines fixant des éléments métalliques (ferritine-like et selenium binding-protein-like), 1 pour une inhibitrice de protéase (cystatin-B-like) et le dernier pour un peptide antimicrobien (damicornin). Ce dernier a fait l'objet d'une étude plus approfondie. Il est localisé au sein de cellules granulaires de l'ectoderme oral, et son expression est fortement réprimée suite à l'invasion des tissus coralliens par les bactéries virulentes. Au terme de ce travail, les principaux résultats obtenus nous ont permis de proposer les interprétations suivantes: i) lors d'un stress thermique, les fonctions de croissance sont probablement altérées, et la reconnaissance moléculaire entre hôte et symbiote est perturbée voire interrompue ; ii) lors d'un stress biotique, la réponse immunitaire du corail est effective aussi

bien dans des conditions pour lesquelles la bactérie est virulente ou avirulente, en étant toutefois spécifique de chacune de ces conditions (différences entre conditions avirulente et virulente) ; iii) dans l'interaction *Pocillopora damicornis/Vibrio coralliilyticus*, la bactérie virulente module la réponse immunitaire de son hôte afin de l'infecter (cas de la damicornin et de la ferritine) ; iv) des molécules impliquées dans la réponse immunitaire semblent intervenir aussi bien dans les interactions hôte/symbiote que dans les interactions hôte/pathogène (PdC-Lectin) ; v) un panel de gènes semble être des biomarqueurs intéressants pour détecter précocement un blanchissement et la présence de bactéries pathogènes dans un état avirulent ou virulent.

#### **IV.1 Réponse physiologique au stress thermique**

Les travaux menés au cours de cette thèse sur la réponse physiologique précoce de *P. damicornis* ont montré qu'un stress thermique inducteur de blanchissement entraînait des changements (i) dans les fonctions de croissance du corail et (ii) les mécanismes régulateurs de la symbiose. En effet, grâce à un panel d'expériences portant sur la structure et l'expression des deux gènes identifiés lors d'une approche transcriptomique (hybridation soustractive), *Pdcyst-rich* et *PdC-Lectin*, les résultats obtenus ont permis d'émettre des hypothèses sur leur rôle putatif et leur utilité potentielle en tant que biomarqueurs. Ainsi, *Pdcyst-rich* participerait au processus de biominéralisation, alors que *PdC-Lectin* permettrait l'acquisition des zooxanthelles par le corail. Ces hypothèses ont été largement étayées dans la discussion présentée dans la publication n°1 (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). L'objectif du développement présenté ci-dessous est de replacer ces résultats dans un contexte plus large entre l'apparition de la photoinhibition et l'activation des mécanismes de dissociation de la symbiose.

##### *Entre stress oxydant et dissociation symbiotique*

Comme cela a été présenté dans l'introduction de ce manuscrit, la première fonction altérée lors d'un stress thermique est la photosynthèse, *via* le phénomène de photoinhibition (Lesser 2006; Venn *et al.* 2008; Weis 2008). Ce dysfonctionnement de la machinerie photosynthétique va induire, au travers de divers mécanismes, la génèse d'une grande quantité d'éléments oxydants, les ROS (Lesser 2006; Venn *et al.* 2008; Weis 2008). Les coraux et leurs zooxanthelles sont physiologiquement équipés pour répondre à ce type de stress, puisque naturellement déjà, ces deux organismes vivent alternativement en conditions d'anoxie et



d'hyperoxie (Richier *et al.* 2005). Certaines fonctions de détoxification, qu'elles soient enzymatiques ou non vont donc être induites. C'est notamment le cas des superoxydes dismutases, des catalases et autres glutathions (Lesser 1996; Downs *et al.* 2002; Franklin *et al.* 2004; Plantivaux *et al.* 2004; Yakovleva *et al.* 2004; Richier *et al.* 2005; Merle *et al.* 2007; Desalvo *et al.* 2008; Richier *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2009; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009). En même temps, et même s'ils sont en partie détoxifiés, les ROS et les températures élevées vont conduire à des dommages cellulaires, que ce soit au niveau de l'ADN, des membranes et des réserves lipidiques (peroxydation), ou des protéines (carbonylation ; Brown *et al.* 2002; Downs *et al.* 2002; Lesser & Farrell 2004; Richier *et al.* 2005). Ces dommages vont nécessiter une réparation rapide afin de préserver l'intégrité cellulaire. A ce stade, le corail survit et répond parfaitement au stress subi (Brown *et al.* 2002). Mais dans le cas d'un stress thermique prolongé et intense, les mécanismes de détoxification et de réparation finissent par être dépassés et l'issue est très souvent le blanchissement. Un stress prolongé conduit petit à petit à un épuisement physiologique, puisque d'une part, les zooxanthelles souffrant de photoinhibition ne fournissent probablement plus de photosynthates à leurs hôtes, et d'autre part, l'activation et le maintien à des niveaux élevés des fonctions de détoxification et de réparation des dommages cellulaires et moléculaires demandent au corail de mobiliser une quantité importante d'énergie (Bachok *et al.* 2006; Papina *et al.* 2007; Borell & Bischof 2008; Borell *et al.* 2008; Anthony *et al.* 2009). Afin de pallier ce déficit, le corail va pouvoir répondre de trois manières non exclusives : i) en augmentant l'importance de l'apport de nourriture par voie hétérotrophique (Grottoli *et al.* 2004; Grottoli *et al.* 2006; Rodrigues *et al.* 2008b; Ferrier-Pagès *et al.* 2010) ; ii) en inhibant la synthèse de protéines instables à haute température (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009) ; iii) et en réduisant ou stoppant des fonctions énergétiquement coûteuses et non essentielles à la survie comme la croissance par exemple (Desalvo *et al.* 2008; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009; Vidal-Dupiol *et al.* 2009). C'est dans ce dernier mécanisme que prend place la répression précoce de *Pdcyst-rich* (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). Ce mécanisme, pouvant être assimilé à un *trade-off*, permettrait alors une réallocation de l'énergie pour lutter contre le stress (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). A ce stade, le stress thermique est toujours présent et génère ainsi toujours plus de ROS, que ce soit au niveau des zooxanthelles ou de leur hôte, suite aux dommages de la membrane mitochondriale (Weis 2008). Si les mécanismes de détoxification des ROS, du maintien de l'homéostasie et de l'intégrité cellulaire sont dépassés, l'accumulation des ROS conduirait alors à l'activation du facteur de transcription immunitaire NF-kB (Weis 2008). Ce dernier initierait l'induction de la voie NOS et donc la production de NO (Weis 2008). En même temps, les zooxanthelles étant

la source d'un stress oxydant intense, elles pourraient induire une réponse immunitaire dont elles seraient la cible : elles ne seraient donc plus considérées comme symbiotes mais comme pathogènes à éliminer. Ce changement de statut pourrait également faire intervenir le NO qui semble être un messager clef de la communication entre hôte et symbiote (Weis 2008). La voie d'entrée en symbiose est alors inhibée afin d'empêcher l'acquisition de nouvelles zooxanthelles qui viendraient augmenter l'intensité du stress. Cette hypothèse pourrait être illustrée par la répression de *PdC-Lectin*, lectine très fortement suspectée d'être le médiateur de la reconnaissance entre l'hôte et le symbiote (Bulgheresi *et al.* 2006; Wood-Charlson *et al.* 2006; Vidal-Dupiol *et al.* 2009). D'autre part, le rôle d'opsonine que peut jouer certaines lectines de type C (Cambi & Figdor 2003) suggère que cette PdC-Lectin pourrait également être impliquée dans la phagocytose des zooxanthelles, et donc être un acteur central de l'initiation de la symbiose. En parallèle ou juste après le processus d'inhibition de la reconnaissance hôte / symbiote et de la génération des NO, la régulation homéostatique du  $Ca^{2+}$  intracellulaire est altérée par les ROS, et se matérialise par une augmentation importante de la concentration de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme des cellules (Desalvo *et al.* 2008). Ce phénomène serait lié, en partie, à la répression de plusieurs gènes régulateurs du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (calmodulin, EF-Hands protéine), à la modification des ryanodines receptors (protéines canal régulant l'efflux du  $Ca^{2+}$  stocké dans des vésicules intracellulaires) par les ROS, et par l'induction du relargage du  $Ca^{2+}$  mitochondrial par les NO (Desalvo *et al.* 2008). La combinaison du stress thermique, du NO et de l'augmentation du  $Ca^{2+}$  cytosolique pourrait conduire à des modifications d'autres fonctions telles qu'une diminution du métabolisme général, des réarrangements du cytosquelette, des modifications dans l'adhésion cellulaire, l'activation des voies de mort cellulaire, mais aussi l'arrêt ou le ralentissement de la calcification (Edge *et al.* 2005; Desalvo *et al.* 2008; Weis 2008; Voolstra *et al.* 2009). Dans le cas de stress thermique avec des températures particulièrement élevées des dénaturations de protéines apparaissent et s'accompagnent de l'induction de protéines de la famille des Heat Shock Protein (HSP ; Black *et al.* 1995; Hayes 1995; Sharp & Brown 1997; Tom *et al.* 1999; Hashimoto *et al.* 2004; Desalvo *et al.* 2008; Chow *et al.* 2009; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009). A ce stade, la cascade de mécanismes démarrant avec la production de ROS, conduit à l'activation des différentes voies de dissociation de la symbiose qui ont été listées et expliquées en introduction : dégradation intra-hôte/symbiophage, exocytose, détachement de l'unité symbiotique (cellule endodermique contenant le symbiote), apoptose et nécrose cellulaire (Weis 2008).

### *Déséquilibre des mécanismes de régulation des populations de zooxanthelles*

Nos résultats concernant la répression de *PdC-Lectin* ainsi que ces fonctions potentielles, nous permettent de proposer une nouvelle voie de dissociation symbiotique. Cette hypothèse repose sur le déséquilibre des mécanismes de régulation des populations symbiotiques, et part d'un constat : la symbiose apparaît fortement dynamique. Dans ce contexte, de nouvelles zooxanthelles en provenance du milieu extérieur seraient constamment acquises par le corail, et inversement, d'autres seraient constamment éliminées des tissus coralliens. Ce dernier point est relativement bien étayé dans la bibliographie. Ainsi, il a été démontré que les coraux régulaient leur population de symbiotes en réduisant leur vitesse de division, dans un premier temps, et en éliminant une partie de leurs zooxanthelles dans un deuxième temps (Muscatine *et al.* 1998). Ces éliminations passent d'une part par des expulsions hors de la cellule hôte et, d'autre part, par des dégradations *in situ* (Muscatine *et al.* 1998). Par ailleurs, chez la plupart des coraux, chaque cellule hôte ne contient qu'une seule zooxanthelle, bien qu'elle continue de se diviser (Muscatine *et al.* 1998). Il a d'ailleurs été montré chez plusieurs cnidaires symbiotiques que les zooxanthelles expulsées étaient majoritairement celles en cours de division ou récemment divisées (Baghdasarian & Muscatine 2000). Une autre voie de régulation implique la digestion des zooxanthelles qui fait appel au processus de symbiophagie qui conduit à la digestion de tous les symbiotes contenus au sein d'un symbiosome (Downs *et al.* 2009). Au final, que ce soit par expulsion ou symbiophagie, la cellule hôte se retrouve "vide" de tout symbiote et cherchera, pour revenir à un état d'équilibre symbiotique, à acquérir une nouvelle zooxanthelle. Cette acquisition peut passer par un transfert de zooxanthelle de cellule à cellule mais aussi par l'acquisition d'un symbiote libre provenant du milieu extérieur. En résumé, la symbiose serait donc très dynamique avec des pertes et des acquisitions permanentes de zooxanthelles. Pour exemple, le taux de zooxanthelles expulsées par jour pour *Apatasia pulchella* est d'environ 4,6% (Baghdasarian & Muscatine 2000). Comme nous l'avons montré précédemment, PdC-Lectin, protéine hôte permettant potentiellement la reconnaissance et l'acquisition des symbiotes, est réprimée précocement lors d'un stress thermique inducteur de blanchissement (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). Cette répression pourrait conduire alors à une forte diminution du taux d'acquisition de nouveaux symbiotes. Dans le même temps, si les pertes en zooxanthelles se maintiennent via les voies classiques de régulation, on arrive alors à une diminution drastique de la densité en zooxanthelles (Fig. 25). Ce nouveau mécanisme conduisant à une diminution de la densité en zooxanthelles pourrait être l'un des premiers à être initié durant le

blanchissement et pourrait donc représenter un biomarqueur précoce tout à fait pertinent dans le cadre de suivis.

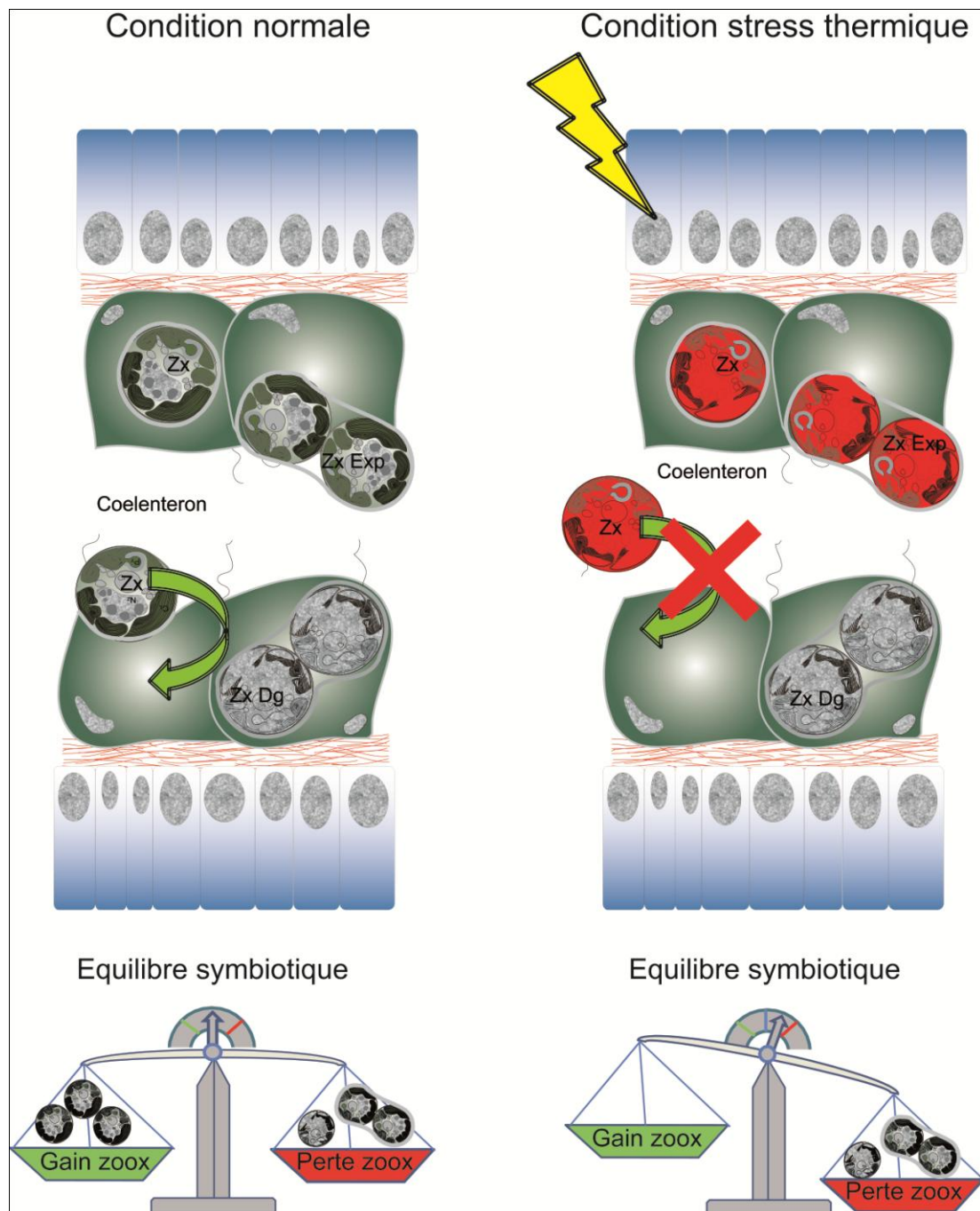


Figure 25 : conceptualisation de l'hypothèse "Imbalance in symbiont population regulation":  
 En conditions "normales", les zooxanthelles en division ou divisées sont éliminées, par dégradation in situ (Zx Dg) ou par expulsion (Zx Exp). Ces pertes sont équilibrées par les gains de nouvelles zooxanthelles. En condition de stress thermique, l'acquisition de nouvelles zooxanthelles est stoppée, or les mécanismes régulateurs de pertes des zooxanthelles continuent d'en éliminer, conduisant à un déséquilibre en faveur des pertes de zooxanthelles.

Par ailleurs et de façon intéressante, nos résultats montrent que *PdC-Lectin* est induit tout au long d'une interaction biotique de type virulente (stress bactérien couplé à un stress thermique). Durant cette expérience, les coraux ont subi des lyses tissulaires sans manifester de symptômes de dissociation symbiotique. En d'autres termes, les coraux infectés par des bactéries présentaient une induction de *PdC-Lectin* et n'ont pas blanchi. Ce type d'observation a, par ailleurs, été faite dans une autre étude, se focalisant sur les défenses immunitaires de *Montastraea faveolata* lors de l'évènement de blanchissement qui a touché les Caraïbes en 2005. Les relevés effectués ont parfaitement montré que les tissus atteints de la maladie de la bande jaune ne blanchissaient pas, alors que les colonies non infectées, étaient bien blanchies (Mydlarz *et al.* 2009). Ce dernier point pris en compte tend à confirmer de façon relativement convaincante le rôle central de PdC-Lectin dans la régulation de la symbiose. Son induction au cours de l'infection pourrait suggérer une dualité fonctionnelle avec un rôle dans l'immunité antibactérienne (anti-vibrion). Ainsi, induite face à ce stress pour assurer un rôle putatif d'opsonine par exemple, elle empêcherait le blanchissement corallien puisqu'elle continuerait à jouer son rôle dans l'acquisition des zooxanthelles.

#### **IV.2 Transcriptome et stress thermique chez d'autres modèles d'invertébrés marins**

La température constitue une pression de sélection majeure sur les organismes vivants et les ectothermes peuvent être confrontés à des amplitudes thermiques plus ou moins importantes selon les températures environnementales variables auxquelles ils sont confrontés (Somero *et al.* 1996). Ils seront sténothermes ou eurythermes si les variations à subir sont faibles ou importantes respectivement. Ainsi, des cas de sténothermie extrême ont été observés, tels que les poissons Antarctiques de la famille des notothenoïdes qui ne peuvent survivre qu'entre -1,86 et 4°C, de même que des cas d'eurythermie extrême tels que le gobie *Gillichthys seta* pouvant supporter des variations de température de plus 32°C (Somero *et al.* 1996). Cette tolérance, plus ou moins grande aux variations de température, est le fruit de nombreuses adaptations physiologiques, notamment d'un point de vue moléculaire (composition en acides aminés des enzymes, fluidité des membranes, régulation génique... ; Somero *et al.* 1996; Podrabsky & Somero 2004; Somero 2004). S'il apparaît fondamental d'aborder les variations de température auxquelles est confronté un organisme pour appréhender sa réponse à un stress thermique, il est aussi fondamental d'intégrer ses "mœurs". Ainsi, lors d'un stress environnemental, les organismes sessiles seront dans l'obligation de le "supporter" via leurs réponses physiologiques alors que des organismes vagiles pourront, dans

une certaine mesure, éviter physiquement ce stress. Dans ce contexte la suite de cette partie portera sur la comparaison des réponses transcriptomiques des scléactiniaires à celles d'autres espèces d'invertébrés marins, plus ou moins mobiles, lorsqu'ils sont confrontés à un stress thermique.

Lors d'un stress thermique, les fortes températures vont conduire à des dénaturations de protéine. Dans ces conditions et afin de maintenir l'homéostasie de la cellule, des protéines chaperonnes vont être induites afin de maintenir la structure de ces protéines dans une forme non dénaturée. Cette famille, les Heat Shock Protein (HSP), a été très largement étudiée lors de la réponse au stress thermique. Ainsi, il a été montré que les gènes codant ces protéines (principalement HSP 70) étaient induits lors de températures anormalement hautes chez de nombreux invertébrés marins tel que l'huître *Crassostrea gigas* (Meistertzheim *et al.* 2007; Farcy *et al.* 2009), les moules *Mytilus trossulus*, *M. galloprovincialis* et *Bathymodiolus thermophilus* (Boutet *et al.* 2009; Lockwood *et al.* 2010) ou encore le concombre de mer *Apostichopus japonicus* (Dong *et al.* 2009). De telles inductions ont également été mesurées chez les scléactiniaires (Sharp & Brown 1997; Desalvo *et al.* 2008; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009).

Outre la dénaturation des protéines, des températures anormalement hautes vont également être génératrices de radicaux libres oxygénés (ROS). Ainsi de nombreuses molécules antioxydantes, enzymatiques ou non enzymatiques, sont induites lors de ces épisodes. Chez l'ormeau *Haliotis discus discus*, les gènes codant les enzymes de type catalase, thioredoxine reductase et glutathione peroxydase sont induits suite à des stress thermiques d'intensité variable (De Zoysa *et al.* 2009). Chez l'huître *C. gigas*, ces fonctions de detoxification sont également induites, notamment les gènes codant les molécules de type methallothioneine et glutathione peroxydase (Meistertzheim *et al.* 2007; Farcy *et al.* 2009). Dans le cadre des coraux symbiotiques, la surexpression de protéines antioxydantes est également utilisée pour lutter contre le stress oxydant (Desalvo *et al.* 2008; Voolstra *et al.* 2009).

Lorsque les températures augmentent, le risque de déstabilisation des membranes plasmiques augmente. En réponse, il a été démontré que la composition en phospholipide (favorisation des acides gras saturés) mais aussi l'inclusion de groupement cholestérol permettait de réduire la fluidité des membranes et donc de limiter les risques de rupture. Relativement bien documentés chez les ectothermes vertébrés (Portner *et al.* 2007) ces mécanismes le sont moins chez les invertébrés. A ma connaissance, il n'ont été appréhendés que chez l'huître *C. virginica* par l'utilisation de méthodes quantitatives et qualitatives des

acides gras et du cholestérol (Pernet *et al.* 2007), et aucune étude transcriptomique n'a été menée à ce jour chez un invertébré marin.

La mise en place des moyens de protection décrits ci-dessus est énergétiquement couteuse. C'est probablement la raison de nombreux ajustements des fonctions de base de la cellule lors des stress thermiques. Ainsi, il a été montré chez l'huitre *C. gigas* que des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et de l'azote étaient induits en réponse à une demande importante et rapide d'énergie (Meistertzheim *et al.* 2007). D'autre part, il a également été proposé que les diminutions dans l'expression de nombreux gènes non directement liés à la réponse au stress thermique étaient probablement un moyen d'économiser cette énergie et donc de la rendre disponible pour la lutte contre le stress. Dans ce contexte, la machinerie de synthèse des protéines se trouve ralentie et de nombreux gènes sont réprimés. Ce phénomène a été identifié chez l'huitre *C. gigas* (Meistertzheim *et al.* 2007) mais aussi chez les scléactiniaires *Montastraea faveolata* et *Acropora millepora* (Edge *et al.* 2005; Desalvo *et al.* 2008; Voolstra *et al.* 2009). Les fonctions immunitaires apparaissent également modifiées lors du stress thermique chez différents modèles. C'est le cas chez l'ormeau *H. discus discus* où un suppresseur de cytokine et un gène de résistance au myxovirus sont réprimés (De Zoysa *et al.* 2009), mais aussi chez certains cnidaires où ce sont des gènes codant de potentiel *Pattern Recognition Receptor* (PPR) de type lectine qui sont réprimés (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009; Vidal-Dupiol *et al.* 2009).

Les coraux hermatypiques étant des organismes formant une symbiose phototrophe, il est également intéressant de se concentrer sur les régulations géniques initiées chez des algues soumises à des stress thermiques. Bien qu'encore relativement peu étudiées, il ressort que les principales fonctions impliquées dans la cytoprotection sont induites comme chez les invertébrés marins. C'est notamment le cas des gènes codant les protéines chaperonnes de la famille des HSP chez la diatomée *Chaetoceros neogracile* (Hwang *et al.* 2008), chez *Zostera marina* (Bergmann *et al.* 2010), mais aussi chez des zooxanthelles du clade C (Rosic *et al.* 2011). Autre similitude avec les invertébrés marins, l'induction de gènes codant des protéines impliquées dans la lutte contre le stress oxydant (monoascorbate reductase, glutaredoxin, glutathione peroxydase, glutathione S-transferase...) a été rapportée chez *C. neogracile* (Hwang *et al.* 2008). Il est cependant intéressant de noter que l'expression des gènes spécifiques au règne photosynthétique est également altérée. Ainsi, un grand nombre de gènes impliqués dans la synthèse d'éléments clefs de la fonction photosynthétique (fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein, light harvesting complexe protein, photosystem II extrinsic protein...) sont réprimés chez *C. neogracile* ce qui suggère une forte perte dans les apports

énergétiques (Hwang *et al.* 2008). Les études transcriptomiques réalisées chez les zooxanthelles et plus généralement chez les algues unicellulaires restent rares aujourd'hui ; hors ce type d'approche manque cruellement afin d'obtenir une vision plus complète des modifications induites lors des stress thermiques, que ce soit chez les algues ou chez les coraux hermatypiques. Chez ces derniers, c'est d'autant plus important car les limites physiologiques des coraux et de leurs symbiotes s'additionnent pour former les limites physiologiques de l'holobionte. Des expériences de stress thermique sur des coraux maintenus en cycle nuit/jour 12h/12h ou 24h/0h ont montré que dans le noir, la tolérance au stress thermique est largement accrue. Ce point suggère que l'organisme "limitant" les capacités de tolérance thermique de l'holobionte est le symbiote plutôt que le corail. Ce dernier point conforte donc l'importance d'études ciblées sur la réponse du symbiote en conditions hyperthermiques.

Au vu des comparatifs effectués dans les paragraphes précédents, il ressort que ce sont les même types de fonctions moléculaires qui sont induits ou réprimés dans les différents modèles d'invertébrés marins présentés. En résumé, il y a une induction des gènes de la famille des HSP, des gènes codant des protéines antioxydantes, et un ensemble de fonctions régulées afin de maximiser la disponibilité en énergie. Ce point est d'autant plus intéressant qu'au sein des modèles présentés, certains sont des sténothermes (scléactiniaire) et d'autres des eurythermes (huitre, moule, ormeau et holothurie), avec pour certains groupes la présence d'écotype plus ou moins sténotherme ou inversement eurytherme. Cette caractéristique a permis d'effectuer au sein d'une même espèce des comparaisons de thermotolérance en lien avec la quantité d'éléments cytoprotecteurs induits lors du stress ou constitutivement présents. Ainsi chez le concombre de mer *A. japonicus* l'écotype le plus eurytherme maintient un niveau constitutif d'HSP plus élevé et présente une induction plus rapide des gènes codant les HSP, que l'écotype moins eurytherme (Dong *et al.* 2009). Ce type de phénomène a également été mesuré chez un gastéropode marin, *Nucella canaliculata* (Hofmann 2005) et chez le scléactiniaire *Goniastrea aspera* qui présentent des éléments antioxydants et des HSP en plus grande quantité chez les individus les plus thermotolérants (Brown *et al.* 2002). Les bases moléculaires de l'eurythermie et de la sténothermie sont aujourd'hui bien moins étudiées chez les invertébrés ectothermes que chez les vertébrés ectothermes. Cependant la grande conservation des mécanismes d'adaptation mis en place chez les ectothermes vertébrés pour supporter les variations de température, laisse supposer que les mêmes types de mécanismes pourraient être présents chez les invertébrés marins. Ce type d'étude est très certainement à envisager dans l'avenir et permettrait, en lien avec la connectivité des populations, de mieux



appréhender les réponses futures des invertébrés marins confrontés au réchauffement climatique. Dans le cas des scléactiniaires, la très grande répartition géographique de notre espèce modèle, *Pocillopora damicornis*, permettrait par exemple l'étude des adaptations à la température des enzymes chez des populations soumises à de très grandes variations de température par comparaison à celles confrontées à de faibles variations.

### **IV.3 Blanchissement, adaptation locale, et résilience**

#### *Adaptation et température*

Certaines espèces de scléactiniaires présentent une aire de répartition très large et sont soumises à des régimes de température très contrastés. C'est notamment le cas de *P. damicornis*, que l'on rencontre sur la plupart des récifs de l'Indo-Pacifique, de la Mer Rouge et du Golfe Persique. Des populations de cette espèce semblent donc bien adaptées à des conditions thermiques différentes. Les populations de *P. damicornis* du Golfe Persique sont soumises à des températures très élevées durant l'été (maximum moyen à 30,9°C, avec des pics réguliers à 32-33°C), et blanchissent lors des années anormalement chaudes (Benzoni *et al.* 2006). Les populations de Moorea (Polynésie française) sont adaptées à des températures moins élevées (maximum moyen à 28,7°C) et blanchissent lorsque la température dépasse 29,2°C et est maintenue durant au moins 6 semaines (Hoegh-Guldberg & Salvat 1995). Ce phénomène d'adaptation locale a été validé par une étude mettant en parallèle la tolérance thermique et la génétique de différentes populations chez une autre espèce de scléactiniaire, *Acropora millepora* (Smith-Keune & van Oppen 2006).

Afin d'appréhender les bases fonctionnelles de cette adaptation chez le corail, une étude comparant le transcriptome de larves aposymbiotiques de *Montastraea faveolata* issues de zones aux caractéristiques thermiques contrastées a été développée ; elle a montré la présence de *patterns* d'expressions communs, mais aussi des différences majeures dans diverses fonctions (Polato *et al.* 2010). Cette étude vient donc soutenir l'hypothèse que le génome hôte peut abriter un potentiel adaptatif fonctionnel permettant la colonisation d'environnements contrastés. Ce travail a été réalisé sur des larves aposymbiotiques de manière à exclure la composante adaptative liée au symbiote. Si l'adaptation et/ou l'acclimatation peuvent effectivement impliquer le corail, dans cette association symbiotique, le symbiote peut présenter également des capacités d'adaptation et d'acclimatation. C'est ce qui a été appréhendé pour une même espèce de corail : il a été montré que des populations de

*Symbiodinium* thermotolérantes pourraient être majoritaires dans les zones plus chaudes en comparaison avec des populations de coraux occupant des zones plus fraîches (Baker 2003).

#### *L'hypothèse du blanchissement adaptif : adaptation ou acclimatation ?*

Dans un contexte de changement climatique conduisant à des événements de blanchissement de plus en plus fréquents, ce concept d'adaptation de l'holobionte à des températures plus chaudes, a donné naissance à l'hypothèse du blanchissement adaptatif (*adaptive bleaching hypothesis*, ABH). Cette hypothèse stipule que les coraux ayant blanchis pourraient être réinfestés par des symbiotes de clades plus résistantes aux fortes températures (clade D par exemple). Cette hypothèse reste encore très discutée et de nombreux résultats contradictoires sont présents dans la bibliographie. Ainsi, Berkelmans & van Oppen (2006) ont montré, suite à des expériences de transplantation, que des colonies originaires de zones "froides" s'adaptaient à des conditions chaudes par un changement dans leurs assemblages de zooxanthelles. A l'inverse, Abrego *et al.* (2008) ont montré que les colonies d'*Acropora tenuis* contenant un clade considéré comme thermotolérant (clade D) étaient moins résistantes à des augmentations de température que celles associées à des clades considérés comme thermosensibles (C1 et C2), démontrant ainsi l'importance de la part phénotypique de l'hôte dans ces capacités de résistance (Abrego *et al.* 2008; Polato *et al.* 2010). Par ailleurs, il a été montré que si de nouvelles associations symbiotiques pouvaient être initiées après un blanchissement, celles-ci n'étaient pas forcément stables et que des retours vers l'association initiale étaient fréquents (Thornhill *et al.* 2006; Coffroth *et al.* 2010).

#### *Des signes d'adaptation/d'acclimatation sur le terrain*

Les études de terrain, notamment celles intégrant des séries temporelles longues, ont également apporté une vue nouvelle sur les capacités d'adaptation/d'acclimatation des coraux face aux augmentations de température. Ainsi, des suivis réalisés sur les récifs de Moorea et ceux au large de Townsville sur la Grande Barrière de Corail montrent que les premiers stress thermiques subis ont conduit à des blanchissements de masse (les colonies blanchissent quelques jours/semaines après le début du stress) avec des mortalités importantes, alors que des événements récents de même intensité ont également induit des blanchissements, mais avec peu ou pas de mortalités à l'issue de la perturbation (Maynard *et al.* 2008; Adjeroud *et al.* 2009; Penin *et al.* en révision). En d'autres termes, les scléactiniaires restent susceptibles au stress thermique et blanchissent, mais il semblerait qu'ils aient acquis les moyens de survivre à ces stress. Cette plus grande tolérance est fondamentale car la survie permet l'adaptation

et/ou l'acclimatation à long terme. Cependant, compte tenu de la difficulté à identifier avec précision certaines espèces de coraux, certaines études se placent très souvent à l'échelle du genre, et il est possible que ces diminutions des taux de mortalité soient plutôt dues à des phénomènes de sélection d'espèces plus résistantes qu'à de l'acclimatation ou de l'adaptation. Par ailleurs, la difficulté de caractériser avec précision un stress en milieu naturel rend la comparaison entre perturbations délicate, et il est donc possible que ces stress successifs ne soient finalement pas similaires, expliquant ainsi les différences des mortalités observées. Les expérimentations en milieu contrôlé restent finalement la meilleure voie pour évaluer ces capacités d'acclimatation et/ou d'adaptation à des stress thermiques successifs.

### *Résistance et résilience des colonies soumises à des stress thermiques*

Lors de nos expérimentations en milieu contrôlé sur l'étude du stress thermique, nous avons pu observer des phénomènes de résilience. Pour cela, des colonies ayant blanchi ont été replacées en conditions thermiques non stressantes. Toujours dans l'objectif de s'approcher le plus possible des conditions naturelles, ces colonies ont été maintenues au sein d'un circuit d'eau hébergeant plus de 40 espèces de coraux symbiotiques. Ces conditions permettaient d'offrir aux colonies blanchies une grande diversité de clades de zooxanthelles pour une éventuelle ré-infestation. Ces colonies ont très vite (3 jours environ) rouvert leurs polypes, puis ont été recolonisées par des zooxanthelles (après plusieurs mois).

Au vu de ces résultats, des expériences de blanchissements successifs (utilisant le protocole décrit par Vidal-Dupiol *et al.* 2009) ont été effectuées (Fig. 26). Ainsi, des colonies génétiquement identiques ont été soumises à plusieurs blanchissements expérimentaux successifs et espacés d'une année (Fig. 26), ce qui correspond à la durée minimale séparant 2 événements de blanchissement en milieu naturel. Au final, et pour un même génotype, nous disposons de colonies n'ayant jamais blanchi, de colonies ayant blanchi et résilié 1 fois, de colonies ayant blanchi et résilié 2 fois et de colonies ayant blanchi et résilié 3 fois. Bien que les résultats soient très préliminaires, nous avons pu observer que plus les colonies ont blanchi et résilié, plus elles deviennent tolérantes aux stress thermiques suivants. Le terme de tolérance semble ici parfaitement adapté, car les colonies ayant subi plusieurs blanchissements, continuent à blanchir. Cependant, en comparaison à des colonies jamais blanchies, la dissociation symbiotique intervient plus tardivement, de même que l'apparition de mortalité partielle (au sein d'une même colonie) ou de mortalité totale de la colonie (Fig. 26). Les données disponibles actuellement sur ces échantillons ne permettent pas de connaître l'artisan de cette tolérance (l'hôte ou/et symbiote). En effet, un changement dans les

peuplements symbiotiques est parfaitement envisageable. Cependant, de plus en plus d'études montrent que la partie hôte ne doit pas être négligée dans ces phénomènes de tolérance, résistance et résilience. Ce travail représente un socle solide pour des études plus approfondies qui se focaliseraient sur les mécanismes sous-jacents (changement de la composition en zooxanthelles, mécanismes épigénétiques chez l'hôte,...).

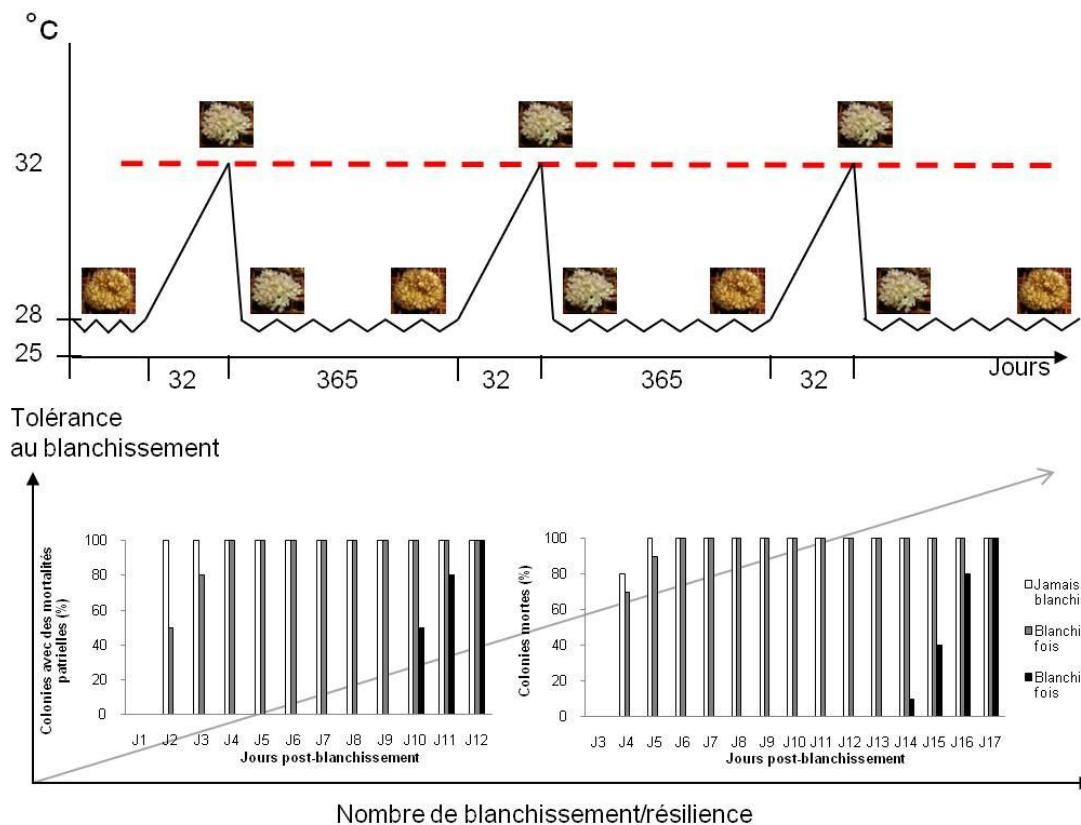


Figure 26 : stress thermiques successifs et tolérance au blanchissement.

Des colonies de *P. damicornis* ont été soumises à 3 blanchissements successifs, chacun d'eux étant séparés par une année ce qui a permis l'obtention d'une résilience totale. Les observations menées (durée du stress avant apparition du blanchissement, durée du stress avant l'apparition de mortalités partielles intra-coloniales, et durée du stress avant mortalités totales) suggèrent une augmentation de la tolérance au stress thermique. Plus les coraux ont blanchi et résilié, plus ils blanchissent tardivement, plus les mortalités partielles intra-coloniales et les mortalités totales arrivent tardivement.

### *L'hypothèse épigénétique dans l'adaptation fonctionnelle au réchauffement climatique*

L'adaptation peut être vue sous deux angles différents. D'un côté, l'adaptation génétique, qui passe par les voies classiques de l'évolution moléculaire, mutation, acquisition de nouvelles fonctions ou perfectionnement de fonctions déjà existantes, puis, par la sélection naturelle, fixation et propagation au travers de la reproduction (sexuée ou asexuée). De façon générale, ce type d'adaptation darwinienne est longue à se mettre en place, d'autant plus quand le temps de génération de l'espèce est long (comme pour les coraux). Elle est cependant

transmissible à 50% à la descendance une fois le caractère fixé dans la population. De l'autre côté, l'adaptation fonctionnelle, qui passe par des modifications épigénétiques, dont la principale caractéristique réside dans un changement de l'expression des gènes pouvant augmenter, diminuer ou "allumer" des fonctions présentes dans le génome. Ces modifications conduiraient à l'apparition de phénotypes nouveaux ayant une valeur sélective plus élevée. Cette adaptation dite fonctionnelle se démarque de l'acclimatation, car elle peut se transmettre tout en restant réversible. Cette transmission pourrait se faire en partie lors de la reproduction sexuée (transmission partielle lors de la méiose) et à 100% lors de la reproduction asexuée (transmission totale lors de la mitose). Ce dernier point apparaît particulièrement intéressant dans le cadre des coraux puisque la clonalité peut représenter une partie importante de la multiplication des coraux au sein des populations locales, notamment chez notre espèce modèle, *Pocillopora damicornis*.

#### **IV.4 Réponse immunitaire antibactérienne chez les scléactiniaires**

Les travaux menés au cours de cette thèse sur la réponse physiologique de *Pocillopora damicornis* confrontée à un stress biotique ont permis de mettre en évidence de nouveaux acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire innée. Ces derniers peuvent être classés en 3 grandes catégories : i) les molécules de type lectine, impliquées dans la liaison à des groupements carbohydrates (une lectine de la famille des lectines de type C, PdC-Lectin ; une lectine de la famille des sélectines, sélectine-P et une autre de la famille des concanavalines) ; ii) un effecteur antimicrobien le peptide antimicrobien (AMP) damicornin impliqué dans l'élimination et/ou la protection constitutive de l'organisme contre des pathogènes ; iii) les molécules limitant l'effet ou le développement du pathogène (ferritine, selenium-binding protein et cystatine B). Les deux premiers groupes peuvent être considérés comme des acteurs directs de la réponse immunitaire car ils interagissent directement avec le pathogène. Le troisième groupe va permettre de limiter l'impact du pathogène et/ou son développement ce qui lui confère un rôle de facilitateur de la réponse immunitaire. Bien que le rôle de ces acteurs moléculaires au sein de la réponse immunitaire n'ait pu être entièrement démontré au cours de cette thèse, les résultats concernant l'expression de ces gènes et les données bibliographiques permettent néanmoins de le suggérer très fortement. Ce paragraphe propose de replacer ces acteurs moléculaires au sein des connaissances actuellement disponibles sur l'immunité des scléactiniaires.

### *Le mucus : première barrière immunitaire*

De façon générale, que ce soit pour les invertébrés ou les vertébrés, les couches épithéliales constituent une barrière physique contre les infections. Dans le cas des scléactiniaires, la structuration très simple en deux feuillets cellulaires ne permet pas la mise en place d'un véritable épithélium protecteur tel qu'observé chez des animaux plus complexes (Bosch 2008). Les scléactiniaires vont en revanche sécréter en permanence un mucus riche en polysaccharide acide *via* des cellules spécialisées localisées dans l'ectoderme oral (Mullen *et al.* 2004). Un système ciliaire constitué par un ensemble de cellules ciliaires localisées dans l'ectoderme oral, va permettre une évacuation permanente du mucus, qui sera en parallèle constamment renouvelé (Mullen *et al.* 2004). Cette "barrière" permet dans un premier temps de capturer et de fixer les pathogènes potentiels venant au contact et, dans un deuxième temps, de les éloigner physiquement des couches cellulaires situées sous la barrière muqueuse (Mullen *et al.* 2004; Bosch 2008). Afin de maximiser cette fonction de première barrière immunitaire, le mucus est enrichi en molécules antimicrobiennes, dont la quantité peut être fortement augmentée lors de blessures (Geffen & Rosenberg 2005; Kelman *et al.* 2006; Geffen *et al.* 2009). Cette notion de réponse immunitaire *via* le mucus a été confortée par nos résultats portant sur l'expression de la damicornin à l'échelle transcriptomique et protéomique (Vidal-Dupiol *et al.* en révision). La damicornin est vraisemblablement sécrétée dans le mucus corallien, comme le suggère sa localisation au sein de cellule granulaire de l'ectoderme oral, et le peptide signal de son précurseur. Cette sécrétion dans le mucus est d'ailleurs largement rencontrée chez d'autres modèles animaux (Ferrandon *et al.* 1998; Mitta *et al.* 1999; Bosch *et al.* 2009). D'autre part, les résultats portant sur l'analyse de l'expression de la damicornin montrent qu'en absence de stimulus immun, la damicornin est transcrite et stockée sous forme inactive. Lors d'un stimulus immun sans franchissement de la barrière épithéliale, il n'y a pas d'induction transcriptionnelle mais sécrétion de la forme active de l'AMP. Par contre, lors de la pénétration de pathogène dans les tissus, la réponse est augmentée *via* une induction de l'expression du gène codant la damicornin. Dans tout les cas, ces résultats montrent bien que l'expression de ce peptide est régulée à différents niveaux transcriptionnel et post-traductionnel et que ces phénomènes peuvent être modulés selon les conditions de virulence bactérienne à l'extérieur comme à l'intérieur des tissus.

### *Les lectines, reconnaissance et opsonisation*

Dans le cas où la barrière physique constituée par le mucus est traversée, 2 des défenses les plus importantes mises en place lors de la réponse immunitaire innée sont la phagocytose et l'activation du système du complément détruisant directement certains agents pathogènes et facilitant la phagocytose (DeFranco *et al.* 2009). L'activation de ces 2 mécanismes passe avant tout par la reconnaissance du pathogène. Cette dernière, dans le cas d'une localisation extracellulaire est largement induite par des protéines de type lectine reconnaissant les groupements carbohydrates de surface des pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs). Chez l'homme, cette fonction de reconnaissance est jouée par les collectines (mannose binding lectin, MBL) et les ficolines (DeFranco *et al.* 2009). Pouvant s'organiser en multimères, ces protéines vont venir se fixer aux composés carbohydrates présents à la surface de l'agent pathogène. Les complexes immuns ainsi formés vont soit être reconnus par les phagocytes qui vont utiliser ces lectines comme des opsonines soit déclencher la cascade du complément suite à des changements conformationnels des lectines (DeFranco *et al.* 2009). Chez les scléroustiniens, deux MBLs, la millectin d'*Acropora millepora* (Kvennefors *et al.* 2008) et la PdC-Lectin de *Pocillopora damicornis*, ont été identifiées (Vidal-Dupiol *et al.* 2009; Vidal-Dupiol *et al.* in press). La millectin est caractérisée par une grande variabilité au niveau de la zone de fixation du substrat, et sa capacité d'accrochage à des zooxanthelles et à des bactéries pathogènes (Kvennefors *et al.* 2008; 2010). Localisée dans les nematocystes et dans certaines cellules de l'endoderme où elle est présente dans des granules, elle est très probablement sécrétée (peptide signal présent en N-terminal ; Kvennefors *et al.* 2008; 2010). Il a également été démontré que, suite à une stimulation immune avec du LPS ou du peptidoglycan, la transcription du gène codant la millectin était induite (Kvennefors *et al.* 2010). Concernant la PdC-Lectin, elle semble jouer un rôle clef dans les relations hôte/symbiote (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). Présentant un peptide signal en région N-terminal et localisée dans des granules des cellules de l'endoderme, PdC-Lectin est, comme la millectin, très probablement sécrétée (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). Nos travaux ont montré que sous l'action d'un stress biotique de type virulent (donc avec franchissement de la barrière muqueuse) elle était induite jusqu'à l'épuisement physiologique de l'organisme (Vidal-Dupiol *et al.* 2009). Ce type de réponse transcriptomique impliquant des lectines a été mis en évidence dans d'autres modèles d'invertébrés soumis à des *stimuli* similaires (O'Rourke *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007; Gowda *et al.* 2008; Soonthornchai *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010). Par analogie, la phagocytose de la zooxanthelle peut être comparée à celle d'un pathogène. C'est le devenir du phagosome qui change. Dans le premier cas, ce

dernier est maintenu dans un stade immature alors que celui contenant le pathogène fusionnera avec les lysosomes (Chen *et al.* 2003; 2004; 2005). Dans le cas de l'initiation de la symbiose, il a été démontré que ce sont les interactions lectine hôte/glycan symbiote qui étaient cruciales dans l'initiation de la symbiose et la phagocytose du symbiote (Wood-Charlson *et al.* 2006). PdC-Lectin et la millectin se fixant aux zooxanthelles, elles semblent donc parfaitement capables de participer directement (par un rôle d'opsonine) ou indirectement (via d'autres molécules encore inconnues et participant à la formation d'un complexe) aux événements précoces de la phagocytose que ce soit dans le cadre de la symbiose ou de la réponse immunitaire. Bien que moins étudiée que la millectin ou la PdC-Lectin, la concanavalin (Vidal-Dupiol *et al.* in press) montre un *pattern* d'expression en tous points similaire à celui de PdC-Lectin lors des stress biotiques pratiqués (Vidal-Dupiol *et al.* in press). Ce point permet donc de poser l'hypothèse qu'elle puisse également participer aux mêmes fonctions que la PdC-Lectin mais en se fixant à des groupements carbohydrates différents.

#### *Les lectines et l'activation du complément*

La cascade du complément peut être définie comme étant une suite de réactions faisant intervenir diverses protéines, et permettant de faire le lien entre la reconnaissance des microbes par des facteurs solubles et les mécanismes qui les détruisent (DeFranco *et al.* 2009). Le déclenchement de cette cascade conduit à l'activation de la réponse inflammatoire, à l'attraction des phagocytes, à la stimulation de la phagocytose par l'opsonisation et à l'attaque directe des microorganismes par le complexe d'attaque membranaire (DeFranco *et al.* 2009). Chez des organismes ne disposant pas d'immunité adaptative, la voie du complément peut être activée selon deux modes : i) par des facteurs solubles de type lectine qui reconnaissent des groupements carbohydrates présents à la surface des pathogènes (la voie lectine) ; ii) directement à la surface des cellules microbiennes (la voie alterne). Dans la voie des lectines (principalement celles liant le mannose), ces dernières se trouvent complexées avec des sérines protéases, les MASPs, qui sont maintenues sous forme inactive tant que le récepteur immun n'est pas lié à un groupement carbohydrate. Lors de cette liaison, les modifications conformationnelles induites vont conduire à l'activation des MASPs qui vont cliver et par la même activer les éléments précoces de la cascade du complément, les facteurs C2 et C4 (DeFranco *et al.* 2009). Par une suite de clivages successifs de divers facteurs, ces étapes vont conduire à l'activation par clivage du facteur C3 en C3a et C3b, éléments prépondérants dans l'initiation des mécanismes de destruction des pathogènes (DeFranco *et al.*



2009). En effet, C3b va d'une part jouer le rôle d'opsonine en venant se fixer à la surface des bactéries, mais, suite à une nouvelle série d'activation, va former d'autre part le complexe d'attaque membranaire qui constitue des pores dans les membranes bactériennes (DeFranco *et al.* 2009). Lors de cette dernière cascade, le C5a sera libéré et avec le C3a induira la réponse pro-inflammatoire (DeFranco *et al.* 2009). Chez les scléactiniaires, cette voie du complément n'a pas été identifiée, cependant des données moléculaires récemment obtenues suggèrent qu'elle pourrait exister. En effet, des protéines similaires au facteur C3 et celles impliquées dans la formation du complexe d'attaque membranaire ont été identifiées (Miller *et al.* 2007; Kvennefors *et al.* 2010). Des protéines similaires aux MASPs n'ont pour l'instant pas été identifiées chez les scléactiniaires, mais elles l'ont été chez un autre anthozaire, une anémone (Kimura *et al.* 2009). La grande proximité taxonomique des anémones et des scléactiniaires (tous deux des anthozoaires) laisse supposer que les MASPs pourraient être présentes chez les scléactiniaires. La présence chez les scléactiniaires de lectines reconnaissant le mannose, leur rôle très probable dans la phagocytose et la présence de divers éléments clefs du complément, constituent un ensemble d'indices qui permettent de suggérer fortement l'existence d'une voie du complément analogue à celle des mammifères chez les scléactiniaires.

#### *Toll like receptor (TLR), NF-kB et réponse inflammatoire*

On connaît aujourd'hui très bien le rôle clé joué par les TLR tant chez les invertébrés (Imler & Hoffmann 2002) que les vertébrés (DeFranco *et al.* 2009). Chez les anthozoaires, des protéines de type TLR ont été identifiées chez divers organismes : l'anémone *Nematostella vectensis* et les scléactiniaires *Acropora millepora* et *A. palmata* (Miller *et al.* 2007; Dunn 2009). Leur fonction n'a pas été étudiée chez les anthozoaires. Concernant les hydraires, ils ne possèdent pas de TLR à proprement dit. En effet, chez ces derniers, les domaines LRR et TIR (contenus dans les TLR "classiques") ne sont pas rassemblés en une seule protéine, ce qui est par contre le cas chez les anthozoaires (Miller *et al.* 2007; Bosch 2008). Chez les deux hydres étudiées, l'induction de la sécrétion d'AMP lors d'un stimulus immun est sous le contrôle de ses récepteurs de type TLR. L'activation de la réponse immunitaire passe par l'interaction entre la protéine portant le domaine LRR fixé à l'antigène et la protéine contenant le domaine TIR qui transmettra le signal de reconnaissance du pathogène et initiera la réponse inflammatoire et antimicrobienne (Bosch *et al.* 2009). Les éléments des voies de transduction de signaux participant habituellement à la régulation de ces *processi* n'ont pas été identifiés chez les cnidaires à ce jour. Cependant, la présence d'un homologue de NF-kB chez

le corail *A. millepora* permet de proposer l'hypothèse que ce facteur de transcription chez les scléactiniaires puisse participer à ces phénomènes. La présence des TLR et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B au sein des banques EST ou des séquences génomiques de plusieurs scléactiniaires constitue un argument de poids pour soutenir que les voies immunitaires dans lesquelles ils sont impliqués puissent être présentes et fonctionnelles, étant donné que ces dernières sont très conservées au fil de l'évolution (Hemrich *et al.* 2007).

### *Réponse inflammatoire chez les scléactiniaires*

La réponse inflammatoire peut être définie comme étant l'ensemble des mécanismes mis en place pour détruire ou limiter le développement d'un agent infectieux. Elle est initiée très rapidement après la détection via les PRR d'agents pathogènes localisés dans les tissus ou les cellules. Chez les mammifères, la réaction inflammatoire conduit à l'activation de 4 mécanismes : i) l'augmentation de la perméabilité vasculaire pour permettre l'apport de facteurs immunitaires solubles ; ii) l'activation de cellules tueuses naturelles ; iii) l'activation des phagocytes pour stimuler leur action microbicide ; iv) la modification des propriétés d'adhérence des épithéliums afin de favoriser la concentration en phagocyte au site d'infection (DeFranco *et al.* 2009). Dans le cas des scléactiniaires, l'absence de vascularisation et de cellules tueuses naturelles font que les deux premiers mécanismes ne peuvent pas être développés. En revanche, de nombreux arguments étayent l'implication des deux autres mécanismes de l'inflammation, la modification des propriétés d'adhérence des épithéliums et l'activation des phagocytes. Chez les mammifères, le recrutement des cellules phagocytaires sur le lieu de l'infection passe en partie par la présentation à la surface des épithéliums concernés, de lectines appartenant à la famille des sélectines de type P (Ley 2003; DeFranco *et al.* 2009). Lors des expérimentations menées au cours de cette thèse (Vidal-Dupiol *et al.* in press), une sélectine de type P a été identifiée chez *P. damicornis*. Lors de nos expériences, cette sélectine-P se trouve réprimée dès la mise en contact des coraux avec le pathogène *Vibrio coralliilyticus*. De façon intéressante, de nombreux *Vibrio* pathogènes d'invertébrés marins sont connus pour réduire significativement les capacités d'adhérence des hémocytes, cellules circulantes et phagocytaires des mollusques (Choquet *et al.* 2003; Allam & Ford 2006; Labreuche *et al.* 2006a; Labreuche *et al.* 2006b; Mateo *et al.* 2009). Ces différents éléments nous ont donc conduits à poser l'hypothèse que la répression de cette sélectine-P pouvait être liée à la présence d'un facteur de virulence du *Vibrio*, qui inhiberait les capacités d'adhésion des phagocytes coralliens. Cependant, cette hypothèse laisse entendre qu'en l'absence de ce facteur de virulence, cette fonction d'adhésion et donc de recrutement des

phagocytes pourrait être maintenue. De tels phénomènes de recrutement des phagocytes ont par ailleurs été observés chez la gorgone *Gorgonia ventalina* lors de son infection par *Aspergillus sydowii* (Mydlarz *et al.* 2008). Chez les scléactiniaires, l'augmentation de la quantité de phagocytes à proprement dit n'a pas été constatée. Cependant, une quantité croissante de cellules granulaires et la présence de cellules sphériques au sein de tissus infectés d'*A. millepora* et de *Porites* sp. a été observée (Palmer *et al.* 2008). De plus, tout comme chez la gorgone, ces tissus infectés montraient une forte activité de l'enzyme phenoloxydase, élément clef dans la cascade d'activation de la voie de mélanisation (Mydlarz *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2009). Cette cascade conduit au final à la mélanisation qui permet la création d'une barrière physique afin d'enrayer l'avancée d'une infection (Mydlarz *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2009). Dans ces deux cas, la mélanisation a été observée (Mydlarz *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2009). De façon intéressante, cette mélanisation est connue pour être pratiquée par les cellules phagocytaires elles-mêmes (Porchet-Henneré & Vernet 1992; Butt & Raftos 2008). L'ensemble de ces éléments permet donc de poser certaines bases de la réponse inflammatoire des scléactiniaires, qui demandent bien entendu des études complémentaires pour être consolidées et développées.

### *Phagocytose et scléactiniaires*

Contrairement à d'autres invertébrés, il n'y a pas de phagocytes spécialisés connus dans la réponse immunitaire des scléactiniaires (Miller *et al.* 2007; Bosch 2008). Des cellules phagocytaires sont cependant présentes, elles constituent le gastroderme. Elles sont impliquées dans la phagocytose des zooxanthelles lors de l'initiation de la symbiose (Rodriguez-Lanetty *et al.* 2006b). Chez l'anémone *Aiptasia pulchera*, ces cellules sont d'ailleurs capables d'effectuer toutes les étapes de la phagocytose : liaison à la particule à phagocyter, englobement, internalisation et destruction par la formation du phagolysosome (Chen *et al.* 2003; 2004; 2005). Même si des phagocytes spécialisés n'ont pas été identifiés, il existe chez les scléactiniaires 3 types de cellules circulantes dans la mésogée qui pourraient jouer ce rôle, les amoebocytes (Mullen *et al.* 2004). Ces dernières apparaissent rondes à ovales, entourées par moment de lacunes. Certaines de ces cellules sont granulaires, et les granules acides ont été considérés comme étant des lysosomes ou des peroxysomes (Mullen *et al.* 2004). Il ressort donc de ces différentes études que même si la capacité phagocytaire et immunitaire de ces amoebocytes n'a pas été observée, elle ne peut être exclue. Par ailleurs, la présence des voies de synthèse de certains éléments participant à la destruction des

microorganismes phagocytés a été identifiée. C'est notamment le cas de la NO synthase inducible (iNOS) qui est une enzyme impliquée dans la génération de monoxyde d'azote (Perez & Weis 2006; Weis 2008). Cet élément particulièrement toxique, une fois produit dans le cytoplasme, diffuse dans le phagosome pour participer à la destruction du pathogène.

### *L'apoptose*

L'apoptose est un mécanisme important de l'immunité, qui entre en jeu dans la réponse aux infections intracellulaires (DeFranco *et al.* 2009). Conduisant à la destruction de la cellule hôte infectée, l'apoptose permet de juguler le développement d'un agent infectieux. L'apoptose implique la mise en oeuvre d'une série de mécanismes comme : la perte de la fonction mitochondriale, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes par des nucléases et la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique (DeFranco *et al.* 2009). Les caspases jouent un rôle fondamental dans ces phénomènes. Ces protéases vont par clivages successifs, s'activer entre elles et conduire au déclenchement des mécanismes apoptotiques. Des caspases mais également d'autres gènes impliqués dans l'apoptose (comme *P53*) ainsi que des observations de symptômes apoptotiques ont été identifiés chez les anthozoaires (Dunn *et al.* 2004; Dunn *et al.* 2006; Richier *et al.* 2006; Ainsworth & Hoegh-Guldberg 2008; Desalvo *et al.* 2008). Ce mécanisme constitue d'ailleurs, comme évoquer précédemment, l'une des voies de perte des zooxanthelles lors du blanchissement. Concernant les coraux, on peut penser que l'apoptose pourrait être un mécanisme immunitaire efficace et avantageux, notamment car il s'agit d'un organisme colonial, "habitué" aux événements de mortalités partielles et doté de capacités de recolonisation importantes.

### *Protéines facilitatrices de la réponse immunitaire*

Classiquement, la réponse immunitaire est considérée comme étant l'ensemble des moyens mis en oeuvre afin de reconnaître un corps étranger et de le détruire. Cependant d'autres mécanismes vont également pouvoir être mis en jeu afin de lutter contre les effets du pathogène et de limiter ses capacités invasives. Ces mécanismes ne sont donc pas en lien direct avec la réponse immunitaire, mais leur action va permettre d'augmenter son efficacité et donc de favoriser la survie de l'hôte. Trois molécules facilitatrices de la réponse immunitaire chez les scléactiniaires ont été identifiées lors de cette thèse. Deux protéines impliquées dans la séquestration d'éléments métalliques, la ferritine et la selenium-binding protéine, et une, dans l'inhibition de protéase, la cystatin B (Vidal-Dupiol *et al.* in press). La ferritine est une

protéine cytosolique ayant la capacité de séquestrer le fer, ce qui lui confère une double fonction de détoxification et de stockage (Arosio *et al.* 2009; Arosio & Levi 2010). Son expression est connue pour être régulée tant au niveau transcriptomique que post-transcriptomique, notamment lors de la réponse inflammatoire des vertébrés (Recalcati *et al.* 2008). Son induction a par ailleurs été mesurée chez de nombreux invertébrés marins soumis à divers agents pathogènes (Beck *et al.* 2002; Nowak *et al.* 2004; Babbey *et al.* 2006; Altincicek *et al.* 2008; Li *et al.* 2008; Kong *et al.* 2010; Simão *et al.* 2010). Ces inductions ont été interprétées comme étant un moyen de défense de l'hôte face à des infections bactériennes. En effet, l'action de séquestration du fer par la ferritine conduit à une diminution de la disponibilité de cet élément connu pour être indispensable à la croissance bactérienne, notamment celles des *Vibrio* (Wright *et al.* 1981; Tolmasky & Crosa 1991; Doherty 2007; Wyckoff *et al.* 2007). Une telle diminution va donc permettre de ralentir, voire d'inhiber la croissance de l'agent pathogène, ce qui laisse plus de temps au système immunitaire pour le détruire. Son rôle crucial a d'ailleurs été récemment confirmé dans une étude où l'injection de ferritine recombinante à des crevettes (*Penaeus monodon*) infectées par *Vibrio harveyi* augmentait le taux de survie de l'hôte (Maiti *et al.* 2010). Tout comme la ferritine, la selenium-binding protein va pouvoir jouer un rôle de séquestration d'un élément essentiel au développement bactérien, le sélénium (Stadtman 1996). Ce rôle essentiel passe notamment via son incorporation aux protéines détoxifiantes des éléments oxydants (glutathione peroxydase, thioredoxine reductase...) qui sont des éléments majeurs de la lutte d'un pathogène contre son hôte compte tenu de la forte implication d'éléments oxydants dans la réponse immunitaire (Burk *et al.* 2003). Tout comme chez *P. damicornis*, son induction en réponse à un stress biotique a été observé chez *Chlamys farreri* (Song *et al.* 2006). L'ensemble de ces éléments nous conduisent donc à proposer que la selenium-binding protein identifiée chez *P. damicornis* puisse jouer un rôle vis-à-vis du sélénium, analogue à celui de la ferritine pour le fer, et donc constituer un élément facilitateur de la réponse immunitaire. Troisième protéine potentiellement facilitatrice de la réponse immunitaire, la cystatine B. Cette protéine cytosolique a la capacité d'inhiber les protéases à cystéines (Zavasnik-Bergant 2008). Or, les pathogènes bactériens sont largement connus pour utiliser des protéases comme facteurs de virulence, c'est d'ailleurs le cas de *V. coralliilyticus* et *V. shiloi*, deux pathogènes de coraux (Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004; Rosenberg 2004). Comme chez plusieurs modèles vertébrés et invertébrés (Lefebvre *et al.* 2004; Kang *et al.* 2006; Zavasnik-Bergant 2008), l'implication de la cystatine B dans la limitation des effets du pathogène est donc parfaitement envisageable. Dernier facteur facilitateur de la réponse immunitaire identifiée, les protéines

fluorescentes des scléactiniaires (Palmer *et al.* 2009). Lors d'une infection par un pathogène, les fonctions de détoxification des éléments oxydants peuvent être dépassées (Martindale & Holbrook 2002). Or, les protéines fluorescentes des scléactiniaires présentent une forte activité antioxydante (Palmer *et al.* 2009). En mesurant la concentration de ces protéines chez diverses espèces de scléactiniaires dans des zones saines et d'autres présentant des signes d'inflammation, Palmer *et al.* (2009) ont montré que ces protéines étaient présentes en plus grande quantité dans les zones inflammées. Leur action anti-oxydante semble donc être mise à profit, afin de maintenir un niveau de stress oxydant viable pour l'hôte, lors de la réponse immunitaire (Palmer *et al.* 2009).

#### *Flore microbienne associée et phénomène probiotique*

Si l'étude des fonctions immunitaires doit bien entendu être poursuivie, celle de l'implication de la flore microbienne associée dans des phénomènes de protection probiotique apparaît indispensable. En effet depuis quelques années maintenant, la colonie corallienne n'est plus appréhendée que sous sa forme hôte / symbiote ; et l'ensemble des espèces participant à l'assemblage est pris en compte (Rosenberg 2004; Reshef *et al.* 2006; Rosenberg *et al.* 2007c; Ainsworth *et al.* 2010). Associée principalement au mucus, la flore bactérienne des coraux peut être comparée, d'un point de vue fonctionnel, à celle rencontrée aux niveaux des muqueuses et épidermes humains (Reshef *et al.* 2006; Rosenberg *et al.* 2007a; Ainsworth *et al.* 2010). Les connaissances taxonomiques et fonctionnelles de cette flore sont encore fragmentaires, cependant, elles pourraient par exemple avoir des effets probiotiques. Cette hypothèse probiotique est abondamment utilisée par le groupe de Rosenberg pour expliquer la résistance acquise des populations d'*O. patagonica* lesquelles sont devenues résistantes à leur pathogène strict *V. shiloi* depuis 2003 (Reshef *et al.* 2006). Rosenberg propose que les populations bactériennes associées au mucus corallien soient responsables directement ou indirectement de l'acquisition de la résistance *via* l'effet probiotique de ces bactéries (Reshef *et al.* 2006). Ainsi des études qualitatives et quantitatives appréhendant l'évolution des populations bactériennes associée à des coraux sains ou infectés pourraient apporter nombre de réponses sur cette hypothèse "d'immunité élargie".

#### IV.5 Virulence et effet de la température chez les *Vibrio* pathogènes d'invertébrés marins

Les bactéries du genre *Vibrio* sont principalement aquatiques. Ubiquistes, elles sont retrouvées dans quasiment toutes les eaux du globe où elles se développent sous forme planctonique, benthique (biofilm) ou parasite/symbiotique (Thompson *et al.* 2004). Responsables du cholera chez l'homme (*Vibrio cholerae*), elles sont également largement impliquées dans des pathologies affectant des invertébrés marins (Thompson *et al.* 2004). Ainsi, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida* et *V. damsela* ont été identifiés comme des pathogènes de crevette (Vandenberghe *et al.* 1998; Vandenberghe *et al.* 1999; Duperthuy 2010) ; *V. tapetis* comme responsables de la maladie de l'anneau brun chez la palourde *Ruditapes philippinarum* (Paillard & Maes 1995a, 1995b; Duperthuy 2010) ; *V. harveyi* pathogène de l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Travers *et al.* 2008; Duperthuy 2010) ; *V. splendidus* et *V. aesturianus* pathogènes de l'huitre *Crassostrea gigas* (Le Roux *et al.* 2002; Gay *et al.* 2004; Garnier *et al.* 2007; Garnier *et al.* 2008) ; *V. shiloi*, *V. coralliilyticus* et *V. harveyi* (précédemment *V. carchariae*) pathogènes de scléactiniaires (Kushmaro *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.* 2003a; Luna *et al.* 2010). D'autres bactéries du genre *Vibrio* sont suspectées d'être responsables d'autres maladies coralliennes, notamment celles de la bande jaune et des points noirs mais l'identification des agents pathogènes et le postulat de Koch n'ont pas été vérifiés dans ces deux cas (Harvell *et al.* 2007).

Une des particularités des *Vibrio* réside dans le contrôle de leur virulence par des facteurs externes ; principalement le *quorum sensing*<sup>6</sup> chez les *Vibrio* pathogènes de vertébrés, et bien souvent la température chez ceux pathogènes d'invertébrés. Ainsi une forte densité de population ou le passage au dessus d'une température seuil pourront induire l'expression de facteurs de virulence. Parmi ces derniers, les protéases de type Zinc metalloprotease et diverses toxines (par exemple toxine cholérique et toxine P) ont été identifiées (Banin *et al.* 2001; Ben-Haim *et al.* 2003b; Travers *et al.* 2009; Duperthuy 2010). Dans le cas des *Vibrio* pathogènes d'invertébrés, les infections et épisodes de mortalité associés interviennent la plupart du temps lors des périodes estivales, comme par exemple dans l'interaction *V. harveyi* / *H. tuberculata*, *V. splendidus* et *V. aesturianus* / *C. gigas*, *V. coralliilyticus* / *Pocillopora damicornis* ou encore *V. shiloi* / *Oculina pathagonica* (Kushmaro *et al.* 1996; Ben-Haim &

---

<sup>6</sup> Mécanisme de régulation de l'expression des gènes contrôlés par la densité de la population bactérienne.

Rosenberg 2002; Le Roux *et al.* 2002; Travers *et al.* 2009). Dans le cas de *V. coralliilyticus* et de *V. shiloi*, il a clairement été démontré que des températures, au dessus d'un certain seuil, initiait la virulence puis qu'avec une augmentation de température au-dessus de ce seuil, la virulence de la bactérie augmentait (Kushmaro *et al.* 1998; Ben-Haim *et al.* 2003a). Chez l'ormeau, il semblerait que la température participe à l'activation de la virulence des *Vibrio* impliqués, mais aussi à un affaiblissement physiologique de l'hôte qui permettrait de favoriser le processus infectieux. Dans le contexte actuel du réchauffement climatique, de tels liens entre, la température, l'activation de la virulence et l'état physiologique de l'hôte ont déjà conduit à l'émergence de vibriose ayant induit de très forte mortalité chez les ormeaux des côtes bretonnes et normandes. En effet, sur la période de 1997 à 2001, la température moyenne estivale des eaux côtières de cette région, a augmenté de 1,4°C (16,1°C à 17,5°C). Cette augmentation, corrélée à un seuil inducteur de pathologie de 18°C, a conduit à plusieurs épisodes de mortalité estivale massive chez les ormeaux de cette région (Travers *et al.* 2009).

Dans le cas de l'interaction *P. damicornis* / *V. coralliilyticus*, nous avons remarqué que pour une même souche de bactérie (YB1, origine Zanzibar), les températures conduisant au développement de l'infection étaient variables selon l'origine géographique de la population corallienne étudiée. En effet, les *P. damicornis* originaires du Nord de la mer Rouge (Golfe d'Eliât) sont affectés à partir de 24,5°C (Ben-Haim *et al.* 2003b), ceux des côtes de Zanzibar à partir de 29,5°C (Ben-Haim & Rosenberg 2002) et ceux originaires de Lombok (Indonésie) à partir de 28°C (Vidal-Dupiol *et al.* in press). Cette variabilité dans les températures auxquelles les coraux sont infectés suggère que "l'histoire évolutive" de l'hôte joue un rôle majeur dans cette interaction. Par extension, il est possible de supposer que *P. damicornis* et *V. coralliilyticus* ont co-évolué localement, ce qui donne lieu à la grande variabilité géographique mise en évidence. Dans ce cadre de dynamique co-évolutive entre un hôte sténotherme et son pathogène, dont la virulence est thermo-dépendante, il est possible de se demander, comme chez l'ormeau, dans quelle mesure le réchauffement climatique actuel pourrait conduire à des mortalités massives futures. Dans ce contexte, ce type de question et les phénomènes d'adaptation locale pourrait être abordés chez ce modèle par des infections expérimentales croisant des souches d'hôtes et de pathogènes en provenance de localités aux régimes thermiques contrastés.

Pendant longtemps, les *Vibrio* ont été considérés comme des bactéries extracellulaires, mais de plus en plus d'exemples viennent contredire ce postulat. Ainsi il a été montré que les espèces *V. coralliilyticus* et *V. shiloi* étaient capables de coloniser les cellules ectodermiques et endodermiques de corail (Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004; Rosenberg & Falkovitz



2004). Dans le cas de *V. cholerae*, il a été récemment montré qu'une étape cruciale du processus infectieux se déroulait dans les cellules phagocytaires de l'homme (Ma & Mekalanos 2009). Plus récemment, il a été démontré chez le pathogène d'huître *V. splendidus*, que les *Vibrio* étaient capables de coloniser les hémocytes de *Crassostrea gigas* (Duperthuy *et al.* 2011). Dans ce dernier cas les mécanismes d'internalisation ont été particulièrement bien disséqués. Il ressort qu'une protéine du vibron, OmpU, joue un rôle clé dans l'internalisation de la bactérie (Duperthuy *et al.* 2011). OmpU agit comme une adhésine, qui en se complexant à la protéine majoritaire du plasma de l'huître (une superoxyde dismutase utilisée comme opsonine) permet l'internalisation de la bactérie (Duperthuy *et al.* 2011). Une fois internalisée, *V. splendidus* survit en perturbant différents mécanismes hémocytaires dédiés à l'élimination de l'élément phagocyté (Duperthuy *et al.* 2011). Que ce soit dans l'interaction *V. cholerae* / homme, *V. splendidus* / huître ou *V. shiloi* / *O. patagonica* les *Vibrio*, dans leur stade intracellulaire, infestent des cellules connues pour leur activité phagocytaire. Chez *P. damicornis*, les *Vibrio* ont cependant été localisés au sein des cellules de l'ectoderme, tissu qui n'est pas connu pour renfermer des cellules ayant une activité de phagocytose (Vidal-Dupiol *et al.* in press). Paradoxalement, les bactéries intracellulaires qui ont été observées sont localisées dans un organe délimité par une bicouche ce qui implique une voie d'entrée par endocytose. Compte tenu du rôle clef que joue OmpU dans l'internalisation de *V. splendidus* et dans la résistance aux AMP de *V. splendidus* et d'autres bactéries pathogènes (Duperthuy *et al.* 2009), et compte tenu des points communs existant entre *V. splendidus* et *V. coralliilyticus* (stade intracellulaire, résistance aux AMPs, modulation et échappement du système immunitaire de l'hôte) il pourrait être très intéressant de rechercher cette protéine chez notre *Vibrio* d'intérêt et d'en étudier la fonction.

#### **IV.6 Pocillopora damicornis, future espèce modèle et sentinelle ?**

##### *Le point sur les espèces modèles*

Les 50 dernières années ont vu naître des avancées majeures dans les domaines de la biologie cellulaire, biologie du développement, biologie des interactions... et ces avancées sont principalement le fruit d'une approche intégrative et pluridisciplinaire autour de quelques espèces modèles : la bactérie *Escherichia coli* et ses virus, les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'insecte *Drosophila melanogaster*, la plante *Arabidopsis thaliana*, la souris *Mus musculus*, ainsi qu'un grand nombre de lignées cellulaires (Davis 2004). Le choix de ces espèces modèles a été dicté

par des caractéristiques particulièrement intéressantes, comme des vitesses de croissance et de multiplication élevées, la possibilité d'obtention de populations clonales, la sélection de populations ou de lignées sensibles à divers facteurs externes, l'existence de nombreux outils d'investigations génétiques, biochimiques, microscopiques...

Même s'il n'existe pas d'espèces modèles "officielles" pour les coraux constructeurs de récifs, certaines espèces ont été privilégiées dans de nombreux travaux. C'est notamment le cas de *Stylophora pistillata* (Fig. 27 A) dont la calcification, l'hétérotrophie et la régulation de la symbiose ont été largement étudiées (Tambutté *et al.* 1995; Muscatine *et al.* 1998; Zoccola *et al.* 1999; Houlbreque *et al.* 2004; Zoccola *et al.* 2004; Ferrier-Pagès *et al.* 2007; Tambutté *et al.* 2007; Ferrier-Pagès *et al.* 2010), de *Fungia scutaria* (Fig. 27 B) étudié pour l'examen de l'initiation et de la spécificité de la symbiose (Weis *et al.* 2001; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2006b; Wood-Charlson *et al.* 2006; de Boer *et al.* 2007), et d'*Acropora millepora* (Fig. 27 C), d'*A. palmata* (Fig. 27 D) et de *Montastraea faveolata* (Fig. 27 E) pour l'étude de la réponse moléculaire à différents stress environnementaux (Desalvo *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2008; Mydlarz *et al.* 2009; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2009; Voolstra *et al.* 2009; Desalvo *et al.* 2010). Autre modèle largement retenu, les anémones du genre *Aiptasia* (Fig. 27 F) qui présentent la particularité intéressante de pouvoir être cultivées sous une forme symbiotique comme aposymbiotique. Cette caractéristique en a fait un modèle de choix pour l'étude des interactions hôte/symbiote (Glider 1983; Lesser 1989; Chen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2004; Kuo *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Rodriguez-Lanetty *et al.* 2006a; Hong *et al.* 2009). Au cours d'un workshop organisé en 2008, des réflexions ont été menées sur le choix de la, ou des espèces modèles de coraux (Weis *et al.* 2008). Au terme de ce workshop, 4 espèces modèles ont été proposées à la communauté scientifique. Pour l'étude des interactions hôtes/symbiotes, le modèle de choix apparaît être les anémones du genre *Aiptasia*. Ce choix est principalement dû aux possibilités de manipulation de la symbiose qu'offre ce modèle (stade viable symbiotique et aposymbiotique, infection symbiotique contrôlée...), mais aussi pour ses caractéristiques zootechniques (croissance rapide, organisme peu exigeant vis-à-vis des conditions d'élevage, clonalité...). La principale limitation de ce modèle est l'absence de squelette calcaire et la faible complexité de sa surface qui font qu'il n'est pas approprié pour l'étude de la calcification ou des interactions holobiontes/microorganismes associés (Weis *et al.* 2008). Les 3 autres espèces modèles retenues lors de ce workshop, *Acropora millepora*, *A. palmata* et *S. pistillata*, qui sont des scléractiniaires.

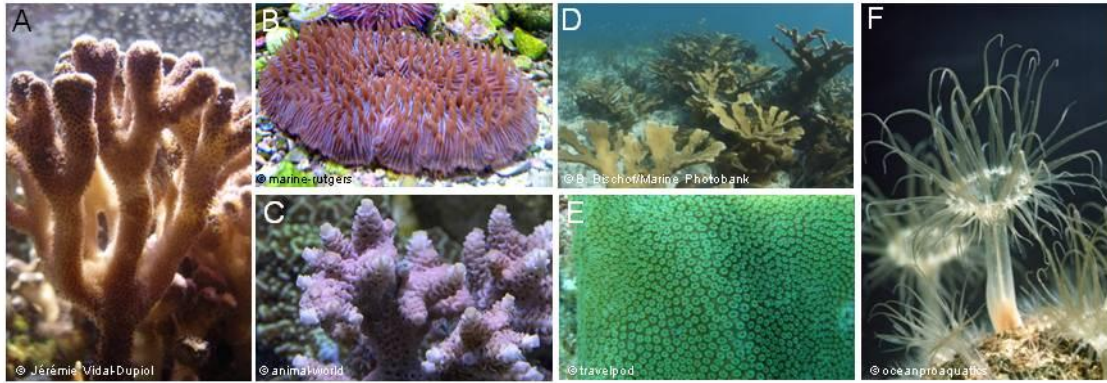


Figure 27 : les espèces modèles de cnidaires les plus largement utilisées :

A) *Stylophora pistillata* (en aquarium). B) *Fungia scutaria* (en aquarium). C) *Acropora millepora* (en aquarium). D) *Acropora palmata* (en milieu naturel). E) *Montastraea faveolata* (en milieu naturel). F) *Aptasia* sp. (en aquarium).

Des bases de connaissances solides tant écologiques, physiologiques que génétiques sont disponibles pour *A. millepora* et *S. pistillata*. Par ailleurs, ces espèces sont relativement faciles à maintenir et à multiplier en aquarium, et sont sensibles aux variations des conditions environnementales, ce qui permet la mise en œuvre d'expérimentations contrôlées sur l'effet des stress liés aux changements globaux. Cependant, ces 2 espèces souffrent du même facteur limitant : leur répartition géographique et/ou leur abondance relativement restreinte. En effet, si *A. millepora* est abondante sur l'ensemble de son aire de répartition, elle reste restreinte au Pacifique Ouest et Central ainsi qu'à l'Est de l'Océan Indien (Veron 2000). *S. pistillata* est rare dans le Pacifique Central et absente dans le Pacifique Est (Veron 2000).

*Acropora palmata* est une espèce particulière, non seulement parce qu'il s'agit d'une espèce en danger d'extinction locale, mais aussi parce qu'il s'agit d'une espèce strictement Atlantique. Le choix de cette espèce est donc intéressant dans la mesure où les systèmes coralliens Atlantiques sont différents de ceux de l'Indo-Pacifique notamment face aux changements globaux et aux maladies coralliennes (Donner *et al.* 2007; Harvell *et al.* 2007; Bourne *et al.* 2009).

Il est particulièrement étonnant que *Pocillopora damicornis* n'ait pas été sélectionnée lors de ce workshop. Elle dispose pourtant des mêmes avantages zootechniques qu'*A. millepora* et *S. pistillata* (L. Fouré, communication personnelle). Les connaissances portant sur sa physiologie ou son écologie sont largement comparables, voire même plus avancées (Tableau 2). De plus, contrairement à *A. millepora* et *S. pistillata*, *P. damicornis* est présente dans l'ensemble de l'Indo-Pacifique, en Mer Rouge et dans le Golfe Persique, où elle est rencontrée de façon abondante (Veron 2000). Une telle répartition géographique permet d'obtenir des populations soumises à des régimes environnementaux très contrastés, et donc

présentant une certaine variabilité phénotypique, ce qui ouvre des voies prometteuses en terme d'approche comparative au sein d'une même espèce. Par ailleurs, l'identification d'un pathogène spécifique de *P. damicornis*, et la caractérisation relativement avancée de l'interaction hôte/pathogène qui en découle, est un atout considérable. A l'heure actuelle les données moléculaires pour *P. damicornis* manquent, mais cette lacune devrait être comblée dans les mois à venir, puisqu'une banque EST utilisant les dernières techniques de séquençage (454) est en cours de publication (Traylor-Knowles, communication personnelle). De plus, une base de données publique et internationale, PdamBase, visant à regrouper l'ensemble des connaissances (tout domaine confondu) relative à cette espèce est sur le point d'être mise en ligne (Traylor-Knowles, communication personnelle). Il est également important de noter qu'un consortium a pour projet le séquençage du génome de *P. damicornis* (Traylor-Knowles, communication personnelle). Ainsi, compte tenu de toutes ces caractéristiques et avec l'ensemble des données déjà disponibles, il nous paraît judicieux d'inclure *P. damicornis* comme un des modèles d'étude pour les programmes de recherche futurs.

#### *Vers quelles espèces sentinelles ?*

Une espèce sentinelle peut être définie comme étant un organisme pour lequel des changements mesurables attestent précocement de la présence et/ou de l'intensité d'un stress environnemental (O'Brien *et al.* 1993). L'utilisation d'espèces sentinelles est très ancienne, comme en témoigne le célèbre exemple des canaris emportés par les mineurs. Plus sensibles que les mineurs aux gaz toxiques tels que le méthane ou le monoxyde de carbone, ces canaris présentaient des symptômes d'empoisonnement très précocement (Van der Schalie *et al.* 1999). Depuis quelques temps, les espèces sentinelles sont très utilisées afin de suivre ou de détecter la présence de pollutions diverses dans l'environnement, et pour suivre l'état de santé des écosystèmes (Tabor & Aguirre 2004).

Tableau 2 : principales caractéristiques de plusieurs espèces de cnidaires, proposées comme modèles d'étude. Modifié de Weis et al. 2008.

Variable	<i>P. damicornis</i>	<i>A. millepora</i>	<i>S. pistillata</i>	<i>Aptasia</i> sp.	Référence
Taille des polypes	4-5 mm (formant des colonies)			0,5-3 cm (polype solitaire)	(Hunter 1984; Veron 2000)
Vitesse de croissance	Lente		Très rapide		(Hunter 1984)
Conditions d'élevage	Difficiles, nécessitent des installations complexes et une expertise			Très simples	(Delbeek & Sprung 2007)
Disponibilité	Accessible via le commerce aquariophile, nécessite d'un permis CITES			Accessible sans permis CITES	(Delbeek & Sprung 2007)
Diversité génétique	Possibilité d'obtention de lignées clonales ou de populations diversifiées				(Hunter 1984; Vollmer & Palumbi 2002; Delbeek & Sprung 2007; Souter et al. 2009)
Aire de répartition	+++	-	+	+++	(Hunter 1984; Veron 2000)
Variabilité phénotypique	+++	+	++	?	(Veron & Pichon 1976a, b; Veron 2000)
Sensibilité aux stress	Forte		Faible		(Hoegh-Guldberg 1999; Belda-Baillie et al. 2002; Perez & Weis 2006)
Accessibilité microscopique	Complexe à cause du squelette			Simple	(Puverel et al. 2005; Perez & Weis 2006; Grasso et al. 2008; Venn et al. 2009)
Méthode de biologie moléculaire et biochimique	Complexe à cause du squelette			Simple	(Zoccola et al. 1999; Kuo et al. 2004; Zoccola et al. 2004)
Méthode génétique (notamment RNAi...)	Inconnu à l'heure actuelle, des pistes sont explorées au travers des systèmes larvaires			Incertain mais prometteur	(Dunn et al. 2007a)
Mise au point de marqueurs microsatellites	14 séquences	11 séquences	Aucune	Aucune	(NCBI 2010)
Références bibliographiques	GS : ~4050 NCBI : ~ 53	GS : ~ 3190 NCBI : ~ 67	GS : ~ 3090 NCBI : ~ 61	GS : ~ 175 NCBI : ~ 12	(Google-Scholar 2010; NCBI 2010)
ESTs	980	15120	98	58	(NCBI 2010)
Séquençage du génome	Envisagé	En cours	?	?	(Traylor-Knowles; Zoccola communication personnelle)
Pathogène spécifique	<i>Vibrio coralliilyticus</i>	Inconnu	Inconnu	Inconnu	(Ben-Haim Rozenblat & Rosenberg 2004)

Les espèces sentinelles doivent remplir certains critères (LeBlanc & Bain 1997; Van der Schalie et al. 1999; Beeby 2001; Basu et al. 2007) : i) avoir une aire de répartition la plus large possible; ii) être abondantes et, si possible, ubiquistes; iii) pouvoir être maintenues et étudiées en captivité ; iv) disposer de bonnes connaissances de base ; v) être facilement identifiables ; et, bien entendu vi) être sensibles aux variations de certaines conditions environnementales.

### *Pocillopora damicornis* postulant majeur au rôle d'espèce sentinelle

Au vu des critères développés dans le tableau 2, *Pocillopora damicornis* nous semble être le corail le plus adéquat pour jouer ce rôle d'espèce sentinelle. Rappelons que *P. damicornis* possède une répartition géographique très large, et que cette espèce est particulièrement abondante dans de nombreux habitats récifaux. Par ailleurs, la taille des colonies adultes est suffisamment grande pour des prélèvements en vue d'analyses biochimiques ou moléculaires (Stimson & Kinzie III 1991; Stimson 1997; Veron 2000; Hashimoto *et al.* 2004). Le maintien de *P. damicornis* est relativement bien maîtrisé (Jokiel & Coles 1977; Jokiel & Coles 1990; Stimson & Kinzie III 1991; Stimson 1997; Hashimoto *et al.* 2004). L'identification des colonies est relativement aisée, même en milieu naturel. Les connaissances sur cette espèce sont maintenant bien avancées, que ce soit au niveau des traits d'histoire de vie (Stoddart & Black 1985; Hodgson 1990; Ward 1992; Stimson 1997; Yeoh & Dai 2010), de sa structuration génétique (Starger *et al.* 2008; Souter *et al.* 2009), ou de sa physiologie (Muscatine *et al.* 1981; Muscatine 1990; Muscatine *et al.* 1998; Baghdasarian & Muscatine 2000). Finalement, *P. damicornis* est particulièrement sensible au blanchissement, principal facteur de perturbation naturelle affectant les récifs coralliens aujourd'hui (Glynn 1983; Fisk & Done 1985; Salvat 1992; Drollet *et al.* 1994; Loya *et al.* 2001). Pour toutes ces raisons, *P. damicornis* semble donc capable de signaler précocement un très grand nombre de perturbations affectant les écosystèmes coralliens. Nos travaux auront permis l'identification de plusieurs biomarqueurs précoces de stress thermique et biotique, qui pourront, à terme, être utilisés dans le cadre de suivis de l'état de santé des récifs coralliens.

### **IV.7 Quelles applications pour nos biomarqueurs potentiels ?**

L'un des objectifs de ce travail de recherche doctorale était de mettre en évidence des biomarqueurs de stress chez notre espèce modèle, *Pocillopora damicornis*. Ces biomarqueurs pourraient être utilisés dans le cadre de suivis de l'état de santé des assemblages de coraux et des récifs coralliens. Nos travaux sur la réponse physiologique aux stress thermique et bactérien chez *P. damicornis*, via des approches de transcriptomique comparative, ont permis de mettre en évidence 9 biomarqueurs. Deux d'entre eux, caractérisés du point de vue de leur structure et de leur expression (PdC-Lectin et Pdcyst-rich) répondent très précocement à une augmentation de la température conduisant au blanchissement. Les 7 autres répondent différemment à un stress bactérien (en condition virulente et/ou avirulente).

Au terme de nos travaux, il ressort que pour des colonies "visuellement" saines :

i) une répression de 10 fois des transcrits correspondant à la PdC-Lectine et de l'ordre de 100 fois pour ceux correspondant à Pdcyst-rich a pu être observée à la suite d'un stress thermique (Vidal-Dupiol *et al.* 2009).

ii) une répression de l'ordre de 5 à 10 fois des transcrits correspondant à la sélectine-P marquerait la présence de *V. coralliilyticus* virulent ou non virulent (Vidal-Dupiol *et al.* in press).

iii) de la même manière, la répression des transcrits de la cystatine B (5 à 12 fois), l'induction (5 à 10 fois) des transcrits de la ferritine et de la selenium-binding protein attesteraient de la présence de *V. coralliilyticus* dans le milieu (Vidal-Dupiol *et al.* in press).

iv) l'induction (5 à 10 fois) des transcrits de PdC-Lectin et de concanavalin marquerait la présence dans les tissus de *V. coralliilyticus* (Vidal-Dupiol *et al.* in press).

v) l'induction des transcrits de la damicornin (10 fois) confirmerait la mise en place d'une réponse inflammatoire liée à la pénétration dans les tissus de *V. coralliilyticus* (Vidal-Dupiol *et al.* en révision).

vi) une induction très forte des transcrits de la ferritine (> à 40 fois) ou une répression tout aussi forte des transcrits de la damicornin seraient un signal fort précédant une mort très probable de *P. damicornis* suite à l'infection par *V. coralliilyticus* (Vidal-Dupiol *et al.* in press).

### *Biomarqueurs et validation*

L'utilisation des gènes identifiés dans nos travaux comme biomarqueurs nécessitera une série de validations. Il est par exemple important de déterminer si les réponses de ces biomarqueurs sont homogènes entre des populations sauvages provenant de récifs aux environnements contrastés. Ce point est d'autant plus crucial que chez certaines espèces de coraux, les taux d'expression de certains gènes varie selon le site d'échantillonnage, en lien avec l'adaptation locale des populations étudiées (Polato *et al.* 2010). Cependant, une certaine variation peut également être observée au sein d'une même population, en lien avec le génotype de l'individu (Souter *et al.* 2010), mais aussi des zooxanthelles associées (Desalvo *et al.* 2010). Il semble également important d'évaluer l'influence potentielle de la taille de la colonie sur la réponse de ces biomarqueurs. Par ailleurs, les caractéristiques physiologiques des coraux devront être pris en compte (période de reproduction). On sait par exemple que la maturité sexuelle apparaît à l'âge de 4 ans environ et que ce facteur a des effets importants sur des fonctions telles que la croissance mais aussi la sensibilité aux stress biotiques (Harrison &

Wallace 1990; Travers *et al.* 2010). En résumé, des approches expérimentales en milieu contrôlé devraient être menées sur : i) des populations génétiquement différentes et issues de récifs aux caractéristiques abiotiques et biotiques très contrastées, afin d'évaluer la variabilité inter-populationnelle ; ii) sur des colonies génétiquement différentes mais issues d'une même population, afin d'évaluer la variabilité intra-populationnelle ; iii) sur des colonies d'une même population mais dont le clade majoritaire constituant la symbiose est différent, afin d'évaluer la variabilité liée au clade ; iv) sur des colonies d'une même population mais de classe de taille différente, afin d'évaluer la variabilité taille-dépendante.

### *Ligne de base et spécificité*

Bien que relativement stables en comparaison de celles que "subissent" d'autres écosystèmes, les conditions environnementales associées aux récifs coralliens sont, pour certaines, très variables au cours de l'année. Variations de la température été/hiver, de l'intensité lumineuse et de la sédimentation entre saison sèche et saison des pluies, de l'hydrodynamisme entre saison cyclonique et non cyclonique... sont des sources de variabilité qui peuvent induire des acclimatations et donc des modifications dans l'expression des gènes. Les études en aquariums présentent l'avantage de contrôler certains paramètres environnementaux, mais l'inconvénient d'ignorer les interactions avec de nombreux autres facteurs, comme c'est le cas en milieu naturel (Kvennefors *et al.* 2010). Or, l'ensemble de ces facteurs et leurs interactions modulent très certainement la réponse physiologique et l'expression de certains gènes. C'est pourquoi la définition d'une "ligne de base" (e.g., gamme des variations comprises entre les maxima et les minima en conditions naturelles "normales") apparaît nécessaire pour la validation de ces biomarqueurs potentiels. La définition de cette ligne de base devrait être conduite à partir de suivis et de prélèvements en milieu naturel, intégrant différentes échelles spatiales et temporelles afin d'appréhender un maximum de variations naturelles (Hughes *et al.* 1999). Outre la définition de cette ligne de base, ce suivi en milieu naturel, en association avec la mesure de différents facteurs environnementaux (intensité lumineuse, sédimentation, concentration bactérienne, température, salinité...) permettrait également d'évaluer la spécificité des biomarqueurs vis-à-vis des stress par lesquels ils ont été identifiés.

### *Biomarqueurs, gestion de l'écosystème et des ressources*

Les biomarqueurs que nous proposons à l'issue de ce travail, pourraient être utilisés dans le cadre de mesures de gestion et de protection des récifs coralliens. Ces biomarqueurs



pourraient s'intégrer dans le cadre de systèmes de détection précoce de ces perturbations. Bien qu'il soit illusoire de remédier à une augmentation des températures saisonnières à l'échelle régionale, la détection précoce d'un blanchissement corallien permettrait, par exemple, la mise en place de mesures destinées à réduire certains stress locaux (hypersédimentation liée aux travaux de construction littorale, qualité de l'eau, surpêche), afin de réduire leurs effets synergiques, et de faciliter les mécanismes de recolonisation et de résilience faisant suite aux perturbations (Marshall & Schuttenberg 2006). Notons au passage que d'autres mesures, "farfelues" pour certaines, ont été testées pour remédier aux évènements de blanchissement de masses. Des essais d'ombrage de portions de récif ont été réalisés en période d'anomalie thermique, et ont permis de stopper le développement du blanchissement dans ces secteurs (Marshall & Schuttenberg 2006). D'autre part, des pompages d'eau profonde, localisée sous la thermocline et donc plus froide, ont été réalisés toujours dans l'optique de minimiser les blanchissements. Enfin, l'utilisation d'aérateurs de surface augmentant l'hydrodynamisme a été testée, dans le but de faciliter la dissipation des toxines générées lors des stress thermiques (Marshall & Schuttenberg 2006). Ces mesures, lorsqu'elles sont efficaces, restent malgré tout très localisées, et sont encore très coûteuses, limitant ainsi leur utilisation potentielle à des zones à fortes valeurs économiques (jardins coralliens d'hôtels, sentiers sous-marins touristiques, projets de restauration récifale). Outre leur rôle dans la gestion et la conservation des milieux naturels, ces biomarqueurs peuvent également être utiles pour la filière économique "corail", en permettant de déterminer avec précision l'état de santé des colonies coralliennes exposées dans les aquariums publics ou destinées au marché de l'aquariophilie. La coralliculture, développée récemment, a pour but d'élever des coraux dans un esprit de développement durable, afin de fournir le marché de l'aquariophilie, les jardins coralliens et autres projets de restauration récifale à base de transplantations de coraux. Ce type d'activité demande beaucoup de temps (les coraux ont un cycle de vie très long), une logistique et une expertise qui engendrent des coûts économiques élevés (Chalias 2010). Un suivi de l'état de santé de ces coraux à l'aide des biomarqueurs permettrait une réelle anticipation des perturbations et mortalités, et permettrait la mise en place de mesures de protection efficaces. Une application de ces biomarqueurs, notamment ceux concernant la détection de stress biotiques, est également envisageable dans les structures de production ou de maintenance hors-sol de coraux, tel que les serres d'élevage ou les aquariums publics, fréquemment soumis à des développements incontrôlés de bactéries pathogènes.

Dans un contexte de dégradation croissante des récifs coralliens, un effort particulier a été récemment réalisé pour la mise en place d'aires marines protégées (Riegl *et al.* 2009). Ces

aires marines protégées ont pour principal objectif de préserver durablement les habitats et leurs espèces, des zones concernées mais aussi, idéalement, des zones adjacentes. La sélection des zones de protection est une étape délicate et il arrive parfois que des "mauvais" sites soient finalement retenus (Hughes *et al.* 2010; Graham *et al.* 2011). Un critère de choix pourrait être la capacité d'acclimatation/d'adaptation des coraux (Mumby *et al.* 2010). Dans ce cadre, les biomarqueurs potentiels issus de nos travaux pourraient être judicieusement utilisés pour identifier les populations coralliennes les plus adaptées à ces mesures de protection, et faciliter ainsi la mise en place des aires marines protégées et augmenter leur efficacité.

## Chapitre V :

### Conclusions

Ce travail de recherche doctorale a eu pour principaux objectifs l'étude de la réponse physiologique d'un corail scléactiniaire à des stress abiotiques et biotiques et l'identification de biomarqueurs potentiels, précoces et spécifiques des stress concernés. Des protocoles de stress "écologiquement réalistes" en milieu contrôlé, des approches de transcriptomiques globales combinées à des approches biochimiques et microscopiques, nous ont permis d'améliorer les connaissances des mécanismes physiologiques et moléculaires des coraux face aux stress. Que ce soit pour le stress thermique conduisant au blanchissement corallien ou pour le stress bactérien, les biomarqueurs identifiés sont des candidats prometteurs. Ces biomarqueurs pourraient également renseigner sur l'état de certaines fonctions caractéristiques des scléactiniaires, telles que la symbiose ou la calcification, essentielles dans le suivi de l'état de santé des coraux (Weis & Allemand 2009).

Ce travail a également permis la mise au point de protocoles expérimentaux et analytiques, et nos résultats permettent d'envisager d'autres perspectives intéressantes.

Il apparaît ainsi particulièrement judicieux, par exemple, de se pencher sur l'implication des mécanismes épigénétiques dans l'adaptation fonctionnelle des coraux en réponse aux stress environnementaux liés aux changements climatiques globaux. L'étude des liens entre l'immunité et la symbiose, marquée ici par les implications différentes d'un même gène (*PdC-Lectin*) dans ces fonctions, nous paraît également une voie de recherche prometteuse afin d'appréhender le continuum parasitisme/symbiose. Enfin, il est désormais indispensable de travailler sur la validation de nos biomarqueurs potentiels, afin qu'ils puissent être rapidement utilisés dans le cadre des mesures de gestion et de conservation des récifs coralliens.

Cette thèse représente également un socle expérimental sur lequel des études ambitieuses se sont récemment appuyées. Nous avons en effet lancé des approches transcriptomiques d'envergure dans un contexte collaboratif impliquant le Centre Scientifique de Monaco et l'Université d'Oregon. En utilisant une approche de type RNAseq, nous avons récemment obtenu près de 120 millions de "reads" lesquelles sont actuellement utilisées pour

assembler le transcriptome de *P. damicornis*. Au travers de cette approche, nous avons utilisé des ARNs extraits à partir de colonies de *P. damicornis* soumises à différents stress (thermique, bactérie virulente et avirulente, acidification) et leurs contrôles. Les "reads" obtenus pourront donc être également utilisés pour quantifier les éventuelles variations de concentration pour chacun des transcrits dans les différentes conditions. Cette approche globale devrait nous permettre (i) d'avoir une vision beaucoup plus globale de l'impact de ces stress sur la physiologie de l'holobionte et (ii) d'augmenter de manière significative le nombre de biomarqueurs potentiels.

Finalelement ces 3,5 années de recherche doctorale m'auront également permis de me pencher sur d'autres problématiques scientifiques plus ou moins directement liées au sujet de cette thèse. Parmi ces dernières, j'ai pu participer aux réflexions sur la réponse des communautés coralliennes à des perturbations naturelles récurrentes (Adjeroud *et al.* 2009 ; Annexe 2), sur l'étude comparative de la réponse des communautés coralliennes face au blanchissement de 2002 et 2005 qui se sont développés en Polynésie française (Penin *et al.* en révision ; Annexe 3) ; sur la définition d'une ligne de base de la densité en zooxanthelle d'*Acropora globiceps* (Ladrière *et al.* soumis; Annexe 4) ; sur l'échantillonnage de différentes populations de *P. damicornis* et la mise au point d'outils de génétique des populations pour cette même espèce, outils et échantillons qui seront d'ailleurs analysés et utilisés au cours de la thèse d'Aurélié Guérécheau ; et finalement, à la participation à un projet pluridisciplinaire de délimitation des espèces du genre *Pocillopora*.

## Chapitre VI : Références bibliographiques

- Abrego D., Ulstrup K.E., Willis B.L. & van Oppen M.J.H. (2008). Species specific interactions between algal endosymbionts and coral hosts define their bleaching response to heat and light stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 2273-2282.
- Adjeroud M., Augustin D., Galzin R. & Salvat B. (2002). Natural disturbances and interannual variability on coral reef communities on the outer slope of Tiahura (Moorea, French Polynesia): 1991 to 1997. *Marine Ecology Progress Series*, 237, 121-131.
- Adjeroud M., Chancerelle Y., Schrimm M., Perez T., Lecchini D., Galzin R. & Salvat B. (2005). Detecting the effects of natural disturbances on coral assemblages in French Polynesia: A decade survey at multiple scales. *Aquatic Living Resources*, 18, 111-123.
- Adjeroud M., Michonneau F., Edmunds P., Chancerelle Y., de Loma T., Penin L., Thibaut L., Vidal-Dupiol J., Salvat B. & Galzin R. (2009). Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef. *Coral Reefs*, 28, 775-780.
- Aeby G.S. & Santavy D., L (2006). Factors affecting susceptibility of the coral *Montastraea faveolata* to black-band disease. *Marine Ecology Progress Series*, 318, 103-110.
- Ainsworth T.D. & Hoegh-Guldberg O. (2008). Cellular processes of bleaching in the mediterranean coral *Oculina patagonica*. *Coral Reefs*, 27, 593-597.
- Ainsworth T.D., Thurber R.V. & Gates R.D. (2010). The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 233-240.
- Alheit J. & Bakun A. (2010). Population synchronies within and between ocean basins: Apparent teleconnections and implications as to physical-biological linkage mechanisms. *Journal of Marine Systems*, 79, 267-285.
- Alker A.P., Smith G.W. & Kim K. (2001). Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia*, 460, 105-111.
- Allam B. & Ford S.E. (2006). Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 374-383.
- Allemand D., Ferrier-Pagès C., Furla P., Houlbrèque F., Puvarel S., Reynaud S., Tambutté É., Tambutté S. & Zoccola D. (2004). Biomineralisation in reef-building corals: From molecular mechanisms to environmental control. *Comptes Rendus Paleoévolution*, 3, 453-467.
- Altincicek B., Knorr E. & Vilcinskis A. (2008). Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 585-595.
- Anthony K.R.N., Hoogenboom M.O., Maynard J.A., Grottoli A.G. & Middlebrook R. (2009). Energetics approach to predicting mortality risk from environmental stress: A case study of coral bleaching. *Functional Ecology*, 23, 539-550.
- Antonius A. (1973). New observations on coral destruction in reefs. In: *Tenth Meeting of the Association of Island Marine Laboratories of the Caribbean*. University of Puerto Rico Mayaguez, p. 3.
- Antonius A. (1985). Coral diseases in the Indo-Pacific: A first record. *Marine Ecology*, 6, 197-218.

- Arosio P., Ingrassia R. & Cavadini P. (2009). Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790, 589-599.
- Arosio P. & Levi S. (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800, 783-792.
- Babbey C.M., Ahktar N., Wang E., Chen C.C.-H., Grant B.D. & Dunn K.W. (2006). Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized madin-darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the cell*, 17, 3156-3175.
- Bachok Z., Mfilinge P. & Tsuchiya M. (2006). Characterization of fatty acid composition in healthy and bleached corals from Okinawa, Japan. *Coral Reefs*, 25, 545-554.
- Baghdasarian G. & Muscatine L. (2000). Preferential expulsion of dividing algal cells as a mechanism for regulating algal-cnidarian symbiosis. *The Biological Bulletin*, 199, 278-286.
- Baker A.C. (2001). Reef corals bleach to survive change. *Nature*, 411, 765-766.
- Baker A.C. (2003). Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic*, 34, 661-689.
- Baker A.C., Glynn P.W. & Riegl B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80, 435-471.
- Banaszak A.T. & Trench R.K. (1995). Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. I. Response of the algal symbionts in culture and in hospite. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194, 213-232.
- Banin E., Israely T., Fine M., Loya Y. & Rosenberg E. (2001). Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiology Letters*, 199, 33-37.
- Banin E., Israely T., Kushmaro A., Loya Y., Orr E. & Rosenberg E. (2000). Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3031-3036.
- Banin E., Sanjay K.H., Naider F. & Rosenberg E. (2001). A proline rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1536-1541.
- Banin E., Vassilakos D., Orr E., Martinez R.J. & Rosenberg E. (2003). Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology*, 46, 0418-0422.
- Basu N., Scheuhammer A.M., Bursian S.J., Elliott J., Rouvinen-Watt K. & Chan H.M. (2007). Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research*, 103, 130-144.
- Beck G., Ellis T.W., Habicht G.S., Schluter S.F. & Marchalonis J.J. (2002). Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 11-26.
- Beeby A. (2001). What do sentinels stand for? *Environmental pollution*, 112, 285-298.
- Belda-Baillie C.A., Baillie B.K. & Maruyama T. (2002). Specificity of a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Biology Bulletin*, 202, 74-85.
- Bellwood D.R., Hughes T.P., Folke C. & Nyström M. (2004). Confronting the coral reef crisis. *Nature*, 429, 827-833.
- Ben-Haim Rozenblat Y. & Rosenberg E. (2004). Temperature-regulated bleaching and tissue lysis of *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. In: *Coral*

- health and disease* (eds. Rosenberg E & Loya Y). Springer-Verlag New-York, pp. 301-324.
- Ben-Haim Y., Banim E., Kushmaro A., Loya Y. & Rosenberg E. (1999). Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*. *Environmental Microbiology*, 1, 223-229.
- Ben-Haim Y. & Rosenberg E. (2002). A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 141, 47-55.
- Ben-Haim Y., Thompson F.L., Thompson C.C., Cnockaert M.C., Hoste B., Swings J. & Rosenberg E. (2003a). *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 309-315.
- Ben-Haim Y., Zicherman-Keren M. & Rosenberg E. (2003b). Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4236-4242.
- Benzoni F., Pichon M., Hazeem S.A.L. & Galli P. (2006). The coral reefs of the Northern Arabian Gulf: Stability over time in extreme environmental conditions? *Proceeding of the 10th International Coral Reef Symposium, Okinawa, Japan*, 969-975.
- Bergmann N., Winters G., Rauch G., Eizaguirre C., Gu J., Nelle P., Fricke B. & Reusch T.B.H. (2010). Population-specificity of heat stress gene induction in northern and southern eelgrass *Zostera marina* populations under simulated global warming. *Molecular Ecology*, 19, 2870-2883.
- Berkelmans R. (2002). Time integrate thermal bleaching threshold of reefs and their variation on the Great Barrier Reef. *Marine Ecology Progress Series*, 229, 73-82.
- Berkelmans R., De'ath G., Kininmonth S. & Skirving W. (2004). A comparison of the 1998 and 2002 coral bleaching events on the Great Barrier Reef: spatial correlation, patterns, and predictions. *Coral Reefs*, 23, 74-83.
- Berkelmans R. & van Oppen M.J.H. (2006). The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 2305-2312.
- Birkeland C. (1997a). Introduction. In: *Life and death of coral reef* (ed. Birkeland C). Chapman and Hall New-York, pp. 1-13.
- Birkeland C. (1997b). *Life and death of coral reefs*. Chapman and Hall, New-York.
- Black N.A., Voellmy R. & Szmant A.M. (1995). Heat shock protein induction in *Montastraea faveolata* and *Aiptasia pallida* exposed to elevated temperatures. *Biological Bulletin*, 188, 234-240.
- Borell E. & Bischof K. (2008). Feeding sustains photosynthetic quantum yield of a scleractinian coral during thermal stress. *Oecologia*, 157, 593-601.
- Borell E.M., Yuliantri A.R., Bischof K. & Richter C. (2008). The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364, 116-123.
- Bosch T.C.G. (2008). The path less explored: Innate immune reactions in cnidarians. In: *Innate Immunity of Plants, Animals, and Humans* (ed. Heine H). Springer Berlin Heidelberg, pp. 27-42.
- Bosch T.C.G., Augustin R., Anton-Erxleben F., Fraune S., Hemmrich G., Zill H., Rosenstiel P., Jacobs G., Schreiber S., Leippe M., Stanisak M., Grötzinger J., Jung S., Podschun R., Bartels J., Harder J. & Schröder J.-M. (2009). Uncovering the evolutionary history of innate immunity: The simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence. *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 559-569.

- Bouchard J.N. & Yamasaki H. (2008). Heat stress stimulates nitric oxide production in *Symbiodinium microadriaticum*: A possible linkage between nitric oxide and the coral bleaching phenomenon. *Plant & Cell Physiology*, 49, 641-652.
- Bourne D.G., Garren M., Work T.M., Rosenberg E., Smith G.W. & Harvell C.D. (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology*, 17, 554-562.
- Boutet I., Jollivet D., Shillito B., Moraga D. & Tanguy A. (2009). Molecular identification of differentially regulated genes in the hydrothermal-vent species *Bathymodiolus thermophilus* and *Paralvinella pandorae* in response to temperature. *BMC Genomics*, 10, 222.
- Brown B.E. (1997). Coral bleaching: Causes and consequences. *Coral Reefs*, 16 (supplement), 129-138.
- Brown B.E., Downs C.A., Dunne R.P. & Gibb S.W. (2002). Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. *Marine Ecology Progress Series*, 242, 119-129.
- Brown B.E., Dunne R.P. & Chansang H. (1996). Coral bleaching relative to elevated seawater temperature in the Andaman Sea (Indian Ocean) over the last 50 years. *Coral Reefs*, 15, 151-152.
- Brown B.E., Dunne R.P., Scoffin T.P. & Le Tissier M.D.A. (1994). Solar damage in intertidal corals. *Marine Ecology Progress Series*, 105, 219-230.
- Brown B.E., Le Tissier M.D.A. & Bythell J.C. (1995). Mechanisms of bleaching deduced from histological studies of reef corals sampled during a natural bleaching event. *Marine Biology*, 122, 655-663.
- Brown B.E. & Suharsono (1990). Damage and recovery of coral reefs affected by El Niño related seawater warming in the Thousand Isand, Indonesia. *Coral Reefs*, 8, 163-170.
- Brown E.K., Jokiel P.L., Rodgers S., Smith W.R. & Friedlander A. (2004). Hawai'i coral reef assessment and monitoring program: spatial patterns and temporal dynamics in reef coral communities. *Pacific Science*, 58, 159-174.
- Bruno J.F., Petes L.E., Harvell D.C. & Hettinger A. (2003). Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology Letters*, 6, 1056-1061.
- Bruno J.F., Selig E.R., Casey K.S., Page C.A., Willis B.L., Harvell C.D., Sweatman H. & Melendy A.M. (2007). Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. *PLoS Biology*, 5, e124.
- Bryant D., Burke L., McManus J.W. & Spalding M.D. (1998). Reefs at risk: a map based indicator of threats to the world's coral reefs. In: World Resources Institute Washington, D.C.
- Buddemeier R.W., Baker A.C., Fautin D.G. & Jacobs J.R. (2004). The adaptative hypothesis of bleaching. In: *Coral Health and Diseases* (eds. Rosenberg E & Loya Y). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 427-444.
- Buddemeier R.W. & Fautin D.G. (1993). Coral bleaching as an adaptative mechanism, a testable hypothesis. *BioScience*, 43, 320-326.
- Bulgheresi S., Schabussova I., Chen T., Mullin N.P., Maizels R.M. & Ott J.A. (2006). A new C-Type Lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2950-2956.
- Burk R.F., Hill K.E. & Motley A.K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *The Journal of Nutrition*, 133, 1517-1520.
- Butt D. & Raftos D. (2008). Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 299-306.



- Cambi A. & Figdor C.G. (2003). Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 539-546.
- Cantin N.E., Cohen A.L., Karnauskas K.B., Tarrant A.M. & McCorkle D.C. (2010). Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea. *Science*, 329, 322-325.
- Carlton R.G. & Richardson L.L. (1995). Oxygen and sulfide dynamics in a horizontally migrating cyanobacterial mat: Black band disease of corals. *FEMS Microbiology Ecology*, 18, 155-162.
- Carr M.H., Anderson T.W. & Hixon M.A. (2002). Biodiversity, population regulation, and the stability of coral-reef fish communities. *Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States of America*, 99, 11241-11245.
- Carte B.K. (1996). Biomedical potential of marine natural products. *BioScience*, 46, 271-286.
- Chabanet P., Adjéroud M., Andréfouët A., Bozec Y., Ferraris J., Garcia-Charton J. & Schrimm M. (2005). Human-induced physical disturbances and their indicators on coral reef habitats: A multi-scale approach. *Aquatic Living Resources*, 18, 215-230.
- Chalias V. (2010). La culture du corail en Indonésie  
In: *Zebrasomag*.
- Chen M.-C., Cheng Y.-M., Hong M.-C. & Fang L.-S. (2004). Molecular cloning of Rab5 (ApRab5) in *Aiptasia pulchella* and its retention in phagosomes harboring live zooxanthellae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 1024-1033.
- Chen M.-C., Cheng Y.-M., Sung P.-J., Kuo C.-E. & Fang L.-S. (2003). Molecular identification of Rab7 (ApRab7) in *Aiptasia pulchella* and its exclusion from phagosomes harboring zooxanthellae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308, 586-595.
- Chen M.-C., Hong M.-C., Huang Y.-S., Liu M.-C., Cheng Y.-M. & Fang L.-S. (2005). ApRab11, a cnidarian homologue of the recycling regulatory protein Rab11, is involved in the establishment and maintenance of the *Aiptasia-Symbiodinium* endosymbiosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 1607-1616.
- Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J.-L. & Paillard C. (2003). Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57, 109-116.
- Chow A.M., Ferrier-Pagès C., Khalouei S., Reynaud S. & Brown I.R. (2009). Increased light intensity induces heat shock protein Hsp60 in coral species. *Cell Stress and Chaperones*, 14, 469-476.
- Coffroth M.A., Poland D.M., Petrou E.L., Brazeau D.A. & Holmberg J.C. (2010). Environmental symbiont acquisition may not be the solution to warming seas for reef-building corals. *PLoS ONE*, 5.
- Coles S.L. & Fadlallah Y.H. (1991). Reef coral survival and mortality at low temperatures in the Arabian Gulf : new species specific lower temperature limits. *Coral Reefs*, 9, 231-237.
- Coles S.L. & Jokiel P.L. (1977). Effects of temperature on photosynthesis and respiration in hermatypic corals. *Marine Biology*, 43, 209-216.
- D'Elia C.F. & Wiebe W.J. (1990). Biogeochemical nutrient cycles in coral reef ecosystem. In: *Ecosystem of the world: Coral reefs* (ed. Dubinsky Z). Elsevier Science publisher B.V. Amsterdam, pp. 49-74.
- Danovaro R., Bongiorno L., Corinaldesi C., Giovannelli D., Damiani E., Astolfi P., Greci L. & Pusceddu A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, 116, 441-7.
- Davis R.H. (2004). The age of model organisms. *Nature Reviews Genetics*, 5, 69-76.

- De'ath G., Lough J.M. & Fabricius K.E. (2009). Declining coral calcification on the Great Barrier reef. *Science*, 323, 116-119.
- de Boer M.L., Krupp D.A. & Weis V.M. (2007). Proteomic and transcriptional analyses of coral larvae newly engaged in symbiosis with dinoflagellates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2, 63-73.
- De Zoysa M., Whang I., Lee Y., Lee S., Lee J.-S. & Lee J. (2009). Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 387-395.
- DeFranco A.L., Locksley R.M. & Robertson M. (2009). *Immunité: La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Delbeek J.C. & Sprung J. (2007). *L'aquarium récifal, science, art et technologie*. Ricordea publishing, Miami.
- Depledge M.H. & Fossi M.C. (1994). The role of biomarker in environmental assessment 2. Invertebrate. *Ecotoxicology*, 3, 161-172.
- Desalvo M.K., Sunagawa S., Voolstra C.R. & Medina M. (2010). Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, 402, 97-113.
- Desalvo M.K., Voolstra C.R., Sunagawa S., Schwarz J.A., Stillman J.H., Coffroth M.A., Szmant A.M. & Medina M. (2008). Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular Ecology*, 17, 3952-3971.
- Diaz R.J. & Rosenberg R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321, 926-929.
- Dishaw L.J. & Litman G.W. (2009). Invertebrate allorecognition: The origins of histocompatibility. *Current Biology*, 19, R286-R288.
- Doherty C.P. (2007). Host-pathogen interactions: the role of iron. *The Journal of Nutrition*, 137, 1341-1344.
- Done T. (1992). Phase shifts in coral reef communities and their ecological significance. *Hydrobiologia*, 247, 121-132.
- Done T.J., Ogden J.C. & Wiebe W.J. (1996). Biodiversity and ecosystem function of coral reefs. In: *Functional role of biodiversity: A global perspective* (eds. Mooney HA, Cushman E, Medina OES & Schulze ED). John Wiley and Sons Chichester, pp. 393-429.
- Doney S.C., Fabry V.J., Feely R.A. & Kleypas J.A. (2009). Ocean acidification: The other CO<sub>2</sub> problem. *Annual Reviews of Marine Science*, 1, 169-192.
- Dong Y.-W., Ji T.-T., Meng X.-L., Dong S.-L. & Sun W.-M. (2009). Difference in thermotolerance between green and red color variants of the Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus selenka*: Hsp70 and heat-hardening effect. *The Biological Bulletin*, 218, 87-94.
- Donner S.D., Knutson T.R. & Oppenheimer M. (2007). Model-based assessment of the role of human-induced climate change in the 2005 Caribbean coral bleaching event. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104, 5483-5488.
- Douglas A.E. (1994). *Symbiotic interactions*. Oxford Science Publications, Oxford.
- Douglas A.E. (2003). Coral bleaching-how and why? *Marine Pollution Bulletin*, 46, 385-392.
- Downs C.A., Fauth J.E., Halas J.C., Dustan P., Bemiss J. & Woodley C.M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Marine Biotechnology*, 33, 533-543.
- Downs C.A., Fauth J.E., Halas J.C., Dustan P., Bemiss J. & Woodley C.M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 533-543.

- Downs C.A., Kramarsky-Winter E., Martinez J., Kushumaro A., Woodley C.M., Loya Y. & Ostrander G.K. (2009). Symbiophagy as a cellular mechanism for coral bleaching. *Autophagy*, 5, 211-216.
- Downs C.A., Mueller E., Phillips S., Fauth J.E. & Woodley C.M. (2000). A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastraea faveolata*) during heat stress. *Marine Biotechnology*, 2, 533-544.
- Drollet J.H., Faucon M., Maritorea S. & Martin P.M.V. (1994). A survey of environmental physico-chemical parameters during a minor mass bleaching event in Tahiti in 1993. *Australian Journal of Marine and Freshwater research*, 45, 1149-1156.
- Dunn S.R. (2009). Immunorecognition and immunoreceptors in the Cnidaria. *Invertebrate Survival Journal*, 6, 7-14.
- Dunn S.R., Bythell J.C., Le Tissier M.D.A., Burnett W.J. & Thomason J.C. (2002). Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272, 29-53.
- Dunn S.R., Phillips W.S., Green D.R. & Weis V.M. (2007a). Knockdown of actin and caspase gene expression by RNA interference in the symbiotic anemone *Aiptasia pallida*. *Biological Bulletin*, 212, 250-258.
- Dunn S.R., Phillips W.S., Spatafora J.W., Green D.R. & Weis V.M. (2006). Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 63, 95-107.
- Dunn S.R., Schnitzler C.E. & Weis V.M. (2007b). Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 3079-3085.
- Dunn S.R., Thomason J.C., Le Tissier M.D.A. & Bythell J.C. (2004). Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. *Cell Death Differentiation*, 11, 1213-1222.
- Duperthuy M. (2010). Effecteurs moleculaire de l'association : *Crassostrea gigas* / *Vibrio splendidus* : Role de la porine OmpU dans les mecanismes de resistance et d'échappement à la réponse immunitaire de l'hote. In. Université Montpellier 2 Montpellier p. 189.
- Duperthuy M., Binesse J., Le Roux F., Romestand B., Caro A., Got P., Givaudan A., Mazel D., Bachère E. & Destoumieux-Garzon D. (2009). The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology*, 12, 951-963.
- Duperthuy M., Schmitt P., Garzon E., Caro A., Rosa R.D., Le Roux F., Lautrédou-Audouy N., Got P., Romestand B., de Lorgeril J., Kieffer-Jaquinod S., Bachère E. & Destoumieux-Garzon D. (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2993-2998.
- Dykens J.A., Shick J.M., Benoit C., Buettner G.R. & Winston G.W. (1992). Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. *The Journal of Experimental Biology*, 168, 219-241.
- Edge S.E., Morgan M.B., Gleason D.F. & Snell T.W. (2005). Development of a coral cDNA array to examine gene expression profiles in *Montastraea faveolata* exposed to environmental stress. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 507-523.

- Enriquez S., Mendez E.R. & Iglesias-Prieto R. (2005). Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnology and Oceanography*, 50, 1025-1032.
- Erez J. (1990). On the importance of food sources in coral reef ecosystem. In: *Ecosystem of the world: Coral reefs* (ed. Dubinsky Z). Elsevier Science publisher B.V. Amsterdam, pp. 411-418.
- Fabricius K.E. (2005). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 125-146.
- Fang F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Review Microbiology*, 2, 820-832.
- Fang L.S., Huang S.P. & Lin K.L. (1997). High temperature induces the synthesis of heat-shock proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*. *Coral Reefs*, 16 (2), 127-131.
- Fang L.S., Liao C.W. & Liu M.C. (1995). Pigment composition in different-colored scleractinian corals before and during the bleaching process. *Zoology Studies*, 34, 10-17.
- Farcy É., Voiseux C., Lebel J.-M. & Fiévet B. (2009). Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress and Chaperones*, 14, 371-380.
- Fautin D. & Buddemeier R. (2004). Adaptive bleaching: a general phenomenon. *Hydrobiologia*, 530-531, 459-467.
- Fautin D.G. & Mariscal R.N. (1991). Cnidaria: Anthozoa. In: *Microscopic anatomy of invertebrates Volume 2 Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora* (eds. Harrison FW & Westfall JA). Wiley-Liss New-York, pp. 267-358.
- Ferrandon D., Jung A.C., Criqui M.C., Lemaitre B., Uttenweiler-Joseph S., Michaut L., Reichhart J.M. & Hoffmann J.A. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO journal*, 17, 1217-1227.
- Ferrier-Pagès C., Richard C., Forcioli D., Allemand D., Pichon M. & Shick J. (2007). Effects of temperature and UV radiations increase on the photosynthetic efficiency in four scleractinian coral species. *Biological Bulletin*, 213, 76-87.
- Ferrier-Pagès C., Rottier C., Beraud E. & Levy O. (2010). Experimental assessment of the feeding effort of three scleractinian coral species during a thermal stress: Effect on the rates of photosynthesis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 390, 118-124.
- Fichez R., Adjeroud M., Bozec Y., Breau L., Chancerelle Y., Chevillon C., Douillet P., Fernandez J., Frouin P., Kulbicki M., Moreton B., Ouillon S., Payri C., Perez T., Sasal P. & Thébault J. (2005). A review of selected indicators of particle, nutrient and metal inputs in coral reef lagoon systems. *Aquatic Living Resources*, 18, 125-147.
- Fine M. & Loya Y. (1995). The coral *Oculina patagonica*: a new immigrant to the Mediterranean coast of Israel. *Israel Journal of Zoology*, 41-81.
- Fisk D.A. & Done T.J. (1985). Taxonomic and bathymetric patterns of bleaching in corals, Myrmidon Reef. In: *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress Tahiti*, pp. 149-154.
- Fitt W.K., Gates R.D., Hoegh-Guldberg O., Bythell J.C., Jatkar A., Grottoli A.G., Gomez M., Fisher P., Lajuenesse T.C., Pantos O., Iglesias-Prieto R., Franklin D.J., Rodrigues L.J., Torregiani J.M., van Woesik R. & Lesser M.P. (2009). Response of two species of Indo-Pacific corals, *Porites cylindrica* and *Stylophora pistillata*, to short-term thermal stress: The host does matter in determining the tolerance of corals to bleaching. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 373, 102-110.

- Fitt W.K., McFarland F.K., Warner M.E. & Chilcoat G.C. (2000). Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 45, 677-685.
- Fitt W.K. & Warner M.E. (1995). Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. *Biology Bulletin*, 189, 298-307.
- Flores-Ramirez L.A. & Linan-Cabello M.A. (2007). Relationships among thermal stress, bleaching and oxidative damage in the hermatypic coral, *Pocillopora capitata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146, 194-202.
- Franklin D.J., Hoegh-Guldberg O., Jones R.J. & Berges J.A. (2004). Cell death and degeneration in the symbiotic dinoflagellates of the coral *Stylophora pistillata* during bleaching. *Marine Ecology Progress Series*, 272, 117-130.
- Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M. & Nicolas J.L. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial ecology*, 53, 187-196.
- Garnier M., Labreuche Y. & Nicolas J.L. (2008). Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and applied microbiology*, 31, 358-365.
- Garrett P. & Ducklow H. (1975). Coral diseases in Bermuda. *Nature*, 253, 349-350.
- Garrison V.H., Shinn E.A., Foreman W.T., Griffin D.W., Holmes C.W., Kellogg C.A., Majewski M.S., Richardson L.L., Ritchie K.B. & Smith G.W. (2003). African and asian dust: From desert soils to coral reefs. *BioScience*, 53, 469-480.
- Gates R.D., Baghdasarian G. & Muscatine L. (1992). Temperature stress caused host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biology Bulletin*, 182, 324-332.
- Gay M., Renault T., Pons A.M. & Le Roux F. (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62, 65-74.
- Geffen Y., Ron E.Z. & Rosenberg E. (2009). Regulation of release of antibacterials from stressed scleractinian corals. *FEMS Microbiology Letters*, 295.
- Geffen Y. & Rosenberg E. (2005). Stress-induced rapid release of antibacterial by scleractinian corals. *Marine Biology*, 146, 931-935.
- Geiser D.M., Taylor J.W., Ritchie K.B. & Smith G.W. (1998). Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature*, 394, 137-138.
- Gleason D.F. & Wellington G.M. (1993). Ultraviolet radiation and coral bleaching. *Nature*, 365, 836-837.
- Gleason D.F. & Wellington G.M. (1995). Variation in UVB sensitivity of planula larvae of the coral *Agaricia agaricites* along a depth gradient. *Marine Biology*, 123, 693-703.
- Glider W.V. (1983). The biology of the association of *Symbiodinium microadriaticum* with *Aiptasia pallida*: an anemone-algal symbiosis. In: University of Nebraska.
- Glynn P.W. (1983). Extensive 'bleaching' and death of reef corals on the Pacific coast of Panama. *Environmental Conservation*, 10, 149-154.
- Glynn P.W. (1984). Widespread coral mortality and the 1982/83 El Niño warming event. *Environmental Conservation*, 11, 133-146.
- Glynn P.W. (1993). Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs*, 12, 1-17.
- Glynn P.W. & D'croz L. (1990). Experimental evidence for high temperature stress as the cause of El Niño-coincident coral mortality. *Coral Reefs*, 8, 181-191.
- Glynn P.W., Imai R., Sakai K., Nakano Y. & Yamazato K. (1992). Experimental responses of Okinawan (Ryukyu Islands, Japan) reef corals to high sea temperature and UV radiation. *Proceeding of the 7th International Coral Reef Symposium*, 1, 27-37.

- Gochfeld D.J. & Aeby G.S. (2008). Antibacterial chemical defenses in Hawaiian corals provide possible protection from disease. *Marine Ecology Progress Series*, 362, 119-128.
- Google-Scholar (2010). Google-Scholar. URL <http://scholar.google.fr/>
- Goreau T.F. (1964). Mass expulsion of zooxanthellae from Jamaican reef communities after hurricane Flora. *Science*, 145, 383-386.
- Goreau T.J. & Hayes R.L. (1994). Coral bleaching and ocean "Hot Spot". *Royal Swedish Academy of Sciences*, 23, 176-194.
- Goreau T.J., Hayes R.L., Clark J.W., Basta D.J. & Robertson C.R. (1993). Elevated sea surface temperatures correlate with Caribbean coral reef bleaching. In: *Global Warming Forum, Scientific, Economic and Legal Overview* (ed. Geyer RA). CRC Press Boca Raton, pp. 225-255.
- Goulet T.M. (2006). Most corals may not change their symbionts. *Marine Ecology Progress Series*, 321, 1-7.
- Gowda N.M., Goswami U. & Islam Khan M. (2008). T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99, 141-145.
- Graham N.A.J., Ainsworth T.D., Baird A.H., Ban N.C., Bay L.K., Cinner J.E., De Freitas D.M., Diaz-Pulido G., Dornelas M., Dunn S.R., Fidelman P.I.J., Foret S., Good T.C., Kool J., Mallela J., Penin L., Pratchett M.S. & Williamson D.H. (2011). From microbes to people: tractable benefits of no-take areas for coral reefs. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 49, *In press*.
- Grasso L., Maindonald J., Rudd S., Hayward D., Saint R., Miller D. & Ball E. (2008). Microarray analysis identifies candidate genes for key roles in coral development. *BMC Genomics*, 9, 540.
- Grigg R.W. & Dollar S.J. (1990). Natural and anthropogenic disturbance on coral reefs. In: *Ecosystem of the world: Coral reefs* (ed. Dubinsky Z). Elsevier Science publisher B.V. Amsterdam, pp. 439-452.
- Grottoli A.G., Rodrigues L.J. & Juarez C. (2004). Lipids and stable carbon isotopes in two species of Hawaiian corals, *Porites compressa* and *Montipora verrucosa*, following a bleaching event. *Marine Biology*, 145, 621-631.
- Grottoli A.G., Rodrigues L.J. & Palardy J.E. (2006). Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature*, 440, 1186-1189.
- Hagger J.A., Jones M.B., Leonard D.R.P., Owen R. & Galloway T.S. (2006). Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2, 312-329.
- Harriott V.J. (1985). Mortality-rates of scleractinian corals before and during a mass bleaching event. *Marine Ecology Progress Series*, 21, 81-88.
- Harrison P.L. & Wallace C.C. (1990). Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: *Ecosystem of the world: Coral reefs* (ed. Dubinsky Z). Elsevier Science publisher B.V. Amsterdam, pp. 133-196.
- Harvell D., Jordán-Dahlgren E., Merkel S., Rosenberg E., Raymundo L., Smith G., Weil E. & Willis B. (2007). Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography*, 20, 172-195.
- Hashimoto K., Shibuno T., Murayama-Kayano E., Tanaka H. & Kayano T. (2004). Isolation and characterization of stress-responsive genes from the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 23, 485-491.
- Hatcher B.G. (1998). Coral reef primary productivity: A beggar's banquet. *Trends in Ecology & Evolution*, 3, 106-111.

- Hayes R.L. (1995). Induction of 70-kD heat shock protein in scleractinian corals by elevated temperature: significance for coral bleaching. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4, 36-42.
- Hemrich G., Miller D.J. & Bosch T.C.G. (2007). The evolution of immunity: a low-life perspective. *Trends in Immunology*, 28, 449-454.
- Hidaka M., Yurugi K., Sunagawa S. & Kinzie Iii R.A. (1997). Contact reactions between young colonies of the coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 16, 13-20.
- Hodgson G. (1990). Sediment and the settlement of larvae of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 9, 41-43.
- Hoegh-Guldberg O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine & Freshwater Research*, 50, 839-866.
- Hoegh-Guldberg O. & Bruno J.F. (2010). The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 328, 1523-1528.
- Hoegh-Guldberg O., Jones R.J., Ward S. & Loh W.K. (2002). Ecology (Communication arising): Is coral bleaching really adaptive? *Nature*, 415, 601-602.
- Hoegh-Guldberg O., Mumby P.J., Hooten A.J., Steneck R.S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C.D., Sale P.F., Edwards A.J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C.M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N., Bradbury R.H., Dubi A. & Hatziolos M.E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318, 1737-1742.
- Hoegh-Guldberg O. & Salvat B. (1995). Periodic mass-bleaching and elevated sea temperatures - bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia. *Marine Ecology Progress Series*, 121, 181-190.
- Hoegh-Guldberg O. & Smith G.J. (1989). The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* dana. *Journal of Experimental Marine Biology*, 129, 279-304.
- Hofmann G.E. (2005). Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 247-255.
- Hong M.-C., Huang Y.-S., Lin W.-W., Fang L.-S. & Chen M.-C. (2009). ApRab3, a biosynthetic Rab protein, accumulates on the maturing phagosomes and symbiosomes in the tropical sea anemone, *Aiptasia pulchella*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152, 249-259.
- Houlbrèque F. & Ferrier-Pagès C. (2009). Heterotrophy in tropical scleractinian corals. *Biological Reviews*, 84, 1-17.
- Houlbreque F., Tambutte E., Allemand D. & Ferrier-Pages C. (2004). Interactions between zooplankton feeding, photosynthesis and skeletal growth in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Journal of Experimental Biology*, 207, 1461-1469.
- Huang G., Liu H., Han Y., Fan L., Zhang Q., Liu J., Yu X., Zhang L., Chen S., Dong M., Wang L. & Xu A. (2007). Profile of acute immune response in Chinese *amphioxus* upon *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 31, 1013-1023.
- Huang S.-P., Lin K.-L. & Fang L.-S. (1998). The involvement of calcium in heat-induced coral bleaching. *Zoological Studies*, 37, 89-94.
- Hughes T.P. (1994). Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*, 265, 1547-1551.
- Hughes T.P., Baird A.H., Dinsdale E.A., Moltschaniwskyj N., Pratchett M.S., Tanner J.E. & Willis B.L. (1999). Patterns of recruitment and abundance of corals along the Great Barrier Reef. *Nature*, 397, 59-63.

- Hughes T.P., Graham N.A.J., Jackson J.B.C., Mumby P.J. & Steneck R.S. (2010). Rising to the challenge of sustaining coral reef resilience. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 633-642.
- Hunter T. (1984). The energetics of asexual reproduction: Pedal laceration in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella* (Carlgren, 1943). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 83, 127-147.
- Hwang Y.-S., Jung G. & Jin E. (2008). Transcriptome analysis of acclimatory responses to thermal stress in Antarctic algae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367, 635-641.
- Iglesia-Prieto R., Matta J.L., Robins W.A. & Trench R.K. (1992). Photosynthetic response to elevated-temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 89, 302-305.
- Iglesia-Prieto R. & Trench R.K. (1994). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Marine Ecology Progress Series*, 113, 163-175.
- Imler J.L. & Hoffmann J.A. (2002). Toll receptors in *Drosophila*: a family of molecules regulating development and immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 270, 63.
- Israely T., Banin E. & Rosenberg E. (2001). Growth, differentiation and death of *Vibrio shiloi* in coral tissue as a function of seawater temperature. *Aquatic Microbial Ecology*, 24, 1-8.
- Jackson J.B.C., Kirby M.X., Berger W.H., Bjorndal K.A., Botsford L.W., Bourque B.J., Bradbury R.H., Cooke R., Erlandson J., Estes J.A., Hughes T.P., Kidwell S., Lange C.B., Lenihan H.S., Pandolfi J.M., Peterson C.H., Steneck R.S., Tegner M.J. & Warner R.R. (2001). Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science*, 293, 629-637.
- Jameson S.C., Erdmann M.V., Karr J.R. & Potts K.W. (2001). Charting a course toward diagnostic monitoring: A continuing review of coral reef attributes and a research strategy for creating coral reef indexes of biotic integrity. *Bulletin of Marine science*, 69, 701-744.
- Jameson S.C., McManus J.W. & Spalding M.D. (1995). State of the reefs: Regional and global perspectives In. U.S Department of state Washington, D.C.
- Jokiel P.J. & Coles S.L. (1990). Responses of hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperatures. *Coral Reefs*, 8, 155-162.
- Jokiel P.L. & Coles S.L. (1977). Effects of temperature on the mortality and growth of hawaiian reef corals. *Marine Biology*, 43, 201-208.
- Jones A.M., Berkelmans R., van Oppen M.J.H., Mieog J.C. & Sinclair W. (2008). A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 1359-1365.
- Jones R.J., Hoegh-Guldberg O., Larkum A.W.D. & Schreiber U. (1998). Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell And Environment*, 21, 1219-1230.
- Jordan-Dahlgren E., Maldonado M., Angel & Rodriguez-Martinez R.E. (2005). Diseases and partial mortality in *Montastraea annularis* species complex in reefs with differing environmental conditions (NW Caribbean and Gulf of Mexico). *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 3-12.
- Kaczmarek L.T. (2006). Coral disease dynamics in the central Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 9-21.



- Kang Y.-S., Kim Y.-M., Park K.-I., Kim Cho S., Choi K.-S. & Cho M. (2006). Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 1119-1131.
- Karako-Lampert S., Katcoff D.J., Achituv Y., Dubinsky Z. & Stambler N. (2004). Do clades of symbiotic dinoflagellates in scleractinian corals of the Gulf of Eilat (Red Sea) differ from those of other coral reefs? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311, 301-314.
- Kelman D., Kashman Y., Rosenberg E., Kushmaro A. & Loya Y. (2006). Antimicrobial activity of Red Sea corals. *Marine Biology*, 149, 357-363.
- Kiessling W. (2005). Long-term relationships between ecological stability and biodiversity in Phanerozoic reefs. *Nature*, 433, 410-413.
- Kimura A., Sakaguchi E. & Nonaka M. (2009). Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Immunobiology*, 214, 165-178.
- Kleypas J.A. & Langdon C. (2006). Coral reefs and changing seawater carbonate chemistry. *Coastal and Estuarine Studies*, 61, 73-110.
- Kleypas J.A., McManus J.W. & Meñez L.A.B. (1999). Environmental limits to coral reef development: where do we draw the line? *Integrative and Comparative Biology*, 39, 146-159.
- Knowlton N. (1992). Thresholds and multiple stable states in coral reef community dynamics. *Integrative and Comparative Biology*, 32, 674.
- Knowlton N. & Jackson J.B.C. (2008). Shifting baselines, local impacts, and global change on coral reefs. *PLoS Biology*, 6, e54.
- Knutson T.R., McBride J.L., Chan J., Emanuel K., Holland G., Landsea C., Held I., Kossin J.P., Srivastava A.K. & Sugi M. (2010). Tropical cyclones and climate change. *Nature Geoscience*, 3, 157-163.
- Kobluck D.R. & Lysenko M.A. (1994). Ring bleaching in Southern Caribbean *Agaricia agaricites* during rapid water cooling. *Bulletin of Marine science*, 54, 142-150.
- Kong P., Wang L., Zhang H., Zhou Z., Qiu L., Gai Y. & Song L. (2010). Two novel secreted ferritins involved in immune defense of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28, 604-612.
- Koop K., Booth D., Broadbent A., Brodie J., Bucher D., Capone D., Coll J., Dennison W., Erdmann M., Harrison P., Hoegh-Guldberg O., Hutchings P., Jones G.B., Larkum A.W.D., O'Neil J., Steven A., Tentori E., Ward S., Williamson J. & Yellowlees D. (2001). ENCORE: The effect of nutrient enrichment on coral reefs. Synthesis of results and conclusions. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 91-120.
- Kortschak R.D., Samuel G., Saint R. & Miller D.J. (2003). EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Current Biology*, 13, 2190-2195.
- Kuo J., Chen M.-C., Lin C.-H. & Fang L.-S. (2004). Comparative gene expression in the symbiotic and aposymbiotic *Aiptasia pulchella* by expressed sequence tag analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318, 176-186.
- Kushmaro A., Banin E., Loya Y., Stackebrandt E. & Rosenberg E. (2001). *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1383-1388.
- Kushmaro A., Loya Y., Fine M. & Rosenberg E. (1996). Bacterial infection and bleaching. *Nature*, 380-396.

- Kushmaro A., Rosenberg E., Fine M., Ben Haim H. & Loya Y. (1998). Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series*, 171, 131-137.
- Kushmaro A., Rosenberg E., Fine M. & Loya Y. (1997). Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series*, 147, 159-165.
- Kvennefors E.C.E., Leggat W., Hoegh-Guldberg O., Degnan B.M. & Barnes A.C. (2008). An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 1582-1592.
- Kvennefors E.C.E., Leggat W., Kerr C.C., Ainsworth T.D., Hoegh-Guldberg O. & Barnes A.C. (2010). Analysis of evolutionarily conserved innate immune components in coral links immunity and symbiosis. *Developmental & Comparative Immunology*, 34, 1219-1229.
- LeBlanc G.A. & Bain L.J. (1997). Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers. *Environmental Health Perspectives*, 105, 65.
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Boulo V., Huvet A. & Nicolas J.-L. (2006a). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*, 8, 2715-2724.
- Labreuche Y., Soudant P., Gonçalves M., Lambert C. & Nicolas J.-L. (2006b). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 367-379.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L. & Berthe F. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*, 15, 251-258.
- Lefebvre C., Cocquerelle C., Vandenbulcke F., Hot D., Huot L., Lemoine Y. & Salzet M. (2004). Transcriptomic analysis in the leech *Theromyzon tessulatum*: involvement of cystatin B in innate immunity. *Biochemical Journal*, 380, 617-625.
- Leggat W., Ainsworth T., Bythell J., Dove S., Gates R., Hoegh-Guldberg O., Iglesias-Prieto R. & Yellowlees D. (2007a). The hologenome theory disregards the coral holobiont. *Nature Reviews Microbiology*, 5.
- Leggat W., Hoegh-Guldberg O., Dove S. & Yellowlees D. (2007b). Analysis of an EST library from the dinoflagellate (*Symbiodinium* sp.) symbiont of reef-building corals. *Journal of Phycology*, 43, 1010-1021.
- Lesser M.P. (1989). Photobiology of natural populations of zooxanthellae from the sea anemone *Aiptasia pallida*: assesment of the host's role in protection againts ultraviolet radiation. *Cytometry*, 10, 653-658.
- Lesser M.P. (1996). Exposure of symbiotic dynoflagellates to elevated temperatures and ultraviolet radiation causes oxidatives stress and inhibits photosynthesis. *Limnology and Oceanography*, 41, 271-283.
- Lesser M.P. (2004). Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300, 217-252.
- Lesser M.P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, 68, 253-278.
- Lesser M.P. (2007). Coral reef bleaching and global climate change: Can corals survive the next century? *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104, 5259-5260.
- Lesser M.P., Bythell J.C., Gates R.D., Johnstone R.W. & Hoegh-Guldberg O. (2007). Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental

- and ecological data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346, 36-44.
- Lesser M.P. & Farrell J.H. (2004). Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs*, 23, 367-377.
- Lesser M.P. & Shick J.M. (1989). Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymatic defences against oxygen toxicity. *Marine Biology*, 102, 243-255.
- Lesser M.P., Stochaj W.R., Tapley D.W. & Shick J.M. (1990). Bleaching in coral reef antozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs*, 8, 225-232.
- Ley K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9, 263-268.
- Li M., Saren G. & Zhang S. (2008). Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150, 263-270.
- Lockwood B.L., Sanders J.G. & Somero G.N. (2010). Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *Journal of Experimental Biology*, 213, 3548-3558.
- Loya Y., Sakai K., Yamazato K., Nakano Y., Sambali R. & Van Woesik R.V. (2001). Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecology Letters*, 4, 122-131.
- Luna G.M., Bongiorno L., Gili C., Biavasco F. & Danovaro R. (2010). *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 120-127.
- Ma A.T. & Mekalanos J.J. (2009). In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 107, 4365-4370.
- Maiti B., Khushiramani R., Tyagi A., Karunasagar I. & Karunasagar I. (2010). Recombinant ferritin protein protects *Penaeus monodon* infected by pathogenic *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88, 99-105.
- Marshall P. & Schuttenberg H. (2006). *A reef manager's guide to coral bleaching*. Great Barrier Reef Marine Park Authority, Townsville, Australia.
- Martindale J.L. & Holbrook N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192, 1-15.
- Matear R.J., Hirst A.C. & McNeil B.I. (2000). Changes in dissolved oxygen in the Southern Ocean with climate change. *Geochemistry Geophysics Geosystem*, 1.
- Mateo D.R., Siah A., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R. & Greenwood S.J. (2009). Differential in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102, 50-56.
- Maynard J., Anthony K., Marshall P. & Masiri I. (2008). Major bleaching events can lead to increased thermal tolerance in corals. *Marine Biology*, 155, 173-182.
- McClanahan T., Ateweberhan M., Ruiz Sebastián C., Graham N., Wilson S., Bruggemann J. & Guillaume M. (2007). Predictability of coral bleaching from synoptic satellite and in situ temperature observations. *Coral Reefs*, 26, 695-701.
- McClanahan T.R. (2004). Coral bleaching, diseases and mortality in the western Indian ocean. In: *Coral Health and Disease* (eds. Rosenberg E & Loya Y). Springer-Verlag New York, pp. 157-176.

- McDougall K.E., Gibb S.W., Boyd K.G. & Brown B.E. (2006). Chlorophyll-like compounds as novel biomarkers of stress in corals. *Marine Ecology Progress Series*, 325, 137-144.
- Meistertzheim A.-L., Tanguy A., Moraga D. & Thébault M.-T. (2007). Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS Journal*, 274, 6392-6402.
- Merle P.L., Sabourault C., Richier S., Allemand D. & Furla P. (2007). Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine*, 42, 236-246.
- Meron D., Efrony R., Johnson W.R., Schaefer A.L., Morris P.J., Rosenberg E., Greenberg E.P. & Banin E. (2009). Role of flagella in virulence of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5704-5707.
- Meyer E., Aglyamova G., Wang S., Buchanan-Carter J., Abrego D., Colbourne J., Willis B. & Matz M. (2009). Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSFlx. *BMC Genomics*, 10, 219.
- Middlebrook R., Hoegh-Guldberg O. & Leggat W. (2008). The effect of thermal history on the susceptibility of reef-building corals to thermal stress. *Journal of Experimental Biology*, 211, 1050-1056.
- Miller D., Hemmrich G., Ball E., Hayward D., Khalturin K., Funayama N., Agata K. & Bosch T. (2007). The innate immune repertoire in Cnidaria - ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biology*, 8, R59.
- Miller J., Waara R., Muller E. & Rogers C. (2006). Coral bleaching and disease combine to cause extensive mortality on reefs in US Virgin Islands. *Coral Reefs*, 25, 418-418.
- Mitchelmore C.L., Alan Verde E., Ringwood A.H. & Weis V.M. (2003). Differential accumulation of heavy metals in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* as a function of symbiotic state. *Aquatic Toxicology*, 64, 317-329.
- Mitchelmore C.L., Schwarz J.A. & Weis V.M. (2002). Development of symbiosis-specific genes as biomarkers for the early detection of cnidarian-algal symbiosis breakdown. *Marine Environmental Research*, 54, 345-349.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F. & Roch P. (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, 112, 4233-4242.
- Morgan M.B., Edge S.E. & Snell T.W. (2005). Profiling differential gene expression of corals along a transect of waters adjacent to the Bermuda municipal dump. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 524-533.
- Mous P.J., Pet-Soede L., Erdmann M., Cesar H.S.J., Sadovy Y. & Pet J.S. (2000). Cyanide fishing on indonesia coral reefs for the live food fish market: What is the problem? *SPC Live Reef Fish Information Bulletin*, 7, 20-26.
- Mullen K.M., Peters E.C. & Harvell C.D. (2004). Coral resistance to disease. In: *Coral health and disease* (eds. Rosenberg E & Loya Y). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 377-399.
- Muller-Parker G. & D'Elia C.F. (1997). Interactions between corals and their symbiotic algae. In: *Life and death of coral reefs* (ed. Birkeland C). Chapman & Hall New-York, pp. 96-113.
- Mumby P., J., Chisholm J., R. M., Edwards A., J., Andrefouet S. & Jaubert J. (2001). Cloudy weather may have saved Society Island reef corals during the 1998 ENSO event. *Marine Ecology Progress Series*, 222, 209-216.
- Mumby P.J., Elliott I.A., Eakin C.M., Skirving W., Paris C.B., Edwards H.J., Enríquez S., Iglesias Prieto R., Cherubin L.M. & Stevens J.R. (2010). Reserve design for uncertain responses of coral reefs to climate change. *Ecology Letters*.

- Murali M., Raja S. & Devaraj S. (2010). Neutralization of radical toxicity by temperature-dependent modulation of extracellular SOD activity in coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi* and its role as a virulence factor. *Archives of Microbiology*, 192, 619-623.
- Muscatine L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. In: *Ecosystem of the world: Coral reefs* (ed. Dubinsky Z). Elsevier Science publisher B.V. Amsterdam, pp. 75-88.
- Muscatine L., Ferrier-Pagès C., Blackburn A., Gates R.D., Baghdasarian G. & Allemand D. (1998). Cell-specific density of symbiotic dinoflagellates in tropical anthozoans. *Coral Reefs*, 17, 329-337.
- Muscatine L., Grossman D. & Doyno J. (1991). Release of symbiotic algae by tropical sea-anemones after cold shock. *Marine Ecology Progress Series*, 77, 233-243.
- Muscatine L., McCloskey L.R. & Marian R.E. (1981). Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnology and Oceanography*, 26, 601-611.
- Mydlarz L.D., Couch C.S., Weil E., Smith G. & Harvell C.D. (2009). Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montastraea faveolata* during a natural bleaching event. *Marine Ecology Progress Series*, 87, 67-78.
- Mydlarz L.D., Holthouse S.F., Peters E.C. & Harvell C.D. (2008). Cellular responses in sea fan corals: Granular amoebocytes react to pathogen and climate stressors. *PLoS ONE*, 3, e1811.
- Mydlarz L.D., Jones L.E. & Harvell C.D. (2006). Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic*, 37, 251-288.
- Mydlarz L.D., McGinty E.S. & Harvell C.D. (2010). What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease? *Journal of Experimental Biology*, 213, 934-945.
- Nakamura T. & van Woesik R. (2001). Water-flow rates and passive diffusion partially explain differential survival of corals during the 1998 bleaching event. *Marine Ecology Progress Series*, 212, 301-304.
- Nakamura T., van Woesik R. & Yamasaki H. (2005). Photoinhibition of photosynthesis is reduced by water flow in the reef-building coral *Acropora digitifera*. *Marine Ecology Progress Series*, 301, 109-118.
- NCBI (2010). NCBI. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Nicotra M.L., Powell A.E., Rosengarten R.D., Moreno M., Grimwood J., Lakkis F.G., Dellaporta S.L. & Buss L.W. (2009). A hypervariable invertebrate allodeterminant. *Current Biology*, 19, 583-589.
- Nii C.M. & Muscatine L. (1997). Oxidative stress in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella* (Carlgren, 1943): Contribution of the animal to superoxide ion production at elevated temperature. *The Biological Bulletin*, 192, 444-456.
- Nowak T.S., Woodards A.C., Jung Y., Adema C.M. & Loker E.S. (2004). Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using suppression subtractive hybridization. *Journal of Parasitology*, 90, 1034-1040.
- O'Brien D.J., Kaneene J.B. & Poppenga R.H. (1993). The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. *Environmental Health Perspectives*, 99, 351.
- O'Rourke D., Baban D., Demidova M., Mott R. & Hodgkin J. (2006). Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Research*, 16, 1005-1016.

- Okamoto M., Nojima S., Furushima Y. & Nojima H. (2005). Evaluation of coral bleaching condition in situ using an underwater pulse amplitude modulated fluorometer. *Fisheries Science*, 71, 847-854.
- Pachauri R.K. (2007). Climate change 2007: Synthesis report. In: IPCC Secretaria Geneva.
- Pacher P., Beckman J.S. & Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87, 315-424.
- Page C. & Willis B. (2006). Distribution, host range and large-scale spatial variability in black band disease prevalence on the Great Barrier Reef, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 41-51.
- Paillard C. & Maes P. (1995a). The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, 91-100.
- Paillard C. & Maes P. (1995b). The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: II. microscopic study of the brown ring syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, 101-110.
- Palmer C.V., Bythell J.C. & Willis B.L. (2010). Levels of immunity parameters underpin bleaching and disease susceptibility of reef corals. *The FASEB Journal*, 24, 1935-1946.
- Palmer C.V., Modi C.K. & Mydlarz L.D. (2009). Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PLoS ONE*, 4, e7298.
- Palmer C.V., Mydlarz L.D. & Willis B.L. (2008). Evidence of an inflammatory-like response in non-normally pigmented tissues of two scleractinian corals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 2687-2693.
- Papina M., Meziane T. & van Woesik R. (2007). Acclimation effect on fatty acids of the coral *Montipora digitata* and its symbiotic algae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147, 583-589.
- Patterson K.L., Porter J.W., Ritchie K.B., Polson S.W., Mueller E., Peters E.C., Santavy D.L. & Smith G.W. (2002). The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States of America*, 99, 8725-8730.
- Pelejero C., Calvo E. & Hoegh-Guldberg O. (2010). Paleo-perspectives on ocean acidification. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 332-344.
- Penin L., Vidal-Dupiol J. & Adjeroud M. (en révision). Response of coral assemblages to thermal stress: Are bleaching intensity and spatial patterns consistent between events?
- Perez S. & Weis V. (2006). Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 209, 2804-2810.
- Pernet F., Gauthier-Clerc S. & Mayrand É. (2007). Change in lipid composition in eastern oyster (*Crassostrea virginica gmelin*) exposed to constant or fluctuating temperature regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147, 557-565.
- Petit J.R., Jouzel J., Raynaud D., Barkov N.I., Barnola J.M., Basile I., Bender M., Chappellaz J., Davis M., Delaygue G., Delmotte M., Kotlyakov V.M., Legrand M., Lipenkov V.Y., Lorius C., Pepin L., Ritz C., Saltzman E. & Stievenard M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399, 429-436.
- Plantivaux A., Furla P., Zoccola D., Garello G., Forcioli D., Richier S., Merle P.-L., Tambutte E., Tambutte S. & Allemand D. (2004). Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 1170-1181.

- Pochon X., Montoya-Burgos J.I., Stadelmann B. & Pawlowski J. (2006). Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 20-30.
- Podestá G.P. & Glynn P.W. (1997). Sea surface temperature variability in Panamá and Galápagos: Extreme temperatures causing coral bleaching. *Journal of Geophysical Research*, 102, 15749-15759.
- Podrabsky J.E. & Somero G.N. (2004). Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology*, 207, 2237-2254.
- Polato N.R., Voolstra C.R., Schnetzer J., DeSalvo M.K., Randall C.J., Szmant A.M., Medina M. & Baums I.B. (2010). Location-specific responses to thermal stress in larvae of the reef-building coral *Montastraea faveolata*. *PLoS ONE*, 5, e11221.
- Polovina J.J., Howell E.A. & Abecassis M. (2008). Ocean's least productive waters are expanding. *Geophysical Research Letter*, 35, L03618.
- Porchet-Henneré E. & Vernet G. (1992). Cellular immunity in an annelid (*Nereis diversicolor*, Polychaeta): production of melanin by a subpopulation of granulocytes. *Cell and Tissue Research*, 269, 167-174.
- Portner H.O., Peck L. & Somero G. (2007). Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362, 2233-2258.
- Puverel S., Tambutte E., Zoccola D., Domart-Coulon I., Bouchot A., Lotto S., Allemand D. & Tambutte S. (2005). Antibodies against the organic matrix in scleractinians: a new tool to study coral biomineralization. *Coral Reefs*, 24, 149-156.
- Raymundo L.J., Rosell K.B., Reboton C.T. & Kaczmarek L. (2005). Coral diseases on Philippine reefs: genus *Porites* is a dominant host. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64, 181-191.
- Reaka-Kudla M.L. (1997). The global biodiversity of coral reefs: A comparison with rain forests. In: *Biodiversity II Understanding and protecting our biological resources* (eds. Reaka-Kudla ML, Wilson DE & Wilson EO). Joseph Henry Press Washington, pp. 83-104.
- Recalcati S., Invernizzi P., Arosio P. & Cairo G. (2008). New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 30, 84-89.
- Reshef L., Koren O., Loya Y., Zilber-Rosenberg I. & Rosenberg E. (2006). The coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology*, 8, 2068-2073.
- Reshef L., Ron E. & Rosenberg E. (2008). Genome analysis of the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Archives of Microbiology*, 190, 185-194.
- Reynolds W.S., Schwarz J.A. & Weis V.M. (2000). Symbiosis-enhanced gene expression in cnidarian-algal associations: cloning and characterization of a cDNA, sym32, encoding a possible cell adhesion protein. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126, 33-44.
- Richier S., Cottalorda J.-M., Guillaume M.M.M., Fernandez C., Allemand D. & Furla P. (2008). Depth-dependant response to light of the reef building coral, *Pocillopora verrucosa*: Implication of oxidative stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357, 48-56.
- Richier S., Furla P., Plantivaux A., Merle P.-L. & Allemand D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 277-285.
- Richier S., Sabourault C., Courtiade J., Zucchini N., Allemand D. & Furla P. (2006). Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *FEBS Journal*, 273, 4186-4198.

- Riegl B., Bruckner A., Coles S.L., Renaud P. & Dodge R.E. (2009). Coral reefs: threats and conservation in an era of global change. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162, 136-186.
- Rodrigues L.J., Grottoli A.G. & Lesser M.P. (2008a). Long-term changes in the chlorophyll fluorescence of bleached and recovering corals from Hawaii. *Journal of Experimental Biology*, 211, 2502-2509.
- Rodrigues L.J., Grottoli A.G. & Pease T.K. (2008b). Lipid class composition of bleached and recovering *Porites compressa* Dana, 1846 and *Montipora capitata* Dana, 1846 corals from Hawaii. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358, 136-143.
- Rodriguez-Lanetty M., Harii S. & Hoegh-Guldberg O. (2009). Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress. *Molecular Ecology*, 18, 5101-5114.
- Rodriguez-Lanetty M., Phillips W. & Weis V. (2006a). Transcriptome analysis of a cnidarian - dinoflagellate mutualism reveals complex modulation of host gene expression. *BMC Genomics*, 7, 23.
- Rodriguez-Lanetty M., Wood-Charlson E.M., Hollingsworth L., Krupp D. & Weis V. (2006b). Temporal and spatial infection dynamics indicate recognition events in the early hours of a dinoflagellate/coral symbiosis. *Marine Biology*, 149, 713-719.
- Rogers C.S. & Miller J. (2006). Permanent 'phase shifts' or reversible declines in coral cover? Lack of recovery of two coral reefs in St. John, US Virgin Islands. *Marine Ecology Progress Series*, 306, 103-114.
- Rosenberg E. (2004). The bacterial disease hypothesis of coral bleaching. In: *Coral health and disease* (eds. Rosenberg E & Loya Y). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 377-399.
- Rosenberg E. & Falkovitz L. (2004). The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annual Review of Microbiology*, 58, 143-159.
- Rosenberg E., Kellogg C.A. & Rohwer F. (2007a). Coral microbiology. *Oceanography*, 20, 146-154.
- Rosenberg E., Koren O., Reshef L., Efrony R. & Zilber-Rosenberg I. (2007b). The hologenome theory disregards the coral holobiont: reply from Rosenberg et al. *Nature Reviews Microbiology*, 5.
- Rosenberg E., Koren O., Reshef L., Efrony R. & Zilber-Rosenberg I. (2007c). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Review Microbiology*, 5, 355-362.
- Rosenberg E., Sharon G., Atad I. & Zilber-Rosenberg I. (2010). The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 500-506.
- Rosic N., Pernice M., Dove S., Dunn S. & Hoegh-Guldberg O. (2011). Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: possible implications for coral bleaching. *Cell Stress and Chaperones*, 16, 69-80.
- Rowan R. & Powers D.A. (1991). Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine Ecology Progress Series*, 71, 65-73.
- Sabourault C., Ganot P., Deleury E., Allemand D. & Furla P. (2009). Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *BMC Genomics*, 10, 333.
- Salvat B. (1992). Natural bleaching and mortality of scleractinian corals on Moorea Reefs (Society Archipelago) in 1991. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 314, 105-111.
- Scheffer M., Carpenter S., Foley J.A., Folke C. & Walker B. (2001). Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, 413, 591-596.



- Scheffer M. & Carpenter S.R. (2003). Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 648-656.
- Schuhmacher H. & Zibrovius H. (1985). What is hermatypic? A redefinition of ecological groups in corals and other organisms. *Coral Reefs*, 4, 1-9.
- Schwarz J., Brokstein P., Voolstra C., Terry A., Miller D., Szmant A., Coffroth M. & Medina M. (2008). Coral life history and symbiosis: Functional genomic resources for two reef building Caribbean corals, *Acropora palmata* and *Montastraea faveolata*. *BMC Genomics*, 9, 97.
- Schwarz J.A. & Weis V.M. (2003). Localization of a symbiosis-related protein, Sym32, in the *Anthopleura elegantissima*-*Symbiodinium muscatinei* association. *Biological Bulletin*, 205, 339-350.
- Sekar R., Mills D.K., Remily E.R., Voss J.D. & Richardson L.L. (2006). Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5963-5973.
- Selig E.R., Harvell C.D., Bruno J.F., Willis B.L., Page C.A., Casey K.S. & Sweatman H. (2006). Analyzing the relationship between ocean temperature anomalies and coral disease outbreaks at broad spatial scales. In: *Coral Reefs and Climate Change: Science and Management* (eds. Phinney JT, Strong A, Skyring W, West J, Kleypas J & Hoegh-Guldberg O) New York, p. American Geophysical Union Press.
- Sharp V.A. & Brown B.E. (1997). Heat shock protein (hsp 70) expression in the tropical reef coral *Goniopora djiboutiensis*. *Journal of Thermal Biology*, 22 (1), 11-19.
- Simão M., Leite R., Rocha C. & Cancela M. (2010). Changes in bioturbation of iron biogeochemistry and in molecular response of the clam *Ruditapes decussates* upon *Perkinsus olseni* infection. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 433-443.
- Smith-Keune C. & Dove S. (2008). Gene expression of a green fluorescent protein homolog as a host-specific biomarker of heat stress within a reef-building coral. *Marine Biotechnology*, 10, 166-180.
- Smith-Keune C. & van Oppen M. (2006). Genetic structure of a reef-building coral from thermally distinct environments on the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 25, 493-502.
- Somero G.N. (2004). Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 321-333.
- Somero G.N., Dahlhoff E. & Lin J.J. (1996). Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal optima and tolerance ranges. In: *Animals and temperature: Phenotypic and evolutionary adaptation* (eds. Johnston IA & Bennett AF). Cambridge University Press New-York, pp. 53-78.
- Song L., Zou H., Chang Y., Xu W. & Wu L. (2006). The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 265-273.
- Soonthornchai W., Rungrassamee W., Karoonuthaisiri N., Jarayabhand P., Klinbunga S., Söderhäll K. & Jiravanichpaisal P. (2010). Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34, 19-28.
- Souter P., Bay L.K., Andreakis N., Csaszar N., Seneca F.O. & Van Oppen M.J.H. (2010). A multilocus, temperature stress-related gene expression profile assay in *Acropora millepora*, a dominant reef-building coral. *Molecular Ecology Resources*, In press.
- Souter P., Henriksson O., Olsson N. & Grahn M. (2009). Patterns of genetic structuring in the coral *Pocillopora damicornis* on reefs in East Africa. *BMC Ecology*, 9, 19.

- Stadtman T.C. (1996). Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 83-100.
- Starger C.J., Yeoh S.S.R., Dai C.-F., Baker A.C. & Desalle R.O.B. (2008). Ten polymorphic STR loci in the cosmopolitan reef coral, *Pocillopora damicornis*. *Molecular Ecology Notes*, 8, 619-621.
- Stat M., Loh W., Hoegh-Guldberg O. & Carter D. (2008). Symbiont acquisition strategy drives host–symbiont associations in the southern Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 27, 763-772.
- Steen R.G. & Muscatine L. (1987). Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *Biological Bulletin*, 172, 246-263.
- Stimson J. (1997). The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 214, 35-48.
- Stimson J. & Kinzie III R.A. (1991). The temporal pattern and rate of release of zooxanthellae from the reef coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus) under nitrogen-enrichment and control conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 153, 63-74.
- Stoddart J.A. & Black R. (1985). Cycles of gametogenesis and planulation in the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Ecology Progress Series*, 23, 153-164.
- Strong A.E., Skirving W.J. & Liu G. (2003). Remote sensing of sea surface temperatures during 2002 barrier reef coral bleaching. *Eos Transaction American Geophysical Union*, 84, 137-144.
- Strychar K.B., Coates M., Sammarco P.W. & Piva T.J. (2004). Bleaching as a pathogenic response in scleractinian corals, evidenced by high concentrations of apoptotic and necrotic zooxanthellae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 304, 99-121.
- Sussman M., Loya Y., Fine M. & Rosenberg E. (2003). The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environmental Microbiology*, 5, 250-255.
- Tabor G.M. & Aguirre A.A. (2004). Ecosystem health and sentinel species: adding an ecological element to the proverbial “canary in the mineshaft”. *EcoHealth*, 1, 226-228.
- Takahashi S., Nakamura T., Sakamizu M., Woesik R.v. & Yamasaki H. (2004). Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant Cell Physiology*, 45, 251-255.
- Takahashi S., Whitney S., Itoh S., Maruyama T. & Badger M. (2008). Heat stress causes inhibition of the de novo synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States of America*, 105, 4203-4208.
- Takahashi S., Whitney S.M. & Badger M.R. (2009). Different thermal sensitivity of the repair of photodamaged photosynthetic machinery in cultured *Symbiodinium* species. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106, 3237-3242.
- Tambutté E., Allemand D., Bourge I., Gattuso J.P. & Jaubert J. (1995). An improved <sup>45</sup>Ca protocol for investigating physiological mechanisms in coral calcification. *Marine Biology*, 122, 453-459.
- Tambutté E., Allemand D., Zoccola D., Meibom A., Lotto S., Caminiti N. & Tambutté S. (2007). Observations of the tissue-skeleton interface in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, 26, 517-529.
- Tchernov D., Gorbunov M.Y., de Vargas C., Narayan Yadav S., Milligan A.J., Haggblom M. & Falkowski P.G. (2004). From the cover: membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101, 13531-13535.

- Terán E., Méndez E.R., Enríquez S. & Iglesias-Prieto R. (2010). Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. *Applied Optics*, 49, 5032-5042.
- Thompson F.L., Iida T. & Swings J. (2004). Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403-431.
- Thornhill D.J., LaJeunesse T.C., Kemp D.W., Fitt W.K. & Schmidt G.W. (2006). Multi-year, seasonal genotypic surveys of coral-algal symbioses reveal prevalent stability or post-bleaching reversion. *Marine Biology*, 148, 711-722.
- Tolmasky M.E. & Crosa J.H. (1991). Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biometals*, 4, 33-35.
- Tom M., Douek J., Yankelevich I., Bosch T.C.G. & Rinkevich B. (1999). Molecular characterization of the first Heat Shock Protein 70 from a reef coral. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262, 103-108.
- Toren A., Landau L., Kushmaro A., Loya Y. & Rosenberg E. (1998). Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1379-1384.
- Trapido-Rosenthal H., Zielke S., Owen R., Buxton L., Boeing B., Bhagooli R. & Archer J. (2005). Increased zooxanthellae nitric oxide synthase activity is associated with coral bleaching. *Biology Bulletin*, 208, 3-6.
- Trapido-Rosenthal H.G., Sharp K.H., Galloway T.S. & Morrall C.E. (2001). Nitric oxide and cnidarian-dinoflagellate symbioses: Pieces of a puzzle. *Integrative and Comparative Biology*, 41, 247-257.
- Travers M.-A., Barbou A., Le Goïc N., Huchette S., Paillard C. & Koken M. (2008). Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiology Letters*, 289, 34-40.
- Travers M.-A., Basuyaux O., Le Goïc N., Huchette S., Nicolas J.-L., Koken M. & Paillard C. (2009). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology*, 15, 1365-1376.
- Travers M.A., Meistertzheim A.L., Cardinaud M., Friedman C.S., Huchette S., Moraga D. & Paillard C. (2010). Gene expression patterns of sensitive and resistant abalone, *Haliotis tuberculata*, in response to the pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, In press.
- Trench R.K. (1979). The cell biology of plant-animal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology*, 30, 485-531.
- Turzhitsky V., Fang A., Fung J., Henss J., Siple M., Stoyneva V., Rogers J.D., Wolfman H., Radosevich A., Backman V. & Marcelino L.A. (2010). Optical characterization of coral skeleton with low-coherence enhanced backscattering spectroscopy. In: *Biomedical Optics*. Optical Society of America, p. BTuD31.
- Ulstrup K., van Oppen M., Kühl M. & Ralph P. (2007). Inter-polyp genetic and physiological characterisation of *Symbiodinium* in an *Acropora valida* colony. *Marine Biology*, 153, 225-234.
- Van der Schalie W.H., Gardner Jr H.S., Bantle J.A., De Rosa C.T., Finch R.A., Reif J.S., Reuter R.H., Backer L.C., Burger J. & Folmar L.C. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107, 309.
- Van Woesik R., De Vantier L. & Glazebrook J. (1995). Effects of cyclone 'Joy' on nearshore coral communities of the Great Barrier Reef. *Marine Ecology Progress Series*, 128, 261-270.

- Vandenbergh J., Li Y., Verdonck L., Li J., Sorgeloos P., Xu H.S. & Swings J. (1998). *Vibrios* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169, 121-132.
- Vandenbergh J., Verdonck L., Robles-Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gomez-Gil B., Calderon J., Sorgeloos P. & Swings J. (1999). *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2592.
- Van der Schalie W.H., Gardner Jr H.S., Bantle J.A., De Rosa C.T., Finch R.A., Reif J.S., Reuter R.H., Backer L.C., Burger J. & Folmar L.C. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107, 309.
- Vaughan T.W. (1914). Reef corals of the Bahamas and of the southern Florida. *Carnegie Institute Washington Yearbook*, 13, 222-226.
- Venn A.A., Loram J.E. & Douglas A.E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1069-1080.
- Venn A.A., Tambutté E., Lotto S., Zoccola D., Allemand D. & Tambutté S. (2009). Imaging intracellular pH in a reef coral and symbiotic anemone. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106, 16574-16579.
- Veron J.E.N. (1995). *Corals in space and time*. Cornell University Press, New York.
- Veron J.E.N. (2000). *Corals of the World*. Australian Institute of Marine Science, Townsville.
- Veron J.E.N. & Pichon M. (1976a). *Scleractinia of eastern Australia, Part I. Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae*.
- Veron J.E.N. & Pichon M. (1976b). *Scleractinia of eastern Australia, Part II. Families Acroporidae*.
- Vidal-Dupiol J., Adjeroud M., Roger E., Foure L., Duval D., Mone Y., Ferrier-Pages C., Tambutte E., Tambutte S., Zoccola D., Allemand D. & Mitta G. (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC Physiology*, 9, 14.
- Vidal-Dupiol J., Ladrière O., Destoumieux-Garzon D., Sautière P.-E., Meistertzheim A.L., Tambutté E., Tambutté S., Duval D., Fouré L., Adjeroud M. & Mitta G. (en révision). Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *The journal of Biological Chemistry*, En révision.
- Vidal-Dupiol J., Ladrière O., Meistertzheim A.L., Fouré L., Adjeroud M. & Mitta G. (in press). Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *The Journal of Experimental Biology*.
- Vizcaino M.I., Johnson W.R., Kimes N.E., Williams K., Torralba M., Nelson K.E., Smith G.W., Weil E., Moeller P.D.R. & Morris P.J. (2010). Antimicrobial resistance of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* and Caribbean sister phylotypes isolated from a diseased octocoral. *Microbial ecology*, 4, 646-657.
- Vollmer S.V. & Palumbi S.R. (2002). Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science*, 296, 2023-2025.
- Voolstra C.R., Schnetzer J., Peshkin L., Randall C., Szmant A.M. & Medina M. (2009). Effects of temperature on gene expression in embryos of the coral *Montastraea faveolata*. *BMC Genomics*, 10.
- Voss J.D. & Richardson L.L. (2006). Coral diseases near Lee Stocking Island, Bahamas: patterns and potential drivers. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 33-40.
- Ward J., R, Kim K. & Harvell C., D (2007). Temperature affects coral disease resistance and pathogen growth. *Marine Ecology Progress Series*, 329, 115-121.
- Ward J.R. & Lafferty K.D. (2004). The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing? *PLoS Biology*, 2, e120.

- Ward J.R., Rypien K.L., Bruno J.F., Harvell C.D., Jordan-Dahlgren E., Mullen K.M., Rodriguez-Martinez R.E., Sanchez J. & Smith G. (2006). Coral diversity and disease in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 23-31.
- Ward S. (1992). Evidence for broadcast spawning as well as brooding in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 112, 641-646.
- Warner M.E., Fitt W.K. & Schmidt G.W. (1996). The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae *in hospite* from four different species of reef coral: a novel approach. *Plant Cell And Environment*, 19, 291-299.
- Warner M.E., Fitt W.K. & Schmidt G.W. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 96, 8007-8012.
- Weil E., Smith G.W. & Gil-Agudelo D., L. (2006). Status and progress in coral reef disease research. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 1-7.
- Weil E., Urreiztieta I. & Garzón-Ferreira J. (2002). Geographic variability in the incidence of coral and octocoral diseases in the wider Caribbean. In: *Proceedings of 9th International Coral Reef Symposium* Bali, Indonesia., pp. 1231-1237.
- Weis V., Reynolds W., deBoer M. & Krupp D. (2001). Host-symbiont specificity during onset of symbiosis between the dinoflagellates *Symbiodinium* spp. and planula larvae of the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Coral Reefs*, 20, 301-308.
- Weis V.M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *The Journal of Experimental Biology*, 211, 3059-3066.
- Weis V.M. & Allemand D. (2009). What Determines Coral Health? *Science*, 324, 1153-1155.
- Weis V.M., Davy S.K., Hoegh-Guldberg O., Rodriguez-Lanetty M. & Pringle J.R. (2008). Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 369-376.
- Wilkinson C. (1999). Global and local threats to coral reef functioning and existence: review and prediction. *Marine & Freshwater Research*, 50, 867-878.
- Wilkinson C. (2000). *Status of Coral Reefs of the world*. Australian Institute of Marine Science, Townsville.
- Wilkinson C. (2008). Status of coral reefs of the world. In: *Status of Coral Reefs of the World* (ed. Wilkinson C). Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest research Center Townsville, p. 296.
- Williams E. & Bunkley-Williams L. (1990). The world-wide coral reef bleaching cycle and related sources of coral mortality. *Atoll Research Bulletin*, 335, 1-71.
- Willis B.L., Page C.A. & Dinsdale E.A. (2004). Coral diseases on the great barrier reef. In: *Coral health and disease*. (eds. Rosenberg E & Loya Y). Springer-Verlag New York, pp. 69-104.
- Wood-Charlson E.M., Hollingsworth L.L., Krupp D.A. & Weis V.M. (2006). Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. *Cellular Microbiology*, 8, 1985-1993.
- Wood-Charlson E.M. & Weis V.M. (2009). The diversity of C-type lectins in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 881-889.
- Wooldridge S., Done T., Berkelmans R., Jones R. & Marshall P. (2005). Precursors for resilience in coral communities in a warming climate: a belief network approach. *Marine Ecology Progress Series*, 295, 157-169.
- Wright A.C., Simpson L.M. & Oliver J.D. (1981). Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infection and Immunity*, 34, 503-507.
- Wyckoff E., Mey A. & Payne S. (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals*, 20, 405-416.

- Yakovleva I., Bhagooli R., Takemura A. & Hidaka M. (2004). Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 721-730.
- Yeoh S.-R. & Dai C.-F. (2010). The production of sexual and asexual larvae within single broods of the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 157, 351-359.
- Zalasiewicz J., Williams M., Haywood A. & Ellis M. (2011). The Anthropocene: a new epoch of geological time? *Philosophical Transactions of the Royal Society London A*, 369, 835-841.
- Zavasnik-Bergant T. (2008). Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Frontiers in Bioscience*, 13, 4625-4637.
- Zhang H., Kong P., Wang L., Zhou Z., Yang J., Zhang Y., Qiu L. & Song L. (2010). Cflec-5, a pattern recognition receptor in scallop *Chlamys farreri* agglutinating yeast *Pichia pastoris*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 149-156.
- Zoccola D., Tambutte E., Kulhanek E., Puverel S., Scimeca J.C., Allemand D. & Tambutte S. (2004). Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1663, 117-126.
- Zoccola D., Tambutte E., S negas-Balas F., Michiels J.F., Failla J.P. & Allemand D. (1999). Cloning of a calcium channel alpha1 subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Gene*, 227, 157-167.

## **Chapitre VII : Annexes**

# ANNEXE 1

## Justificatif d'acceptation de la publication n°2

Fichier Édition Affichage Aller à Messages Outils ?

Relever · Écrire Adresses Étiquette ·

Pub gene bactos JEXBIO/2010/053165 - M... ×

de jeb@biologists.com ☆

sujet **JEXBIO/2010/053165 - Manuscript Decision**

pour Guillaume Mitta ☆

copie à Vous-même ☆, Ophélie Ladrière ☆, Anne-Leila Meistertzheim ☆, Laurent Fouré ☆, Mehdi adjeroud ☆

MS ID#: JEXBIO/2010/053165  
MS TITLE: Physiological responses of the scleractinian coral <I>Pocillopora damicornis</I> to bacterial stress from <I>Vibrio coralliilyticus</I>

Dear Dr. Guillaume,

Congratulations to an excellen ms - very well received by both reviewers

We have now reached a decision on the above manuscript.

To see the reviewers' reports and a copy of this decision letter, please go to:  
<http://submit-jeb.biologists.org>  
and click on the 'Manuscripts with Decisions' queue in the Author Area.  
Co-authors are only able to see reviews and this decision letter through  
the 'Author History' link in the Author Area.

As you will see, both reviewers gave favourable reports but raised some minor points that may require amendments to your manuscript. I hope that you will be able to carry these out, because I would like to be able to accept your paper. In revising your manuscript, I would be grateful if you would list how you have dealt with the points raised by the reviewers in the 'Response to Reviewers' box online. Please attend to all of the reviewers' comments. If you do not agree with any of their criticisms or suggestions please explain clearly why this is so.

I am sorry to face you with more work on your interesting paper.

To submit your revised manuscript, please go to:  
<http://submit-jeb.biologists.org>  
and click on the 'Submit a revision' link within the Author Area.

Please note that the original source files for text, tables and all figures will be required. Do not upload a single pdf containing tables and figures but instead provide a separate file for each item (i.e. a Word file of the main text and legends, a Word file for each Table, a separate file for each figure in JPEG/EPS/PDF format, and a separate file for each supplementary fig/table/cover art).

In order to promote timely publication, we require that the revision be completed within 90 days from the date of this message. Manuscripts received after this time will be considered as new submissions.

I look forward to receiving your revised manuscript.



## Annexe 2

Coral Reefs (2009) 28:775–780  
DOI 10.1007/s00338-009-0515-7

### NOTE

## Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef

M. Adjeroud · F. Michonneau · P. J. Edmunds ·  
Y. Chancerelle · T. Lison de Loma · L. Penin ·  
L. Thibaut · J. Vidal-Dupiol · B. Salvat · R. Galzin

Received: 27 March 2009 / Accepted: 13 May 2009 / Published online: 6 June 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Coral reefs are increasingly threatened by various disturbances, and a critical challenge is to determine their ability for resistance and resilience. Coral assemblages in Moorea, French Polynesia, have been impacted by multiple disturbances (one cyclone and four bleaching events between 1991 and 2006). The 1991 disturbances caused large declines in coral cover (~51% to ~22%), and subsequent colonization by turf algae (~16% to

~49%), but this phase-shift from coral to algal dominance has not persisted. Instead, the composition of the coral community changed following the disturbances, notably favoring an increased cover of *Porites*, reduced cover of *Montipora* and *Pocillopora*, and a full return of *Acropora*; in this form, the reef returned to pre-disturbance coral cover within a decade. Thus, this coral assemblage is characterized by resilience in terms of coral cover, but plasticity in terms of community composition.

Communicated by Ecology Editor Prof. Peter Mumby

M. Adjeroud (✉) · F. Michonneau · L. Penin ·  
J. Vidal-Dupiol · B. Salvat · R. Galzin  
Centre de Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne,  
UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Université de Perpignan via  
Domitia, 66860 Perpignan, France  
e-mail: adjeroud@univ-perp.fr

M. Adjeroud · Y. Chancerelle · T. L. de Loma · B. Salvat ·  
R. Galzin  
Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de  
l'Environnement, UMS 2978 CNRS-EPHE, BP 1013, Papetoai,  
Moorea, French Polynesia

F. Michonneau  
Department of Zoology, University of Florida, Gainesville,  
FL 32611-8525, USA

P. J. Edmunds  
Department of Biology, California State University,  
18111 Nordhoff Street, Northridge, CA 91330-8303, USA

L. Penin · L. Thibaut  
Australian Research Council Center of Excellence for Coral  
Reef Studies, James Cook University, Townsville, QLD 4811,  
Australia

L. Thibaut  
Institut de Recherche pour le Développement, UR 128 Coreus,  
Université de Perpignan via Domitia, 66860 Perpignan, France

**Keywords** Coral · Bleaching · Cyclone · Phase-shift ·  
Resilience · Moorea

### Introduction

Like many marine ecosystems, in recent decades, coral reefs have been severely impacted by various types of natural and anthropogenic disturbances (Hughes et al. 2003, 2007; Pandolfi et al. 2003; Bellwood et al. 2004). While some disturbances are a routine part of coral reef dynamics, there is concern that the frequency and severity of large-scale disturbances have increased over the last three decades (Hoegh-Guldberg et al. 2007). Faced with assaults by numerous disturbances, coral reefs have been affected by widespread mortalities of keystone organisms, and in many cases have undergone a striking phase shift in community structure (McManus and Polsenberg 2006). Classically, these phase shifts have involved the replacement of stony corals by algae, which are then unable to provide the ecosystem goods and services previously supplied by corals (McManus and Polsenberg 2006).

Scleractinians provide the framework of coral reefs, and the dynamics of these ecosystems are largely influenced by changes in the population structure of corals, the detection

# Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef

M. Adjeroud<sup>1,2</sup>, F. Michonneau<sup>1,3</sup>, P.J. Edmunds<sup>4</sup>, Y. Chancerelle<sup>2</sup>, T. Lison de Loma<sup>2</sup>, L.

Penin<sup>1,5</sup>, L. Thibaut<sup>5,6</sup>, J. Vidal-Dupiol<sup>1</sup>, B. Salvat<sup>1,2</sup>, R. Galzin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Centre de Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan via Domitia, 66860 Perpignan, France*

<sup>2</sup>*Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement, UMS 2978 CNRS-EPHE, BP 1013 Papetoai, Moorea, French Polynesia*

<sup>3</sup>*Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, FL 32611-8525, USA*

<sup>4</sup>*Department of Biology, California State University, 18111 Nordhoff Street, Northridge, California 91330-8303, USA*

<sup>5</sup>*Australian Research Council Center of Excellence for Coral Reef Studies, James Cook University, Townsville, QLD 4811, Australia*

<sup>6</sup>*Institut de Recherche pour le Développement, UR 128 Coreus, Université de Perpignan via Domitia, 66860 Perpignan, France*

M. Adjeroud (✉)

UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Centre de Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan via Domitia, 66860 Perpignan, France

Phone: +33 4 68 66 21 94, fax: +33 4 68 50 36 86, email: adjeroud@univ-perp.fr

## Abstract

Coral reefs are increasingly threatened by various disturbances, and a critical challenge is to determine their ability for resistance and resilience. Coral assemblages in Moorea, French Polynesia, have been impacted by multiple disturbances (one cyclone and four bleaching events between 1991 and 2006). The 1991 disturbances caused large declines in coral cover (~51% to ~22%), and subsequent colonization by turf algae (~16% to ~49%), but this phase-shift from coral to algal dominance has not persisted. Instead, the composition of the coral community changed following the disturbances, notably favoring an increased cover of *Porites*, reduced cover of *Montipora* and *Pocillopora*, and a full return of *Acropora*; in this form, the reef returned to pre-disturbance coral cover within a decade. Thus, this coral assemblage is characterized by resilience in terms of coral cover, but plasticity in terms of community composition. Our results support the possibility that instead of a rapid collapse in

response to disturbances, some coral reefs may undergo gradual changes in their community structure.

*Key words : Coral, Bleaching, Cyclone, Phase-shift, Resilience, Moorea*

## **Introduction**

Like many marine ecosystems, in recent decades coral reefs have been severely impacted by various types of natural and anthropogenic disturbances (Hughes et al. 2003, 2007, Pandolfi et al. 2003, Bellwood et al. 2004). While some disturbances are a routine part of coral reef dynamics (Grigg and Dollar 1990), there is concern that the frequency and severity of large-scale disturbances have increased over the last three decades (Hoegh-Guldberg 1999, Hoegh-Guldberg et al. 2007). Faced with assaults by numerous disturbances, coral reefs have been affected by widespread mortalities of keystone organisms, and in many cases have undergone a striking phase shift in community structure (Bellwood et al. 2006, Graham et al. 2007, among others). Classically, these phase shifts have involved the replacement of stony corals by algae, which are then unable to provide the ecosystem goods and services previously supplied by corals (McManus and Polsenberg 2006).

Scleractinians provide the framework of coral reefs, and the dynamics of these ecosystems are largely influenced by changes in the population structure of corals, the detection of which requires long-term monitoring efforts, with frequent sampling necessary to resolve rapidly-occurring events such as episodic recruitment, sudden-onset lethal diseases, or transient population perturbations (Connell et al. 1997, Coles and Brown 2007). The temporal resolution of time-series analyses is particularly germane to testing coral communities for resistance (i.e., the capacity to remain unchanged following disturbances), describing recovery trajectories (i.e., patterns of recolonization following disturbances), and assessing

resilience (i.e., the capacity to return to a reference state following disturbances; Nyström et al. 2000, West and Salm 2003).

The coral reefs along the north shore of Moorea have been studied at the Tiahura Outer Reef Sector (TORS) since the early 1970s, but starting in 1991, a new quantitative program began to record changes with annual resolution (Adjeroud et al. 2002). Between 1991 and 2006, TORS has been impacted by one cyclone (1991), and four bleaching episodes (1991, 1994, 2002, 2003) that were associated with high sea-surface temperatures in the absence of high cloud cover (Mumby et al. 2001, Penin et al. 2007; Fig. 1). Prior to 1991, TORS experienced two bleaching events (1984 and 1987), and outbreaks of the coral predator *Acanthaster planci* (1980-1982), which caused coral cover to decline from ~45% in 1979 to ~12% in 1982 (Berumen and Pratchett 2006). The 37-year history of TORS constitutes one of the longest records of coral reef dynamics, and the trajectories of change are marked by striking differences compared to those dominating contemporary literature. Notably, while TORS has sustained multiple severe losses of coral cover, this reef has repeatedly regained coral cover to levels similar to pre-disturbance levels, and has shown no sign of a persistent phase shift to macroalgal dominance. Here, we focus on the most recent 15 years of TORS, and compare the effects of five disturbances in the context of better understanding the roles of resilience and recovery in determining the trajectory of change in coral communities.

## **Material and methods**

The study site is located on the outer reef slope at the Tiahura sector at the western end of the north shore of Moorea Island (17°30'S, 149°50'W). The Tiahura reef slope is largely free of direct anthropogenic disturbances, as demonstrated by sediment and water quality analyses (Adjeroud 1997, Schrimm et al. 2004). The percent cover of algal turf

(heterogeneous assemblage of filamentous algae that typically is < 10 mm in height), macroalgae (macroscopic fleshy algae, represented mostly by the genera *Turbinaria*, *Halimeda* and *Sargassum*) and scleractinian corals was recorded along 4 permanent transects of 25 m length, oriented parallel to the reef front, and placed at 10-12 m depth on the outer slope. For the purpose of the present analyses, each transect was treated as a statistical replicate (n = 4) in all temporal contrasts. We used the Point Intercept Transect Method, with points placed every 0.25 m, to estimate cover of each category of benthic organisms. Data were collected once a year in March-April. For further details on the sampling design and methodology, see Adjeroud et al. (2002).

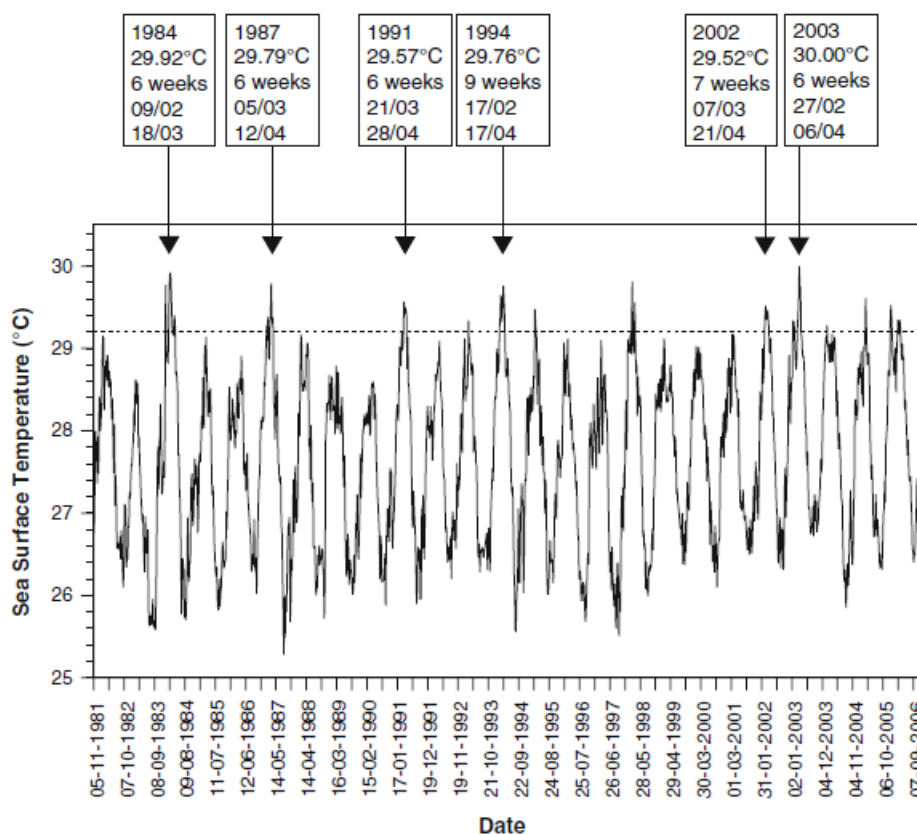


Figure 1: Weekly sea surface temperature around Moorea from November 1981 to December 2006. IGOSS-nmc data courtesy of the Lamont-Doherty Climate Center. Arrows indicate bleaching events, and the horizontal dotted line indicates the thermal threshold for Moorea (29.2°C). For each event, the amplitude of the temperature anomaly (highest temperature recorded during the anomaly) and its duration (number of consecutive weeks with temperature higher than the threshold, and dates) are indicated in boxes.

The significance of the interannual variability was evaluated using the nonparametric test of Friedman, because of the absence of normality in the data, and because these data were not independent. The Wilcoxon test was used in an a posteriori fashion to compare values of two different years. We used Kruskal's non metric multidimensional scaling (MDS) to examine the interannual variation in the composition of the coral assemblage based on the Bray-Curtis dissimilarity index.

## **Results and discussion**

The five disturbances had different impacts on the coral assemblages. A significant decline in coral cover followed the two disturbances of 1991. Coral cover (pooled among genera) declined from  $51.0 \pm 9.5\%$  (mean  $\pm$  SD) in early 1991 to  $24.2 \pm 14.4\%$  in 1992, and  $22.5 \pm 9.3\%$  in 1993 (Fig. 2, Table 1). In contrast, the bleaching events of 1994, 2002 and 2003 had no detectable effects on coral cover, even though the thermal anomalies (duration and amplitude) causing these events and their short-term impacts in term of bleaching prevalence were similar to the 1991 bleaching event and its subsequent coral mortality (Salvat 1992, Hoegh-Guldberg and Salvat 1995, Penin et al. 2007; Fig. 1). The decline in coral cover in the four years following 1991 is among the most rapid of this magnitude recorded following natural disturbances on any coral reef. For instance, along the north coast of Jamaica, coral cover at 7 m depth declined from  $\sim 75\%$  in 1977-1979 to  $\sim 40\%$  in 1980 after Hurricane Allen, and to  $\sim 5\%$  by 1993 (Hughes 1994). The protracted loss of coral cover in Jamaica followed two hurricanes, three bleaching events, a reduction of grazing pressure and a potential pulse of nutrients which all contributed to a dramatic increase of algal cover, from  $\sim 4\%$  in 1977 to  $\sim 92\%$  in 1993 (Hughes 1994). On the southern Great Barrier Reef, an 'extreme' loss in coral cover was also reported as a result of storm effects, from  $\sim 80\%$  in 1987 to  $\sim 10\%$  in 1989 (Halford et al. 2004), and in the eastern Indian Ocean, coral

cover decreased from ~48% in 1998 to ~11% in 1999 after the 1998 bleaching event (Smith et al. 2008).

Between 1991 and 1994, the decline in coral cover at TORS was accompanied by a rapid colonization by turf algae ( $16.2 \pm 5.5\%$  in 1991 to  $48.5 \pm 2.5\%$  in 1994; Fig. 2, Table 1). Turf algae are generally among the first to colonize vacant space, but are often replaced by dense growths of macroalgae (McManus and Polsenberg 2006, Done et al. 2007). On TORS however, a successional sequence of algal growth was not observed, but instead, the cover of algal turf decreased after 1994, and returned to the pre-disturbance levels within a decade. This result suggests that the availability of vacant space is not sufficient to cause a persistent increase in algal cover, and that other factors, such as a reduction in grazing pressure or an increase in nutrients – that were not present at TORS – are necessary for a phase change to macroalgal dominance (McManus and Polsenberg 2006, Mumby et al. 2007).

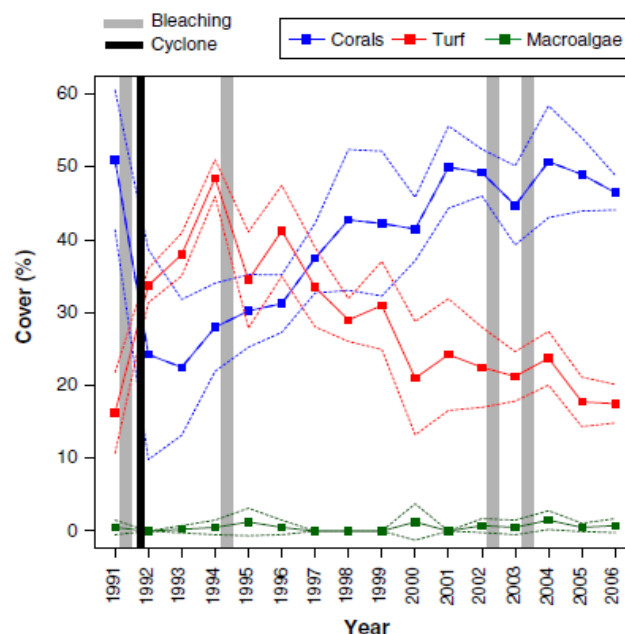


Figure 2: Variation in coral, turf, and macroalgal cover at Tiahura between 1991 and 2006. The cyclone (December 1991) and the four bleaching events (March-July 1991, 1994, 2002 and 2003) are indicated. Dotted lines represent standard deviation.

For TORS, the response of coral populations to disturbances, and their recovery trajectories, differed among the four dominant genera. *Acropora* was affected by the

disturbances of 1991, declining from  $11.5 \pm 2.6\%$  in 1991 to  $2.5 \pm 1.7\%$  in 1992, but its cover was only slightly affected by subsequent bleaching events (Fig. 3, Table 1). *Acropora* showed a high rate of recovery after the 1991 disturbances and until 2005, with pre-disturbance cover restored by 1999. *Montipora* was also affected by the 1991 disturbances, but its cover declined further as a result of two other bleaching events (1994 and 2002), and did not show signs of recovery. *Pocillopora* was also affected by the 1991 disturbances, declining from  $25.0 \pm 7.0\%$  in 1991 to  $10.5 \pm 8.6\%$  in 1992, thereafter with the cover remaining relatively stable at  $\sim 15\%$ . In contrast to other genera, the cover of *Porites* was unaffected by the five disturbances, and its cover increased between 1991 and 2005, finally reaching  $12.2 \pm 2.3\%$  when it became the second most dominant coral. Interestingly, massive *Porites* has also been identified as an ecological "winner" in Okinawa following the bleaching event of 1998 (Loya et al. 2001), and in the Caribbean, *P. astreoides* (the "massive" *Porites* of this region) has also been a relative winner over the last few decades of disturbances (Green et al. 2008). Together, this evidence suggests it would be productive to evaluate the biological characteristics favoring the success of massive *Porites* in the face of multiple disturbances.

*Table 1: Statistical significance (P value) of interannual variability in cover among year (Friedman tests), and of differences between select pairs of years (Wilcoxon tests), for major taxa of corals and algae*

	All corals	<i>Acropora</i>	<i>Montipora</i>	<i>Pocillopora</i>	<i>Porites</i>	Turf algae	Macroalgae
Among years	<0.001	<0.001	0.046	0.312	<0.001	<0.001	0.449
1991 vs. 1992	0.061	0.029	0.183	0.061	0.659	0.029	0.453
1991 vs. 1993	0.030	0.029	0.055	0.030	0.559	0.030	1.000
1991 vs. 1994	0.030	0.029	0.183	0.030	0.559	0.029	1.000
1994 vs. 1995	0.661	0.369	0.306	0.194	0.659	0.028	0.620
2002 vs. 2003	0.309	0.462	0.243	0.470	1.000	0.770	0.739
2003 vs. 2004	0.465	0.301	0.766	0.243	1.000	0.442	0.278
1991 vs. 2006	0.312	0.561	0.053	0.108	0.028	0.561	0.739

The results of this long-term survey support the hypothesis that the algal-dominated phase can represent a state from which a rapid reversal is possible, or a transitional state along a gradient of temporal changes (Bellwood et al. 2006, Idjadi et al. 2006, Mumby et



al. 2007). In addition, our results reveal that corals can recover rapidly following a dramatic decline. Such decadal-scale recovery of coral cover has been documented at some locations (Connell 1997, Halford et al. 2004, Emslie et al. 2008, Sheppard et al. 2008), but our results are novel in demonstrating rapid recovery against a backdrop of ongoing, high frequency, and large-scale disturbances (but see Connell et al. 1997, Wakeford et al. 2008). At TORS, the post-disturbance dynamic is associated with a shift in the structure of the assemblages (Fig. 4). Thus, coral assemblages at TORS appear to be characterized by ecological resilience in terms of overall coral cover, but plasticity in terms of generic composition.

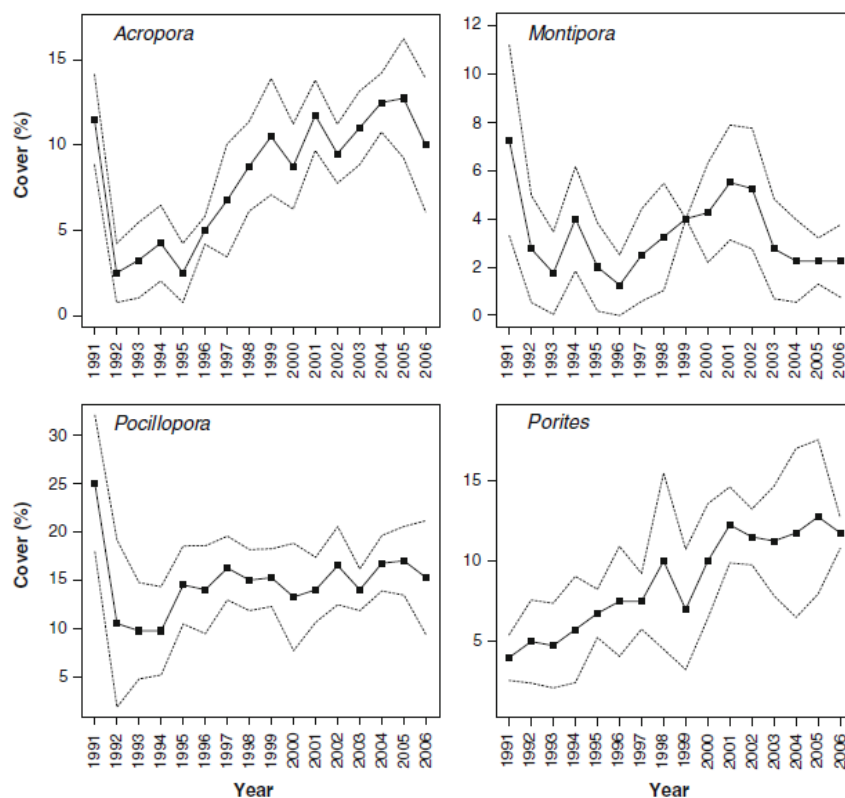


Figure 3: Impacts of disturbances and recovery trajectories of the four dominant coral genera at Tiahura between 1991 and 2006. Dotted lines represent standard deviation.

Tiahura is among the few reefs, all located in the Indo-Pacific, that have shown the capacity to recover from severe and recurrent disturbances (Connell 1997), and it supports the hypothesis that some reefs will undergo gradual changes in structure of their coral

communities in response to major stress rather than collapse abruptly (Loya et al. 2001, Hughes et al. 2003, Wakeford et al. 2008). Despite the optimism that the last 15 years of coral dynamics at TORS engender, these results must be considered with caution, as most models predict an increase in the frequency and severity of disturbances over the next few decades (Pandolfi et al. 2003, Hoegh-Guldberg et al. 2007). Indeed, a significant outbreak of *Acanthaster planci* (the crown-of-thorns seastar) began in Moorea immediately following the period covered by this study (late 2006) (Salvat et al. 2008), and this ongoing outbreak has reduced the coral cover on most of the outer reef of Moorea to <10% (in May 2008, PJ Edmunds, unpublished data). While it is too soon to evaluate the long-term implications of this disturbance for TORS, we suspect that the coral community in this location may regrow rapidly, at least based on the abundance of coral recruits we have found at near-by sites, both on settlement tiles and natural surfaces.

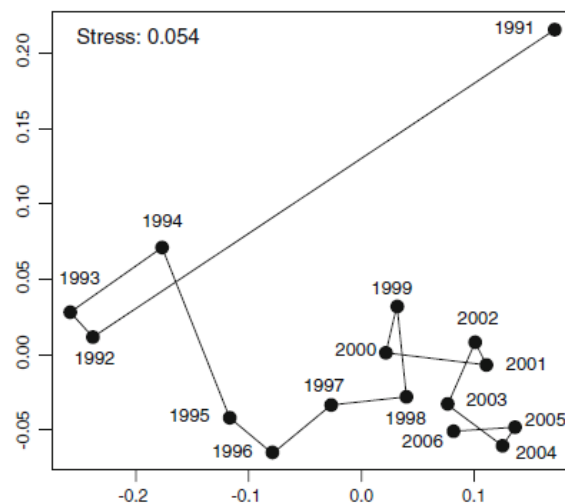


Figure 4: Variation in composition of the coral assemblage. Kruskal's non-metric multidimensional scaling (MDS), using Bray-Curtis dissimilarity index of the coral assemblage recorded annually from 1991 to 2006 at Tiahura.

### Acknowledgments

This research was supported by grants from the Total Foundation, CRISP, BioAqua, and the US National Science Foundation grant BIO-OCE 04-17412 (to PJE).

## References

- Adjeroud M (1997) Factors influencing spatial patterns on coral reefs around Moorea, French Polynesia. *Mar Ecol Prog Ser* 159:105-119
- Adjeroud M, Augustin D, Galzin R, Salvat B (2002) Natural disturbances and interannual variability of coral reef communities on the outer slope of Tiahura (Moorea, French Polynesia): 1991 to 1997. *Mar Ecol Prog Ser* 237:121-131
- Bellwood DR, Hoey AS, Ackerman JL, Depczynski M (2006) Coral bleaching, reef fish community phase shifts and the resilience of coral reefs. *Global Change Biol* 12:1587-1594
- Bellwood DR, Hughes TP, Folke C, Nyström M (2004) Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429:827-833
- Berumen ML, Pratchett MS (2006) Recovery without resilience: Persistent disturbance and long-term shifts in the structure of fish and coral communities at Tiahura Reef, Moorea. *Coral Reefs* 25:647-653
- Coles SL, Brown EK (2007) Twenty-five years of change in coral coverage on a hurricane impacted reef in Hawai'i: The importance of recruitment. *Coral Reefs* 26:705-717
- Connell JH (1997) Disturbance and recovery of coral assemblages. *Coral Reefs* 16:S101-S113
- Connell JH, Hughes TP, Wallace CC (1997) A 30-year study of coral abundance, recruitment, and disturbance at several scales in space and time. *Ecol Monogr* 67:461-488
- Done TJ, Turak E, Wakeford M, DeVantier L, McDonald A, Fisk D (2007) Decadal changes in turbid-water coral communities at Pandora Reef: Loss of resilience or too soon to tell? *Coral Reefs* 26:789-805
- Emslie MJ, Cheal AJ, Sweatman H, Delean S (2008) Recovery from disturbance of coral and reef fish communities on the Great Barrier Reef, Australia. *Mar Ecol Prog Ser* 371:177-190
- Graham NAJ, Wilson SK, Jennings S, Polunin NVC, Robinson J, Bijoux JP, Daw TM (2007) Lag effects in the impacts of mass coral bleaching on coral reef fish, fisheries, and ecosystems. *Conserv Biol* 21:1291-1300
- Green DH, Edmunds PJ, Carpenter RC (2008) Increasing relative abundance of *Porites astreoides* on Caribbean reefs mediated by an overall decline in coral cover. *Mar Ecol Prog Ser* 359: 1-10
- Grigg RW, Dollar SJ (1990) Natural and anthropogenic disturbances on coral reef ecology. In Dubinsky Z (ed) *Ecosystems of the world 25, Coral reefs*. Elsevier, Amsterdam, pp 439-452
- Halford A, Cheal AJ, Ryan D, Williams DMcB (2004) Resilience to large-scale disturbance in coral and fish assemblages on the Great Barrier Reef. *Ecology* 85:1892-1905
- Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshw Res* 50:839-866
- Hoegh-Guldberg O, Salvat B (1995) Periodic mass-bleaching and elevated sea temperatures: bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia. *Mar Ecol Prog Ser* 121: 181-190
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatzitolos ME (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318:1737-1742

- Hughes TP (1994) Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean Coral Reef. *Science* 265:1547-1551
- Hughes TP, Rodrigues MJ, Bellwood DR, Ceccarelli D, Hoegh-Guldberg O, McCook L, Moltschaniwskyj N, Pratchett MS, Steneck RS, Willis B (2007) Phase shifts, herbivory, and the resilience of coral reefs to climate change. *Curr Biol* 17:360-365
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR, Folke C, Grosberg R, Hoegh-Guldberg O, Jackson JBC, Kleypas J, Lough JM, Marshall P, Nyström M, Palumbi SR, Pandolfi JM, Rosen B, Roughgarden J (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301:929-933
- Idjadi JA, Lee SC, Bruno JF, Precht WF, Allen-Requa L, Edmunds PJ (2006) Rapid phase-shift reversal on a Jamaican coral reef. *Coral Reefs* 25:209-211
- Loya Y, Sakai K, Yamazato K, Nakano Y, Sambali H, van Woesik R (2001) Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecol Lett* 4:122-131
- McManus JW, Polsenberg JF (2006) Coral-algal phase shifts on coral reefs: Ecological and environmental aspects. *Prog Oceanogr* 60:263-279
- Mumby PJ, Hastings A, Edwards HJ (2007) Thresholds and the resilience of Caribbean coral reefs. *Nature* 450:98-101
- Mumby PJ, Chisholm JRM, Edwards AJ, Andréfouët S, Jaubert J (2001) Cloudy weather may have saved Society Island reef corals during the 1998 ENSO event. *Mar Ecol Prog Ser* 222:209-216
- Nyström M, Folke C, Moberg F (2000) Coral reef disturbance and resilience in a human-dominated environment. *Trends Ecol Evol* 15:413-417
- Pandolfi JM, Bradbury RH, Sala E, Hughes TH, Bjorndal KA, Cooke RG, McArdle D, McClenachan L, Newman MJH, Paredes G, Warner RR, Jackson JBC (2003) Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science* 301:955-958
- Penin L, Adjeroud M, Schrimm M, Lenihan H (2007) High spatial variability in coral bleaching around Moorea, French Polynesia: Patterns across locations and water depths. *CR Biol* 330:171-181
- Salvat B (1992) Blanchissement et mortalité des scléactiniaires sur les récifs de Moorea (archipel de la Société) en 1991. *CR Acad Sci Paris* 314:105-111
- Salvat B, Chancerelle Y, Lison de Loma T, Penin L, Stievenart C, Lerouvreur F, Aubanel A, Monier C, Lagouy E, Adjeroud M (2008) Evidence of an outbreak of crown-of-thorns starfish (COTS) in French Polynesia: observations between 2005 and 2007. *Proc 11<sup>th</sup> Int Coral Reef Symp Abstracts* 18.702
- Schrimm M, Buscail R, Adjeroud M (2004) Spatial variability of the biogeochemical composition of surface sediments in an insular coral reef ecosystem: Moorea, French Polynesia. *Estuar Coast Shelf Sci* 60:515-528
- Sheppard CRC, Harris A, Sheppard ALS (2008) Archipelago-wide coral recovery patterns since 1998 in the Chagos Archipelago, central Indian Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 362:109-117
- Smith LD, Gilmour JP, Heyward AJ (2008) Resilience of coral communities on an isolated system of reefs following catastrophic mass-bleaching. *Coral Reefs* 27:197-205
- Wakeford M, Done TJ, Johnson CR (2008) Decadal trends in a coral community and evidence of changed disturbance regime. *Coral Reefs* 27:1-13
- West JM, Salm RV (2003) Resistance and resilience to coral bleaching: implications for coral reef conservation and management. *Conserv Biol* 17:956-967

## ANNEXE 3

### **Response of coral assemblages to thermal stress: Are bleaching intensity and spatial patterns consistent between events?**

Lucie Penin <sup>a,b,c\*</sup>; Jérémie Vidal-Dupiol <sup>a</sup>; Mehdi Adjeroud <sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> UMR CNRS-EPHE-UPVD 5244 Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne. Université de Perpignan. 66 860 Perpignan Cedex, France.

<sup>b</sup> USR CNRS-EPHE 3278 CRIOBE, Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement. CBETM. Université de Perpignan. 66 860 Perpignan Cedex, France.

<sup>c</sup> Australian Research Council Centre of Excellence for Coral Reef Studies. James Cook University, QLD 4811 Townsville, Australia.

<sup>d</sup> Institut de Recherche pour le Développement, Unité 227 CoRéUs2 Biocomplexité des écosystèmes coralliens de l'Indo-Pacifique. BP A5, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia.

\*corresponding author. Email: penin@univ-perp.fr

#### **Abstract**

Coral mortality associated with mass bleaching events is among the most important threats to coral reefs, and these events are projected to increase in frequency and intensity as the earth warms. Better understanding the consistency of assemblages response to thermal stress, both spatially and temporally, is essential to determine which reefs are the more able to cope with climate change. We compared spatial and taxonomic patterns of variations between two bleaching events at the scale of an island, Moorea. Bleaching intensity was significantly lower in 2007 (37 %) than in 2002 (55 %), despite similar thermal stress and light conditions. Spatial patterns were consistent between events at nine different stations located in three locations and three depths: The stations where bleaching was the most severe in 2002 also displayed the highest bleaching levels in 2007. Taxonomic patterns of susceptibility to bleaching were also consistent between events. These findings have important implication for conservation, showing that, even at a small spatial scale, some areas are more susceptible than others, and that this is consistent through time.

#### **Key words**

Coral bleaching. Climate change . Disturbances . Spatial patterns . Moorea, French Polynesia .

## Introduction

During recent decades, mortalities associated with mass coral bleaching events have emerged as a major threat to coral reefs, and are now recognized as one of the main concerns to their future [1,2]. Reef building corals display obligate endosymbioses with single-celled algae, called zooxanthellae (genus *Symbiodinium*). This symbiosis has important implications, particularly for the coral energy budget and coral calcification [3]. Coral bleaching occurs when this symbiosis is disrupted, resulting in a loss of corals color due to partial or total elimination of their endosymbiotic algae and/or a degradation of the algal pigments [4]. Mass bleaching events, where large areas are affected, are associated with higher than average seawater temperature periods, often in conjunction with increased light [5,6]. These events can have dramatic consequences for coral assemblages, causing immediate mortality as well as longer-term effects such as decreases in growth and fecundity, reduction in competitive abilities or increase in susceptibility to diseases [7]. Scleractinian corals are the foremost habitat-forming species of coral reefs: They are responsible for their tri-dimensional structure, and provide food and shelter to a multitude of associated species [8]. As a consequence, mass mortalities linked with bleaching events do not only threaten corals, but the ecosystem as a whole [9,10], contributing to what is called the “coral reef crisis” [2,11].

The response of coral assemblages to elevated temperature is greatly variable at different spatial and temporal scales [1,6,12,13]. The thermal threshold above which bleaching is observed varies at a regional scale [5,14,15] and bleaching intensity is influenced by light exposure [16], as well as by other local factors such as habitat characteristics [17,18,19] and hydrodynamic conditions [20,21]. Response to elevated temperature is also highly dependant on the taxa considered [22,23] and thus, taxonomic composition of an assemblage has a major impact on its response to thermal stress [12,24]. The history of bleaching events also plays an important role in a corals response to thermal stress, which has been linked with capacities of acclimatization and/or adaptation of the holobiont to elevated temperature and solar irradiance [17,25,26].

In this context, addressing the question of the consistency of spatial patterns and intensity of bleaching among events, and understanding the factors that regulate spatial and temporal variation in response to elevated temperature is necessary to determine which reefs are the more able to cope with climate change [6]. This has implications for conservation

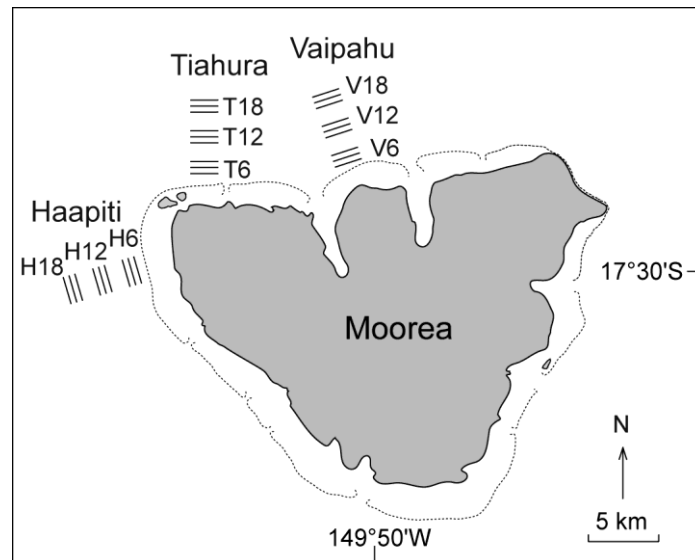
planning: Identifying the most resistant areas is essential to prioritize conservation efforts. These areas could thus receive special protection in order to limit secondary stressors and preserve resilience and recovery capacities [6,13].

While some work has been done at large spatial scales, for example across the Great Barrier Reef [17,25], comparisons at a small spatial scale are unavailable. The objective of this study is thus to assess the consistency of spatial variation and intensity of a coral assemblage's response to thermal and solar radiation stress at a small spatial scale, by comparing two successive bleaching events that occurred in Moorea, French Polynesia in 2002 and 2007.

## **Materials and Methods**

### **Bleaching observations**

This study was conducted on the island of Moorea (17°30' S, 149°50' W), French Polynesia. Moorea is a volcanic island comprising 134 km<sup>2</sup> of land, surrounded by 49 km<sup>2</sup> of lagoon and nearshore coral reef habitat (Fig. 1). The experiments were approved by CRIOBE research station (USR CNRS EPEHE 3278), in the framework of its mission of observatory of the Environment. Moorea island experienced coral bleaching events in 1984, 1987, 1991, 1994, 2002, 2003 and 2007 [27,28]. Nine stations, including three locations (Haapiti, Tiahura, and Vaipahu) and three depths (6, 12 and 18m) have been routinely surveyed for different scientific purposes since 2001 [29,30]. Despite similarities in reef structure (i.e., spur and groove formations from the reef crest to ~ 30 m depth), the three locations vary greatly in their exposure to oceanic swell, which varies seasonally around the island. Haapiti, located on the west coast, is the most exposed location because it faces south-western swells which prevail throughout much of the year [31]. In contrast, Vaipahu and Tiahura, located on the north coast, are sheltered from these southwestern swells but exposed to northern swells that are generally lower in magnitude and frequency, occurring mainly during summer months (Fig. 1). Every station encompasses three permanent 10 × 1 m belt transects, parallel to each other and to the coastline.



**Fig.1: Map of Moorea Island.** Nine stations were sampled on the outer reef slope, representing three locations (Vaipahu, Tiahura, Haapiti), and three depths (6, 12, and 18 m). Dashed lines represent the approximate extent of the reef front surrounding Moorea.

Bleaching intensity was measured at these nine stations in 2002 and 2007. In 2002, the sampling was initiated two weeks after the first signs of bleaching were recorded [12], and this sampling strategy was repeated in 2007 by the same observer, in order to assess the temporal consistency of spatial patterns in the response of the assemblage to thermal stress.

At each station, all the colonies present in the three permanent belt transects were counted and either classified as healthy (no apparent bleaching), partially bleached (when portions of the colony were bleached or when the colony was pale), or completely bleached (when the whole colony was white). In 2002 all the colonies were sampled, regardless of genera. However, only six genera (*Acropora*, *Montipora*, *Montastrea*, *Pavona*, *Pocillopora* and *Porites*) were sufficiently abundant to be used in separate analysis [12]. As they together represented 88 % of the total assemblage, we focused on these six genera in the present study.

A repeated measures ANOVA was used to test the influence of year, location and depth on the percentage of bleached colonies (all genera pooled). Data were arcsine transformed to meet ANOVA assumptions of normality and homoscedasticity. Fisher LSD post-hoc tests were then used to determine differences among specific treatments. As some of the genera studied were not present at all stations in 2007, repeated measures ANOVA could not be led by genera. Instead, percentage of bleached colonies of each genus was compared between years using a t-test for matching samples. Data were arcsine transformed prior to this analysis. To explore temporal consistency of spatial variation of assemblage response to thermal stress, linear correlations were calculated between the percentage of bleached



colonies at the 27 transects in 2002 and in 2007, for each of the six genera, and for all genera pooled.

Relative abundance of the different taxa was compared between years using a t-test for matching samples on arcsine transformed data.

### **Stress indices**

In order to compare the stress faced by corals in Moorea during the two years studied, stress indices were calculated. The most widespread thermal stress index used in coral bleaching studies is the coral bleaching Degree Heating Weeks (DHW) index provided by the NOAA's National Environmental Satellite, Data, and Information Service [32]. However, this index does not accurately predict bleaching events in Moorea, contrary to many other locations. Reefs are considered as being at risk of bleaching when the DHW exceeds 4°C weeks. In Moorea, it never exceeded zero since 2000 (when data became available), yet bleaching events were observed in 2002, 2003 and 2007 [12,28].

In that context, Degree Heating Days index (DHD) was calculated as a stress index. Degree Heating Days (DHD) value is defined by Maynard et al [33] as “the summed positive deviations of daily average sea surface temperatures (T<sub>Heating</sub>) from the climatology of long-term mean summer temperatures (LMST), for the summer period”. Maynard et al. used satellite-derived daily Sea Surface Temperature (SST) data. However, a recent study pointed out that sea surface temperature can be different from the temperature actually experienced by corals [34]. As a consequence, mean daily water temperature was used instead of SST in the present study. Water temperature was measured on the outer reef slope at Tiahura, with underwater temperature data loggers (ONSET optic stowaway). These loggers located at 14 m depth record temperature every hour with a 0.02°C accuracy, since 1998. In the present study, the summer period was defined as February 1st to April 30th, since it is the warmest period in Moorea, with bleaching events generally beginning in April [12,35]. Long term mean summer temperatures were calculated using mean daily temperature between 30/01/98 and 26/12/07.

As DHD do not differentiate among a broad range of heat stress, Heating Rates (HR) were also calculated. Heating Rate (HR) is defined as “the number of DHDs divided by the number of days in which temperatures (T<sub>Heating</sub>) have exceeded the long-term mean summer

temperatures (LMST)” i.e. “the average rate at which DHDs have accumulated throughout the summer” [33].

Solar radiations are also known to play a role in bleaching response of coral assemblages. Both solar radiation conditions prior and during thermal stress mitigate bleaching response of corals, although in a different way. High solar radiation during thermal stress can augment corals response and thus induce higher bleaching rates [36], whereas on the contrary, high solar radiation prior to thermal anomaly can protect corals from bleaching through triggering photoprotective defense mechanisms [37]. In the present study, radiation conditions were characterized through the use of average insolation incident on a horizontal surface (AIIHS; MJ/m<sup>2</sup>/day; data courtesy: NASA Langley Research Center POWER). We used non-parametric Mann-Whitney tests to compare AIIHS between the two years studied for each of two periods of time: 1) the month preceding the beginning of thermal anomaly, and 2) the period of thermal anomaly.

## Results

### Bleaching observations

Bleaching intensity was lower in 2007 than in 2002 (repeated measures ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Table 1). In 2007, a mean of  $36.6 \pm 7.8$  % (mean +SD) colonies were bleached (either partially or completely) at the time of the study, including  $5.0 \pm 4.9$  % completely bleached. In 2002, percentage of bleached colonies of the six major genera was  $54.2 \pm 13.0$ %, including  $17.9 \pm 5.9$ % completely bleached. Percentage of bleached (completely + partially), partially bleached and completely bleached colonies was significantly higher in 2002 than in 2007 (t-test for matched samples, respectively  $t = -7.668$ ,  $p < 0.0001$ ;  $t = -2.470$ ,  $p = 0.0204$ ;  $t = -9.212$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 2). In addition, the first signs of bleaching were observed after about 40 days of higher than long term mean summer temperature in 2002, whereas they were not observed before 57 days of higher than long term mean summer temperature in 2007 (Fig. 3). Bleaching intensity was lower in 2007 compared to 2002 for all the genera studied, and the differences were all significant except for *Montipora* (Table 2; Fig. 4). Despite these differences in bleaching intensity between years, the susceptibility of the different genera was conserved. *Montastrea* and *Acropora* were the most susceptible genera, *Porites* and *Pavona* the least susceptible (Fig. 4).

**Table 1:** Results of the repeated measures two way (location x depth) ANOVA on percentage of bleached colonies (all taxa pooled).

Factor	SS	df	MS	F	p
location	.082	2	.041	4.69	0.023
depth	.239	2	.120	13.73	0.000
location x depth	.119	4	.030	3.40	0.031
year	.551	1	.551	63.34	0.000
year × location	.007	2	.004	0.43	0.659
year × depth	.052	2	.026	3.01	0.075
year × location × depth	.026	4	.006	0.73	0.580

Bleaching intensity was variable among stations, as demonstrated by the significant influence of location × depth interaction on percentage of bleached colonies (repeated measures ANOVA, Table 1). Percent of bleached colonies was generally lower at 6 m than at deeper stations, and slightly lower at Haapiti than at the other locations for both years. Spatial patterns of bleaching were consistent between years as demonstrated by the non-significant influence of year × location, year × depth or year × location × depth interactions on percentage of bleached colonies (repeated measures ANOVA, Table 1).

Moreover, a significant and positive correlation was observed between years for percentage of bleached colonies in the permanent transects (Spearman correlation,  $n = 27$ ,  $R = 0.475$ ,  $p = 0.0113$ ). The lower percentage of bleached colonies at shallow depths was observed for most of the genera studied in both years (Fig. 2). In 2007, only *Pocillopora* presented an opposite pattern (Fig. 2). In 2002, *Acropora* did not display spatial variation in bleaching intensity, exhibiting very high rates of bleaching at virtually all stations (Fig. 2). Conversely, when comparing the percentage of bleached colonies among stations for each genera, no significant correlation was observed between years except for *Pavona* and *Porites* (Spearman correlations,  $n = 27$   $R=0.703$ ,  $p<0.0001$  and  $R=0.543$ ,  $p=0.0028$ , respectively).

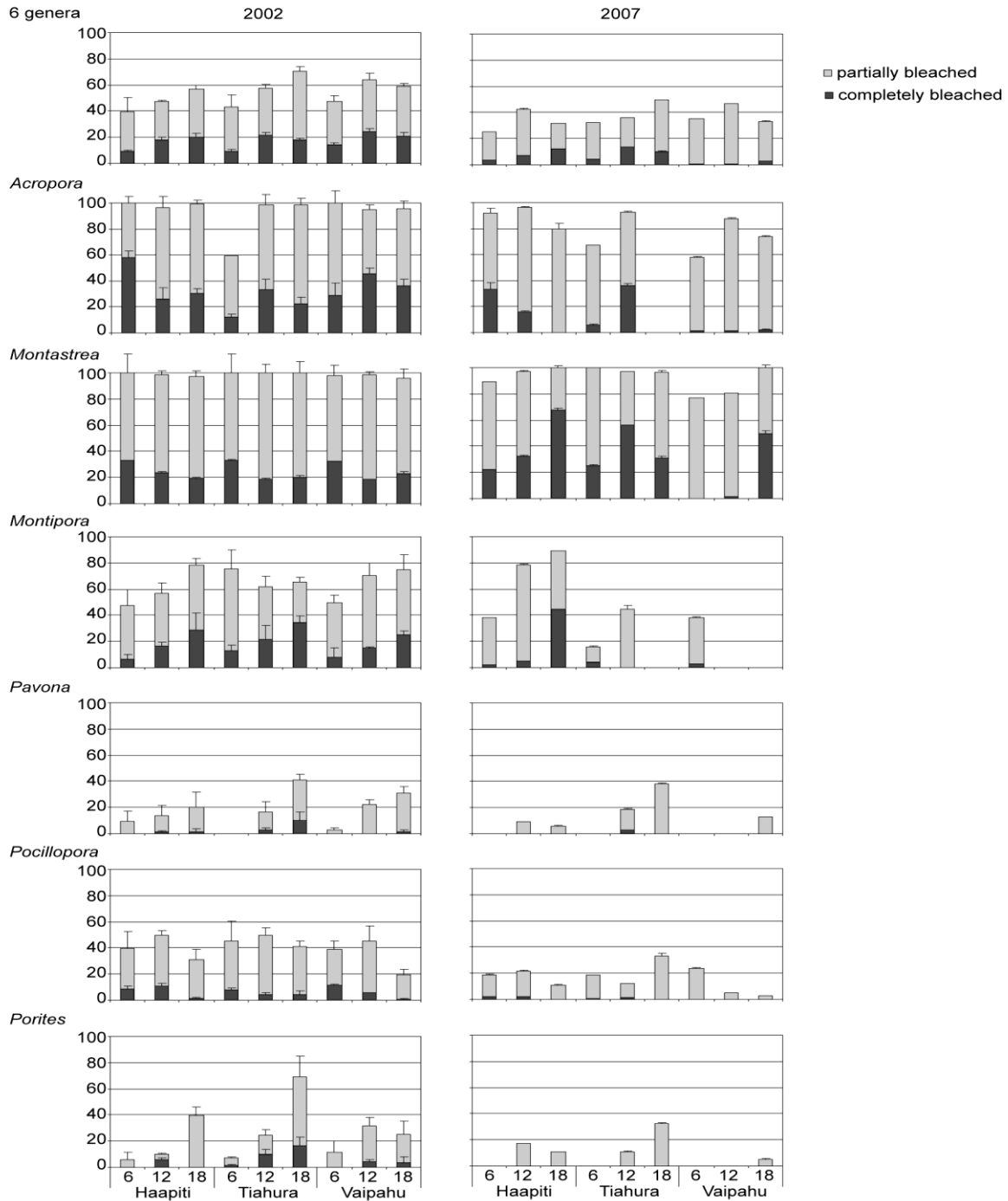
**Table 2:** Results of t-test for matched samples performed on percentage of bleached colonies (partially and completely) between 2002 and 2007, for the six genera studied, and for all genera pooled.

Taxa	t	P
All genera pooled	-7.668	< 0.0001
<i>Acropora</i>	-2.958	0.0069
<i>Montastrea</i>	-2.704	0.0122
<i>Montipora</i>	-0.372	0.7131
<i>Pavona</i>	-3.256	0.0031
<i>Pocillopora</i>	-7.842	< 0.0001
<i>Porites</i>	-4.815	< 0.0001

Coral abundance was lower in 2007 than in 2002, due to a recent *Acanthaster planci* outbreak [28]. Nevertheless, relative abundance of the studied genera wasn't different between 2002 and 2007, except for *Montipora* (Fig. 5; t-tests for matching samples, n = 27, all  $p > 0.05$  except for *Montipora*  $p = 0.0001$ ).

### Stress indices

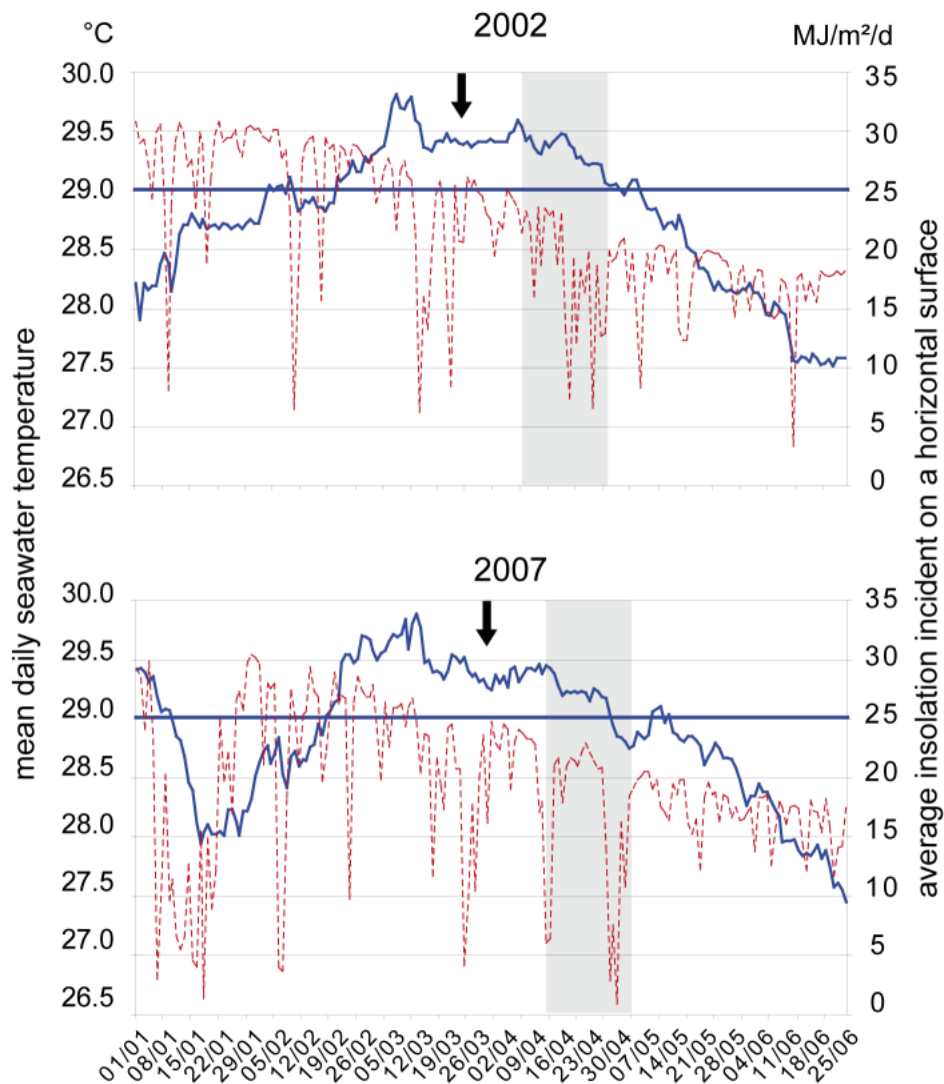
Mean daily temperature between February, 1<sup>st</sup> and April, 30<sup>th</sup> did not significantly differ between 2002 and 2007 (t-test,  $t = 0.176$ ,  $p > 0.05$ ). The DHD value for the February 1<sup>st</sup> – April 30<sup>th</sup> period was comparable between the two years: 26.8 in 2002 and 29.5 in 2007. Likewise, Heating Rates were similar between the two years: 0.37 in 2002 and 0.41 in 2007. This shows that thermal stress was similar between the two years studied and even slightly higher in 2007.



**Fig. 2: Bleaching intensity.** Percentage of partially bleached and completely bleached colonies at the nine sampling stations, in 2002 and in 2007, for the six major genera combined (*Acropora*, *Montastrea*, *Montipora*, *Pavona*, *Pocillopora*, and *Porites*) and for each of them. Error bars represent standard deviations. For stations codes, the letter indicates the location (V: Vaipahu; T: Tiahura; H: Haapiti), and the associated number corresponds to the depth (6, 12, and 18 m). In 2007, abundance of *Acropora* at T18 and of *Montipora* at T18, V12 and V18 was too low to allow meaningful analysis.

Average insolation incident on a horizontal surface (AIIHS) during thermal anomaly wasn't significantly different between the two years ( $21.79 \pm 5.01$  SD in 2002 vs.  $22.82 \pm 5.70$  SD in 2007; Mann-Whitney test,  $p > 0.05$ ). On the contrary, AIIHS during the month

preceding thermal anomaly was significantly higher in 2002 ( $26.47 \pm 5.14$  SD) than in 2007 ( $17.73 \pm 9.79$  SD; Mann-Whitney test,  $p < 0.01$ ; Fig. 3).



**Fig. 3: Mean daily seawater temperature and daily average insolation on a horizontal surface.** Mean daily seawater temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) was measured at 14 m deep at Tiahura outer reef slope and is represented by the blue solid line (left axis). Daily average insolation incident on a horizontal surface ( $\text{MJ}/\text{m}^2/\text{d}$ ) is represented by the red dotted line (right axis). For each year, time of first record of bleaching on the outer slope is designated by an array, and sampling period is indicated in grey. Data courtesy: temperature: USR CNRS-EPHE 3278 CRIIBE, insolation: NASA Langley Research Center POWER. Horizontal line indicates the long term mean summer temperature, calculated between 1998 and 2007.

## Discussion

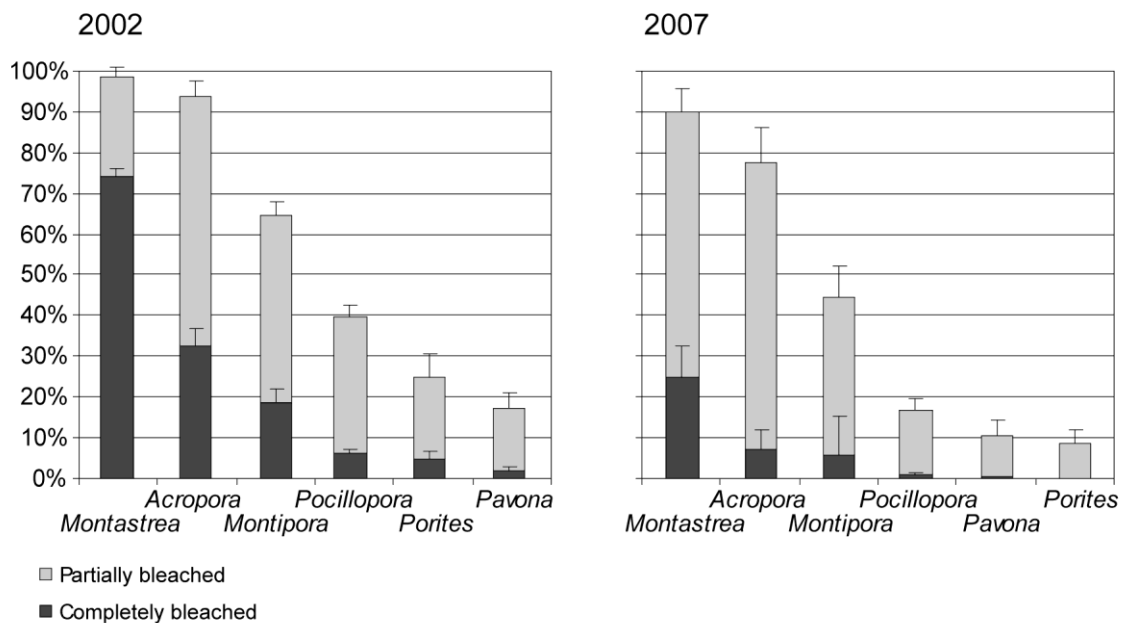
Bleaching intensity was lower in 2007 (25-49%) than in 2002 (39-72%), and the response to elevated temperature was delayed in the latter year. Moreover, a similar drop in stress response was observed for each of the six genera studied, which together represent nearly 90 % of the assemblage. This decrease in bleaching response cannot be explained by

differences in thermal conditions, since thermal stress was actually slightly higher in 2007 compared to 2002. This cannot be explained by differences in light conditions either since insolation during the thermal anomalies did not differ significantly between years and insolation before thermal anomaly was lower in 2007 than in 2002, which is not compatible with the hypothesis of better photoprotective defense in 2007 compared to 2002 [38]. It is unlikely that this reduction in susceptibility to thermal stress is due to selective mortality after the 2002 bleaching event because: 1) mortality following this event was low [28]; and 2) all of the studied genera showed the same pattern. Moreover, relative abundance of the different taxa was highly similar between years, and thus differences in stress response are not the result of a major shift in dominance. Moorea outer slopes are located in an oligotrophic, oceanic environment, and are not under terrestrial influence [28,39], which makes unlikely any effect of nutrients on corals response, as it has been proposed in some systems [19].

Considering these elements, it is likely that the observed decrease in stress response is the result of acclimatization of the coral/algal holobionts [17,25] or a recent influx of thermo-tolerant individuals between 2002 and 2007. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that other environmental factors like water motion differed between the two events. Similar decrease in susceptibility to thermal stress has already been documented between successive events, as 1991 and 1994 in Moorea [27], 1998 and 2002 on the Great Barrier Reef (GBR) in Australia [25], or 1982-83 and 1997-98 in the Galapagos Islands [40], Panama [41], and Costa Rica [42].

The thermal stress indices calculated for the bleaching years 2002 and 2007 in Moorea, DHW and HR, were considerably lower than those generally observed during bleaching years on the GBR. In the latter region, moderate events (i.e. 25-50 % colonies bleached) are observed at sites that incurred 61-100 DHD or presented a HR value comprised 1.7-2.4, and severe events (> 50% colonies bleached) when DHD values were higher than 100 and HR values higher than 2.4 [33]. Following this classification, in Moorea, the 2002 bleaching event was severe and the 2007 event was moderate. Yet in both cases, DHD was lower than 61 (26.8 and 29.5, respectively) and HR lower than 1.7 (0.37 and 0.41 respectively). It is unlikely that this is due to the use of water temperature instead of sea surface temperature, since remotely sensed temperature data values used by Maynard et al. (2008a) were consistently within 0.25°C of values recorded by in situ loggers. These differences thus show that Moorea reefs experience bleaching at a lower thermal stress than the reefs of the GBR, and probably of other regions. This is confirmed by the observation of

bleaching events in 2002 and 2007 despite a Degree Heating Weeks value equal to 0 whereas reefs are considered as being at risk for bleaching when the DHW value reaches 4 [32]. Despite this higher susceptibility to bleaching, mortality following bleaching events is generally low in Moorea [28]. In Tiahura, no substantial loss of coral cover was observed after the 1994 and 2003 bleaching events, despite moderate to severe bleaching intensity (40-73% in 1994[35]; and around 35 % in 2003, A. Carroll, unpublished data). The decrease of coral cover after the 2002 bleaching event was less than 10 %, despite high bleaching rate [28]. Thus, coral assemblages around Moorea seem to be highly susceptible to thermal stress in terms of bleaching, but not in terms of mortality. These results also underline the need to adjust risk assessment tools to local characteristics [33].



**Fig. 4:** Percentage of partially and completely bleached colonies for the six major genera. All stations pooled. Error bars represent standard deviations.

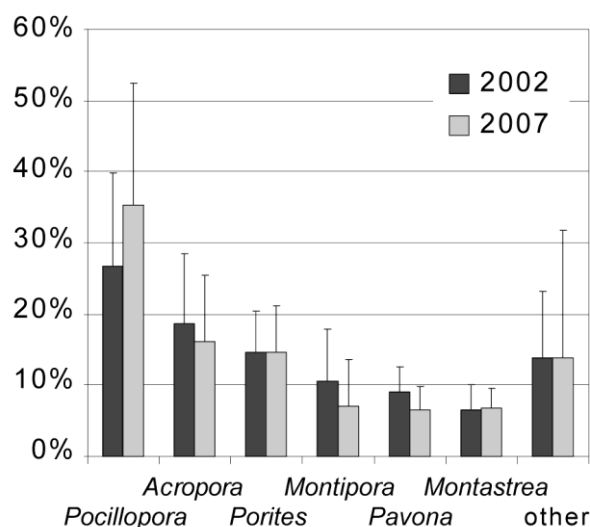
The hierarchy in bleaching susceptibility of the different taxa was conserved between years: *Montastrea* and *Acropora* were the most susceptible genera, and *Porites* and *Pavona* the less susceptible ones, which is consistent with previous observations [35,43,44]. The consistency in taxa-related variation in bleaching susceptibility underlines the potential long-term effects of repeated bleaching events on the assemblage composition, and may be one of the causes of the observed shift in composition of the reef slopes of Moorea from an *Acropora* dominated assemblage to a *Pocillopora* and *Porites* dominated assemblage [28,45].



Spatial patterns of bleaching were consistent among years. The stations where bleaching was the most severe in 2002 are the ones that experienced the highest bleaching levels in 2007. These consistent spatial patterns may be the result of different factors. Assemblage composition is one such factor, due to the observed differences in bleaching susceptibility among taxa [12,24]. Local environmental conditions, such as exposure to high water flows, can also influence coral tolerance to high temperatures [18,21]. In the present study, the Haapiti location, where bleaching rates were lowest, is located on the west coast of Moorea, which is more exposed to swells than the other sites, located on the north coast [31]. This suggests a possible effect of hydrodynamism on assemblage susceptibility to bleaching. The lower bleaching rates observed at shallow depth can be the result of a better acclimatization and/or adaptation of shallow assemblages. These assemblages experience higher solar irradiance than deep assemblages, and as a consequence are more likely to be more acclimatized and/or adapted to conditions leading to bleaching, i.e. combined high temperature and solar irradiance [16,46].

The observed temporal consistency in spatial patterns of bleaching susceptibility has important implications for conservation planning, because it shows that some areas are more likely to cope with global climate change than others. Identifying these zones provides important information for the implementation of conservation measures. For example, the most resistant zones should be included in protected areas, where efforts are made to maintain ecosystem resilience.

To conclude, the lower bleaching intensity observed in 2007 compared to 2002 despite similar thermal and solar conditions suggests the possibility of acclimatization of the coral holobionts following recurrent bleaching events. At a local scale, spatial and taxonomic variation in bleaching intensity was consistent between the two bleaching events. These results highlight the importance of factors acting at a small spatial scale to assemblage response to high temperatures, and have important implications in conservation planning.



*Fig. 5: Mean relative abundance of the different taxa in 2002 and 2007. Error bars represent standard deviations.*

## Acknowledgments

We thank the logistic support from CRIOBE station (USR CNRS-EPHE 3278, Moorea), Pascal Ung, Yannick Chancerelle, Franck Lerouvreur and many students for diving assistance, Andrew Baird for his constructive remarks and Rebecca Weeks for proofreading. Insolation data were obtained from the NASA Langley Research Center POWER Project.

## References

1. Oliver JK, Berkelmans R, Eakin CM (2009) Coral bleaching in space and time. In: van Oppen MJH, Lough JM, editors. Coral Bleaching. Berlin: Springer-Verlag. pp. 21-39.
2. Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR, et al. (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301: 929-933.
3. vanOppen MJH, Baker AC, Coffroth MA, Willis BL (2009) Bleaching resistance and the role of algal endosymbionts. In: van Oppen MJH, Lough JM, editors. Coral Bleaching. Berlin: Springer-Verlag. pp. 83-101.
4. Douglas AE (2003) Coral bleaching - how and why? *Mar Poll Bull* 46: 385-392.

5. Berkelmans R (2009) Bleaching and mortality thresholds: How much is too much? In: van Oppen MJH, Lough JM, editors. *Coral Bleaching*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 103-119.
6. Baker AC, Glynn PW, Riegl B (2008) Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Est Coast Shelf Sci* 80: 435-471.
7. McClanahan TR, Weil E, Cortés J, Baird AH, Ateweberhan M (2009) Consequences of coral bleaching for sessile reef organisms. In: van Oppen MJH, Lough JM, editors. *Coral Bleaching*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 121-138.
8. Jones GP, McCormick MI, Srinivasan M, Eagle JV (2004) Coral decline threatens fish biodiversity in marine reserves. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8251-8253.
9. Pratchett MS, Wilson SK, Graham NAJ, Munday PL, Jones GP, et al. (2009) Coral bleaching and consequences for motile reef organisms: Past, present and uncertain future effects. In: van Oppen MJH, Lough JM, editors. *Coral Bleaching*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 139-158.
10. Munday PL, Jones GP, Pratchett MS, Williams AJ (2008) Climate change and the future for coral reef fishes. *Fish Fish* 9: 261-285.
11. Bellwood DR, Hughes TP, Folke C, Nyström M (2004) Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429: 827-833.
12. Penin L, Adjeroud M, Schrimm M, Lenihan H (2007) High spatial variability in coral bleaching around Moorea (French Polynesia): patterns across locations and water depths. *C-R Bio* 330: 171-181.
13. Wooldridge S, Done T (2004) Learning to predict large-scale coral bleaching from past events: A Bayesian approach using remotely sensed data, in-situ data, and environmental proxies. *Coral Reefs* 23: 96-108.
14. Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshw Res* 50: 839-866.

15. Coles SL, Brown BE (2003) Coral bleaching - Capacity for acclimatization and adaptation. *Adv Mar Biol* 46: 184-206.
16. Gleason D, Wellington G (1993) Ultraviolet radiation and coral bleaching. *Nature* 365: 836-837.
17. Berkelmans R, De'ath G, Kininmonth S, Skirving WJ (2004) A comparison of the 1998 and 2002 coral bleaching events on the Great Barrier Reef: Spatial correlation, patterns and predictions. *Coral Reefs* 23: 74-83.
18. Lenihan HS, Adjeroud M, Kotchen MJ, Hench JL, Nakamura T (2008) Reef structure regulates small-scale spatial variation in coral bleaching. *Mar Ecol Prog Ser* 370: 127-141.
19. Wooldridge SA, Done TJ (2009) Improved water quality can ameliorate effects of climate change on corals. *Ecol App* 19: 1492-1499.
20. Nakamura T, vanWoesik R (2001) Water-flow rates and passive diffusion partially explain differential survival of corals during the 1998 bleaching event. *Mar Ecol Prog Ser* 212: 301-304.
21. Nakamura T, vanWoesik R, Yamasaki H (2005) Photoinhibition of photosynthesis is reduced by water flow in the reef-building coral *Acropora digitifera*. *Mar Ecol Prog Ser* 301: 109-118.
22. Goulet T, LaJeunesse T, Fabricius K (2008) Symbiont specificity and bleaching susceptibility among soft corals in the 1998 Great Barrier Reef mass coral bleaching event. *Mar Biol* 154: 795-804.
23. Loya Y, Sakai K, Yamazato K, Nakano Y, Sambali H, et al. (2001) Coral bleaching: The winners and the losers. *Ecol Lett* 4: 122-131.
24. Marshall PA, Baird AH (2000) Bleaching of corals on the Great Barrier Reef: Differential susceptibilities among taxa. *Coral Reefs* 19: 155-163.
25. Maynard JA, Anthony KRN, Marshall PA, Masiri I (2008) Major bleaching events can lead to increased thermal tolerance in corals. *Mar Biol* 155: 173-182.

26. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Rev Microbiol* 5: 355-362.
27. Adjeroud M, Augustin D, Galzin R, Salvat B (2002) Natural disturbances and interannual variability on coral reef communities on the outer slope of Tiahura (Moorea, French Polynesia): 1991 to 1997. *Mar Ecol Prog Ser* 237: 121-131.
28. Adjeroud M, Michonneau F, Edmunds PJ, Chancerelle Y, Lison de Loma T, et al. (2009) Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef. *Coral Reefs* 28: 775-780.
29. Penin L, Adjeroud M, Pratchett MS, Hughes TP (2007) Spatial distribution of juvenile and adult corals around Moorea (French Polynesia): Implications for population regulation. *Bull Mar Sci* 80: 379-389.
30. Penin L, Michonneau F, Baird AH, Connolly SR, Pratchett MS, et al. (2010) Early post-settlement mortality and the structure of coral assemblages. *Mar Ecol Prog Ser* 408: 55-64.
31. Laurent V, Maamaatuaiahutapu K, Maiiau J, Varney P (2004) Atlas climatologique de la Polynésie française. Papeete, Polynésie Française: Météo France. 205 p.
32. Liu G, Strong AE, Skirving W, Arzayus LF. Overview of NOAA Coral Reef Watch Program's near-real-time satellite global coral bleaching monitoring activities; 2004; Okinawa, Japan. pp. 1783-1793.
33. Maynard JA, Turner PJ, Anthony KRN, Baird AH, Berkelmans R, et al. (2008) ReefTemp: An interactive monitoring system for coral bleaching using high-resolution SST and improved stress predictors. *Geophys Res Lett* 35.
34. Sheppard C (2009) Large temperature plunges recorded by data loggers at different depths on an Indian Ocean atoll: comparison with satellite data and relevance to coral refuges. *Coral Reefs* 28: 399-403.

35. Hoegh-Guldberg O, Salvat B (1995) Periodic mass-bleaching and elevated sea surface temperatures: bleaching of outer slope communities in Moorea, French Polynesia. *Mar Ecol Prog Ser* 121: 181-190.
36. Lesser MP, Farrell JH (2004) Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs* 23: 367-377.
37. Brown BE, Dunne RP, Goodson MS, Douglas AE (2000) Marine ecology: Bleaching patterns in reef corals. *Nature* 404: 142-143.
38. Dunne R, Brown B (2001) The influence of solar radiation on bleaching of shallow water reef corals in the Andaman Sea, 1993-1998. *Coral Reefs* 20: 201-210.
39. Schrimm M, Buscail R, Adjeroud M (2004) Spatial variability of the biogeochemical composition of surface sediments in an insular coral reef ecosystem: Moorea, French Polynesia. *Est Coast Shelf Sci* 60: 515-528.
40. Podesta GP, Glynn PW (2001) The 1997-98 El Nino event in Panama and Galapagos: an update of thermal stress indices relative to coral bleaching. *Bull Mar Sci* 69: 43-59.
41. Glynn PW, Maté JL, Baker AC, Calderón MO (2001) Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997-1998 El Nino Southern Oscillation Event: Spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982-1983 event. *Bull Mar Sci* 69: 79-109.
42. Jiménez C, Cortés J, León A, Ruíz E (2001) Coral bleaching and mortality associated with the 1997-98 El Nino in an upwelling environment in the eastern Pacific (Gulf of Papagayo, Costa Rica). *Bull Mar Sci* 69: 151-169.
43. Gleason MG (1993) Effects of disturbance on coral communities: Bleaching in Moorea, French Polynesia. *Coral Reefs* 12: 193-201.
44. Salvat B (1992) Blanchissement et mortalité des scléactiniaires sur les récifs de Moorea (archipel de la Société) en 1991. *CR Acad Sci Paris III* 314: 105-111.
45. Berumen ML, Pratchett MS (2006) Recovery without resilience: persistent disturbance and long-term shifts in the structure of fish and coral communities at Tiahura Reef, Moorea. *Coral Reefs* 25: 647-653.

46. Brown B, Dunne R, Goodson M, Douglas A (2002) Experience shapes the susceptibility of a reef coral to bleaching. *Coral Reefs* 21: 119-126

## ANNEXE 4

### **Variability of algal endosymbiont density in the reef-building coral *Acropora globiceps*: a multi-scale approach along environmental gradients around Moorea (French Polynesia)**

Ophélie Ladrière<sup>1\*</sup>, Lucie Penin<sup>2,3,4</sup>, Elodie van Lierde<sup>1,2</sup>, Jérémie Vidal-Dupiol<sup>2</sup>, Mohsen Kayal<sup>2,3</sup>, Stéphane Roberty<sup>1</sup>, Mathieu Poulicek<sup>1</sup> and Mehdi Adjeroud<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Unit of Marine Ecology, Laboratory of Animal Ecology and Ecotoxicology, University of Liège, allée du 6 août, 15, Bat. B6C, B-4000 Liège (Sart Tilman), Belgium

<sup>2</sup>UMR 5244 CNRS EPHE UPVD, Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan Via Domitia, avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

<sup>3</sup>USR 3278 CNRS EPHE, Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement, BP 1013, Moorea, French Polynesia

<sup>4</sup>ARC Centre of Excellence for Coral Reef Studies, James Cook University, Townsville, Australia

<sup>5</sup>Institut de Recherche pour le Développement, U227 CoRéUs 2 "Biocomplexité des récifs coralliens de l'Indo-Pacifique", BP A5, 98848 Nouméa, New Caledonia

\*Phone: (32) 43665058, Fax: (32) 43665147, Email: oladriere@ulg.ac.be

**Keywords:** Multi-scale variability; Symbiosis; *Symbiodinium* density; Scleractinian corals; Environmental gradients.



"This paper has not been submitted elsewhere in identical or similar form, nor will it be during the first three months after its submission to *Hydrobiologia*."

### **Abstract**

Coral-zooxanthellae symbiosis is a key process for the health of coral reef ecosystems, and understanding mechanisms that maintain or disrupt this symbiosis has become a critical challenge. The level and causes of variability in the density of coral endosymbionts in natural populations is still poorly understood, specifically in oceanic islands of the Central Pacific that are confronted to large-scale recurrent disturbances. The present study aims at examining the spatial variability of *Symbiodinium* density in the branching coral *Acropora globiceps* (Dana, 1846) during a pre-bleaching period at multiple scales, including contrasting depths and locations, around Moorea Island, French Polynesia. Measurements of light intensity, sedimentation, and water motion allowed identification of the major environmental factors associated with the observed variability. Results revealed that zooxanthellae density was not significantly different between internal and external branches of colonies (i.e., colony scale), nor among colonies within 8 of the 9 sampling stations (i.e., station scale) or between similar depths among the three locations (i.e., island scale). In contrast, a marked depth gradient in zooxanthellae density was observed. This increase of zooxanthellae density with increasing depth was strongly and negatively correlated to variations in light intensity, but not in sedimentation or water motion. Results may be used as a baseline for future monitoring surveys of the impacts of large-scale perturbations such as coral bleaching events.

## Introduction

Reef-building corals live in symbiotic association with unicellular dinoflagellate algae, referred to as zooxanthellae (genus *Symbiodinium*). Endosymbiont algae cover most of the energetic requirements of their host and are essential for the coral survival in oligotrophic tropical shallow waters (Muscatine & Porter, 1977). Algal symbionts supply the coral host with sugars, glycerol and amino acids while these algae benefit from metabolic products of the host, such as CO<sub>2</sub>, phosphates and nitrogenous compounds (Muscatine & Porter, 1977). The symbiotic relationship between *Symbiodinium* and the coral host is vulnerable and highly sensitive to environmental or anthropogenic disturbances, and may be disrupted (Bhagooli & Yakovleva, 2004; Weis, 2008). The disruption of the symbiosis is commonly referred to as coral bleaching, which is broadly defined as the loss or drastic reduction of endosymbiotic dinoflagellates or their associated pigments from the coral host cells (Douglas, 2003). Mass-bleaching events at a regional scale are associated with higher than average seawater temperature periods (Baker et al., 2008), often in conjunction with increased light (Lesser & Shick, 1990). These events often cause mass mortality within coral populations and subsequent cascading effects on coral-associated fauna (McClanahan et al., 2009), and may induce long-term shift in composition of reef assemblages (Adjeroud et al., 2009). Surviving coral colonies often show decreased growth and fecundity, reduction in competitive abilities and increased susceptibility to diseases (McClanahan et al., 2009). In recent decades, coral bleaching events have increased in frequency, intensity, and extent, and this trend is predicted to continue as a result of climate change (Baker et al., 2008). In this context, understanding the key mechanisms that maintain or disrupt the coral-zooxanthellae symbiosis has become a critical challenge for the future of coral reefs.

*Symbiodinium* density in coral colonies varies at several spatial and temporal scales, both under normal conditions (i.e., in the absence of perturbation) and after specific disturbances. Endosymbiont density varies among coral species (Drew, 1972), but also among colonies of the same species, at both local and regional scales (Fitt & Cook, 2001). Light and water temperature are among the major factors influencing density of endosymbionts (D'Croz et al., 2001; Bhagooli & Yakovleva, 2004). However, other factors such as salinity (Hoegh-Guldberg & Smith, 1989; Sunagawa et al., 2008), sedimentation (Brodie et al., 2007) and water motion (Finelli et al., 2006) may also influence *Symbiodinium* densities. Zooxanthellae density may fluctuate at the scale of the day (Titlyanov et al., 1996), the season (Stimson, 1997; Pillay et al., 2005), and in relation with disturbances such as bleaching events (Li et al., 2008) or anthropogenic pollutions (Cervino et al., 2003). Despite these recent advances, the level and causes of variability in the density of coral endosymbionts in natural populations remain poorly documented, specifically in oceanic islands of the Central Pacific, which are particularly threatened by large-scale disturbances like bleaching events.

In this context, the present study aimed at examining the spatial variability of *Symbiodinium* density in the branching coral *Acropora globiceps* (Dana, 1846) around Moorea Island, French Polynesia. A hierarchical sampling design including contrasting depths and locations was used to determine the variation of endosymbiont density at multiple scales (colony, station, location, and island scales). Complementary measurements of light intensity, sedimentation rate, and water motion allowed the identification of major environmental factors associated with the observed variability in endosymbiont density. Not only do the results improve our understanding of the nature and causes of endosymbiont variability in natural populations, they also provide a baseline for future monitoring programs on health of coral assemblages. Monitoring coral assemblages at Moorea has become a urgent necessity as this island has been confronted to recurrent disturbances, including seven mass bleaching

events over the last three decades (Adjeroud et al., 2009). In this context, there is a critical need to monitor not only ecological parameters such as coral percent cover, but also physiological parameters like zooxanthellae density.

The present study focused on the coral *Acropora globiceps*, a major reef-building species in Moorea. *A. globiceps* is highly sensitive to changes in environmental conditions, and particularly to temperature variations, like most species of this genus (Marshall & Baird, 2000). It can thus be considered as a sentinel species and an adequate candidate for monitoring surveys.

## Material and methods

Moorea Island (17°30'S, 149°50'W, Society Archipelago, French Polynesia) represents a unique system to study the spatial variability of endosymbiont density and the role environmental factors may play in causing these patterns. The narrow coral reef belt surrounding the island compresses the spatial organization along highly marked environmental gradients (Adjeroud, 1997). Spatial variation of zooxanthellae density was assessed at four different scales: 1) at the colony scale, among branches within a colony; 2) at the station scale, among colonies within a sampling station; 3) at the location scale, among stations within a location; and 4) at the island scale, among locations within the island of Moorea (Fig.1). For this purpose, nine sampling stations were chosen around the island, encompassing three depths (6, 12, and 18 m) sampled at three locations (Haapiti on the west coast, and Tiahura and Vaipahu on the north coast; Fig.1). Colony scale variability of *Symbiodinium* density was studied independently at three different depths (6, 12, and 18 m) at Vaipahu (Fig. 1). At each of these three depths, nine colonies were randomly chosen. For each colony, the extremity of four branches (2 cm long apex), two internal and two external, were

collected for comparison of zooxanthellae density (Oliver, 1984). Since no significant differences were observed at the colony level, larger scale variability (i.e. station, location and island scales) was assessed through the sampling of three branches randomly chosen within each of eight colonies at each of the nine sampling stations. Coral samples were collected in March 2007, i.e. about one month before the first signs of a bleaching event that affected Moorea in mid-April (Penin et al, unpublished data). This sampling period was specifically chosen because it corresponds to the usual pre-bleaching season (Penin et al., 2007), and thus allows the definition of a pre-bleaching baseline. To identify major factors associated with spatial variations of zooxanthellae density, light intensity (relative photosynthetic photon flux, rPPF, in  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), sedimentation (total sedimentation rate, SR, in  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and water motion (diffusion factor, DF) were measured at each station (Supplementary Material).

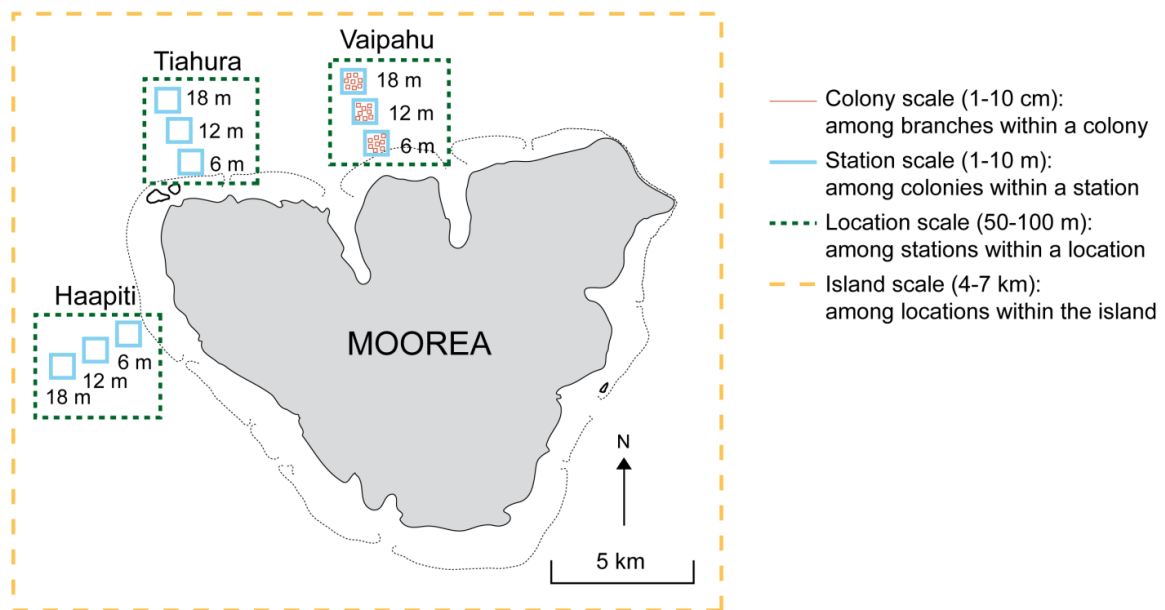


Figure 1: Map of Moorea indicating the position of the nine sampling stations encompassing three locations (Haapiti, Tiahura and Vaipahu) and three depths (6, 12 and 18 m) on the outer reef slope. The four different scales considered are summarized and colour coded. Distances among stations within a location are not at scale.

Coral samples were initially preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tissues of the frozen fragments were then separated from the coral skeleton with a high-pressure water jet (Water-Pick<sup>TM</sup>; Fitt et al., 2000) using 0.22  $\mu\text{m}$ -filtered seawater (50 ml per sample)) and allowed to settle. The

slurry was then grounded in a glass tissue homogenizer and fixed with 4% formalin for further counts and observations (Lasker, 2003). Density was determined from counts of three replicate aliquots, using a haemocytometer (Bürker type), under optical microscope. The *Symbiodinium* cell counts were normalized to total coral surface using the paraffin method of Chancerelle (2000), based on the weight difference between the clean and dry skeleton and the same skeleton coated with paraffin.

Non-parametric statistical analyses were used for comparisons of *Symbiodinium* densities, due to lack of normality and isoscedasticity of the distributions, even after appropriate transformations. Comparisons between internal and external branches were performed using Mann-Whitney rank tests (MW). For comparisons among stations, locations, and depths, Kruskal-Wallis rank tests (KW) were conducted, completed by Mann-Whitney rank tests for post-hoc pairwise comparisons. Spatial variability of light intensity, water motion and sedimentation rate was explored through the use of Kruskal-Wallis rank tests and complementary Mann-Whitney rank tests for pairwise comparisons. Non-parametric Spearman correlations were used to detect significant relationships between variability of *Symbiodinium* density and variability of light intensity, sedimentation, and water motion among the nine sampling stations.

## **Results and discussion**

The range in zooxanthellae density observed in *A. globiceps* around Moorea (Fig. 2) is comparable to those previously measured in *A. palmata* and *A. cervicornis* in the Caribbean (Fitt et al., 2000), in *A. formosa* in the Indian ocean (Fagoonee et al., 1999), and in different *Acropora* species in the South China Sea (Li et al., 2008). However, it was slightly lower than in *A. millepora* on the GBR (Pillay et al., 2005). This suggests that the range of zooxanthellae

density is consistent within the *Acropora* genus, even for highly divergent species from different biogeographic regions.

No differences in zooxanthellae density were observed between internal and external branches, whatever the depth considered (MW, all depths pooled,  $P = 0.4059$ ; 6 m,  $P = 0.1657$ ; 12 m,  $P = 0.0875$ ; 18 m,  $P = 0.5217$ ; Fig. 2). Similarly, *Symbiodinium* density did not significantly vary among colonies within each sampling station (i.e., station scale), except at Haapiti deeper station (KW, all  $P > 0.05$  except H18:  $P = 0.0324$ ; Fig. 3). In contrast, significant differences in zooxanthellae density were observed among stations (KW,  $P < 0.05$ ,  $H = 173.96$ ) and depths (KW,  $P < 0.05$ ; Fig. 3). A clear variation in environmental conditions was also documented among the nine sampling stations (Supplementary material).

At the colony scale, results showed homogeneity of the *Symbiodinium* densities between inner and outer branches in *A. globiceps*, whatever the depth considered. This outcome is not consistent with results of previous surveys on other *Acropora* species (Oliver, 1984; Pillay et al., 2005). These contrasted results suggest that intra-colony variation in zooxanthellae density in reef-building corals is species-specific. It may be related to growth form and/or to micro-environmental conditions surrounding coral colonies. The absence of differences among branches of *A. globiceps* colonies on Moorea outer reef slope may be due to the combined high light intensity ( $> 0.2 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) and water motion ( $> 3.5$ ; Fig. S1) observed at all study sites, even the deepest. The differences in light intensity and water motion between external and internal branches of *A. globiceps* at our study sites are probably too small to induce a significant heterogeneity in zooxanthellae density in the upper part of the branches. This hypothesis could be addressed through intra-colony measurements of light intensity and water motion.

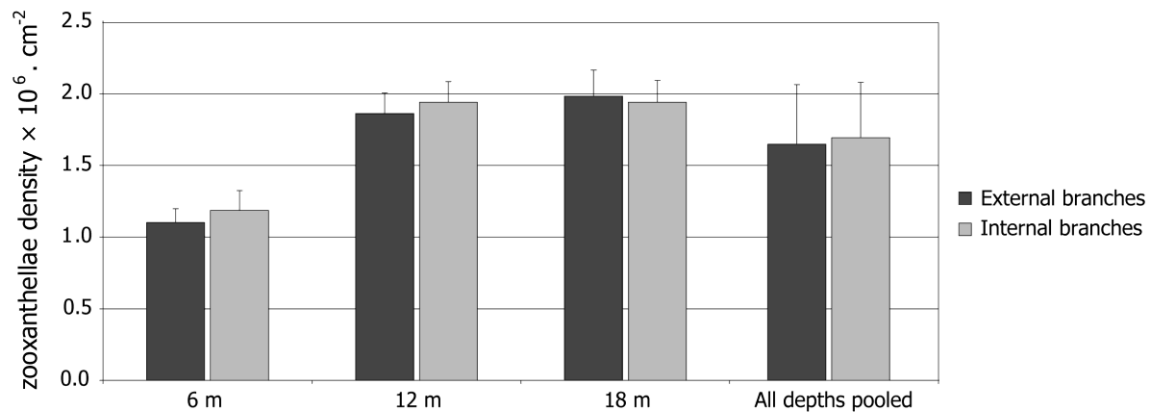


Figure 2: Colony scale variation of *Symbiodinium* densities: mean density (in  $\text{zoox.cm}^{-2}$ ) of internal vs. external branches, at 6 m, 12 m, 18 m, and for all depths pooled (Vaipahu location). Error bars represent standard deviations.

At the station scale (among colonies of the same station), no differences were observed in the density of zooxanthellae (at eight out of nine sampling stations). Again, this result suggests that environmental factors are sufficiently homogeneous at this scale to avoid significant variability in zooxanthellae density. This also suggests that zooxanthellae density in *A. globiceps* colonies is highly conservative within a particular habitat, underlining the major importance of extrinsic vs. intrinsic factors. At the location scale, a marked and consistent increase in zooxanthellae density with increasing depth was observed at all three locations. At the island scale, significant differences in zooxanthellae density have been observed among the nine stations (KW,  $P < 0.0001$ ,  $H = 173.96$ ), but not among the three locations (KW,  $P = 0.8305$ ,  $H = 0.371$ ; Fig. 3). This shows that variability in zooxanthellae density is mostly driven by depth, and not significantly by location.



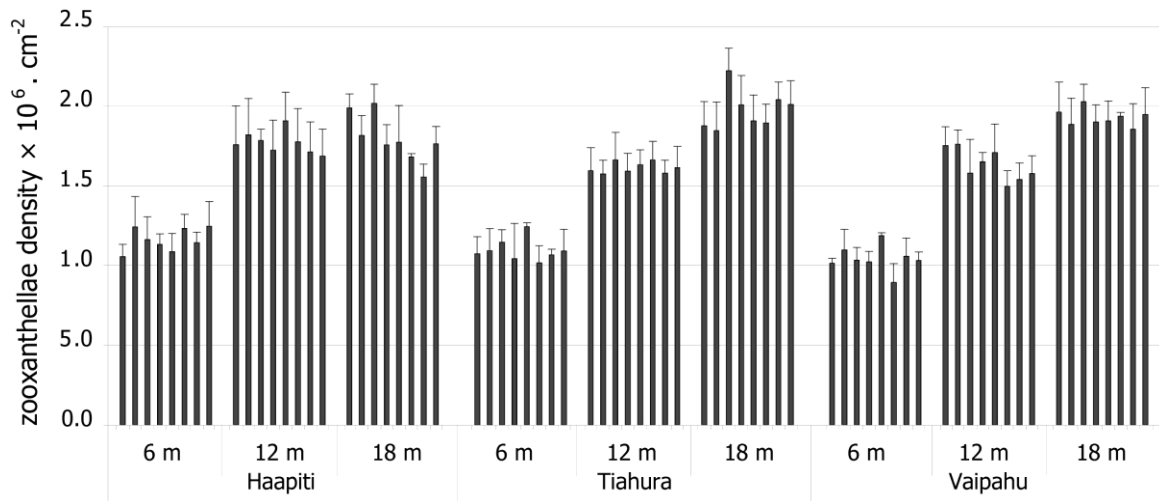


Figure 3: Multi-scale variation of Symbiodinium densities: mean density (in  $\text{zoox.cm}^{-2}$ ) for each of the eight colonies sampled at each of the nine sampling stations encompassing three locations (Haapiti, Tiahura and Vaipahu) and three depths (6, 12 and 18 m) around Moorea. Error bars represent standard deviations.

Spatial variability in zooxanthellae density was strongly and negatively correlated with light intensity (Pearson rank correlation,  $P = 0.0109$ ,  $\rho = -0.900$ ; Fig. 4a), but not with sedimentation rates (Pearson rank correlation,  $P = 0.3222$ ,  $\rho = 0.350$ ; Fig. 4b) or water motion (Pearson rank correlation,  $P = 0.1314$ ,  $\rho = -0.533$ ; Fig. 4c). This underlines the importance of light intensity on the characteristics of the coral-algal symbiosis. This depth/light pattern in endosymbiont density was found in other organisms, such as the sea anemone *Aiptasia tagetes* (Steele, 1976), and some corals (Drew, 1972; Dustan, 1979). Reduced light intensity is known to induce an increase of zooxanthellae density and pigments concentration under experimental conditions (Titlyanov et al., 2001) or in relation with cloud cover (Titlyanov et al., 2001; Sunagawa et al., 2008). Indeed, acclimation to low light involves maximization of the light harvesting capacity by increasing photosynthetic pigment concentration in zooxanthellae and zooxanthellae population density in coral branches (Titlyanov et al., 2001). Increasing density of zooxanthellae with increasing depth may also explain why recent bleaching events at Moorea had stronger effects at deeper stations, both in terms of bleaching rates and subsequent mortality of coral colonies (Salvat, 1992; Penin et al., 2007). Coral bleaching is clearly linked to photodamages faced by zooxanthellae under

thermal stress (Venn et al., 2008). These damages usually cause overproduction of oxidative radicals (ROS) leading to coral bleaching (Weis, 2008). As a consequence, coral from deeper stations, with high zooxanthellae density and concentration of photosynthetic pigments would suffer higher oxidative stress during temperature anomalies than corals at shallower stations, characterized by lower zooxanthellae and pigment density.

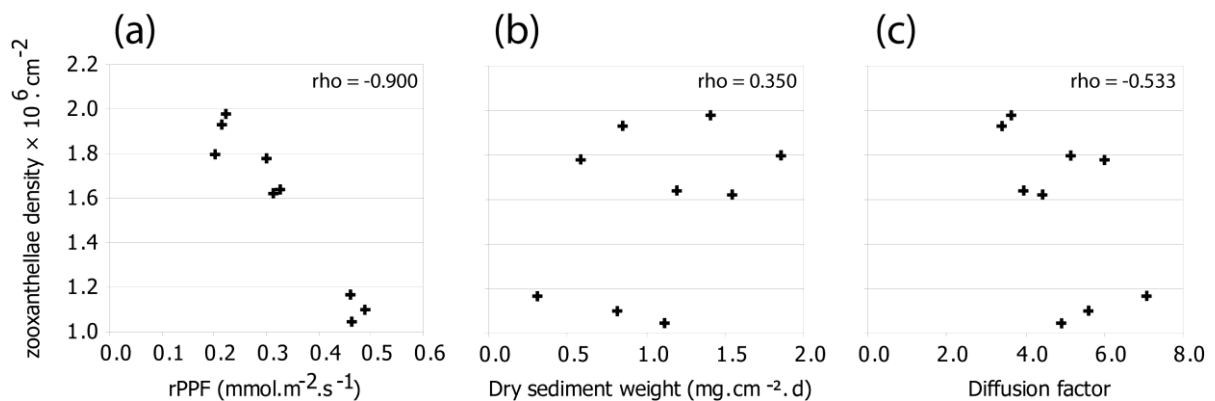


Figure 4: Relationships between variation of zooxanthellae density ( $\text{zoox} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) and environmental factors among the nine stations: a) light intensity (relative photosynthetic photon flux, rPPF,  $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), b) sedimentation (dry sediment weight,  $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and c) water motion (diffusion factor). Rho is the Spearman's rank correlation coefficient.

Results of this study demonstrate that endosymbiont density in *Acropora globiceps* is highly controlled by light intensity, as it is the case for photophysiological and symbiotic mechanisms in reef-building coral species (Venn et al., 2008; Mass et al., 2010). Homogeneity in zooxanthellae density at the colony (i.e., between branches of the same colony) and station scales (i.e., between colonies of the same habitat) allows considering endosymbiont density in *A. globiceps* as a potential indicator of coral health in monitoring surveys. In the present study, zooxanthellae density was measured in non-disturbed conditions (i.e. in the absence of major perturbations), just before the usual bleaching season, and at various depths and locations. Results may thus be used as a baseline for monitoring surveys of coral health, designed to improve our understanding of the impacts on coral communities of large-scale perturbations like bleaching events, which are expected to increase in frequency in the next decades.

## Acknowledgements

We would like to thank CRIOBE staff for field logistics and support, and particularly Yannick Chancerelle, Pascal Ung, Pauline Bosserelle and volunteers of Planète Urgence for logistical help in data collection. Fundings: FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium, Ophélie Ladrière); European Marie Curie Outgoing Fellowship (Lucie Penin PIOF-GA-2008-220798), Société Polynésienne des Eaux et de l'Assainissement in French Polynesia, and Planète Urgence (Mohsen Kayal).

## References

- Adjeroud, M., 1997. Factors influencing spatial patterns on coral reefs around Moorea, French Polynesia. *Marine Ecology Progress Series* 159: 105-119.
- Adjeroud, M., F. Michonneau, P. J. Edmunds, Y. Chancerelle, T. L. de Loma, L. Penin, L. Thibaut, J. Vidal-Dupiol, B. Salvat & R. Galzin, 2009. Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef. *Coral Reefs* 28: 775-780.
- Baker, A. C., P. W. Glynn & B. Riegl, 2008. Climate change and coral reef bleaching: an ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 80: 435-471.
- Bhagooli, R. & I. Yakovleva, 2004. Differential bleaching susceptibility and mortality patterns among four corals in response to thermal stress. *Symbiosis* 37: 121-136.
- Brodie, J., G. De'ath, M. Devlin, M. Furnas & M. Wright, 2007. Spatial and temporal patterns of near-surface chlorophyll a in the Great Barrier Reef lagoon. *Marine and Freshwater Research* 58: 342-353.
- Cervino, J. M., R. L. Hayes, M. Honovich, T. J. Goreau, S. Jones & P. J. Rubec, 2003. Changes in zooxanthellae density, morphology, and mitotic index in hermatypic corals and anemones exposed to cyanide. *Marine Pollution Bulletin* 46: 573-586.
- Chancerelle, Y., 2000. Methods to estimate actual surface areas of scleractinian coral at the colony- and community-scale. *Oceanologica Acta* 23: 211-219.
- D'Croz, L., J. L. Mate & J. E. Oke, 2001. Responses to elevated sea water temperature and UV radiation in the coral *Porites lobata* from upwelling and non-upwelling environments on the Pacific coast of Panama. *Bulletin of Marine Science* 69: 203-214.
- Douglas, A. E., 2003. Coral bleaching - how and why? *Marine Pollution Bulletin* 46: 385-392.
- Drew, E. A., 1972. The biology and physiology of alga-invertebrates symbioses. II. The density of symbiotic algal cells in a number of hermatypic hard corals and alcyonarians from various depths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 9: 71-75.
- Dustan, P., 1979. Distribution of zooxanthellae and photosynthetic chloroplast pigments of the reef-building coral *Montastrea annularis* (Ellis and Solander) in relation to depth on a West Indian coral reef. *Bulletin of Marine Science* 29: 79-95.

- Fagoonee, I., H. B. Wilson, M. P. Hassell & J. R. Turner, 1999. The dynamics of zooxanthellae populations: a long-term study in the field. *Science* 283: 843-845.
- Finelli, C. M., B. S. T. Helmuth, N. D. Pentcheff & D. S. Wethey, 2006. Water flow influences oxygen transport and photosynthetic efficiency in corals. *Coral Reefs* 25: 47-57.
- Fitt, W. K. & C. B. Cook, 2001. Photoacclimation and the effect of the symbiotic environment on the photosynthetic response of symbiotic dinoflagellates in the tropical marine hydroid *Myrionema amboinense*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 256: 15-31.
- Fitt, W. K., F. K. McFarland, M. E. Warner & G. C. Chilcoat, 2000. Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnology and Oceanography* 45: 677-685.
- Hoegh-Guldberg, O. & G. J. Smith, 1989. The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129: 279-303.
- Lasker, H. R., 2003. Zooxanthella densities within a Caribbean octocoral during bleaching and non-bleaching years. *Coral Reefs* 22: 23-26.
- Lesser, M. P. & J. M. Shick, 1990. Effects of visible and ultraviolet radiation on the ultrastructure of zooxanthellae (*Symbiodinium* sp.) in culture and in situ. *Cell and Tissue Research* 261: 501-508.
- Li, S., K. F. Yu, Q. Shi, T. R. Chen, M. X. Zhao & J. X. Zhao, 2008. Interspecies and spatial diversity in the symbiotic zooxanthellae density in corals from northern South China Sea and its relationship to coral reef bleaching. *Chinese Science Bulletin* 53: 295-303.
- Marshall, P. A. & A. H. Baird, 2000. Bleaching of corals on the Great Barrier Reef: differential susceptibilities among taxa. *Coral Reefs* 19: 155-163.
- Mass, T., D. I. Kline, M. Roopin, C. J. Veal, S. Cohen, D. Iluz & O. Levy, 2010. The spectral quality of light is a key driver of photosynthesis and photoadaptation in *Stylophora pistillata* colonies from different depths in the Red Sea. *Journal of Experimental Biology* 213: 4084-4091.
- McClanahan, T., E. Weil, J. Cortés, A. Baird & M. Ateweberhan, 2009. Consequences of coral bleaching for sessile reef organisms. In Van Oppen, M. & J. Lough (eds), *Coral bleaching - patterns, processes, causes and consequences*. Springer Berlin Heidelberg.
- Muscatine, L. & J. Porter, 1977. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience* 27: 454-460.
- Oliver, J., 1984. Intra-colony variation in the growth of *Acropora formosa*: extension rates and skeletal structure of white (zooxanthellae free) and brown-tipped branches. *Coral Reefs* 3: 139-147.
- Penin, L., M. Adjeroud, M. Schrimm & H. S. Lenihan, 2007. High spatial variability in coral bleaching around Moorea (French Polynesia): patterns across locations and water depths. *Comptes Rendus Biologies* 330: 171-181.
- Pillay, R. M., B. Willis & H. Terashima, 2005. Trends in the density of zooxanthellae in *Acropora millepora* (Ehrenberg, 1834) at the Palm Island Group, Great Barrier Reef, Australia. *Symbiosis* 38: 209-226.
- Salvat, B., 1992. Natural bleaching and mortality of scleractinian corals on Moorea reefs (Society Archipelago) in 1991. *Comptes Rendus De l'Académie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences* 314: 105-111.
- Steele, R. D., 1976. Light intensity as a factor in the regulation of the density of symbiotic zooxanthellae in *Aiptasia tagetes* (Coelenterata, Anthozoa). *Journal of Zoology* 179: 387-405.

- Stimson, J., 1997. The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 214: 35-48.
- Sunagawa, S., J. Cortes, C. Jimenez & R. Lara, 2008. Variation in cell densities and pigment concentrations of symbiotic dinoflagellates in the coral *Pavona clavus* in the eastern Pacific (Costa Rica). *Ciencias Marinas* 34: 113-123.
- Titlyanov, E. A., T. V. Titlyanova, V. A. Leletkin, J. Tsukahara, R. van Woesik & K. Yamazato, 1996. Degradation of zooxanthellae and regulation of their density in hermatypic corals. *Marine Ecology Progress Series* 139: 167-178.
- Titlyanov, E. A., T. V. Titlyanova, K. Yamazato & R. van Woesik, 2001. Photo-acclimation dynamics of the coral *Stylophora pistillata* to low and extremely low light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263: 211-225.
- Venn, A. A., J. E. Loram & A. E. Douglas, 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany* 59: 1069-1080.
- Weis, V. M., 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Biol* 211: 3059 - 3066.

### **Supplementary material: Spatial variation of light intensity, water movement and sedimentation around Moorea Island**

To characterize environmental conditions at each of the nine study stations, light intensity, sedimentation, and water motion were quantified. Variability in light intensity was assessed through comparison of relative photosynthetic photon flux (rPPF in  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), calculated as the ratio between underwater light intensity and surface light intensity within the range of the photosynthetically active radiations (400-700 nm). Measures were made using a MQ-200 quantum meter (Apogee Instruments Inc., Logan UT, USA) at zenith and on cloud-free days. For each replicate, PPF was measured five times within 60 seconds on each of five random replicate plots. Three time replicates were performed at each station, on three different days. Variability in water movement was characterized through comparison of diffusion factor (DF), calculated as the ratio between weight loss of clod cards deployed on the field for 24 h and weight loss of identical cards kept in a motionless seawater tank (Thompson & Glenn, 1994). At each station, four replicate clod cards were used in each of five randomly chosen days. Variability in sedimentation was quantified through comparison

of dry sediment weight deposited per  $\text{cm}^2$  and per day. At each station, five sediment collectors were deployed for ten days in three replicate periods, following Stewart et al. (2006).

Relative PPF decreased with depth (KW  $P < 0.0001$ ), but no significant variation was observed among locations (Fig. S1). Total dry sediment weight did not vary among depths, but was significantly lower at Haapiti than at Vaipahu or Tiahura (KW,  $P < 0.0001$ ; MW, H vs. T:  $P < 0.0001$ , H vs. V:  $P = 0.0011$ , T vs. V:  $P = 0.1151$ ; Fig. S1). Diffusion factor decreased with depth (KW  $P < 0.001$ ; MW, all  $P < 0.0001$ ), and significant differences were detected among location, Haapiti presenting the highest values and Vaipahu the lowest (KW,  $P < 0.0001$ ; MW, all  $P < 0.0001$ ; Fig. S1).

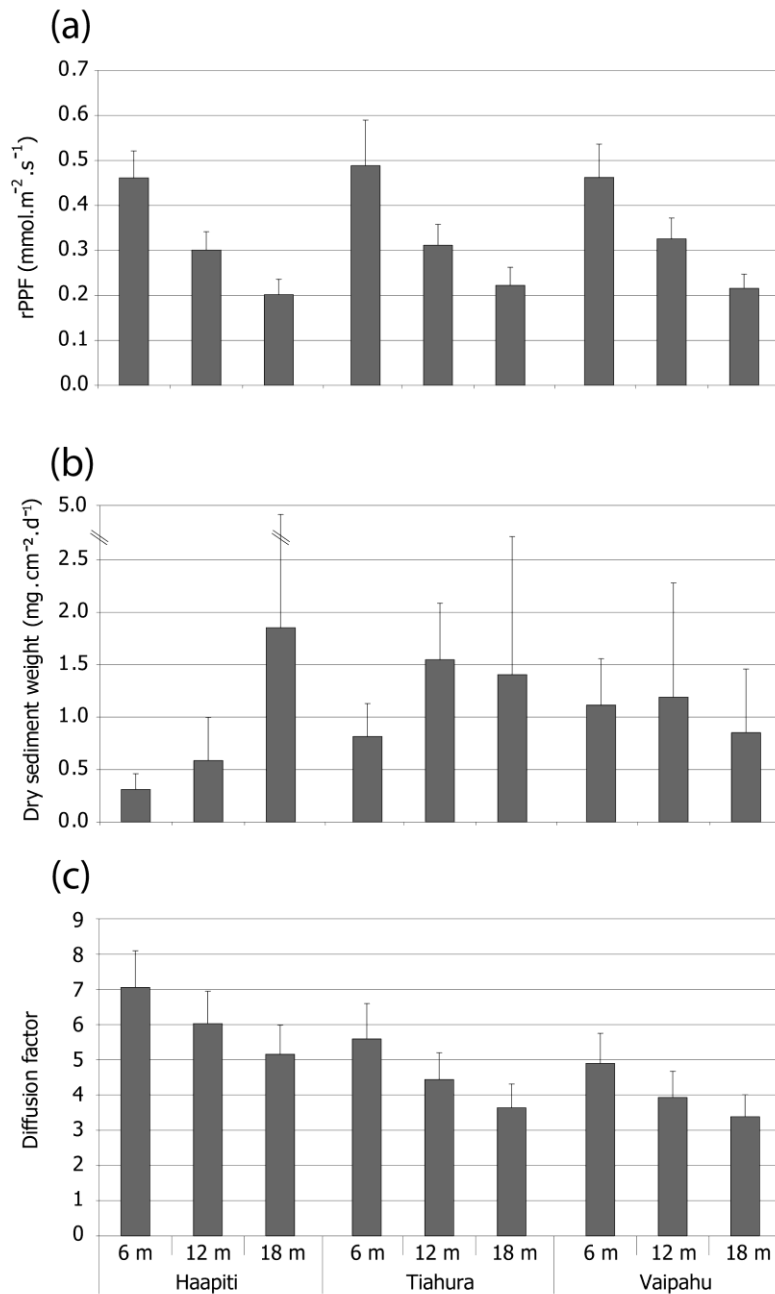


Figure S1: Spatial variation of a) light intensity (relative Photosynthetic Photon Flux (rPPF);  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), b) sedimentation (total sedimentation rate,  $\text{mg.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$ ), and c) water motion (diffusion factor) over the nine stations encompassing three locations (Haapiti, Tiahura and Vaipahu) and three depths (6, 12 and 18 m) on the outer reef slope around Moorea.

## References

- Thompson, T. L. & E. P. Glenn, 1994. Plaster standards to measure water motion. *Limnology and Oceanography* 39: 1768-1779
- Stewart, G. J., J. M. Caldwell, A. R. Cloutier & L. E. Flight, 2006. Water Resources Data - Maine Water Year 2005. Survey, U. S. G., Maine Water Science Center, Augusta, Maine 04330

## ANNEXE 5

### Jérémie Vidal-Dupiol

Res du Square, Bat C,  
4 rue des Géraniums  
66860 Perpignan  
06 33 84 38 86  
jeremie.vidal-dupiol@univ-perp.fr

### Curriculum vitae

#### Mots clefs

---

Récifs coralliens, Coraux scléactiniaires, Blanchissement corallien, Symbiose, Biomarqueur, Réchauffement climatique, Changements globaux, Génomique fonctionnelle, Transcriptomique, Ecophysiologie, Séquençage haut débit

#### Diplômes

---

- 2011/2012      **Post-doctorat** Etude de la réponse transcriptionnelle par RNA-seq (Illumina SOLEXA) de *Pocillopora damicornis* confronté aux stress environnementaux ; thermique, bactérien et acidification.
- 2007/2011      **Doctorat** « Stress environnementaux chez le corail Scléactiniaire *Pocillopora damicornis* : Du modèle expérimental à l'identification de marqueurs fonctionnels du stress ». Direction : Mehdi Adjeroud et Guillaume Mitta. UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Université de Perpignan.  
Mention très honorable avec les félicitations du jury.
- 2005/2007      **Master** « Ecologie fonctionnelle, des molécules aux populations », Université de Perpignan. Major mention B
- 2003/2005      **Licence** « Biologie Ecologie Evolution », Université de Perpignan. Mention AB.
- 2001/2003      **BATSA** « Productions aquacoles », LEGTA Lozère Lacanourgue. Major mention B.

#### Expériences en recherche

---

- Juillet 2007      Taxonomie des Scléactiniaires. Direction : Michel Pichon. UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Université de Perpignan.
- Jan-Juin 2007      Blanchissement corallien : développement d'une approche expérimentale et recherche de marqueurs fonctionnels chez le Scléactiniaire *Pocillopora damicornis*. Direction : Mehdi Adjeroud, Guillaume Mitta. UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Université de Perpignan.



- Jan-Juin 2006      Différentiation morphométrique de deux espèces du genre *Pocillopora* ; *P. verrucosa* et *P. meandrina*. Direction : Michel Pichon. UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Université de Perpignan.
- Juil-Aou 2004      Contamination microbiologique de *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis*, implications alimentaires. Direction : Didier Mayer. IFREMER, station d'Arcachon.

## Compétences méthodologiques

---

- Biologie moléculaire (ARN, ADN, Protéines)
- PCR quantitative
- Microbiologie
- Séquençage haut débit (Illumina SOLEXA)
- Approches expérimentales en milieu contrôlé
- Travail de terrain (échantillonnage, monitoring des populations)

## Enseignement et encadrement

---

- Ecologie et physiologie des Scléactiniaires.
- Techniques de cultures et de maintenances des Scléactiniaires.
- Bases moléculaires du blanchissement corallien.
- Du mutualisme au parasitisme, le cas de la symbiose Cnidaires/Dinoflagellés.
- Co-Encadrement de Marc Manetti (Master 2 recherche). Recherche de biomarqueurs fonctionnels de l'interaction hôte/pathogène, *Pocillopora damicornis* / *Vibrio coralliilyticus*.
- Co-Encadrement d'Aurélie Guérécheau (Master 2 recherche). Différentiation génétique et clonalité chez le Scléactiniaire *Pocillopora damicornis* : une analyse multi-échelles.

## Publications

---

Adjeroud, M. Michonneau, F. Edmunds, P.J. Chancerelle, Y. Lison de Loma, T. Penin, L. Thibaut, L. **Vidal-Dupiol, J.** Salvat, B. Galzin, R. (2009). Recurrent disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblages on a South Central Pacific reef. *Coral Reefs*, 28 : 775-780.

**Vidal-Dupiol, J.** Adjeroud, M. Roger, E. Foure, L. Duval, D. Moné, Y. Ferrier-Pagès, C. Tambutté, E. Tambutté, S. Zoccola, D. Allemand, D. Mitta, G. (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC Physiology*, 9 : 14.

**Vidal-Dupiol, J.** Ladrière, O. Meiztercheim, A.L. Adjeroud, M. Mitta, G. (2011). Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 1533-1545

**Vidal-Dupiol, J.** Ladrière, O. Meiztercheim, A.L. Destoumieux, D. Tambutté, E. Tambutté, S. Adjeroud, M. Mitta, G. (2011). Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *The Journal of Biological Chemistry*, in press

Penin, L. **Vidal-Dupiol, J.** Adjeroud, M. (Submitted). Response of coral assemblages to thermal stress: Are bleaching intensity and spatial patterns consistent between events? *Marine Biology*

Ladrière, O. Van Lierde, E. **Vidal-Dupiol, J.** Penin, L. Roberty, S. Poulicek, M. Adjeroud, M (Submitted). Zooxanthellae density in the coral *Acropora globiceps* along different environmental gradients around Moorea (French Polynesia).

## **Communications**

---

**Vidal-Dupiol J.**, Ladrière O., Meistertzheim, A-L., Destoumieux-Garzon, D., Tambutté E., Tambutté S., Zoccola D., Adjeroud M & Mitta G (2010). Antimicrobial response of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. 11th European Coral Reefs Symposium, December 2010, Wageningen, Netherland. Abstract volume p 153. Poster

**Vidal-Dupiol J.**, Mitta G., Roger E., Allemand D., Ferrier-Pagès C., Furla P., Grover R., Merle P.-L., Tambutté E., Tambutté S., Zoccola D., Ladrière O., Poulicek M., Fouré L. & Adjeroud M (2009). Potential implication of host/symbiont recognition mechanisms during coral bleaching. *Advancing the Science of Limnology and Oceanography*, Janvier 2009, Nice, France. Abstract volume p 278. Talk

**Vidal-Dupiol J.**, Mitta G., Roger E., Allemand D., Ferrier-Pagès C., Furla P., Grover R., Merle P.-L., Tambutté E., Tambutté S., Zoccola D., Ladrière O., Poulicek M., Fouré L. & Adjeroud M (2008). Potential implication of host/symbiont recognition mechanisms during coral bleaching. 11th International Coral Reefs Symposium, Juillet 2008, Fort Lauderdale, USA. Abstract volume p 298. Poster

**Vidal-Dupiol J** & Pichon M (2008). *Pocillopora verrucosa* and *Pocillopoa meandrina* are distinct species: Morphometric evidences. 11th International Coral Reefs Symposium, Juillet 2008, Fort Lauderdale, USA. Abstract volume p 561. Poster

**Vidal-Dupiol J.**, Mitta G., Roger E., Allemand D., Ferrier-Pagès C., Furla P., Grover R., Merle P.-L., Tambutté E., Tambutté S., Zoccola D., Ladrière O., Poulicek M., Fouré L. & Adjeroud M (2008). Potential implication of host/symbiont recognition mechanisms during coral bleaching. 13th France-Japan oceanography symposium, Septembre 2008, Marseille, France. Abstract volume p 109. Poster

Adjeroud M., Michonneau F., Edmunds PJ., Chancerelle Y., Penin L., Thibaut L., **Vidal-Dupiol J.**, Salvat B & Galzin R (2008). Recurrent large-scale disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblage on a coral reef in the south-central pacific. 11th International Coral Reefs Symposium, Juillet 2008, Fort Lauderdale, USA. Abstract volume p 161. Talk

Penin L., **Vidal-Dupiol J** & Adjeroud M (2009). Bleaching events: are spatial and taxonomic patterns consistent among year? A case study around Moorea, French Polynesia. 11th Pacific Science Inter-Congres, Mars 2009, Papeete, Polynésie Française. Abstract volume p 200. Talk

Adjeroud M., Michonneau F., Edmunds PJ., Chancerelle Y., Penin L., Thibaut L., **Vidal-Dupiol J.**, Salvat B & Galzin R (2009). Recurrent large-scale disturbances, recovery trajectories, and resilience of coral assemblage on a coral reef in the south-central pacific. 11th Pacific Science Inter-Congres, Mars 2009, Papeete, Polynésie Française. Abstract volume p 198. Talk

**Vidal-Dupiol** (2007). Le réchauffement climatique sonne-t-il le glas des récifs coralliens ? Exposition du CNRS Explorateurs des Mers, Juillet 2007, Paris, France. Poster

## **Divers**

---

- Plongée sous-marine, Niveau 3 initiateur (> 200 plongées)
- Aquariologie
- Voyages et découvertes
- Pêche
- Membre de l'International Society for Reef Studies