HAL open science

Absorption et devenir du phosphore au sein de la symbiose corallienne

Claire Godinot

To cite this version:

Claire Godinot. Absorption et devenir du phosphore au sein de la symbiose corallienne. Milieux et Changements globaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066199 . tel-00829443

HAL Id: tel-00829443

https://theses.hal.science/tel-00829443

Submitted on 3 Jun 2013

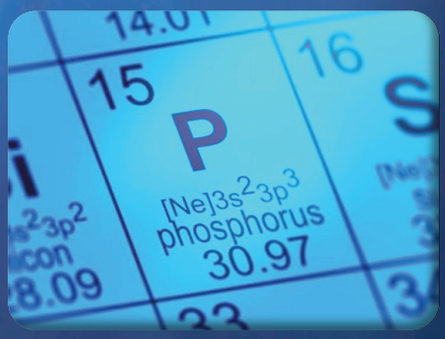
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

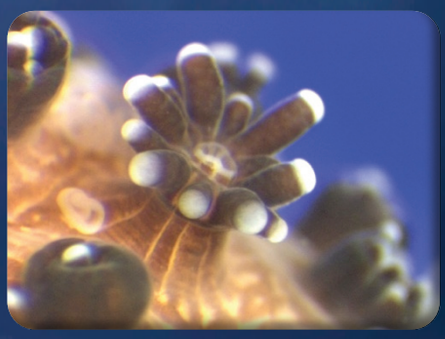
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Absorption et devenir du phosphore au sein de la symbiose corallienne

Claire GODINOT





Thèse publiée par le Centre Scientifique de Monaco | Établissement fondé le 23 mai 1960
par SAS le Prince Rainier III

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT D'ÎLE DE FRANCE

Présentée par

Claire GODINOT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Discipline | Spécialité

SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT | ÉCOPHYSIOLOGIE CORALLIENNE

Sujet de la thèse

ABSORPTION ET DEVENIR DU PHOSPHORE AU SEIN DE LA SYMBIOSE CORALLIENNE

Thèse dirigée par le Dr. Christine FERRIER-PAGÈS et le Dr. Renaud GROVER

Soutenue le lundi 17 septembre 2012
dans la salle de conférences du Musée Océanographique de Monaco
devant le jury composé de

RAPPORTEURS

Dr. Laurent CHAUVAUD | Centre National de la Recherche Scientifique, Brest
Dr. Roberto IGLESIAS-PRIETO | Université Nationale Autonome du Mexique, Puerto Morelo

EXAMINATEURS

Dr. Christine FERRIER-PAGÈS | Centre Scientifique de Monaco & Université Pierre et Marie Curie
Dr. Renaud GROVER | Centre Scientifique de Monaco
Pr. Paul NIVAL | Université Pierre et Marie Curie, Villefranche
Dr. Christophe MIGON | Université Pierre et Marie Curie, Villefranche

A ma mère,

qui a passé non loin des hôpitaux

chacune des années que j'ai passées au laboratoire.

Ton courage continue de m'inspirer chaque jour.

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas pu se faire sans votre aide, ce manuscrit est pour vous tous.

Une thèse est loin d'être une aventure en solitaire, comme en témoigne l'ampleur de ces remerciements. C'est au contraire, par bien des aspects, un travail d'équipe, humainement et professionnellement enrichissant. Il m'est ainsi agréable de remercier très chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à son élaboration d'une manière ou d'une autre.

Merci | aux membres de mon jury tout d'abord, le Dr. Laurent Chauvaud et le Dr. Roberto Iglesias-Prieto qui ont acceptés d'être mes rapporteurs malgré un emploi du temps chargé, ainsi que mes examinateurs venus de Villefranche, le Pr. Paul Nival et le Dr. Christophe Migon, qui ont eux aussi pris le temps de lire mon manuscrit malgré leurs maintes obligations professionnelles.

Merci | aux membres de mon comité de thèse ensuite, le Dr. Christophe Migon, dont l'inégalable humour corse a toujours égayé nos réunions, et le Dr. Mehdi Adjeroud, qui a accepté de suivre ma thèse depuis la Nouvelle-Calédonie.

Merci | à l'École Normale Supérieure et à l'Université Pierre et Marie Curie, dont l'allocation doctorale couplée m'a permis d'effectuer ce travail de thèse. Je tiens à remercier particulièrement Laurence Touchon de l'École Doctorale 129, et Martine Bretheau de l'ENS, dont l'aide m'a été bien précieuse pour démêler les nombreux problèmes administratifs inhérents à une thèse passée si loin des locaux parisiens.

Merci | à mes deux directeurs de thèse, qui m'ont accordé leur soutien et leur confiance tout au long de ces quatre années au CSM. Le Dr. Christine Ferrier-Pagès, dont les relectures si extensives, constructives et rapides !, m'ont fait tant progresser durant ma thèse. Et le Dr. Renaud Grover, dont les relectures, pointues mais non moins constructives, m'ont également permis d'améliorer ma rédaction. Les discussions scientifiques que nous avons eues tous les trois ont également grandement fait avancer ma conception de la recherche, et la liberté que vous m'avez accordée m'a permis de laisser relativement libre cours à mes envies expérimentales et mes rêves de nouvelles techniques (la RMN, c'était pas gagné, mais on y est arrivés !).

Merci | à l'ensemble de l'équipe d'écophysiologie. Le Dr. Stéphanie Reynaud, pour son aide précieuse lors de la fabrication d'eau de mer artificielle (quel casse-tête !), et avec qui j'ai passé un très agréable cours de statistiques au Croisic. Le Dr. Éric Béraud, pour son humour et nos conversations photographiques. Pascale Tremblay, avec qui j'ai partagé ces quatre années et déjoué les pièges de la thèse (ah, nos coups de fil à l'UPMC !...). Mais aussi, le Dr. Mia

Hoogenboom, le Dr. Malik Naumann et le Dr. Andrea Gori, pour leur gentillesse et pour m'avoir chacun donné un avant-goût de l'expérience post-doctorale. Merci enfin aux techniciens et techniciennes de l'équipe, Nicolas Tolstoï, Séverine Sikorski et Cécile Rottier, dont l'aide, et la bonne humeur, m'ont été inestimables lors de mes expériences (ah, la course lors des incubations d'APA et les fous rires lors des extractions de RMN...).

Merci | à l'ensemble de l'équipe de physiologie. Le Dr. Sylvie Tambutté et le Dr. Alex Venn, qui m'ont bien volontiers aidée pour mettre au point le tampon de RMN. Le Dr. Didier Zoccola, qui m'a fait découvrir la biologie moléculaire (quel chalenge enrichissant que de travailler en ta compagnie pour déterminer le clade de mes zooxanthelles !), et dont les fins jeux de mots matinaux, challenge d'imagination pour neurones embrumés, ont souvent égayé mon premier café journalier. Le Dr. Michael Holcomb, dont l'amitié et les compétences scientifiques m'ont fait aller de découverte en découverte. Les thésards de l'équipe de physiologie, le Dr. Anthony Bertucci, Julien Debreuil et Julien Laurent, auxquels je souhaite bon courage pour la poursuite de leurs recherches. Je n'oublie pas non plus le Dr. Éric Tambutté, le Dr. Philippe Ganot, Natacha Caminiti Segonds, Natalie Techer, et Edwige Barajas.

Merci | aux autres membres du CSM dont la collaboration me fut indispensable. Le Pr. Patrick Rampal et le Pr. Denis Allemand en premier lieu, pour m'avoir accueillie au sein du CSM. Le Pr. Allemand a toujours été disponible pour parler de science malgré ses nombreuses obligations, et je l'en remercie. Corinne Gaziello, Muriel Chilot et Patricia Serna, dont le travail à l'administration permet le bon fonctionnement administratif du CSM. Éric Elia, qui a toujours bien volontiers (et fort patiemment) assuré mes commandes de produits chimiques de dernière minute et lavé les montagnes de verrerie que produisaient mes incubations. Dominique Desgré, l'aquariologiste fournissant le CSM en *Stylophora* nounours. Jorge Sebdico, qui a si souvent réparé mon ordinateur et m'a prodigué de précieux conseils en informatique.

Merci | à tous ceux avec qui j'ai été amenée à collaborer à Monaco ou à Nice durant cette thèse. Le Dr. Olivier Thomas et Marc Gaysinski de l'Université de Nice, avec qui j'ai eu la joie d'expérimenter la RMN du phosphore. Patrick Rolland de la Direction de l'Environnement de Monaco, qui m'a si gentiment laissé mettre en place et utiliser son analyseur de nitrates. Le Dr. Florence Boisson, le Dr. Beat Gasser, le Dr. Fanny Houlbrèque et le Dr. Riccardo Rodolfo Metalpa, pour m'avoir permis de réaliser les expériences de pH à l'AIEA.

Merci | aux organismes qui m'ont attribué une bourse pour aller travailler trois semaines sur le terrain en Polynésie Française, la fondation Robert WAN - Tahiti Perles et l'Institut des Récifs Coralliens du Pacifique. Merci également à ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler à Moorea et Tahiti. Le Dr. Véronique Berteaux Lecellier du CRIOBE et le Dr. Loïc Charpy de l'IRD, qui m'ont si bien accueillie et assistée, tant sur place qu'en amont, lors de la préparation de la mission. Ceux qui m'ont apporté leur aide sur place également : le Dr. Marie-José Langlade de l'IRD, Anya Brown, Jenny Gowan et le Dr. Robert Carpenter de la GUMP, et tous ceux du CRIOBE, Héloïse Rouzé, Chloé Gonzalez, Benoit Espiau, le Dr. Thierry Lison De Loma, Yannick Chancerelle,

Elina Burns, et le "couple" d'enfer formé par le Pr. René Galzin et Cédric Dayot le PU. Ce fût enfin un réel plaisir d'être accompagnée du Dr. Renaud Grover lors de cette mission à Moorea. Outre les joies de notre travail sur place, nous y avons eu le bonheur d'officier en cuisine et de nous découvrir un loisir commun (Renaud, on refait du mi-cuit de thon au sésame ou du sashimi au lait de coco quand tu veux !).

Merci | aux membres de l'IRD France Nord qui m'ont reçue à Bondy pour deux semaines de travail sur les micro-organismes perforant le squelette des coraux. Le Dr. Aline Tribollet bien sûr, qui m'a à nouveau accueillie et guidée pour l'observation des endolithes, et avec qui c'est toujours un plaisir de travailler. Thierry Pilorge pour son aide lors de l'inclusion des échantillons. Le Dr. Claire Lazareth qui m'a permis d'utiliser sa scie circulaire, sa polisseuse et son microscope. Sandrine Caquineau qui m'a guidée lors de la manipulation du magnifique MEB de la plateforme Alizés.

Merci | à l'ensemble du personnel du Musée Océanographique de Monaco, et en particulier Robert Calcagno, pour m'avoir permis de soutenir ma thèse dans la prestigieuse salle de conférence du Musée, et Anne-Marie Damiano et Élisabeth Baltzinger de la bibliothèque, dont l'aide me fut inestimable pour localiser les articles toujours plus introuvables dont j'ai eu besoin lors de cette thèse.

Merci | à Pierre Grécias et toute l'équipe de la maison d'édition Lavoisier, qui m'ont fait confiance pour expérimenter les voies de l'enseignement lors de la rédaction d'un manuel scolaire en parallèle de ma thèse. Cette expérience hors du commun m'a permis d'approfondir mes compétences en matière d'illustration scientifique, ce qui s'est révélé bien utile pour la rédaction de ma thèse.

Merci | bien évidemment à mes amis, dont le soutien sans faille m'a été si précieux tout au long des années. Séverine et Aymeric, cobayes complaisants de mes expériences culinaires dominicales, en compagnie desquels les trajets en train, les apéros et les petits week-ends ont été source de tant de joies. Merci aussi à vous deux et à Andrea pour nos séances de sport, défoulement (voulu) hebdomadaire (quoique parfois plus irrégulier dans les faits..., mais qu'importe !), toujours ô combien exutoire. Mélanie, Sébastien, Romain, Cathy, Audrey, Benji, Pi, Nicou, et Bill, que je n'ai pas eu le loisir de voir aussi souvent que je l'aurai aimé durant ces quatre années, et qui ont eu la bonté de ne pas m'en tenir rigueur. Un remerciement particulier à Audrey, pour ses relectures toujours attentives de mes écrits scientifique.

Merci | enfin à mes parents, qui n'ont jamais douté que je réussirai, et sans qui toutes mes années d'étude n'auraient pas été possibles.

Cette thèse n'aurait pas pu se faire sans votre aide, ce manuscrit est pour vous tous.

Merci !

Table des matières

Table des matières 8
Table des illustrations 14
Publications et communications scientifiques 16
Principales abréviations 18

Préambule 21

La théorie de la limitation 21
Carte d'identité du phosphore 24
Choix de présentation de cette thèse 28

Chp. 1 | La problématique du phosphore au sein de la symbiose corallienne 29

1 | Les récifs coralliens, un écosystème basé sur la symbiose corallienne 33
Les récifs coralliens ..... ~
Morphologie ~
Distribution ~
Importance pour l'Homme 34
Un écosystème en péril ~
Les polypes coralliens 35
Taxonomie ~
Anatomie et histologie 37
Les zooxanthelles, symbiotes coralliens 39
Définition de la symbiose ~
Taxonomie 40
Les différents clades ~
Caractéristiques des zooxanthelles ~
Physiologie de la symbiose 42
La sécrétion d'un squelette calcaire ~
La photosynthèse ~
Des modes de nutrition variés ~
Bénéfices, coûts et rupture de la symbiose 44
Bénéfices mutuels de la symbiose ~
Un partenariat qui a un coût ~
La rupture de la symbiose ~
Modèles biologiques 45
Les coraux durs comme modèle d'étude ~

Stylophora pistillata, un modèle de choix 46
Les autres coraux tropicaux symbiotiques utilisés ~
Les coraux méditerranéens étudiés 48
Le corail asymbiotique étudié ~
Un mode de culture adapté au travail en laboratoire ~
2 | Importance du phosphore pour les coraux 49
Cycle du phosphore en milieu récifal ..... ~
Les différentes formes de phosphore ~
Concentrations en phosphore 50
Un recyclage important 54
Importance biologique du phosphore ..... ~
Importance à l'échelle moléculaire et cellulaire 55
Importance à l'échelle des organismes 56
Importance à l'échelle des écosystèmes ~
3 | Incertitudes actuelles et problématiques 58
Les incertitudes sur la limitation en phosphore dans la symbiose ..... ~
Techniques d'étude ~
Hypothèse d'une limitation en azote 59
Hypothèse d'une limitation en phosphore ~
Hypothèse d'une limitation conjointe en phosphore et azote 60
Les incertitudes sur l'absorption du phosphore dissous par la symbiose 61
L'absorption de PID ~
L'absorption de POD 62
Les incertitudes sur le devenir du phosphore dans la symbiose ..... ~
Objectifs et problématiques de la thèse ..... ~
Chp. 2 | L'absorption de phosphore inorganique dissous 63
Chp. 3 | L'absorption de phosphore organique dissous ~
Chp. 4 | Étude par RMN du ^{31}P de la composition en phosphore de la symbiose ~
Chp. 5 | Devenir du phosphore absorbé au sein de la symbiose ~
Chp. 6 | Application sur le terrain : limitation sur un récif mésotrophe 64
4 | Démarche expérimentale ..... ~
Maintenance des coraux en aquarium ..... ~
Isolement des zooxanthelles 65
Culture des zooxanthelles ..... ~
Mesure des taux d'absorption de phosphore ..... ~
Mesure du contenu en phosphore 66
Mesure des paramètres physiologiques 67
Mesure de biomasse ..... ~

Chp. 2 | L'absorption de phosphore inorganique dissous 69

1 | Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude 73
2 | Mécanisme d'absorption du phosphate 74
Effet de la concentration en phosphate ..... ~
La vitesse d'absorption du phosphate dépend de sa concentration ~
Le transport de phosphate est actif ~
Caractérisation du transporteur de phosphate de l'hôte 75
Comparaison des coraux entiers et des zooxanthelles fraîchement isolées ..... ~
3 | Effets de facteurs environnementaux 76
Effet de la lumière, rôle des symbiotes ..... ~

Effet d'une acclimatation au phosphate 76
Effet de la nutrition 77
Effet des changements globaux ..... ~
Effet d'un enrichissement en azote 79
4 | Schéma bilan ..... ~
5 | Article 1 81
6 | Article 2 95
7 | Article 3 111

Chp. 3 | L'absorption de phosphore organique dissous 135

1 | Mécanisme d'absorption du phosphore organique dissous 139
Le POD en milieu récifal ..... ~
Une conversion enzymatique est nécessaire à l'absorption du POD ..... ~
Rôle des phosphatases ~
Existence de phosphatases alcalines et acides ~
Localisation des phosphatases ~
2 | Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude 141
3 | Absorption de phosphore organique dissous ..... ~
Comparaison des coraux entiers et des zooxanthelles fraîchement isolées ..... ~
Rôles respectifs de l'hôte et des symbiotes, importance du clade 142
4 | Effets de facteurs environnementaux 143
Effet de la lumière, rôle des symbiotes ..... ~
Effet du blanchissement ..... ~
Effet de la nutrition ..... ~
5 | Schéma bilan ..... ~
6 | Article 4 145

Chp. 4 | Étude par RMN du ^{31}P de la composition en phosphore de la symbiose 163

1 | La spectroscopie RMN du ^{31}P chez les coraux 167
Principe de la spectroscopie RMN ..... ~
Une technique basée sur l'existence d'un moment magnétique des noyaux... ~
... et sur son interaction avec les champs magnétiques externes ~
Une technique qui repose sur l'entrée en résonance des différents noyaux 168
Étapes de la spectroscopie RMN par transformée de Fourier 170
De la RMN du phosphore aux coraux... ..... ~
Avantages de la spectroscopie RMN du phosphore ~
Inconvénients de la spectroscopie RMN du phosphore 171
Utilisations antérieures de la RMN sur des organismes comparables aux coraux 172
2 | Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude ..... ~
3 | Mise au point du protocole de RMN du ^{31}P 173
Protocole mis au point ..... ~
Isolation des cellules ~
Extraction des cellules 174
Observation en spectroscopie RMN ~
Tests de l'efficacité du protocole 175
Paramétrage des analyses ~
Test de la qualité de l'isolation : une technique non optimale... 176

Test de la qualité de l'extraction : du triomphe de la simplicité 177
Mesure de la composition en phosphore ~
4 | Composition en phosphore de la symbiose ~
Composition des tissus hôtes et des zooxanthelles en culture ~
Effet de facteurs environnementaux... 178
... sur la composition des zooxanthelles en culture ~
... sur la composition de l'hôte corallien ~
5 | Schéma bilan ~
6 | Article 5 181

Chp. 5 | Devenir du phosphore absorbé au sein de la symbiose 205

1 | L'eutrophisation des récifs 209
Point trop n'en faut ~
Des effets physiologiques méconnus ~
Dispositif expérimental choisi 210
2 | Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude ~
3 | Effets sur la physiologie de la symbiose 212
4 | Effets sur la stœchiométrie de la symbiose 213
5 | Schéma bilan ~
6 | Article 6 215

Chp. 6 | Application sur le terrain : limitation sur un récif mésotrophe 235

1 | Site d'étude, problématiques scientifiques et objectifs 239
Site d'étude de la Pépinière ~
Techniques testées sur le terrain ~
2 | Matériel et méthodes 240
Préparation des boutures de corail ~
Mesure de l'absorption de phosphore 242
Absorption de PID seul ~
Absorption de PID en présence d'ammonium ~
Absorption de POD ~
Mesure du contenu en phosphore ~
Rapports C:N:P ~
Composition en phosphore en RMN ~
3 | Résultats 243
Absorption de phosphore ~
Absorption de PID seul ~
Absorption de PID en présence d'ammonium ~
Absorption de POD ~
Contenu en phosphore ~
Rapports C:N:P ~
Composition en phosphore en RMN ~
4 | Discussion 246
Limitation par les nutriments ~
Pas ou peu de limitation par le phosphore... ~
... mais une limitation par l'azote... ~
... malgré une forte concentration de nitrate ~

Techniques testées sur le terrain 247
Comparaison avec les résultats obtenus au CSM 248
5 | Schéma bilan ..... ~

Chp. 7 | Discussion générale et perspectives 251

1 | Rappel des enjeux et objectifs de cette thèse 255
2 | Limitation par le phosphore dans la symbiose ..... ~
Limitation en phosphore ..... ~
Limitation conjointe en phosphore et en azote 256
Variabilité de la limitation en phosphore 257
Techniques d'étude de la limitation ..... ~
Deux indicateurs efficaces ~
Un indicateur remis en question ~
3 | Régulation de l'absorption de phosphore 258
Régulation par la disponibilité des diverses sources de phosphore ..... ~
Régulation de l'absorption de PID et de POD par la présence de PID ~
Régulation de l'absorption de PID et de POD par la présence de POP 260
Régulation par les autres conditions environnementales ..... ~
Effet de la lumière ~
Effet du changement global ~
4 | Devenir du phosphore absorbé au sein de la symbiose 261
Effets physiologiques d'un enrichissement en PID et sites d'accumulation de phosphore dans la symbiose ..... ~
Répartition du phosphore dans les biomolécules ..... ~
5 | Conclusion générale : sources de phosphore et limitation par les nutriments ... 262
Contributions du PID et du POD aux besoins en phosphore ..... ~
En conditions oligotrophes ~
En conditions mésotrophes 263
Contribution du POP aux besoins en phosphore ..... ~
Bilan de la contribution des diverses sources de phosphore ..... ~
6 | Perspectives 264
Le bilan des apports de phosphore dans la symbiose reste à compléter... ..... ~
... dans le contexte du changement global... ~
... et en tenant compte d'autres sources de phosphore 266
Les indicateurs et la répartition du phosphore dans les biomolécules du corail ..... ~
Des indicateurs à améliorer ~
Une catégorie de molécules à examiner de plus près ~

Annexe A | L'absorption d'azote inorganique dissous 269

1 | L'azote inorganique dissous en milieu récifal 273
Présentation de l'azote en milieu récifal ..... ~
Voies d'absorption et d'assimilation ..... ~
L'absorption est active ~
L'assimilation d'ammonium dépend à la fois de l'hôte et des symbiotes 274
L'assimilation de nitrate reste un phénomène controversé ~
2 | Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude 275

3 | Effets du phosphate et du changement global sur l'absorption d'azote 275
Effet de la concentration en phosphate ..... ~
Effet des changements globaux 276

Annexe B | Influence du phosphore sur la bioérosion 279

1 | La bioérosion récifale 283
La bioérosion, une force majeure de destruction des récifs coralliens ..... ~
Importance des microbioérodeurs 284
Effets de l'eutrophisation 286
2 | Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude ..... ~
3 | Effets du PID sur la bioérosion par les endolithes 287
4 | Article 7 289

Références bibliographiques 305

Table des illustrations

Liste des figures

Fig. 1	Loi du minimum	22
Fig. 2	Carte d'identité du phosphore élémentaire	25
Fig. 3	L'alchimiste, de Joseph Wright	27
Fig. 4	La Grand Barrière de corail, Australie	32
Fig. 5	Répartition mondiale des récifs coralliens	33
Fig. 6	Phylogénie simplifiée des Cnidaires	36
Fig. 7	Polype de *Stylophora pistillata*	~
Fig. 8	Représentation schématique en coupe transversale de tissus coralliens	38
Fig. 9	Phylogénie simplifiée des Alvéolés	41
Fig. 10	Photographie de zooxanthelles	42
Fig. 11	Modèles utilisés durant cette thèse	47
Fig. 12	Cycle simplifié du phosphore en milieu récifal	52
Fig. 13	Métabolisme du phosphore dans la symbiose	57
Fig. 14	Dispositif de mesure des taux d'absorption de nutriments	66
Fig. 15	Bouture de *Stylophora pistillata*	72
Fig. 16	Transporteur de phosphate de l'hôte	75
Fig. 17	Chimie des ions phosphate dans l'eau de mer	77
Fig. 18	Bilan de l'absorption du PID dans la symbiose	80
Fig. 19	Bouture de *Pocillopora damicornis* lors d'une mesure d'absorption de POD	138
Fig. 20	Activité des phosphatases	140
Fig. 21	Bilan de l'absorption du POD dans la symbiose	144
Fig. 22	Les coraux et la RMN-^{31}P	166
Fig. 23	Principe de la résonance magnétique nucléaire	168
Fig. 24	Étapes de la résonance magnétique nucléaire	169
Fig. 25	Exemple de spectre de RMN-^{31}P	171
Fig. 26	Principe de l'expérience de contamination croisée	176
Fig. 27	Bilan de la composition en phosphore de la symbiose	179
Fig. 28	Dispositif expérimental d'enrichissement en phosphate	208
Fig. 29	Bilan de l'effet d'un enrichissement en PID sur la symbiose	214

Fig. 30 Site de la Pépinière dans le lagon de Moorea 238
Fig. 31 Position géographique du site de la Pépinière 241
Fig. 32 Absorption de PID seul 243
Fig. 33 Absorption de PID en présence d'ammonium 244
Fig. 34 Absorption de POD ~
Fig. 35 Composition en phosphore 245
Fig. 36 Bilan de l'absorption et de la composition en phosphore à la Pépinière 249
Fig. 37 Coucher de soleil concluant la mission de terrain en Polynésie Française 254
Fig. 38 Bilan des apports de phosphore en conditions oligotrophes et mésotrophes 259
Fig. 39 Colonie de *Pocillopora meandrina* abritant des poissons domino 272
Fig. 40 Voies d'assimilation de l'azote inorganique dissous 274
Fig. 41 Destruction des récifs coralliens par les organismes bioérodeurs 282
Fig. 42 Le délicat équilibre entre croissance et destruction des récifs coralliens 283
Fig. 43 Traces de bioérosion 284
Fig. 44 Squelette perforé par des endolithes 285
Fig. 45 Exemple d'endolithes ~

Liste des tableaux

Tableau 1 Détails sur la position taxonomique de *Stylophora pistillata* 37
Tableau 2 Classification des symbioses 39
Tableau 3 Détails sur la position taxonomique des zooxanthelles 41
Tableau 4 Les diverses formes de phosphore présentes en milieu récifal 51
Tableau 5 Suivi des paramètres au cours du temps lors de l'enrichissement en PID 211
Tableau 6 Concentrations en nutriments du site de la Pépinière 239
Tableau 7 Rapports C:N:P 245
Tableau 8 Bilan des apports de phosphore pour la symbiose 264

Publications & communications scientifiques

Liste des publications à comité de lecture international

In review | C. Godinot, C. Ferrier-Pagès, S. Sikorski, et R. Grover | Limnology and Oceanography | Significant use of dissolved organic phosphorus by reef-building corals ★

In review | C. Godinot, M. Gaysinski, O. Thomas, C. Ferrier-Pagès, et R. Grover | Coral Reefs | Phosphorus composition of coral host tissues and cultured zooxanthellae revealed by ^{31}P-NMR ★

2012 | C. Godinot, A. Tribollet, R. Grover, et C. Ferrier-Pagès | Biogeosciences | Bioerosion by euendoliths decreases in phosphate-enriched skeletons of living corals | doi: 10.5194/bgd-9-2425-2012 ★

2011 | C. Godinot, F. Houlbrèque, R. Grover, et C. Ferrier-Pagès | PLoS One | Coral uptake of inorganic phosphorus and nitrogen negatively affected by simultaneous changes in temperature and pH | 6(9), Doi: 10.1371/journal.pone. 0025024 ★

2011 | C. Godinot, C. Ferrier-Pagès, P. Montagna, et R. Grover | Journal of Experimental Marine Biology and Ecology | Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral *Stylophora pistillata* Esper 1797 under phosphate enrichment | 409: 200-207 ★

2011 | C. Godinot, R. Grover, D. Allemand, et C. Ferrier-Pagès | Journal of Experimental Biology | High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* | 214: 2749-2754 ★

2009 | C. Godinot, C. Ferrier-Pagès, et R. Grover | Limnology and Oceanography | Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata* | 54: 1627-1633 ★

2009 | A. Tribollet, C., Godinot , M. Atkinson, et C. Langdon | Global Biochemical Cycles | Effects of elevated pCO_2 on dissolution of coral carbonates by microbial euendoliths | 23, GB3008: 1-7

2009 | C. Godinot, et N. Chadwick | Bulletin of Marine Science | Phosphate excretion by anemonefish and uptake by giant sea anemones: demand outstrips supply | 85: 1-9

Les publications et communications indiquées par une étoile ★ ont été réalisées dans le cadre de cette thèse.

Liste des communications orales

2012 | C. Godinot, F. Houlbrèque, R. Grover, et C. Ferrier-Pagès | International Coral Reef Symposium | Coral nutrient uptake negatively impacted by elevated temperature and pCO_2 | Cairns, Australie ★

2012 | R. Grover, C. Godinot, et C. Ferrier-Pagès | International Coral Reef Symposium | Phosphorus species characterization by ^{31}P-NMR in the coral *Stylophora pistillata* | Cairns, Australie ★

2011 | C. Godinot, F. Houlbrèque, R. Grover, et C. Ferrier-Pagès | Ocean Acidification Meeting | Nutrient uptake is negatively impacted by elevated temperature and pCO_2 in the coral *Stylophora pistillata* | Monaco ★

2010 | C. Godinot, C. Ferrier-Pagès, P. Montagna, et R. Grover | International Society for Reef Studies Symposium | Physiological response and phosphorus budget of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* | Wageningen, Pays-Bas ★

Liste des posters

2012 | C. Godinot, C. Ferrier-Pagès, et R. Grover | | International Coral Reef Symposium | Role of host and symbionts in coral alkaline phosphatase activity | Cairns, Australie ★

2009 | C. Godinot, C. Ferrier-Pagès, et R. Grover | Association for the Sciences of Limnology and Oceanography Meeting | Phosphate uptake by symbiotic zooxanthellae is dependent upon host control and internal phosphorus pools in the tropical coral *Stylophora pistillata* | Nice, France ★

Liste des publications de vulgarisation

2011 | C. Godinot, et R. Grover | Gazette de Monaco | Mission du CSM à Moorea | Article sous forme de bande dessinée | Rubrique : Chroniques du CSM ★

2011 | C. Godinot, et R. Grover | Communiqué du Centre de Presse de Monaco | Le Centre Scientifique de Monaco en mission en Polynésie ★

2010 | C. Godinot, H. Moreau, M. Paulhiac, et F. Tejedor | Tec & Doc Lavoisier (Éds.) | Biologie Géologie BCPST 1ère année | Collection Méthodes et Annales | 560 pp.

Principales abréviations

ADN	DNA (*US*)	acide désoxyribo-nucléique
AEP		acide (aminoéthyl)phosphonique
AIEA	IAEA (*US*)	Agence Internationale de l'Énergie Atomique
APA		activité de la (des) phosphatase(s) alcaline(s)
APAc	AcPA (*US*)	activité de la (des) phosphatase(s) acide(s)
APP	PPA (*US*)	acide phénylphosphonique (*standard utilisé en RMN*)
ARN	RNA (*US*)	acide ribonucléique
ATP		adénosine triphosphate
C:N:P		rapport atomique entre le contenu en carbone (C), en azote (N) et en phosphore (P)
CO_2		dioxyde de carbone
CRIOBE		Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement
CSM		Centre Scientifique de Monaco
δ		déplacement chimique (*RMN*)
D_2O		oxyde de deutérium (*eau lourde*)
FID		décroissance libre de l'induction (*free induction decay en anglais*, *RMN*)
GDH		glutamate déshydrogénase
GOGAT		glutamine oxoglutarate amino transférase
GS		glutamine synthétase
H_2O		eau
IRD		Institut de Recherche pour le Développement
K		constante d'affinité d'un transporteur ou d'une enzyme
μ		taux de croissance spécifique
μ		moment magnétique nucléaire (*RMN*)
MEB	SEM (*US*)	microscope électronique à balayage
NAR		nitrate réductase
NH_4^+		ion ammonium
NIR		nitrite réductase
NO_2^-		ion nitrite
NO_3^-		ion nitrate

O_2		dioxygène
PID	**DIP** (*US*)	phosphore inorganique dissous
PIP		phosphore inorganique particulaire
pNP		para-nitrophénolate (*produit de l'hydrolyse du pNPP*)
pNPP		para-nitrophényl phosphate (*substrat artificiel utilisé pour doser l'APA*)
PO_4^{3-}		ion phosphate
POD	**DOP** (*US*)	phosphore organique dissous
POP		phosphore organique dissous
RPA	**PAR** (*US*)	rayonnement photosynthétiquement actif
RMN	**NMR** (*US*)	résonance magnétique nucléaire
S		spin (en *RMN*)
V_{max}		vitesse maximale d'absorption d'un nutriment ou de fonctionnement d'une enzyme

Préambule

"Suddenly, as rare things will, it vanished"

Robert Browning

Ainsi que l'écrivait le poète anglais Robert Browning, les choses rares ou précieuses ont une fâcheuse tendance à nous échapper. Comme cette thèse s'est attachée à l'illustrer, il en va ainsi du phosphore pour les coraux. Élément rare dans les eaux entourant les récifs coralliens, le phosphore n'en est pas moins précieux pour les coraux. En effet, il entre dans la composition de très nombreuses molécules du vivant : c'est le "P" de l'ATP (adénosine triphosphate), c'est le lien entre les différents nucléotides de la double hélice d'ADN (acides désoxyribonucléiques), c'est le "phospho" des phospholipides membranaires… Bien que les coraux aient développé des stratégies efficaces pour son absorption, le phosphore reste souvent considéré comme un élément limitant pour leur croissance. Cette limitation des coraux par le phosphore a constitué le fil de conduite des expériences de cette thèse.

Le concept de limitation fait l'objet de nombreuses théories en écologie. Il ne s'applique pas qu'aux coraux, qui ne sont pas les seuls organismes à être assujettis à la disponibilité d'un élément extérieur. Il ne s'applique pas non plus qu'au phosphore, qui n'est pas le seul facteur pouvant limiter la croissance des organismes. Ce préambule introduit quelques notions relatives à la théorie de la limitation, suivies d'une présentation du phosphore et de ses caractéristiques. Cette présentation détaille notamment la troublante et édifiante histoire de cet élément chimique. Elle est plus personnelle et anecdotique, et voulue comme un clin d'œil à l'excellent roman du scientifique britannique John Emsley, *"The 13th element: the sordid tale of murder, fire, and phosphorus"*. C'est en effet ce livre, découvert en licence, qui m'a donné l'envie d'étudier le phosphore. Ce préambule se termine par une explication de deux des choix de présentation faits pour cette thèse.

Enfin, bien qu'ils soient l'objet d'étude de cette thèse, les coraux ne seront pas abordés plus avant dans ce préambule (ils seront présentés dans le chapitre 1).

La théorie de la limitation

Historiquement, la théorie de la limitation a été formulée sous le nom de "loi du minimum" par Justus von Liebig. Ce chimiste allemand, reconnu comme le fondateur de l'agriculture industrielle, a établi le caractère crucial des sels minéraux contenus dans le sol pour la croissance des plantes. Sous sa forme initiale, énoncé par Liebig vers 1850 dans sa théorie de l'alimentation minérale des plantes (Liebig, 1855), la loi

du minimum stipule que "*le rendement d'une culture est limité par celui des éléments fertilisants qui le premier vient à manquer*". Cette loi est couramment illustrée par un tonneau dont chaque planche correspond à un élément indispensable : carbone, azote, phosphore, ... (figure 1). Les planches sont toutes de longueur différente, et le tonneau fuit fatalement par la plus courte. À l'identique, une plante ne parvient pas à se développer de manière optimale tant que certains nutriments[1] organiques ou inorganiques [2] ne sont pas présents en quantités suffisantes.

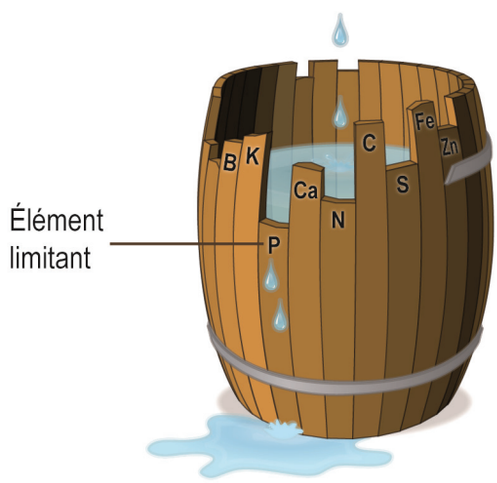


Figure 1 | Loi du minimum
Illustration théorique de la loi de Liebig sous la forme d'un tonneau, dont la capacité est limitée par la longueur de la planche la plus courte, et peut seulement être augmentée en rallongeant cette planche (la planche du phosphore dans le cas de l'illustration).

Généralisée par la suite, cette théorie établit que si l'un des nutriments[3] essentiels fait défaut, tous les autres qui sont présents sont inutiles (en termes de rendement de croissance) tant que ce manque persiste. Elle peut s'appliquer à la croissance de tout être vivant. Ainsi, un nutriment limitant est un nutriment dont l'absence ou la faible concentration empêche la pleine croissance d'un organisme ou d'une population, et ce même en présence de fortes concentrations d'autres éléments nutritifs. L'élément limitant est donc celui qui est présent dans la proportion la plus faible par rapport aux besoins des organismes.

Les océanographes distinguent deux catégories de nutriments selon les quantités nécessaires aux organismes : les micro- et les macro-nutriments. Les micro-nutriments sont ceux dont les organismes ont besoin en très petites quantités, tels que certains métaux (fer, cobalt, chrome, cuivre, manganèse, zinc…), certains composés halogénés (brome, iode) et les vitamines. Ces micro-nutriments interviennent essentiellement en tant que cofacteurs[4] du métabolisme : les métaux interviennent par exemple dans la photosynthèse, notamment le zinc, le fer et le manganèse, qui sont nécessaires à la formation des pigments chlorophylliens. La faible concentration du fer dans certaines régions océaniques est d'ailleurs responsable d'une forte limita-

[1] Un **nutriment**, ou élément nutritif, est un composé nécessaire aux organismes vivants pour couvrir leurs besoins physiologiques.

[2] Une **molécule organique** comporte au moins un atome de carbone lié à un atome d'hydrogène. Elle contient généralement une chaine carbonée hydrogénée et des groupements fonctionnels faisant intervenir d'autres éléments (oxygène, azote, phosphore…). Une **molécule inorganique**, anciennement appelée molécule minérale, est une molécule ne comportant pas d'atome de carbone lié à un atome d'hydrogène.

[3] La **loi du minimum** ne s'applique en fait pas qu'aux nutriments : la lumière, l'humidité, la température, la présence ou l'absence d'autres organismes, la présence de composés toxiques… peuvent également limiter la croissance des organismes. Seule la limitation par les nutriments a été considérée ici car c'est le sujet de cette thèse.

[4] Un **cofacteur** est une molécule organique ou inorganique, non protéique, qui favorise l'activité d'une enzyme du métabolisme, sans être pour autant obligatoirement indispensable à son fonctionnement.

tion du phytoplancton par cet élément (De Baar *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1994; Behrenfeld *et al.*, 1996). Les macro-nutriments, quant à eux, sont les nutriments dont les organismes ont besoin en quantités plus importantes, en tant que véritables "blocs de construction" des molécules du vivant. Il s'agit essentiellement du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore et du soufre. Cette thèse s'étant attachée à l'un de ces macro-nutriments, le phosphore, il ne sera par la suite plus question des micro-nutriments, et le terme "nutriment" sera utilisé pour désigner plus simplement les macro-nutriments, dès lors qu'aucune ambiguïté ne sera possible.

Dans les milieux aquatiques, la faible concentration du phosphore comparée aux besoins élevés des organismes a fait qu'il a rapidement été considéré comme un des principaux facteurs contrôlant la production primaire planctonique. Si en milieu lacustre, le phosphore a très tôt été reconnu comme l'élément le plus limitant (Vollenweider, 1976), il n'en va pas de même en milieu océanique. Deux macro-nutriments sont majoritairement considérés comme capables de contrôler la production primaire océanique : le phosphore et l'azote (Falkowski, 1997; Tyrrell, 1999). Aucun consensus n'a à ce jour été atteint quant auquel de ces deux nutriments est le plus souvent limitant. De manière simplifiée, deux types d'arguments s'affrontent sur cette question.

Les partisans de la limitation par le phosphore sont majoritairement des géochimistes. Ils fondent principalement leur appréciation sur des mesures des rapports atomiques C:N:P du plancton et de l'eau de mer, initiées dans les années 1930 par l'océanographe américain Alfred Redfield[5] (1934; 1963). Ils se basent également sur la comparaison des diverses sources biogéochimiques des deux nutriments, et notamment sur la différence fondamentale existant entre l'azote et le phosphore au niveau de leurs sources atmosphériques. En effet, l'azote est un composant abondant de l'atmosphère, sous forme de diazote gazeux, N_2. Or ce diazote atmosphérique peut être fixé par certaines cyanobactéries marines (dites fixatrices d'azote), qui augmentent ainsi les stocks marins d'azote (Capone et Carpenter, 1999). Au contraire, le phosphore n'a pas de source atmosphérique significative, comme nous le verrons dans le chapitre 1. Ainsi, à l'échelle des temps géologiques, le phosphore semble être l'ultime macro-élément limitant pour la production océanique (Redfield, 1958; Tyrrell, 1999). De nombreux travaux ont d'ailleurs montré que le phosphore joue un rôle déterminant dans la productivité de certaines régions océaniques, comme en Mer Méditerranée (Diaz *et al.*, 2001), dans le Pacifique Nord (Karl *et al.*, 1997) et dans l'Atlantique (Cotner *et al.*, 1997).

Les partisans de la limitation par l'azote sont quant à eux majoritairement des biologistes et des écologistes. Ils se basent tout d'abord sur les travaux de Ryther et Dunstan (1971). Ceux-ci reconnaissent l'importance de la fixation d'azote atmosphérique à l'échelle planétaire, à l'échelle des écosystèmes, et à l'échelle des temps

[5] **Redfield** a montré que le plancton marin possède un rapport atomique C:N:P voisin de 106:16:1 (nommé **rapport de Redfield**), et que le rapport entre l'azote et le phosphore dissous dans l'eau est également proche de 16. Ce rapport donne la **stœchiométrie** du plancton et de l'eau de mer, c'est à dire les proportions quantitatives dans lesquels on y retrouve certains éléments chimiques.

géologiques. Par contre, à l'échelle locale et à court terme, ces travaux concluent que la fixation d'azote n'est pas assez efficace pour garantir la croissance optimale du phytoplancton en zone côtière. Cela est notamment du à de fortes pertes de l'azote fixé via la sédimentation et via une production d'azote gazeux par certains processus biologiques dans l'océan, qui viennent compenser la fixation d'azote des cyanobactéries. Les partisans de la limitation par l'azote se basent également sur des expériences d'enrichissement de cultures de phytoplancton avec de l'azote et/ou du phosphore. Ces expériences démontrent que la plupart du temps, c'est l'azote qui est limitant (Thomas, 1970a, b; Goldman *et al.*, 1979).

Les articles de synthèse sur la limitation par les deux nutriments concluent qu'il ne semble pas exister de réponse générale à la question de la limitation des organismes ou des écosystèmes en milieu côtier (Smith, 1984; Beardall *et al.*, 2001). À l'échelle d'un environnement donné, la réponse dépend de l'équilibre entre les sources (entrées) et les puits (pertes) de nutriments sur la zone considérée d'une part, et du rapport entre les processus biologiques de fixation et de pertes d'azote atmosphérique d'autre part. À l'échelle d'un organisme donné, la réponse dépend de son métabolisme[6], de ses besoins respectifs en phosphore et en azote, et des sources de nutriments qu'il est capable d'utiliser dans son environnement.

C'est à cette échelle des organismes que cette thèse a eu pour but d'étudier la limitation par les nutriments, en choisissant les coraux tropicaux comme modèles biologiques. Seuls les processus en lien avec le phosphore ont été étudiés directement. Néanmoins, comme nous le verrons au fur et à mesure des différents chapitres, les résultats obtenus ont permis d'apporter des réponses sur la limitation par les deux nutriments, phosphore et azote.

Carte d'identité du phosphore

Le phosphore, de symbole chimique P, est le 11ème élément le plus abondant de la croûte terrestre, le 13ème élément découvert, et le 15ème élément dans la classification périodique (figure 2). Le phosphore n'a qu'un seul isotope naturel, de masse atomique 31 (mais 25 isotopes radioactifs artificiels). À l'état pur, ou élémentaire, il se présente sous quatre formes cristallines de couleur blanche, rouge, noire ou violette. À l'état naturel, il se retrouve lié à d'autres éléments chimiques au sein de très nombreuses molécules. C'est un élément qui se lie difficilement au carbone et à plutôt tendance à établir des liaisons avec l'oxygène : le phosphore se trouve ainsi sous forme oxydée à l'état naturel.

La découverte de cet élément est attribuée à Hennig Brandt, un alchimiste allemand qui, à la recherche de la pierre philosophale[7], calcina en 1669 des sels issus de l'évaporation d'urine en présence de charbon. Il obtint un matériau blanc qui luisait

[6] Le **métabolisme** est l'ensemble des réactions biochimiques qui se produisent au sein d'une cellule ou d'un organisme vivant et qui permettent la réalisation de ses fonctions, au travers des processus de synthèse organique (anabolisme) et de dégradation (catabolisme).

[7] La **pierre philosophale** est une hypothétique substance à laquelle les alchimistes attribuaient trois vertus essentielles : permettre la transmutation des métaux vils (tels que le plomb ou le mercure) en métaux précieux (or ou argent), guérir les maladies, et assurer vie et jeunesse éternelles.

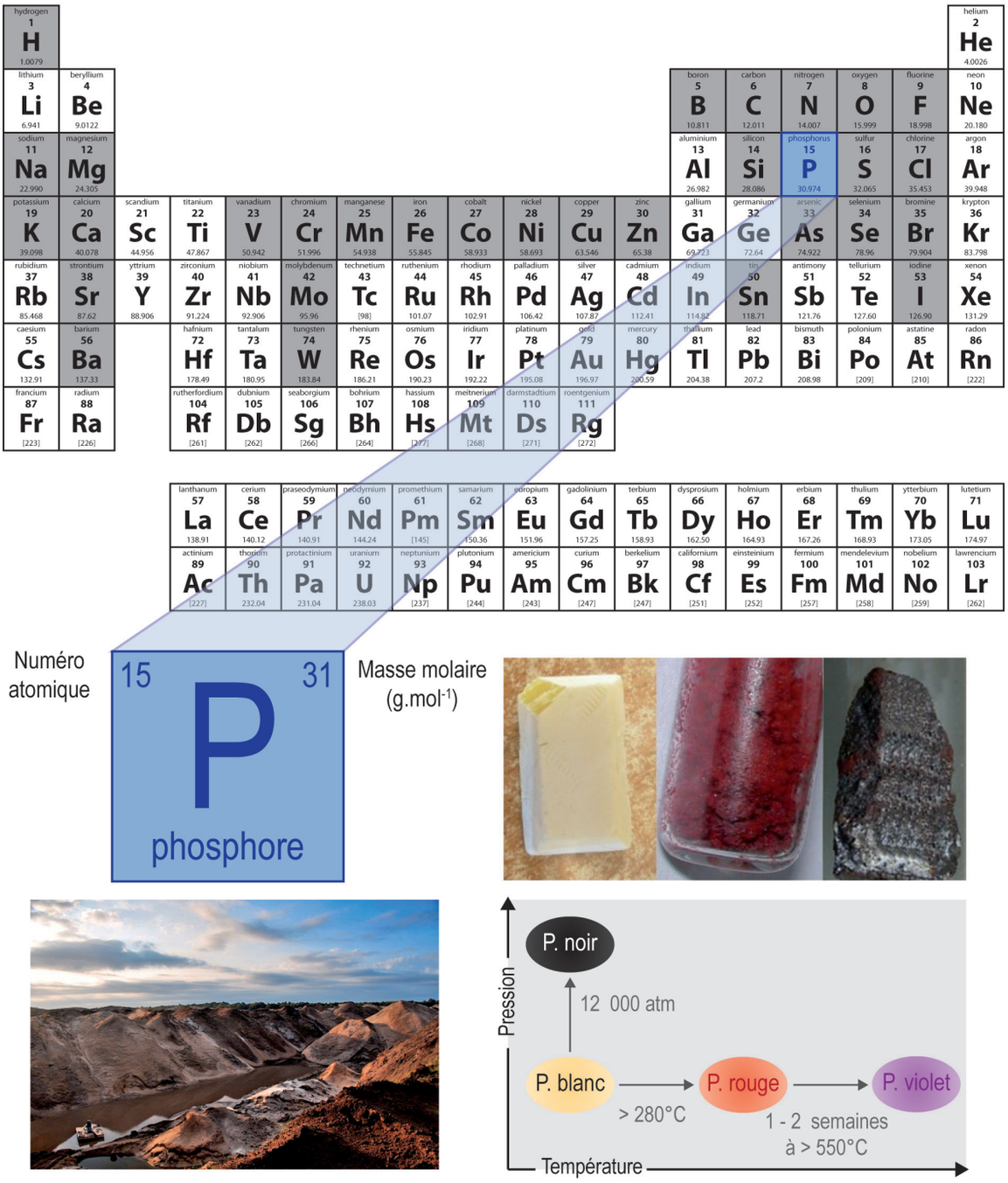


Figure 2 | Carte d'identité du phosphore élémentaire
Position dans le tableau périodique des éléments | Photographie d'une mine de phosphore au Maroc | Photographies des formes blanche, rouge et noire de phosphore élémentaire | Conditions de formation de ces diverses formes. Les 31 éléments en gris dans le tableau périodique sont ceux qui sont considérés comme indispensables pour les bactéries, les plantes et les animaux, le phosphore en faisant bien sûr partie (D'après Williams et Fraùsto da Silva, 1996). Photographies : C. F. Starmer et http://en.wikipedia.org/wiki/File:PhosphComby.jpg.

dans l'obscurité et s'enflammait spontanément dans l'air, en produisant une lumière éclatante : le phosphore élémentaire (figure 3). Ce phénomène a d'ailleurs valu son nom au phosphore, qui provient du grec *phosphoros* et signifie "porteur de lumière". Depuis sa découverte jusqu'à nos jours, le phosphore élémentaire connut alors une histoire trouble. Il fut activement recherché par les chimistes et alchimistes de la fin du 17ème siècle. Au 18ème siècle, il était prescrit par les apothicaires sous forme de "pilules lumineuses" réputées lutter contre la fièvre, la goutte et les rhumatismes, et censées remédier à l'impuissance. Au 19ème siècle, la toxicité des prétendus remèdes à base de phosphore élémentaire blanc fut prouvée et reconnue. Le phosphore élémentaire rouge, moins instable que le blanc, fut découvert et exploité, plutôt à des fins industrielles, notamment pour la fabrication d'allumettes, d'alliages métalliques et de dispositifs pyrotechniques. Durant les 20ème et 21ème siècles, de la première guerre mondiale aux combats de la bande de Gaza, le phosphore élémentaire blanc fut largement utilisé pour la production de munitions incendiaires. À la fin du 20ème siècle, une famille de composés, contenant du phosphore lié à un atome de carbone, fut découverte. Ces composés furent synthétisés pour la fabrication d'agents neurotoxiques comme le gaz sarin, et pour la synthèse de divers pesticides tels que le malathion et le glyphosate. Avec une production annuelle de 900 000[8,9] tonnes actuellement, le phosphore élémentaire, blanc ou rouge, reste également employé, par exemple pour la production de détergents, d'adoucisseurs d'eau, de dentifrices, de sodas, d'agents fertilisants…

Si l'histoire du phosphore élémentaire est associée à des nombreux homicides, empoisonnements et autres applications plus ou moins toxiques ou meurtrières, les formes de phosphore qui font l'objet de cette thèse sont en fait beaucoup moins pernicieuses. En effet, le phosphore élémentaire, ou pur, dont il était question dans l'historique qui précède, n'existe pas à l'état naturel, car il est trop réactif pour demeurer stable. En revanche, le phosphore rencontré naturellement, sous forme oxydée, est non seulement inoffensif en comparaison, mais il s'agit de surcroît d'un élément vital pour tous les organismes. Il est présent au sein de très nombreuses molécules, dont la nomenclature est complexe et prête malheureusement souvent à confusion. Avant de clore ce préambule, il convient de s'attarder un instant sur les termes "phosphore" et "phosphate", qui seront utilisés tout au long de cette thèse.

Chimistes, biologistes, géologues, océanographes…, mais aussi francophones et anglophones, ont tous leur vocabulaire de prédilection, et n'utilisent pas les termes "phosphore" et "phosphate" dans le même sens. Ainsi, selon le contexte, le terme "phosphore" peut s'appliquer au phosphore élémentaire, à un atome de phosphore au sein d'une molécule, ou à une molécule phosphorée en général. Quant au "phosphate", son cas est encore plus complexe,

[8] À titre de comparaison, le **phosphore naturel** extrait des roches phosphatées est utilisé à raison de 150 000 000 de tonnes par an.

[9] La **production du phosphore élémentaire** par l'homme implique de chauffer des composés phosphorés, à l'époque de l'urine ou des os d'animaux, aujourd'hui du minerai de phosphate, dans des conditions bien particulières et à une température dépassant les 1000°C.

Figure 3 | L'alchimiste, de Joseph Wright
Toile du peintre britannique Joseph Wright, datée de 1771 et intitulée "L'alchimiste, à la recherche de la pierre philosophale, découvre le phosphore, et prie pour le succès de son expérience, ainsi que le faisaient les anciens astrologues chimistes". Cette toile figure une allégorie de la découverte du phosphore élémentaire, un siècle auparavant, par l'alchimiste allemand Hennig Brandt.

car il désigne aussi bien des ions que des molécules phosphorées ou même des roches. Chimiquement parlant, les atomes de phosphore se trouvent dans les molécules naturelles au sein de groupements "phosphate"[10]. Le terme adéquat pour parler de toutes les formes naturelles de phosphore est donc "phosphates" en chimie organique. Mais dans le langage courant, le terme "phosphate" reste plutôt employé selon son sens en chimie inorganique, où il désigne les ions orthophosphate (de formule $H_{3-n}PO_4^{n-}$). En géologie, il peut également servir à désigner les "roches phosphatées", soit sous leur forme de minerai de phosphate, une roche sédimentaire concentrée en sels de phosphate, soit sous leurs formes biogènes, telles que le guano ou les os des Vertébrés. Les roches phosphatées n'ayant pas été étudiées durant cette thèse, le terme de "phosphate" ne sera pas employé dans ce sens dans le reste du manuscrit.

Afin de parler du phosphore de manière simple dans cette thèse, il a ainsi fallu faire des choix de nomenclature. Dans le reste du manuscrit, le terme "phosphore" sera utilisé dans le sens général pour désigner l'atome de phosphore contenu dans une molécule, et par extension toutes les molécules qui contiennent un atome de phosphore. Le terme "phosphate" sera quant à lui réservé aux ions orthophosphate[11]. Lorsque le propos concernera une molécule phosphorée bien particulière, cela sera spécifié de manière claire (par exemple, l'adénosine triphosphate, ou l'ion pyrophosphate). Dans le chapitre 1, la présentation des diverses molécules phosphorées que les coraux rencontrent dans les récifs sera l'occasion de s'attarder à nouveau sur ces questions de nomenclature.

Choix de présentation de cette thèse

Bien que les notes de bas de page soient généralement évitées ou réduites à leur plus simple expression, il a ici été délibérément choisi d'en faire un usage prononcé. Ce choix a été fait pour permettre une lecture aussi fluide que possible de la thèse, tout en s'attachant à préciser chaque terme ambigu ou technique dans les notes de bas de page, ne concédant ainsi qu'en apparence la précision à la concision.

Autre convention choisie pour cette thèse, les résultats personnels obtenus durant les travaux sont signalés par un trait vertical bleu ciel dans la marge gauche de chaque paragraphe concerné, afin d'en permettre une identification aisée. Les conclusions générales de la discussion sont quant à elles signalées par un trait bleu marine. Cette mise en valeur, appliquée au corps de texte principal uniquement (et non aux résumés et aux articles, ou la distinction entre littérature scientifique et résultats personnels est relativement évidente), a été choisie afin d'aider à l'évaluation des apports scientifiques de cette thèse.

Cela étant dit, la notion de limitation ayant été ébauchée, et le portrait du phosphore brossé, il est maintenant temps de mettre en lumière le cœur du sujet de cette thèse, les coraux, et leur relation au phosphore.

[10] Un **groupement phosphate** est formé d'un atome de phosphore lié à quatre atomes d'oxygène, eux même liés à des atomes d'hydrogène, de carbone ou de métaux tels que le sodium. Il est inorganique s'il est dépourvu de substituant carboné, et organique s'il contient du carbone. Dans ce dernier cas, on parle aussi de "**résidu phosphate**".

[11] Attention, en **anglais**, le terme "phosphates" est souvent préféré au terme "phosphorus" pour désigner les molécules phosphorées naturelles, bien que les deux termes restent largement employés.

Chapter 1

The issue of phosphorus within the coral symbiosis

Abstract

Coral reefs are bioconstructed structures that develop in shallow tropical waters. They are chiefly built by corals, which secrete a calcareous skeleton. These highly diversified ecosystems form real life oases among the blue oceans. Yet, due to their extreme sensitivity to environmental perturbations, they are becoming increasingly threatened by human activities. Corals are colonial animals belonging to the Cnidarian phylum. As all living beings, they can't synthesize the chemical elements crucial for their metabolism, and are thus forced to scavenge these elements from their environment. Phosphorus is one of the vital nutrients that corals need to retrieve from seawater. Indeed, it enters into the composition of many biological molecules, such as DNA and phospholipids. It also has a key energetic role within the ATP molecule. Corals partly fulfill their phosphorus needs with the planktonic preys caught with their stingy tentacles. However, these preys represent a rather low phosphorus concentration in reef waters (0.1 µmol L^{-1}). Owing to the presence of photosynthetic Dinoflagellates living in symbiosis within their tissues, corals are also able to use phosphorus dissolved in seawater (0.1 to 1.0 µmol L^{-1}). These microalgae, called zooxanthellae, take up this dissolved phosphorus, as well as the phosphorus contained in the metabolic waste products of the coral host, and recycle it into organic molecules. By in turn transferring most of their photosynthetic products to the host, zooxanthellae also provide corals with a source of carbon- and nitrogen-rich molecules. This optimal use of nutrients is one of the reasons why corals are able to flourish in nutrient-poor reef waters. Yet, phosphorus remains a limiting nutrient for photosynthesis and calcification. The general aim of this study was to assess the phosphorus needs of corals and the use of dissolved phosphorus by the symbiosis. The particular objectives developed were 1) to determine the conditions under which corals take up dissolved inorganic and organic phosphorus, 2) to establish the phosphorus composition of the coral host and its zooxanthellae, and 3) to determine the physiological parameters which take part in the fate of phosphorus within the symbiosis.

Chapitre 1

La problématique du phosphore au sein de la symbiose corallienne

Résumé

Les récifs coralliens sont des structures sous-marines bâties principalement par les coraux, qui sécrètent un squelette calcaire. Véritables oasis de vie dans l'océan, ces écosystèmes, très sensibles aux perturbations environnementales, sont à l'heure actuelle fortement menacés par les activités humaines. Les coraux sont des animaux coloniaux qui appartiennent à l'embranchement des Cnidaires. Comme tous les organismes vivants, ils sont incapables de synthétiser les éléments chimiques indispensables à leur métabolisme, et doivent les trouver dans leur environnement. Le phosphore fait partie de ces éléments vitaux que les coraux doivent puiser dans l'eau. Il rentre en effet dans la composition de nombreuses biomolécules telles que l'ADN et les phospholipides, et a un rôle énergétique crucial au sein de la molécule d'ATP. Les coraux trouvent ce phosphore en partie dans les proies planctoniques qu'ils capturent grâce à leurs tentacules urticants. Mais ces proies représentent une concentration de phosphore relativement faible en milieu récifal (0,1 µmol L^{-1}). La présence de Dinoflagellés photosynthétiques vivant en symbiose dans leurs tissus permet aux coraux d'utiliser également le phosphore dissous dans l'eau (0,1 à 1,0 µmol L^{-1}). Ces microalgues, nommées zooxanthelles, absorbent le phosphore dissous ainsi que le phosphore provenant des déchets du métabolisme de l'hôte corallien, et les recyclent en molécules organiques. Les zooxanthelles fournissent d'autre part des molécules carbonées et azotées à l'hôte, en lui transférant la majeure partie des produits de leur photosynthèse. C'est grâce à cette optimisation de l'utilisation des éléments nutritifs que les coraux sont capables de se développer dans des eaux pourtant pauvres en nutriments. Malgré cela, le phosphore reste un élément limitant pour la photosynthèse et la calcification des coraux. L'enjeu majeur de cette thèse a été d'évaluer les besoins en phosphore des coraux et l'utilisation des formes dissoutes de phosphore. Les objectifs précis ont été 1) d'examiner les conditions d'absorption du phosphore inorganique et organique dissous par les coraux, 2) d'établir la composition en phosphore de l'hôte et des zooxanthelles, et 3) de déterminer les paramètres physiologiques intervenant dans le devenir du phosphore absorbé.

Figure 4 | La Grand Barrière de corail, Australie
Photographie : B. Charlton.

1 Les récifs coralliens, un écosystème basé sur la symbiose corallienne

Les récifs coralliens

Les récifs coralliens sont des structures sous-marines bioconstruites, dont les bâtisseurs principaux sont les coraux Scléractiniaires symbiotiques. Ceux-ci sont caractérisés par l'association, ou symbiose, de petits animaux coloniaux sessiles, les polypes, possédant des tentacules comme les anémones de mer et les méduses, avec des microalgues unicellulaires, les zooxanthelles, situées à l'intérieur des polypes. Les polypes des coraux précipitent les ions calcium (Ca^{2+}) et bicarbonate (HCO_3^-) de l'eau de mer en carbonate de calcium ($CaCO_3$) pour fabriquer leur squelette calcaire, avec une production annuelle moyenne de 2 à 6 kg de $CaCO_3$ par m^2 de récif (Barnes et Devereux, 1984).

Morphologie

Selon leur forme et leur expansion, qui sont influencées par l'hydrodynamisme et l'éloignement de la terre ferme, on distingue trois grands types de récifs :

- les récifs frangeants, au contact des côtes, en eaux très peu profondes (ex. mer Rouge) ;
- les récifs barrières, larges bandes parallèles à la côte et séparées de la terre ferme par un lagon (ex. Australie, figure 4) ;
- les atolls, récifs plus ou moins circulaires pour lesquels l'île ayant servi d'appui au développement du récif a disparu par érosion ou par enfoncement sous la surface (ex. Maldives).

La morphologie des colonies coralliennes est elle aussi dépendante de l'hydrodynamisme : les lagons abrités voient plutôt des colonies finement branchues ou feuillues se développer, tandis que les eaux agitées du bord externe des récifs barrières et des atolls abritent plutôt des colonies à ramifications courtes et solides.

Distribution

Quelle que soit leur morphologie, les récifs coralliens s'épanouissent principalement dans les zones côtières des mers tropicales et subtropicales, à des latitudes de 30°N à 30°S (figure 5). Ils se développent princi-

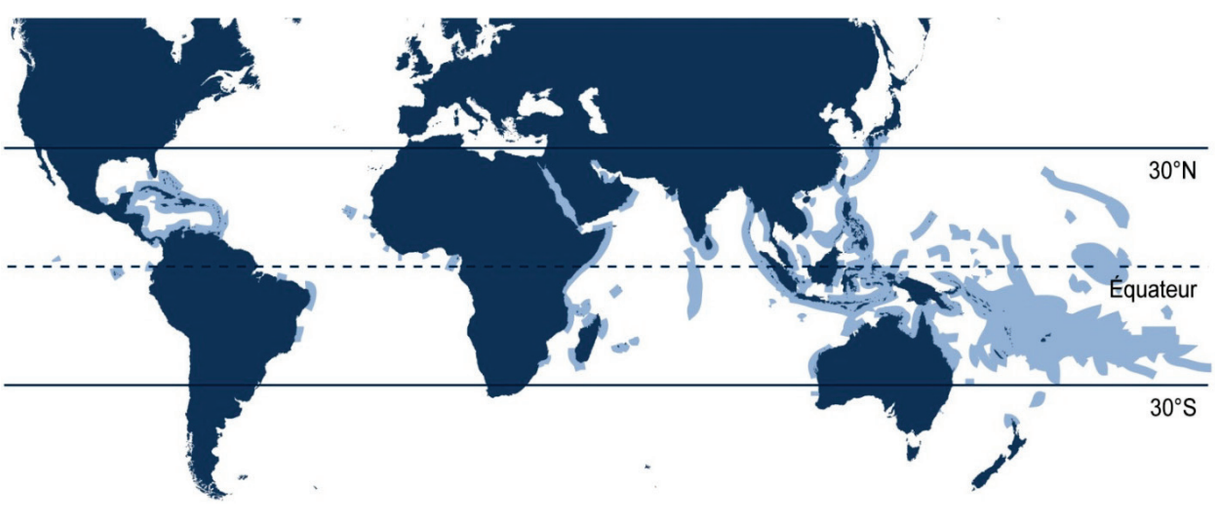


Figure 5 | Répartition mondiale des récifs coralliens
Les récifs sont indiqués en bleu ciel. Ils se situent principalement entre 30°N et 30°S de latitude.

palement entre la surface et une trentaine de mètres de profondeur, pour peu que la température soit comprise entre 18 et 30°C.

Les récifs coralliens ne recouvrent pas plus de 0,1% des fonds marins et seulement 10,8% des fonds côtiers (près de 284 800 km², soit une superficie proche de celle de la Nouvelle-Zélande). Ils abritent pourtant environ 30% des espèces marines connues à ce jour, dont près de 4 000 espèces de poissons par exemple (Spalding *et al.*, 2001). La plus imposante de ces formations, la Grande Barrière de corail (figure 4), s'étend sur près de 2 600 km de longueur au large de l'Australie.

Importance pour l'Homme

Les récifs coralliens présentent une importance sociale et économique majeure pour les plus de 100 pays dont ils bordent les côtes. Ils constituent notamment des zones de pêche privilégiées pour les populations locales. Ils permettent ainsi la survie directe de plus de 30 millions de personnes, en particulier dans les pays en voie de développement (Wilkinson, 2008).

Mais ce chiffre passe à près de 500 millions de personnes si l'on inclut leur rôle dans la protection des côtes contre l'érosion des vagues et contre l'impact des tempêtes et tsunamis, les nombreux emplois liés au tourisme qu'ils procurent, ainsi que la source de biomolécules destinées à l'industrie pharmaceutique qu'ils représentent (Wilkinson, 2008).

Un écosystème en péril

En dépit des services rendus à l'Homme, l'écosystème corallien reste l'un des plus menacés de la planète à l'heure actuelle, car il est particulièrement dépendant de la qualité de son environnement : éclairement, turbidité, salinité, concentration en éléments nutritifs, chimie de l'eau, température…, sont autant d'éléments auxquels les coraux sont sensibles. Cela les rend particulièrement susceptibles aux perturbations environnementales chroniques. Celles-ci sont tout d'abord liées aux activités anthropiques locales, telles que les pollutions agricoles et urbaines qui changent la qualité de l'eau, la surpêche, la pêche non sélective et destructrice, l'utilisation du sable corallien et des squelettes de coraux comme matériaux de construction, ainsi que la dégradation des récifs par les mouillages sauvages et les plongeurs. 19% des récifs ont ainsi été irrémédiablement détruits au cours des dernières décennies, et on estime que 35% des récifs sont actuellement menacés par les activités anthropiques, notamment dans les Caraïbes et en Asie du Sud-Est (Wilkinson, 2008).

Les récifs coralliens sont également menacés par les changements climatiques globaux, et notamment par les rejets dans l'atmosphère de gaz à effet de serre tel que le dioxyde de carbone (CO_2). L'augmentation de la concentration en CO_2 dans l'atmosphère entraîne à la fois une acidification des océans et une élévation de leur température en surface. Au cours du 20ème siècle, le pH des océans a ainsi diminué de 0,1 unité (de 8,2 à 8,1), et devrait encore diminuer de 0,3 à 0,5 unités d'ici la fin du siècle (Orr *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2007). Durant les 40 dernières années, la température des eaux de surface s'est quant à elle élevée de 0,4 à 1,0°C en moyenne, avec une hausse de 0,5°C en zone récifale (Solomon *et al.*, 2007; Kleypas *et al.*, 2008; Wilkinson, 2008).

Or l'acidification menace directement la structure même des récifs coralliens, puisqu'elle rend moins favorable les conditions de précipitation de nouveaux squelettes carbonatés par les organismes calcificateurs, et favorise la dissolution chimique des carbonates existants (Feely *et al.*, 2004; Kleypas *et al.*, 2006). Les coraux et leur squelette calcaire sont ainsi particulièrement menacés par l'acidification des océans (Kleypas *et al.*, 1999; Marubini et Atkinson, 1999; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007; Guinotte et Fabry, 2008).

Quant à l'augmentation de la température des eaux de surface, elle représente également une menace pour les coraux, car ils s'épanouissent généralement dans des eaux dont la température est déjà proche de leur limite thermique maximale. Cela les rend très vulnérables aux hausses rapides de la température (Hoegh-Guldberg, 1999; Kleypas *et al.*, 2001; Coles et Brown, 2003).

Enfin, les changements climatiques risquent également d'affecter d'autres paramètres clés pour l'écosystème corallien, comme le niveau marin, la circulation océanique globale, la fréquence des tsunamis, ouragans et cyclones, la salinité de l'eau, les niveaux de rayonnements ultraviolets, etc.

Toutes les menaces listées précédemment mettent fortement en péril la survie de l'écosystème corallien à l'heure actuelle. Cela justifie l'intérêt scientifique croissant porté aux effets du changement global sur les récifs coralliens au cours des deux dernières décennies. L'une des expériences de cette thèse a ainsi été consacrée à cette problématique (chapitre 2).

Les polypes coralliens

Taxonomie

Si le terme de "corail" évoque indubitablement les coraux tropicaux constructeurs de récif, il désigne en fait un ensemble bien plus vaste d'organismes marins coloniaux appartenant tous à l'embranchement des Cnidaires, mais à des clades[12] très différents. La figure 6 présente une phylogénie simplifiée de cet embranchement, apparu très tôt à l'échelle géologique (des fossiles ont été datés de l'ère Précambrienne, -700 millions d'années) et qui comporte à l'heure actuelle près de 11 000 espèces. Comme illustré sur cette figure, outre les coraux constructeurs de récifs (Scléractiniaires), le terme de "corail" regroupe le corail de feu (*Millepora*, un Hydrozoaire), les coraux mous et le corail rouge des bijoutiers (Octocoralliaires), le corail noir (Anthipataire)… Cela étant dit, dans la suite de cette thèse, le mot "corail" sera utilisé, sauf mention contraire, dans le sens restrictif de corail Scléractiniaire (qui sécrète un squelette calcaire).

Quelques caractéristiques de chaque niveau taxonomique de l'embranchement des Cnidaires sont exposées dans le tableau 1, en ne retenant dès à présent que les clades permettant d'aboutir au corail *Stylophora pistillata* (Esper, 1797), le modèle d'étude principalement utilisé pour cette thèse. Les particularités de cette espèce, ainsi que des autres espèces utilisées, seront détaillées par la suite (page 46).

[12] Un **clade** est un groupe monophylétique d'organismes comprenant un organisme ancêtre et l'ensemble de ses descendants. C'est l'unité de base de la classification phylogénétique.

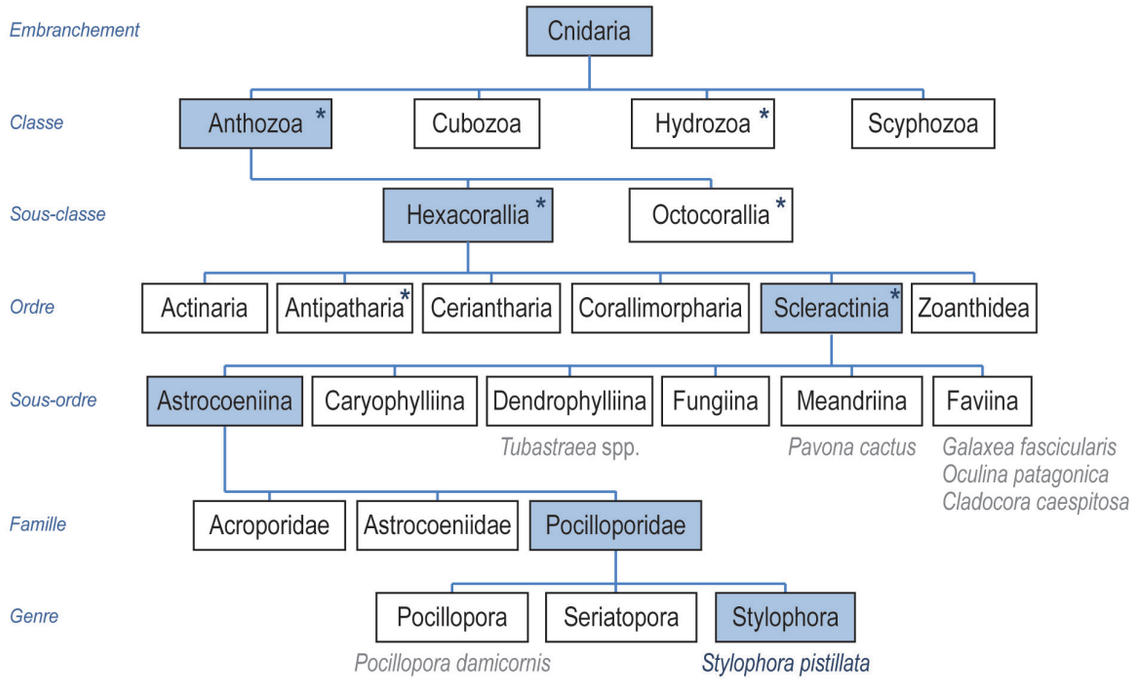


Figure 6 | Phylogénie simplifiée des Cnidaires
La position taxonomique de l'espèce étudiée, *Stylophora pistillata*, est précisée en bleu sur l'arbre. Les 6 espèces indiquées en gris ont également été étudiées durant cette thèse. Les classes, sous-classes et ordres notés d'une étoile * contiennent des coraux (au sens large). D'après Veron et Stafford-Smith (2000), Daly *et al*. (2007), et http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy.

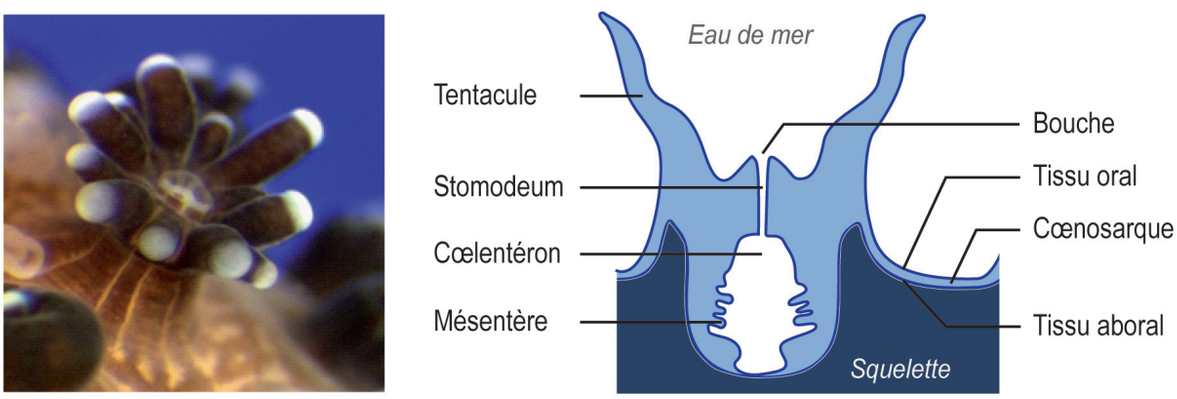


Figure 7 | Polype de *Stylophora pistillata*
Photographie et représentation schématique en coupe d'un polype de *Stylophora pistillata*. Photographie : É. Tambutté.

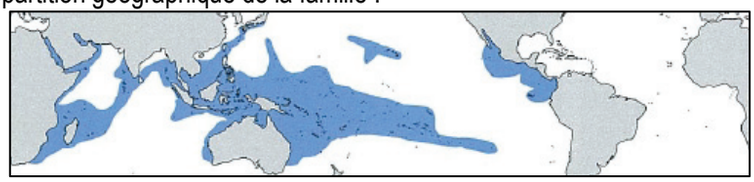
Position taxonomique	Caractéristiques générales des principaux niveaux taxonomiques
Embranchement *Cnidaria*	Métazoaires diploblastiques à symétrie radiaire Absence de véritables organes Présence de cellules urticantes : les cnidocytes Alternance de deux morphotypes au cours du cycle biologique : forme sessile (dite polype) et forme mobile (dite méduse)
Classe *Anthozoa*	Absence de phase méduse Organismes exclusivement marins, solitaires ou coloniaux Présence d'une symétrie secondaire (d'ordre 6 ou 8)
Sous-classe *Hexacorallia*	Présence d'une symétrie secondaire d'ordre 6 (ou d'un multiple de 6) : 6 (ou n x 6) tentacules et cloisons mésentériques divisant la cavité gastrique (cœlentéron)
Ordre *Scleractinia*	Sécrétion d'un squelette calcaire à base d'aragonite (*sklêros* = dur en grec) Ordre divisé en deux groupes fonctionnels, qui distinguent les coraux constructeurs de récifs (hermatypiques) des non constructeurs de récifs (ahermatypiques)
Famille *Pocilloporidae*	Organismes coloniaux, dont les polypes sont reliés entre eux par un tissu : le cœnosarque Organismes pour la plupart zooxanthellés Colonies submassives ou branchues Répartition géographique de la famille : 
Genre *Stylophora*	Existence de 7 espèces de *Stylophora*, dont *S. pistillata* Branches courtes et rarement fusionnées Répartition géographique du genre :

Tableau 1 | Détails sur la position taxonomique de *Stylophora pistillata*
Les caractéristiques majeures de la classification de l'espèce modèle *Stylophora pistillata* sont précisées dans ce tableau. Les cartes de répartition géographiques sont tirées de Veron et Stafford-Smith (2000).

Anatomie et histologie

Les coraux sont des organismes majoritairement coloniaux. Chaque colonie est formée d'une multitude de polypes (figure 7).

Chaque polype présente un seul orifice, la bouche, qui assure les fonctions de nutrition et d'excrétion. Cette bouche est entou-

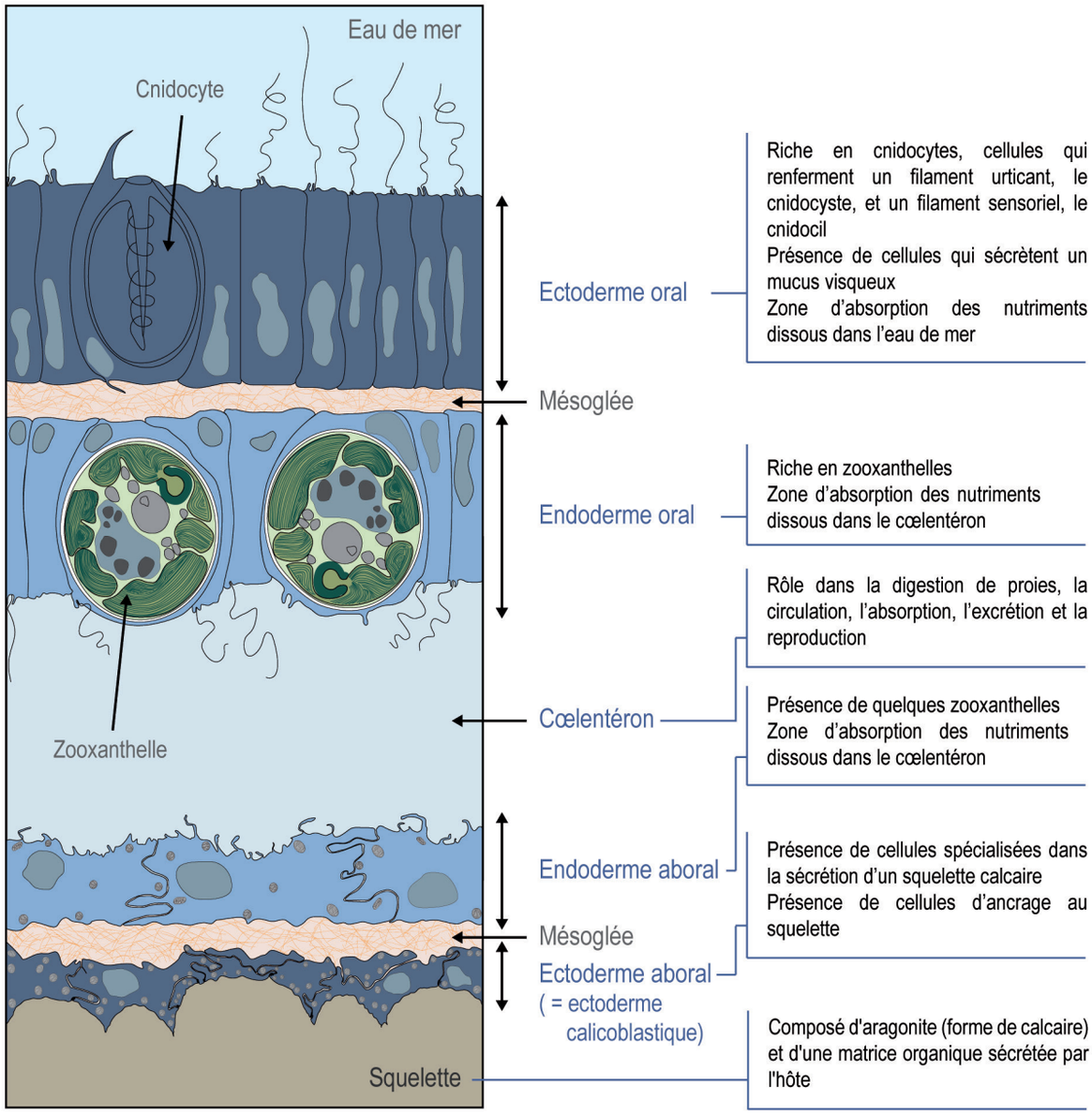


Figure 8 | Représentation schématique en coupe transversale de tissus coralliens
La coupe représente la zone du cœnosarque. Les principales caractéristiques de chaque couche cellulaire, de la cavité cœlentérique et du squelette sont détaillées sur la droite du schéma. Modifié d'après É. Tambutté.

rée d'une ou plusieurs couronnes de n x 6 tentacules tactiles, extensibles et préhensiles, qui permettent à l'animal d'attraper ses proies et ont également un rôle défensif. À l'intérieur du polype, la bouche se prolonge par un court canal œsophagien, le stomodeum, qui s'ouvre sur la cavité gastrovasculaire, ou cœlentéron. Le cœlentéron présente des replis nommés mésentères et se prolonge jusque dans les tentacules.

Chaque polype est délimité par deux tissus : un tissu oral en contact avec l'eau de mer, et un tissu aboral en contact avec le squelette. Chacun de ces tissus est lui-même constitué de deux couches cellulaires, l'ectoderme (également nommé épiderme) et l'endoderme (également nommé gastroderme), qui sont séparées par un troisième tissu acellulaire nommé mésoglée. Les polypes sont ainsi formés de quatre

couches cellulaires distinctes, dont la disposition et les caractéristiques majeures sont présentées sur la figure 8.

Ces quatre couches cellulaires, ainsi que le cœlentéron, se prolongent entre les polypes et constituent un tissu de connexion appelé cœnosarque. Ce tissu relie les polypes et permet le transport des éléments nutritifs d'un bout à l'autre de la colonie (figure 7).

Les zooxanthelles, symbiotes coralliens

Comme évoqué dans le début de ce chapitre, de très nombreux coraux constructeurs de récifs établissent une association symbiotique avec des microalgues unicellulaires photosynthétiques, communément appelés zooxanthelles.

Définition de la symbiose

Au cours de ses travaux sur les lichens, le botaniste allemand Anton De Barry définit en 1866 une symbiose comme "*une association entre deux types d'organismes vivants qui persiste pour une longue période*" (DeBary, 1866). Depuis cette première reconnaissance de l'existence d'associations symbiotiques entre espèces différentes, de très nombreuses études ont démontré que la symbiose est un phénomène universellement répandu au travers des règnes biologiques. Les deux partenaires de la symbiose sont appelés l'hôte (le plus gros des deux) et le symbiote (le plus petit des deux). L'association des deux est nommée holobionte.

Il existe différentes classifications des symbioses, notamment selon la localisation du symbiote par rapport à l'hôte et selon la nature des interactions existant entre eux, comme le présente le tableau 2.

Type	Définition
Distinction selon la localisation	
Ectosymbiose	Symbiote localisé hors des tissus de l'hôte *Ex. : anémones poussant sur le dos de certains crabes*
Endosymbiose extracellulaire	Symbiote localisé dans les tissus de l'hôte, entre les cellules *Ex. : zooxanthelles des bénitiers*
Endosymbiose intracellulaire	Symbiote localisé dans les cellules de l'hôte *Ex. : zooxanthelles des coraux*
Distinction selon la nature des interactions	
Parasitisme	Association qui ne bénéficie qu'à une seule des deux espèces, l'autre étant lésée *Ex. : vers parasites du système digestif comme le ténia*
Commensalisme	Association qui ne bénéficie qu'à une seule des deux espèces, sans que l'autre ne soit lésée *Ex. : poisson-pilote des requins*
Mutualisme	Association profitant aux deux partenaires *Ex. : zooxanthelles des coraux, poisson-clown et anémone de mer*

Tableau 2 | Classification des symbioses
Une définition succincte est donnée pour deux des classifications des types de symbioses. Un exemple est donné en bleu pour chaque type de symbiose. D'autres classifications des symbioses existent, par exemple selon les capacités métaboliques acquises par l'association, ou selon le caractère obligatoire ou facultatif de l'association. Dans le cas des zooxanthelles et des coraux, il s'agit d'une endosymbiose intracellulaire mutualiste photosynthétique, obligatoire pour l'hôte et facultative pour les symbiotes.

L'association symbiotique entre les coraux (hôtes) et les zooxanthelles (symbiotes, ou zooxanthelles *in vivo*) est décrite comme une endosymbiose intracellulaire, car les zooxanthelles sont localisées à l'intérieur des cellules de l'endoderme corallien (Muscatine et Porter, 1977). De plus, cette

symbiose est décrite comme mutualiste, car les deux partenaires tirent des bénéfices de l'association (développés en page 44). Cette symbiose est considérée comme obligatoire à la survie du partenaire animal, qui périt généralement suite à la perte de ses symbiotes (on parle de blanchissement, voir page 44). En revanche, la vie en symbiose est facultative pour les zooxanthelles, qui vivent également à l'état libre comme composants du phytoplancton dans les océans.

La notion de symbiose corallienne introduit une ambiguïté supplémentaire sur le terme de "corail", qui peut en fait désigner aussi bien l'hôte au sens strict (les polypes) que l'holobionte dans le cas des coraux symbiotiques. Dans la suite de cette thèse, le mot "corail" sera utilisé aussi bien dans un sens que dans l'autre dès qu'aucune confusion se sera possible. Si l'ambiguïté demeure, le terme adéquat sera précisé.

Taxonomie

Tout comme le terme de "corail", le terme "zooxanthelle" pose également problème. Malgré son usage courant dans la littérature scientifique, ce terme n'a en fait aucune valeur taxonomique. Du point de vue de la classification, les zooxanthelles associées aux coraux Scléractiniaires sont des Dinoflagellés symbiotiques qui appartiennent au règne des Alvéolés (dont une phylogénie simplifiée est présentée sur la figure 9). Les caractéristiques des principaux niveaux taxonomiques de ce règne sont exposées très succinctement dans le tableau 3, en ne retenant que les clades permettant d'aboutir au genre *Symbiodinium* associé aux coraux. Le terme de "zooxanthelle" sera néanmoins employé tout au long de cette thèse pour plus de simplicité, de même que les termes de "symbiote" et d'"algue symbiotique".

Les différents clades

Jusque dans les années 1980, toutes les zooxanthelles du genre *Symbiodinium* étaient assimilées à une seule et même espèce, *S. microadriaticum* Freudenthal, 1962, initialement décrite en symbiose chez la méduse tropicale *Cassiopea xamachana*. Par la suite, des techniques de génétique moléculaire ont subdivisé cette espèce en au moins 8 clades distincts, allant du clade A au clade H (Rowan et Powers, 1991; Wilcox, 1998; Santos *et al.*, 2002). Certains de ces clades ont eux-mêmes été subdivisés en sous-clades (D1, D2 par ex.).

Les clades majoritairement associés aux Cnidaires sont les clades A, C et D (Coffroth et Santos, 2005), les autres clades s'associant avec des Foraminifères et d'autres Cnidaires. Chez les coraux, une même espèce peut s'associer à des clades différents selon les conditions environnementales, voire abriter plusieurs sous-clades en même temps. Bien qu'une grande spécificité semble généralement exister entre hôte et clade majoritairement hébergé, les mécanismes impliqués dans cette fidélité sont encore largement incompris (LaJeunesse *et al.*, 2003; LaJeunesse *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Coffroth et Santos, 2005).

L'une des expériences de cette thèse a visé à déterminer si le clade des zooxanthelles hébergé avait une influence sur l'une des voies d'absorption du phosphore (chapitre 3).

Caractéristiques des zooxanthelles

Les zooxanthelles en symbiose sont des cellules de forme sphérique d'environ 8 à

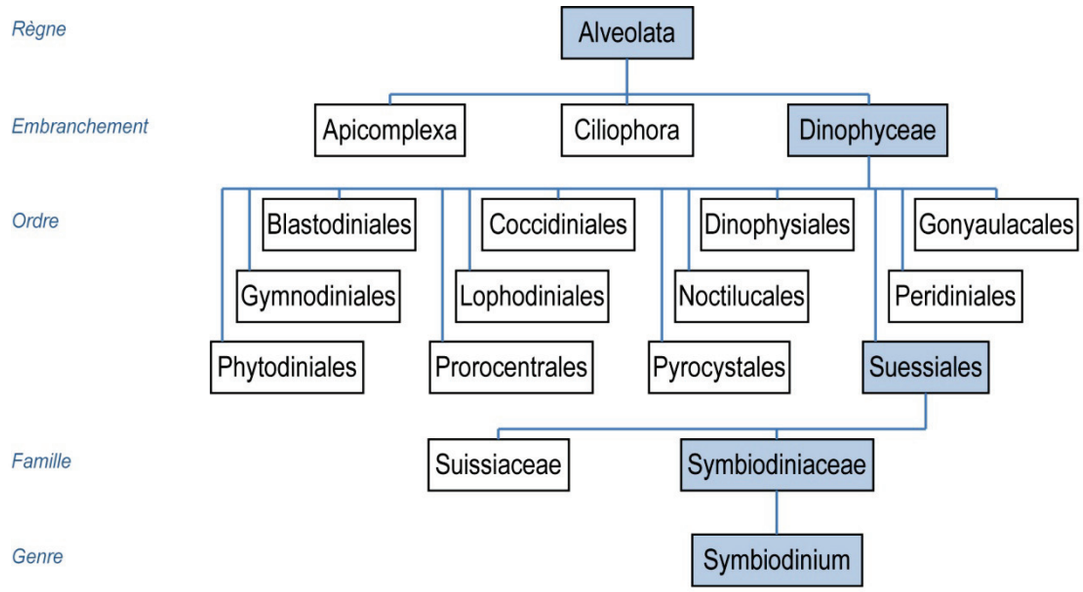


Figure 9 | Phylogénie simplifiée des Alvéolés
La position taxonomique des Dinoflagellés du genre *Symbiodinium* est précisée en bleu sur l'arbre. D'après Lecointre et Le Guyader (2001), et http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy.

Position taxonomique	Caractéristiques générales des principaux niveaux taxonomiques
Règne *Alveolata*	Organismes unicellulaires Présence de vésicules sous-membranaires : les alvéoles
Embranchement *Dinophyceae*	Micro-organismes aquatiques, libres ou symbiotiques de nombreux invertébrés La moitié est photosynthétique, l'autre moitié est hétérotrophe ou mixotrophe Mobiles à l'état libre grâce à la présence de deux flagelles, absence de flagelles en symbiose Présence de cellulose dans les alvéoles, qui forment une enveloppe externe : la thèque
Ordre *Suessiales* **Famille** *Symbiodiniaceae* **Genre** *Symbiodinium*	Existence d'au moins 8 clades au sein du genre *Symbiodinium*

Tableau 3 | Détails sur la position taxonomique des zooxanthelles
Les caractéristiques majeures de la classification du genre *Symbiodinium* sont précisées dans ce tableau.

12 µm de diamètre (figure 10). Elles sont localisées dans le cytoplasme des cellules de l'endoderme (figure 8), dont elles sont isolées au sein d'une vacuole d'origine animale, dite vacuole périsymbiotique (Wakefield et Kempf, 2001), et avec laquelle elles forment le "symbiosome" (Roth *et al.*, 1988). Au sein de cette vacuole, on peut observer jusqu'à six zooxanthelles par cellule endodermale chez

S. pistillata, avec une densité moyenne de 1 à 10 millions de symbiotes par cm² (Muscatine *et al.*, 1998). Les symbiotes peuvent être acquis par l'hôte par transmission directe du parent vers l'embryon (on parle de transmission verticale), ainsi que par endocytose de symbiotes libres dans l'eau de mer (on parle de transmission horizontale) (Trench, 1987). La densité des zooxanthelles et leur répartition dans les tissus à l'échelle de la colonie dépendent de la physiologie du corail et des conditions environnementales.

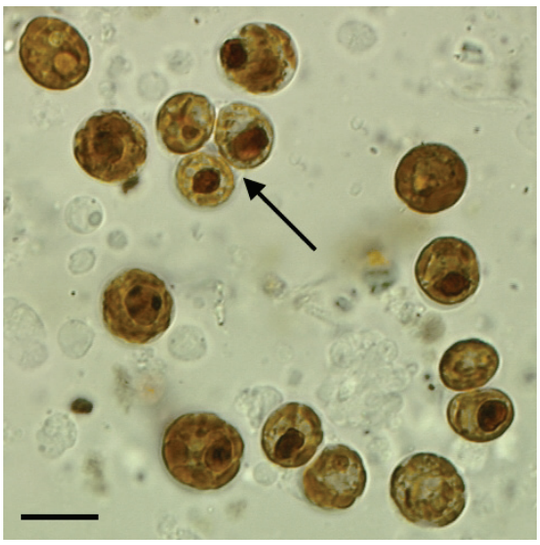


Figure 10 | Photographie de zooxanthelles
Zooxanthelles (en brun) isolées de l'hôte *S. pistillata*, observées au microscope optique. Barre d'échelle : 10 µm. Flèche : symbiosome contenant trois zooxanthelles au sein d'une même cellule animale.

Physiologie de la symbiose

La symbiose entre coraux et zooxanthelles se caractérise principalement par la sécrétion d'un squelette calcaire par les polypes, la photosynthèse des symbiotes et la diversité des sources nutritives qu'utilisent les coraux. Ces caractéristiques sont brièvement présentées dans les paragraphes qui suivent.

La sécrétion d'un squelette calcaire

Comme évoqué au début de ce chapitre, les polypes des coraux Scléractiniaires réalisent la calcification. On parle également de minéralisation biologiquement contrôlée, car il s'agit en fait d'un processus biologique, par lequel les coraux transforment les ions Ca^{2+} et HCO_3^- de l'eau de mer en un squelette extracellulaire hautement organisé à base d'aragonite, une forme de calcaire. En plus de cette fraction minérale, les coraux déposent également une trame organique dans leur squelette, dénommée matrice organique. Cette matrice organique serait constituée principalement de protéines riches en acides aminés acides et pouvant être glycosylées ou sulfatées, de sucres sulfatés, et de phospholipides (Cuif *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2003; Puverel *et al.*, 2005; Tambutté *et al.*, 2007) ; mais relativement peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur cette fraction organique difficile à étudier.

La photosynthèse

Les zooxanthelles contiennent des pigments comme les chlorophylles *a* et *c2* et les caroténoïdes qui sont responsables de leur couleur brune, et grâce auxquels elles réalisent la photosynthèse. Comme tous les organismes autotrophes photosynthétiques, elles fabriquent ainsi des composés carbonés complexes (nommés photosynthétats) à partir d'eau et de CO_2, sous l'action énergétique de la lumière.

Des modes de nutrition variés

Les coraux sont considérés comme des organismes mixotrophes (Houlbrèque et Ferrier-Pagès, 2009), car ils peuvent utiliser des sources de carbone et de nutriments aussi bien organiques (hétérotrophie de

l'hôte) qu'inorganiques (autotrophie des symbiotes).

Pour sa nutrition hétérotrophe, le corail utilise notamment les bactéries, les protozoaires, le phytoplancton et le zooplancton qu'il trouve dans l'eau de mer. Pour capturer ces proies, il dispose dans ses tentacules et au bord de sa bouche d'un grand nombre de cellules urticantes, les cnidocytes, qui peuvent paralyser certaines proies avant que les tentacules ne les portent vers la bouche (Sorokin, 1990). La capture est optimisée par le mucus visqueux sécrété par l'ectoderme oral et par la présence de nombreux cils sur les parois des polypes. Les proies ingérées sont digérées dans le cœlentéron, de même que le mucus ingéré avec les proies. Or le mucus est colonisé par une microflore bactérienne abondante, ce qui constitue donc une source supplémentaire de nourriture pour le corail (Sorokin, 1990). Dans certains cas, des filaments issus du mésentère, nommés filaments mésentériques, peuvent être éjectés pour permettre une digestion externe des proies planctoniques (Lang, 1973; Walter M, 2002; Wijgerde *et al.*, 2011). Enfin, les coraux sont également capables d'assimiler en partie la matière organique dissoute (Grover *et al.*, 2008), ainsi que la matière organique particulaire détritique en suspension (Anthony, 1999).

Pour leur nutrition autotrophe, outre le CO_2, les zooxanthelles absorbent également activement les nutriments dissous dans l'eau de mer, qu'elles transforment ensuite en molécules organiques complexes (Pomeroy et Kuenzler, 1967; Muscatine, 1980). Cette absorption ne se fait néanmoins pas directement depuis l'eau de mer, mais via les tissus de l'hôte au travers desquels les nutriments transitent avant d'être utilisés par les zooxanthelles.

Une grande partie des photosynthétats produits par les symbiotes est transférée à l'hôte, qui l'utilise pour ses propres besoins métaboliques (Muscatine et Porter, 1977). Les symbiotes peuvent par exemple couvrir jusqu'à près de la totalité des besoins énergétiques de l'hôte chez *S. pistillata* (Muscatine *et al.*, 1984). Néanmoins, les photosynthétats transférés sont relativement pauvres en éléments essentiels (Muscatine, 1967; Battey et Patton, 1987), et notamment en phosphore, que les zooxanthelles ont plutôt tendance à conserver. Les photosynthétats contiennent en fait surtout du carbone, comme dans le glycérol, une molécule qui représente jusqu'à 40% des molécules transférées (Muscatine, 1967). Il sert majoritairement à la respiration de l'hôte et est peu incorporé dans les biomolécules produites par le corail (Davies, 1984; Falkowski *et al.*, 1984). Le transfert des photosynthétats peut également se faire sous la forme de lipides qui s'accumulent dans les réserves animales ou servent à la sécrétion du mucus, d'acides aminés essentiels pour l'hôte (qui ont la particularité de contenir de l'azote en plus du carbone), ainsi que de précurseurs de la matrice organique du squelette (Muscatine et Cernichiari, 1969; Muscatine *et al.*, 1984; Douglas *et al.*, 1993; Swanson et Hoegh-Guldberg, 1998; Cuif *et al.*, 1999).

C'est grâce à cette capacité à utiliser des sources nutritives très diversifiées, aussi bien particulaires que dissoutes, organiques qu'inorganiques, que les coraux sont capables de vivre dans des eaux relativement pauvres en éléments nutritifs. Les deux modes de nutrition hétérotrophe et auto-

trophe sont étroitement liés dans la symbiose, chacun des partenaires étant capable d'utiliser certains des éléments nutritifs obtenus par ces deux voies (Anthony et Fabricius, 2000). Certaines expériences de cette thèse se sont attachées à l'étude du rôle régulateur de l'hétérotrophie de l'hôte sur l'absorption autotrophe de phosphore dissous (chapitres 2 et 3).

Bénéfices, coûts et rupture de la symbiose

Bénéfices mutuels de la symbiose

Comme évoqué précédemment, l'hôte et les zooxanthelles tirent tous deux parti de leur association mutualiste. Pour l'hôte, la présence de symbiotes réalisant la photosynthèse au sein de ses tissus lui confère une nouvelle capacité métabolique ainsi qu'une source abondante de photosynthétats. Ces bénéfices se traduisent par une amélioration de la respiration métabolique, de la mise en réserve, de la reproduction, et de la croissance cellulaire et squelettique (Muscatine et Cernichiari, 1969; Trench, 1971; Crossland, 1980; Shick, 1990).

Comparés à des Dinoflagellés libres, les symbiotes, quant à eux, se trouvent relativement à l'abri du broutage au sein de l'hôte, et bénéficient d'un environnement à la composition stable, le cytoplasme animal. Ils profitent également du CO_2 issu de la respiration cellulaire de l'hôte, ainsi que de ses déchets métaboliques, qui contiennent de l'azote et du phosphore, qu'ils recyclent via leur photosynthèse (Cook, 1983; Smith et Douglas, 1987).

La symbiose entre les zooxanthelles et les coraux présente donc des avantages à la fois pour l'algue et l'animal, et constitue un "avantage évolutif" indéniable grâce à l'acquisition de nouvelles capacités métaboliques par l'association symbiotique (Muller-Parker et D'Elia, 1997). L'algue a trouvé un refuge protecteur et riche en nourriture dans le tissu animal, tandis que le corail bénéficie d'une véritable usine de fabrication de composés organiques et d'oxygène, ainsi que d'une station d'épuration de ses déchets métaboliques.

Un partenariat qui a un coût

Malgré ces bénéfices mutuels, la symbiose induit également des coûts pour les deux partenaires. L'hôte se retrouve confronté à une hyperoxie générée par la photosynthèse et doit se protéger des fortes radiations lumineuses nécessaires à ses symbiotes (Dykens *et al.*, 1992; Muller-Parker et D'Elia, 1997; Richier *et al.*, 2005).

Les zooxanthelles *in vivo* doivent quant à elles céder la majeure partie de leurs photosynthétats à leur hôte. Cela représente une perte qui dépasse largement les 5% de photosynthétats généralement perdus dans le milieu par les microalgues marines non symbiotiques (Battey, 1992). Les zooxanthelles sont aussi vraisemblablement confrontées au système immunitaire inné de l'hôte (Baghdasarian et Muscatine, 2000). En outre, elles encourent le risque de se retrouver limitées dans leurs apports en CO_2 et en nutriments, car ces flux sont largement contrôlés par l'hôte (Rees, 1991; Muller-Parker et D'Elia, 1997).

La rupture de la symbiose

Les conditions environnementales sont primordiales pour déterminer le ratio entre les bénéfices et les coûts de l'association symbiotique. Lorsque la température, la quantité et la qualité de la lumière, ou la qualité de l'eau changent, la symbiose peut être rompue (Brown *et al.*, 1994; Shick *et*

al., 1996; Hoegh-Guldberg, 1999, 2008). La rupture se traduit par la perte des symbiotes et/ou par la dégradation de leurs pigments photosynthétiques, deux processus qui aboutissent à un phénomène de blanchissement des coraux, qui peut à terme mettre en péril la survie des colonies coralliennes blanchies (Kinzie *et al.*, 1984; Glynn, 1993). Deux expériences de cette thèse ont visé à étudier l'influence de la présence ou de l'absence des symbiotes sur l'une des voies d'absorption du phosphore (chapitre 3), ainsi que sur la composition en phosphore de la symbiose (chapitre 4) en comparant des coraux "normaux" à des coraux blanchis.

À l'échelle planétaire, les menaces environnementales liées aux perturbations anthropiques évoquées en page 34 tendent à exposer les coraux à des épisodes de blanchissement dont l'intensité et l'extension géographique sont de plus en plus élevées (Donner et Potere, 2007; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007). Certains modèles prédisent même un arrêt de la calcification des coraux d'ici à 2070 si les températures de surface en zones récifales continuent à croître au même rythme (Cantin *et al.*, 2010).

Modèles biologiques

Les coraux durs comme modèles d'étude

Ces menaces ont changé l'optique de nombreux programmes de recherche sur les récifs coralliens, dont la composante appliquée à leur préservation s'est trouvée renforcée au cours des dernières années (Richmond et Wolanski, 2011). L'étude du maintien des populations de coraux Scléractiniaires est particulièrement importante car, comme évoqué au début de ce chapitre, ils forment la structure physique de l'écosystème récifal, et bâtissent ainsi l'habitat de nombreuses espèces (Connell, 1978). Ils constituent donc un modèle d'étude privilégié pour la survie de l'écosystème corallien. De plus, leur croissance lente implique que la période durant laquelle ils sont sensibles aux variations environnementales est particulièrement longue (van Moorsel, 1988). Les coraux durs sont à ce titre utilisés par les paléoclimatologues en tant qu'archives environnementales, car ils intègrent dans leur squelette des éléments présents dans l'eau au fur et à mesure de leur calcification (Goreau, 1977; Barnes et Lough, 1996; Lough *et al.*, 1996; Swart *et al.*, 1999). Les coraux durs constituent également un modèle d'étude comparatif intéressant pour la biominéralisation des os, et sont déjà utilisés en tant que bioimplants en chirurgie osseuse (Demers *et al.*, 2002).

Selon les études réalisées, différentes espèces de coraux sont utilisées, et la notion d'"espèce modèle" dépend en fait surtout de l'usage qui en est fait. Le corail tropical *S. pistillata* a ainsi été utilisé dans de nombreux domaines tels que la biologie, l'écologie, la physiologie et la biochimie, et fut par exemple présenté lors d'un congrès sur la biominéralisation comme un modèle de choix pour l'étude des transports de calcium (Tambutté *et al.*, 1995). Dans le cadre du séquençage du génome corallien par contre, c'est le genre *Acropora* qui a été choisi comme modèle initial (Miller et Ball, 2000; Kortschak *et al.*, 2003), du fait de son abondance dans les régions dont sont issus les laboratoires moteurs du projet, l'Australie et les États-Unis. Pour les géochimistes, le modèle de

choix est plutôt le genre *Porites*, car il forme des colonies massives, un avantage pour les carottages nécessaires aux études de paléoclimatologie.

Les paragraphes suivants présentent les différentes espèces de coraux durs étudiées durant cette thèse, dont des photographies et cartes de répartition géographique sont présentées en figure 11. Leur position taxonomique est quant à elle indiquée sur la figure 6.

Stylophora pistillata, un modèle de choix

Pour cette thèse, c'est le corail *S. pistillata* qui a été retenu comme modèle d'étude. De nombreuses données sont disponibles dans la littérature sur cette espèce, autant concernant sa morphologie que sa physiologie ou sa génétique (voir pour synthèse Allemand *et al.*, 1998; Gattuso *et al.*, 1999). Sa calcification relativement rapide (Tentori et Allemand, 2006) et sa culture relativement aisée en aquarium (Tambutté *et al.*, 1995) en font de plus un modèle de choix pour les manipulations en laboratoire. Les colonies de *S. pistillata* cultivées au Centre Scientifique de Monaco proviennent initialement de la mer Rouge (Golfe d'Aqaba, Jordanie), où elles ont été récoltées il y a une vingtaine d'années.

Cette espèce branchue à petits polypes colonise des habitats très variés, allant des lagons protégés aux plateaux récifaux battus par les vagues, et se retrouve de la zone Indo-Pacifique à la mer Rouge (Veron et Stafford-Smith, 2000). La morphologie et la couleur des colonies de cette espèce dépendent de l'habitat qu'elles colonisent (Gattuso, 1987).

En milieu naturel, le corail *S. pistillata* héberge des zooxanthelles du clade A en mer Rouge (Karako-Lampert *et al.*, 2004) et du clade C et parfois D dans l'océan Pacifique (LaJeunesse *et al.*, 2003; Mieog et Van Oppen, 2007). Dans les laboratoires du CSM, des analyses moléculaires (selon les protocoles de Santos *et al.*, 2002) ont confirmé que les colonies de *S. pistillata* initialement récoltées en mer Rouge étaient associées au clade A.

Les autres coraux tropicaux symbiotiques utilisés

Une partie du travail de cette thèse a également été réalisée avec d'autres espèces de coraux tropicaux symbiotiques, qui ont été comparés à *S. pistillata*.

Pocillopora damicornis (Linnaeus, 1758) est une espèce branchue à petits polypes appartenant à la même famille que *S. pistillata*, les Pocilloporidae. Elle se développe surtout dans des eaux peu profondes.

Pavona cactus (Forskål, 1775) appartient au sous-ordre des Meandriina. Cette espèce forme de fines feuilles contournées qui présentent une faible densité de polypes. Elle se développe surtout dans les lagons et les récifs frangeants peu profonds, et peut supporter des eaux turbides.

Figure 11 | Modèles utilisés durant cette thèse (*figure en page suivante*)
De gauche à droite : Carte de répartition géographique | Photographie d'une colonie vivante | Photographie d'un squelette nu. Symboles : ☼ espèce tropicale symbiotique, ❄ espèce tempérée symbiotique, ✖ espèce tropicale non symbiotique. Barre d'échelle pour les squelettes : 10 mm (*P. damicornis*, *G. fascicularis*, *C. caespitosa*), 20 mm (*O. patagonica*, *Tubastraea* spp.), 50 mm (*S. pistillata*, *P. cactus*). Photographies et cartes : pour les cartes et les squelettes, Veron et Stafford-Smith (2000), et pour les colonies vivantes, É. Tambutté (*S. pistillata*), N. Coleman (*P. damicornis*), C. Veron (*P. cactus* et *G. fascicularis*), J. Sprung (*C. caespitosa*), M. Fine (*O. patagonica*) et S. Sikorski (*Tubastraea* spp).

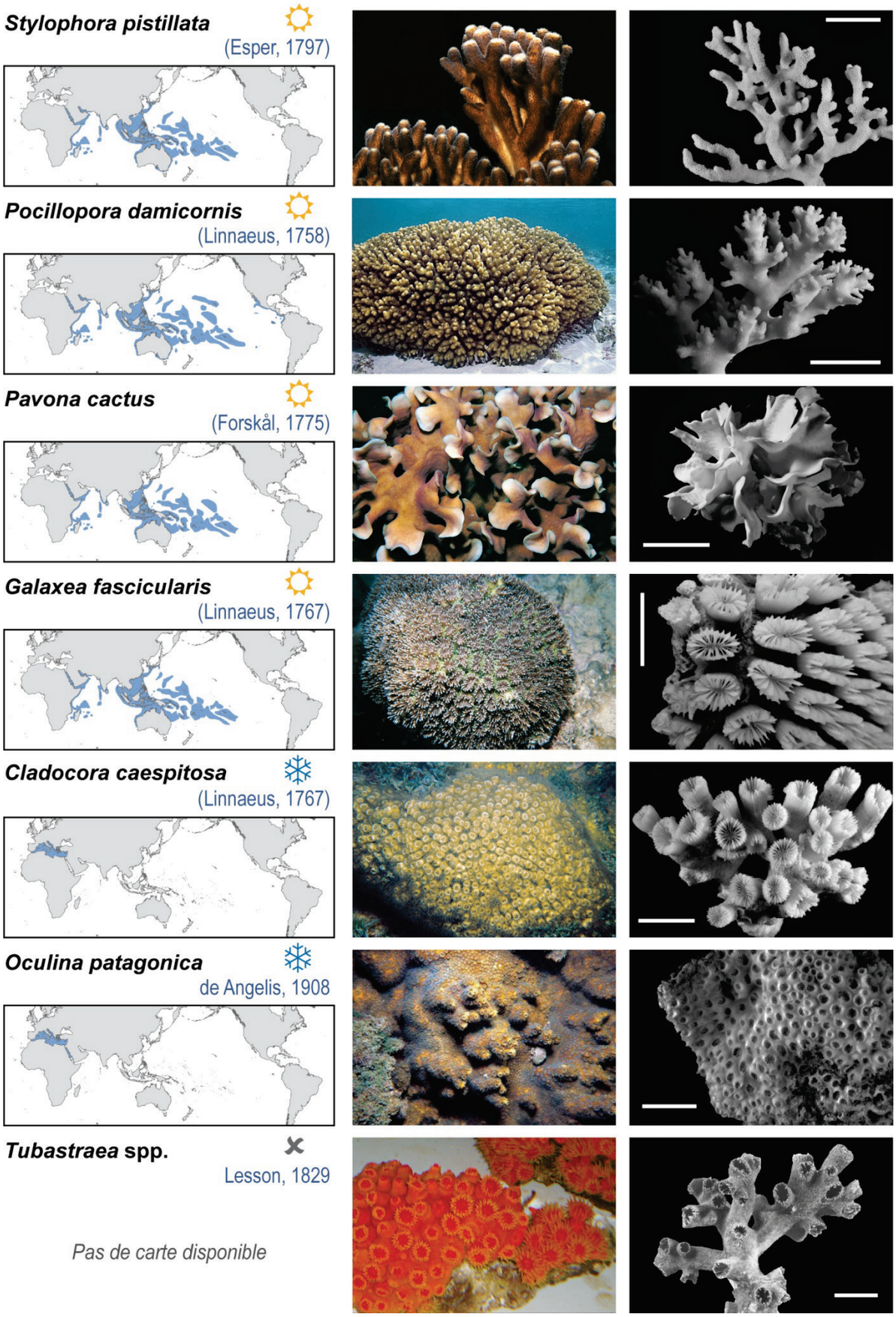


Figure 11 | Modèles utilisés durant cette thèse (*légende en page précédente*)

Galaxea fascicularis (Linnaeus, 1767) appartient au sous-ordre des Faviina, et à la famille des Oculinidae. Cette espèce présente de larges polypes faiblement connectés entre eux et des colonies en forme de dôme dont la taille excède fréquemment 5 mètres. Elle se développe sur des récifs à hydrodynamisme faible.

Les coraux méditerranéens étudiés

Pour l'une des expériences menées durant cette thèse, deux coraux méditerranéens ont également été utilisés et comparés aux espèces tropicales. Les coraux méditerranéens sont des coraux Scléractiniaires tempérés qui ne forment pas de récifs à proprement parler (coraux ahermatypiques), même si certaines espèces comme *Cladocora caespitosa* sont capables de former des colonies de taille métrique. Parmi les 37 espèces qui existent en Méditerranée, seules 5 sont symbiotiques (Zibrowius, 1980), parmi lesquelles les deux espèces étudiées.

Cladocora caespitosa (Linnaeus, 1767) appartient au même sous-ordre que *G. fascicularis*, celui des Faviina. C'est une espèce endémique de Méditerranée, qui se développe à des profondeurs allant jusqu'à 40 mètres et forme des colonies massives en dôme. Les polypes sont de taille moyenne, et relativement séparés.

Oculina patagonica de Angelis, 1908 [13] appartient au même sous-ordre que *G. fascicularis*, celui des Faviina. C'est une espèce immigrante originaire du sud de l'Atlantique. Elle recouvre les rochers à faible profondeur en formant des coussins, et présente parfois de petites branches non ramifiées. Elle présente une forte densité de polypes de petite taille.

Le corail asymbiotique tropical étudié

Parmi les coraux Scléractiniaires, tous ne sont pas symbiotiques. C'est le cas du genre *Tubastraea* Lesson, 1829, qui appartient à la famille des Dendrophyllidae, au sein du sous-ordre des Dendrophylliina. Il s'agit d'un corail tropical ahermatypique, qui forme de gros polypes solitaires ou coloniaux à faible taux de croissance. Les différentes espèces de *Tubastraea* se développent fréquemment dans des zones récifales à fort hydrodynamisme. L'intérêt de cette espèce pour cette thèse réside dans son absence naturelle de zooxanthelles, ce qui permet des comparaisons intéressantes avec les autres espèces tropicales utilisées.

Un mode de culture adapté au travail en laboratoire

Ces sept espèces de coraux sont cultivées avec succès dans les laboratoires du Centre Scientifique de Monaco depuis de nombreuses années. Pour les expérimentations physiologiques, de petites colonies (appelées boutures) sont réalisées par section des apex pour les colonies branchues (*S. pistillata* et *P. damicornis*), par section de quelques polypes pour les colonies à polypes isolés (*Tubastraea* spp., *G. fascicularis*, *C. caespitosa*), et par fragmentation de la colonie mère en colonies de petite taille pour les autres espèces (*P. cactus* et *O. patagonica*). Les boutures obtenues mesurent de 1 à 5 cm de long en moyenne, et leur taille peut être adaptée aux nécessités expérimentales. Avant de les utiliser pour des expérimentations, la cicatrisation des tissus lésés au niveau de la zone de

[13] En **taxonomie**, l'autorité taxonomique ayant décrit une espèce est notée entre parenthèses si le nom de genre a été modifié depuis la première description (ex. cas de *S. pistillata*), et sans parenthèses sinon (ex. cas de *O. patagonica*).

coupe est attendue, un processus qui prend généralement un mois (Tambutté *et al.*, 1995). Les boutures peuvent être cultivées posées sur le fond des aquariums, colées sur un support plastique ou sur des lames de verre, ou bien encore suspendues à un fil de nylon, en fonction de l'usage prévu.

2 Importance du phosphore pour les coraux

Comme tous les organismes vivants, les coraux sont incapables de synthétiser les éléments chimiques dont ils ont besoin pour vivre (carbone, azote, phosphore, calcium, sodium, potassium, etc. ; figure 2). Ils doivent donc les trouver sous forme de nutriments dans leur environnement afin de les utiliser ensuite comme "blocs de construction" pour leur métabolisme. Or les coraux tropicaux ont une étonnante capacité à se développer dans des eaux pourtant relativement pauvres en éléments nutritifs, et notamment en phosphore. Comme évoqué précédemment, la raison de ce succès en apparence paradoxal tient à la présence des zooxanthelles dans les tissus des coraux, qui optimisent l'utilisation des éléments nutritifs au sein de la symbiose.

Après la présentation historique de l'élément phosphore faite dans le préambule, les paragraphes qui suivent expliquent les formes sous lesquelles les coraux rencontrent le phosphore en milieu récifal, et l'importance toute particulière que revêt cet élément pour la biologie de la symbiose. Rappelons juste que le phosphore ne se trouve à l'état naturel que sous forme oxydée, et que, pour plus de simplicité, ce sont les sens courants en français des termes "phosphore" (l'atome de phosphore contenu dans une molécule, et par extension toutes les molécules qui contiennent un atome de phosphore) et "phosphate" (ions orthophosphate) qui ont été retenus dans cette thèse, sauf mention spécifique du contraire.

Cycle du phosphore en milieu récifal

Les différentes formes de phosphore

En milieu récifal, les coraux trouvent le phosphore sous forme d'ions orthophosphate et de phosphates condensés (formes inorganiques), ainsi que sous forme d'esters de phosphates, d'esters de polyphosphates et de phosphonates (formes organiques) (Kolowith *et al.*, 2001; Karl et Björkman, 2002). La signification de tous ces termes est donnée dans le tableau 4. L'une des expériences de cette thèse a été consacrée à l'occurrence de ces différentes formes de phosphore chez les coraux (chapitre 4).

Ces formes inorganiques et organiques sont chacune subdivisées en deux phases, dissoute et particulaire[14]. La phase dissoute correspond à toutes les petites molécules solubles dans l'eau de mer. La phase particulaire consiste quant à elle en des composés phosphorés associés à de "grosses particules", vivantes ou détritiques. Cette phase particulaire se retrouve en suspension dans la colonne d'eau d'une part (sous forme notamment de phytoplancton, de zooplancton et de bactéries, ainsi que de leurs exsudats et formes de dégradation), et

[14] La **distinction entre les phases particulaire et dissoute** se fait de manière pratique selon la taille des molécules, la limite entre les deux étant fréquemment placée à 0,7 µm de diamètre (mais elle peut varier selon les études).

sous forme benthique d'autre part (tous les organismes et leurs déchets posés sur le fond).

Chacune de ces formes de phosphore est désignée par un acronyme qui sera utilisé dans la suite de cette thèse. Ainsi, le phosphore inorganique dissous est nommé PID (ou DIP en anglais, pour dissolved inorganic phosphorus). Le phosphore inorganique particulaire est nommé PIP (également PIP en anglais, pour particulate inorganic phosphorus). Le phosphore organique dissous est nommé POD (ou DOP en anglais, pour dissolved organic phosphorus). Enfin, le phosphore organique particulaire est nommé POP (également POP en anglais, pour particulate organic phosphorus). Même si ces termes sont plus fréquemment utilisés pour désigner le phosphore qui se trouve dans la colonne d'eau que sur le fond ou dans le sédiment, ils peuvent s'employer pour les deux. Des exemples de molécules sont donnés dans la figure 12 pour chacune de ces formes de phosphore.

Les coraux peuvent utiliser certaines de ces formes présentes dans la colonne d'eau (PID, POD et POP, à l'exception du PIP) en tant que sources de phosphore pour leur métabolisme, mais avec des efficacités très variables, qui dépendent de la biodisponibilité[15] de ces différentes sources de phosphore. De manière schématique, la forme la plus facilement accessible, et donc la plus utilisée, est le PID (Björkman et Karl, 1994). L'utilisation du POD et du POP est généralement plus coûteuse. Ceci est dû aux nombreuses étapes métaboliques nécessaires à leur assimilation. Les expériences des chapitres 2 et 3 de cette thèse ont été consacrées à l'utilisation du PID et du POD par la symbiose.

Concentrations en phosphore

En milieu récifal, la biomasse et la productivité les plus importantes, et donc la quantité de phosphore la plus importante, sont associées aux organismes benthiques et aux sédiments, contrairement à la majorité des autres écosystèmes marins où les formes planctoniques dominent (D'Elia et Wiebe, 1990). La concentration de ce phosphore benthique s'exprime par unité de surface (m² de récif par exemple), et est extrêmement variable d'un récif à l'autre selon les organismes qu'il abrite. Dans un récent article de synthèse sur les nutriments en milieu récifal, Atkinson rapporte des concentrations de l'ordre de 100 mmol m^{-2} pour le POP des organismes benthiques, et 2, 140, et 1 000 mmol m^{-2} pour le PID + POD, le POP, et le PIP (respectivement) des sédiments supérieurs (Atkinson, 2011). À titre d'exemple, cette revue cite des concentrations environ 2 000 fois plus faibles pour la colonne d'eau (toutes formes de phosphore confondues, pour une colonne d'eau de 1 m), de l'ordre de 0,16 à 0,90 mmol m^{-2} (Atkinson, 2011). La majorité du phosphore se trouve donc bien sur le fond dans les récifs coralliens, et non dans la colonne d'eau. Ces faibles niveaux dans la colonne d'eau sont également la norme pour l'azote, autre élément indispensable aux coraux, et font

[15] La **biodisponibilité** est un terme permettant de décrire la plus ou moins grande facilité d'assimilation d'un élément nutritif par les organismes. C'est un concept qui recouvre à la fois la concentration de l'élément en question, la forme chimique sous laquelle il se trouve, ainsi que le coût des processus métaboliques associés à son absorption et à son assimilation par un organisme donné. Les phosphonates sont par exemple peu biodisponibles, car très coûteux à assimiler malgré leur concentration relativement importante en milieu marin, la liaison C-P qu'ils comportent étant peu réactive.

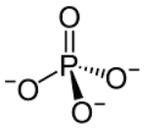
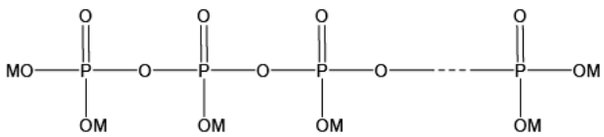
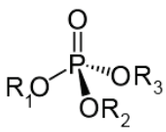
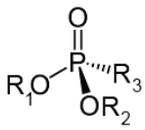
Forme de phosphore	Détails
Phosphore inorganique *Molécule phosphorée dépourvue de substituant carboné*	
Orthophosphates (généralement simplement appelés ions phosphate, et phosphate dans cette thèse)	Composés qui existent sous quatre formes selon le pH : PO_4^{3-} (anion phosphate proprement dit, fortement basique, et dont la structure est présentée ci-contre ⇨) HPO_4^{2-} (hydrogénophosphate, faiblement basique) $H_2PO_4^-$ (dihydrogénophosphate, faiblement basique) H_3PO_4 (trihydrogénophosphate, ou acide phosphorique, fortement acide) 
Pyrophosphates (également appelés diphosphates)	Composés formés de deux molécules de phosphates condensées De formule $P_2O_7^{4-}$
Métaphosphates (également appelés cyclophosphates)	Composés formés de n molécules de phosphate condensées selon une structure cyclique De formule $P_nO_{3n}M_n$ (avec M un atome d'hydrogène, H, ou un métal monovalent somme le sodium, Na, ou le potassium, K)
Polyphosphates	Composé formé de n molécules de phosphate condensées selon une structure linéaire non ramifiée De formule $P_nO_{3n+1}M_{n+2}$ ⇨ 
Phosphore organique *Molécule phosphorée qui comporte des substituants organiques*	
Mono-, di-, triesters de phosphates & Phosphates organiques condensés (également appelés esters de polyphosphates)	"Versions organiques" des molécules précédentes, formées par leur estérification avec des groupements organiques La structure ci-contre illustre un triester d'orthophosphate ⇨ (avec R un groupement organique) *L'ATP est un exemple de monoester de triphosphate* 
Phosphonates	Composés phosphorés qui présentent une liaison directe entre un atome de carbone et l'atome de phosphore ⇨ Ces organophosphorés sont une exception à la règle selon laquelle le phosphore se lie peu au carbone 

Tableau 4 | Les diverses formes de phosphore présentes en milieu récifal
Les caractéristiques majeures des diverses formes de phosphore que peuvent rencontrer les coraux sont précisées dans ce tableau, en distinguant les formes inorganiques et organiques.

des récifs coralliens des environnements dits oligotrophes (c.-à-d. pauvres en éléments nutritifs).

Bien que moins concentré, le phosphore présent dans la colonne d'eau est celui qui est utilisé par les coraux pour leur nutrition autotrophe et hétérotrophe. La concentration du phosphore dans l'eau s'exprime plus généralement par unité de volume (litre ou m^3 d'eau par exemple). Si la concentration des formes dissoutes est relativement bien

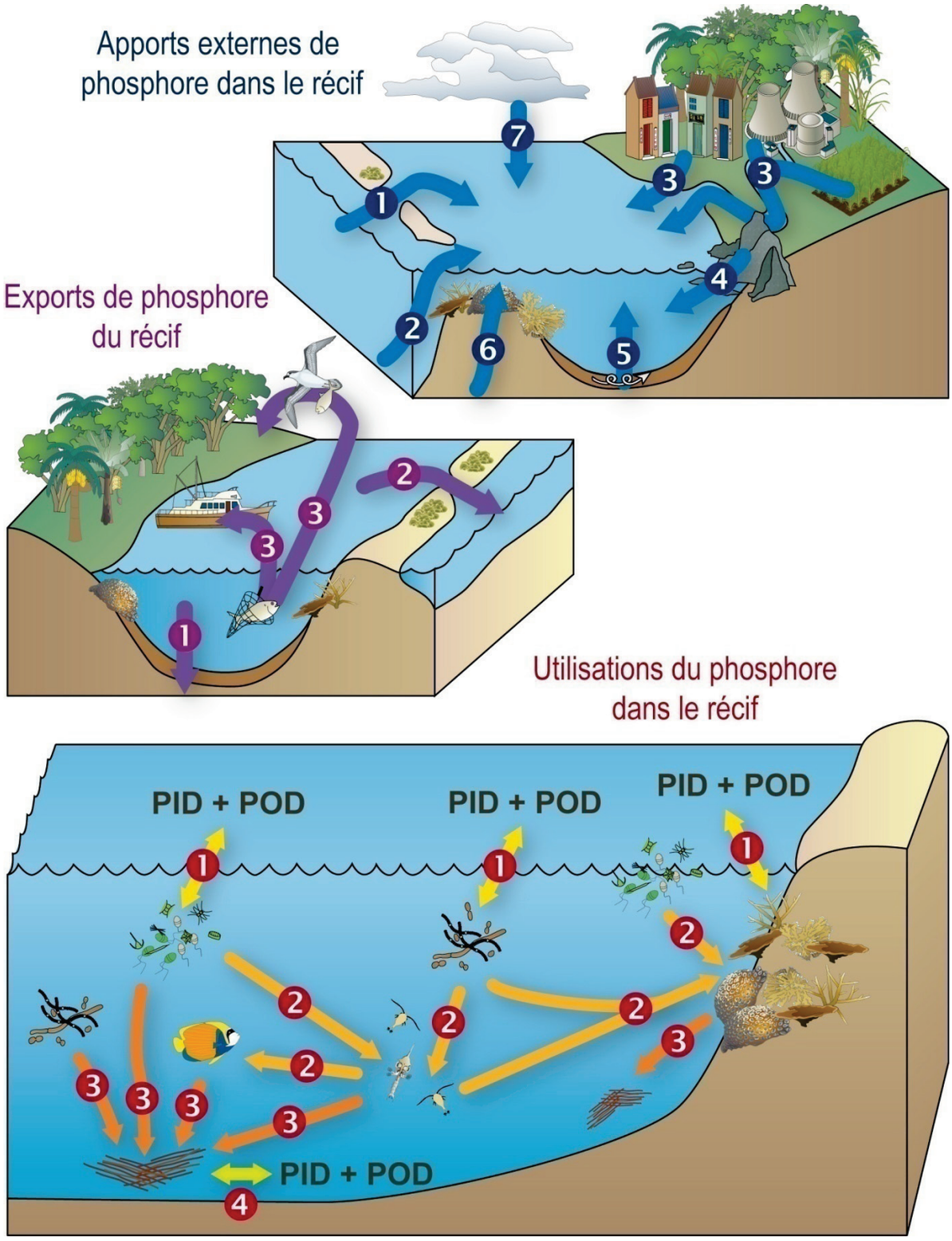


Figure 12 | Cycle simplifié du phosphore en milieu récifal (*légende en page suivante*)

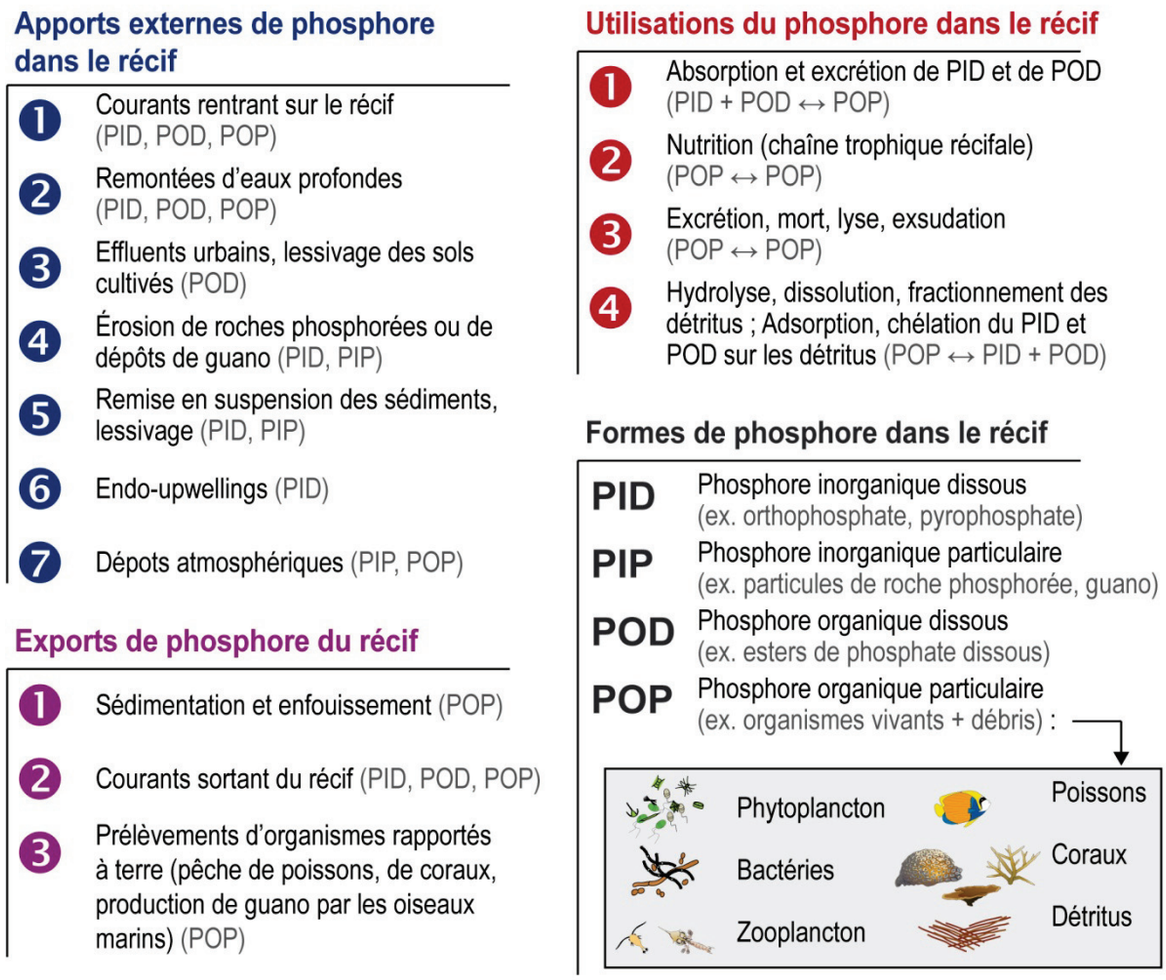


Figure 12 | Cycle simplifié du phosphore en milieu récifal (*légende*)
Les diverses formes de phosphore concernées (PID, PIP, POD, POP) sont indiquées en gris pour chaque source, puits et utilisation. Des exemples sont donnés en gris pour chaque forme de phosphore dans le récif. Pour le POP, les diverses formes considérées sur la figure sont détaillées dans l'encart gris.
Les **apports** de phosphore sont divisés en sources d'origine océanique (1 et 2), terrestre (3 et 4), récifale (5 et 6) et atmosphérique (7). L'importance relative de ces différentes sources dépend fortement de la géographie et de la morphologie du récif considéré, mais les sources 6 et 7 restent généralement anecdotiques par rapport aux autres. La source 6 relève d'une théorie selon laquelle les atolls bénéficieraient de remontées d'eau océanique profonde, riche en nutriments, sous l'action du flux géothermique (Rougerie et Wauthy, 1986).
Pour les **exports**, la sédimentation est le principal puits, la pêche étant d'importance variable selon les récifs et les sorties par les courants s'équilibrant globalement avec les entrées.
Pour le **recyclage interne** du phosphore dans le récif, le schéma présente une vision simplifiée et non exhaustive, en mettant l'accent sur le recyclage par certains organismes clé de la chaîne trophique récifale.

caractérisée, celle des formes particulaires l'est beaucoup moins. Par ordre d'importance croissante, voici les concentrations typiquement trouvées en zone récifale. La concentration du POP est en moyenne de l'ordre de 0,10 µmol L^{-1} (Furnas *et al.*, 1988; Charpy, 2001). Le PID présente des concentrations typiquement comprises entre 0,05 et 0,50 µmol L^{-1} (Kinsey et Davies, 1979; Atkinson, 1987b; Furnas, 1991; Atkinson *et al.*, 1995; Charpy, 2001). Enfin, la concentration du POD est généralement au moins du même ordre de grandeur que celle du PID (Atkinson, 1987a; Furnas *et al.*, 1988), et est ordinairement inférieure à 1 µmol L^{-1} (Crossland, 1983; Crossland et Barnes, 1983).

Un recyclage important

Le cycle du phosphore est unique parmi les cycles biogéochimiques majeurs, car il ne possède quasiment pas de composante gazeuse[16], et n'affecte par conséquent pratiquement pas l'atmosphère. En milieu marin le phosphore présente un cycle complexe, qui fait intervenir de multiples compartiments et de nombreuses formes de phosphore (Baturin, 2003). Il est affecté à la fois par des processus purement chimiques (dits abiotiques) et par des processus biologiques (dits biotiques).

À l'échelle planétaire, c'est la composante abiotique du cycle qui domine : la plupart des atomes de phosphore qui intègrent le milieu marin proviennent des roches phosphatées et ne sont même pas utilisés par les organismes vivants avant d'être enfouis dans les sédiments et de reformer des roches phosphatées (Schlesinger, 1997; Bashkin et Howarth, 2003). Ce cycle se fait à des échelles de temps très longues, de l'ordre de 10 000 à 38 000 ans (Ruttenberg, 1993; Colman et Holland, 2000; Baturin, 2003). Mais en milieu récifal, et notamment dans les premiers mètres éclairés du récif, où se déroule la photosynthèse (c.-à-d. la zone euphotique), c'est la composante biologique du cycle du phosphore qui domine. Le recyclage par les organismes vivants du PID et du POD en POP et inversement y est rapide, et se fait parfois en quelques jours ou heures seulement (Sorokin, 1990).

Bien peu d'études ont recensé, voire mesuré, les diverses composantes du cycle du phosphore en milieu récifal (Smith et Jokiel, 1978; Smith et Atkinson, 1983; Charpy et Charpy-Roubaud, 1988; D'Elia et Wiebe, 1990; Sorokin, 1992), et aucune n'en propose de représentation schématique complète. Le cycle du phosphore dépend en effet pour chaque récif de sa géographie et de sa morphologie, ce qui rend toute vision globale difficile et toute évaluation chiffrée problématique. La figure 12 propose un cycle du phosphore théorique, distinguant les sources apportant du "nouveau" phosphore sur le récif, les puits évacuant du phosphore du récif, et le recyclage interne.

Importance biologique du phosphore

S'il n'est bien sûr pas le seul élément indispensable à la vie (figure 2), le phosphore est néanmoins l'un des constituants majeurs des êtres vivants, qui représente en général environ 1% de la matière sèche

[16] Le **phosphore gazeux**, ou phosphane, de formule chimique PH_3, est un gaz toxique et inflammable qui ne se forme que dans des conditions très particulières (volcans, sites d'émission de méthane, zones marécageuses, fumier, certaines zones de l'atmosphère) et a une incidence relativement faible sur le cycle du phosphore.

d'un organisme[17] alors qu'il n'est présent qu'à 0,1% dans la croûte terrestre (Bowen, 1979). Cette concentration du phosphore par les organismes est due à son importance à tous les niveaux, de la composition même des molécules du vivant à l'échelle du fonctionnement des écosystèmes tout entiers, en passant par l'échelle des cellules et des organismes.

Importance à l'échelle moléculaire et cellulaire

Le phosphore se retrouve dans de nombreuses biomolécules[18]. Ses propriétés de réactivité chimique lui valent une position tout à fait unique dans la biologie cellulaire, aucun autre élément n'ayant de rôle aussi crucial dans les réactions métaboliques (Westheimer, 1987).

Parmi les biomolécules notables contenant du phosphore, sous forme de groupement phosphate organique (ion phosphate lié à une biomolécule par une ou plusieurs liaisons ester C–O–P), on trouve en premier lieu les acides nucléiques : acides désoxyribonucléiques (ADN), acides ribonucléiques (ARN[19]), et nucléotides. Le résidu phosphate est en grande partie responsable de la stabilité de ces molécules, et notamment de la double hélice d'ADN. En effet, au pH cellulaire, ce résidu possède une charge négative qui protège l'ADN contre les molécules réactives, et garantit ainsi l'intégrité de la structure des brins d'ADN. La charge négative des résidus phosphate empêche également la diffusion des molécules qui les portent au travers des membranes biologiques. Elle participe ainsi à la rétention des phospholipides au sein des membranes cellulaires, et à la séquestration des intermédiaires du métabolisme au sein des compartiments cellulaires. Enfin, la charge des résidus phosphate intervient dans la reconnaissance entre les enzymes et leurs cofacteurs (ex. vitamines B1-P, B2-P et B12).

Outre le rôle de la charge négative du résidu phosphate dans toutes ces biomolécules, le phosphore joue également un rôle crucial dans l'énergétique et les voies de signalisation cellulaire. En effet, les groupements phosphate comportent des liaisons riches en énergie, c'est-à-dire que leur rupture libère une quantité d'énergie relativement importante qui peut être récupérée par les cellules pour leur métabolisme. L'adénosine triphosphate, ou ATP, est le meilleur exemple de molécule phosphorée ayant un rôle énergétique fondamental. Cette molécule comporte en effet une chaîne de trois résidus phosphate, liés entre eux par deux liaisons anhydride phosphorique (P–O–P) très énergétiques, et fonctionne à ce titre comme une véritable "monnaie énergétique" pour toutes les cellules. L'énergie libérée lors de l'hydrolyse de cette "monnaie" (on parle de réaction exergonique) est utilisée par les cellules pour réaliser des réactions chimiques nécessitant un apport d'énergie (on parle de réactions endergoniques). Ces liaisons riches en énergie sont également utilisées

[17] **À titre de comparaison**, l'oxygène représente en moyenne 65%, le carbone 20%, l'hydrogène 10% et l'azote 2,5%.

[18] Une **biomolécule** est une molécule produite par un organisme, à base de carbone et d'autres éléments tels que l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le phosphore…, et qui participe aux processus métaboliques de cet organisme. Il ne faut pas confondre biomolécule et molécule organique (préambule). Une molécule organique peut en effet être produite par des processus sans rapport avec le vivant (ex. pétrole, plastiques).

[19] Les **ARN**, très abondants dans les cellules actives, constituent en général le plus gros réservoir cellulaire de phosphore.

dans les intermédiaires de la plupart des voies du métabolisme cellulaire (ex. glucose-6-phosphate dans la glycolyse). Enfin, les réactions d'addition (phosphorylation) ou d'hydrolyse (déphosphorylation) des résidus phosphate sur les biomolécules sont exploitées dans les voies de signalisation cellulaire et pour la régulation du métabolisme ; la présence ou l'absence d'un résidu phosphate sur une molécule permettant par exemple son adressage à un compartiment cellulaire particulier, sa reconnaissance par une autre molécule, l'inhibition ou l'activation de son activité…

Importance à l'échelle des organismes

Tous les rôles illustrés précédemment à l'échelle cellulaire ont une répercussion à l'échelle du métabolisme des organismes tout entiers. Mais le phosphore possède également d'autres rôles à cette échelle, qui dépendent des organismes considérés. Pour les Vertébrés par exemple, le phosphore intervient dans le maintien du pH du sang et est un composant de la partie minérale des os et des dents. Cependant chez les coraux, ces rôles ne sont pas retrouvés, étant donné leur anatomie simplifiée et le fait que leur squelette ne soit pas formé à base de phosphate de calcium mais de carbonate de calcium. Le phosphore a par contre un rôle connu dans la croissance de l'hôte et dans la photosynthèse des zooxanthelles (D'Elia, 1977; Ferrier-Pagès *et al.*, 2000), et l'une des expériences de cette thèse a d'ailleurs visé à préciser ces rôles (chapitre 5). La figure 13 illustre de manière synthétique le métabolisme du phosphore dans la symbiose, les mécanismes liés à son absorption[20] et à son assimilation [21] par les différents compartiments constitutifs du corail, ainsi que les répercussions sur la physiologie des deux partenaires.

Importance à l'échelle des écosystèmes

Comme évoqué dans le préambule, le phosphore constitue un élément tout à fait indispensable pour les processus biologiques à l'échelle des écosystèmes océaniques. Ses faibles concentrations limitent en partie la productivité de ces écosystèmes (Smith, 1984; Benitez-Nelson, 2000; Elser *et al.*, 2007). La notion de biodisponibilité vue en page 50 permet de préciser la première définition de la limitation donnée en pages 21-22. Ainsi, le nutriment limitant est celui, parmi tous les facteurs indispensables, dont la biodisponibilité est la plus proche du minimum critique nécessaire pour soutenir l'activité biologique des organismes dans un écosystème donné (Odum, 1971). Une illustration de cette définition est la compétition existant pour les ressources en phosphore entre les différentes espèces de bactéries, de phyto- et de zooplancton. Les différentes capacités d'assimilation du phosphore de ces organismes sont déterminantes pour la composition des assemblages planctoniques (Moutin *et al.*, 2002; Estrada *et al.*, 2008).

Dans le cas des récifs coralliens, des expériences ont démontré que les concentrations relativement faibles de phosphore contribuent à en faire un élément considéré

[20] L'**absorption** regroupe l'ensemble des étapes par lesquelles le phosphore passe de l'eau de mer à l'intérieur des cellules du corail.

[21] L'**assimilation** regroupe l'ensemble des étapes par lesquelles le phosphore absorbé est incorporé dans les molécules biologiques du corail via son métabolisme.

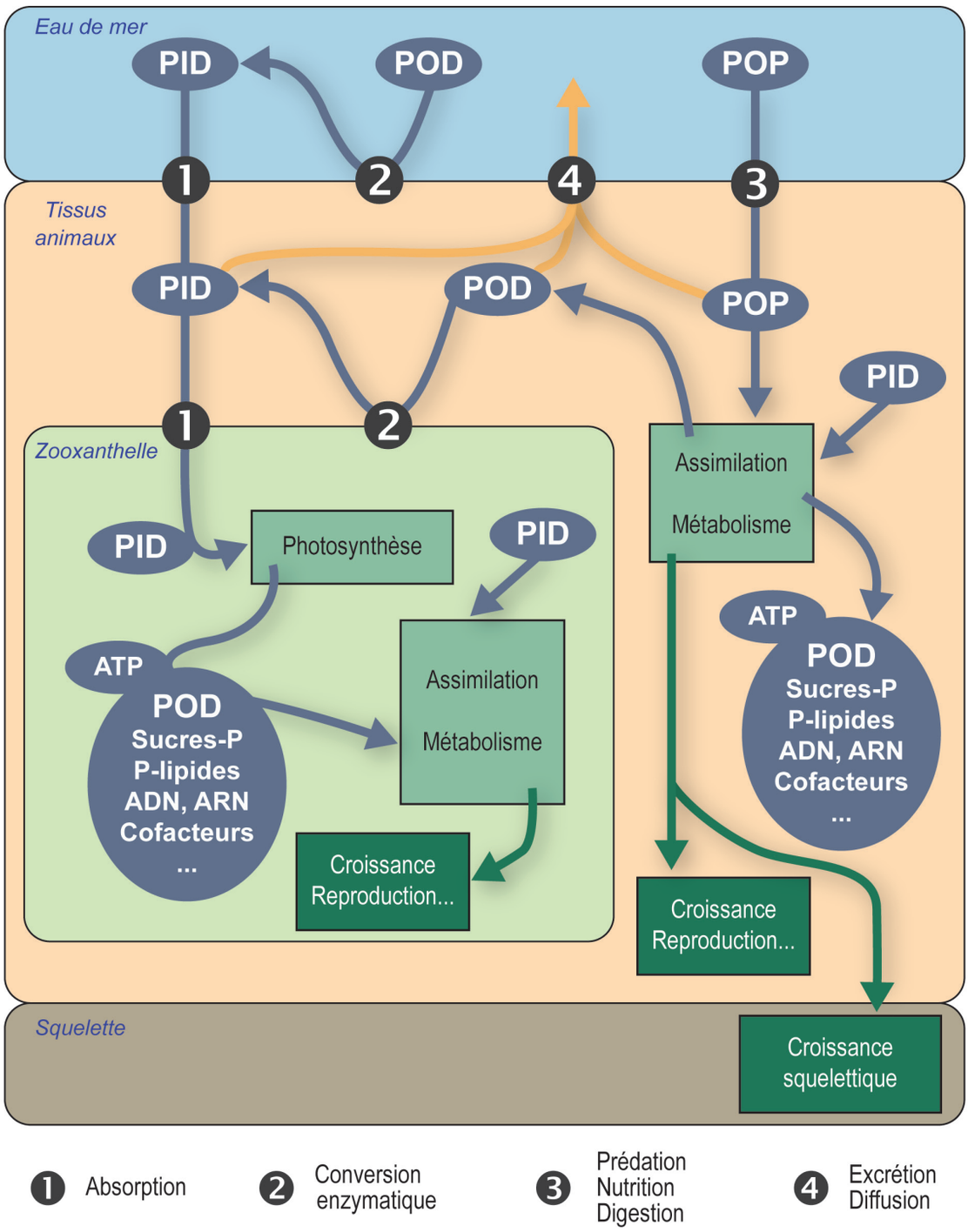


Figure 13 | Métabolisme du phosphore dans la symbiose
Les formes de phosphore sont indiquées en bleu-gris, les mécanismes d'entrée et de sortie du phosphore dans la symbiose avec des chiffres, les mécanismes d'assimilation et de conversion en vert pâle, et les effets sur la physiologie du corail en vert foncé. L'association symbiotique est représentée de manière très schématique comme trois compartiments (animal, zooxanthelle, squelette), et les étapes du métabolisme ne sont pas détaillées.
Concernant l'absorption du POD, la figure illustre le fait qu'il ne diffuse *a priori* pas à travers les membranes biologiques, et est converti en PID par voie enzymatique avant d'être absorbé par les coraux et les zooxanthelles. Ce processus sera expliqué dans le chapitre 3 (*légende continuée en page suivante*).

comme limitant pour la photosynthèse et la calcification des coraux (D'Elia, 1977; Jackson *et al.*, 1989; Jackson et Yellowlees, 1990; Annis et Cook, 2002). Mais toutes les études ne s'accordent pas sur ce point, comme l'illustreront les paragraphes qui suivent. En fait, les deux hypothèses de la limitation par le phosphore ou par l'azote, envisagées pour le cas général dans le préambule, se retrouvent également dans la littérature relative à la limitation des coraux et de leurs zooxanthelles.

3 Incertitudes actuelles et problématiques

Dans cette thèse, c'est l'hypothèse de la limitation par le phosphore qui a constitué le fil conducteur de la majorité des expériences. Les paragraphes qui suivent en expliquent la raison. Comparé à l'azote, le phosphore a été beaucoup moins étudié dans les récifs. De ce fait, de nombreuses incertitudes persistent concernant la limitation et le métabolisme du phosphore dans la symbiose corallienne.

Les incertitudes sur la limitation en phosphore dans la symbiose

Techniques d'étude

La limitation de la symbiose en azote et/ou phosphore a rarement été étudiée directement, et la plupart des arguments en faveur ou défaveur d'une limitation sont indirects. Les approches permettant d'obtenir des indices de limitation par les nutriments ont été classées en quatre catégories (D'Elia *et al.*, 1986; Beardall *et al.*, 2001). Ce classement a été effectué pour le phytoplancton, mais peut cependant être appliqué aux coraux :

- 1. l'approche physiologique et biochimique, basée sur la mesure de paramètres métaboliques (respiration, photosynthèse, nutrition…) et de paramètres cinétiques d'absorption des nutriments ;
- 2. l'approche stœchiométrique, basée sur des mesures de rapports C:N:P qui permettent la comparaison entre la disponibilité des nutriments dans l'eau d'une part et la composition élémentaire des coraux d'autre part ;
- 3. l'approche expérimentale par mesure de taux de croissance, basée sur l'interprétation des changements de biomasse qui surviennent lorsqu'un enrichissement en nutriments est réalisé ;
- 4. l'approche mathématique, basée sur la modélisation de la réponse des coraux à diverses conditions d'enrichissement en nutriments.

L'approche 4 n'a pratiquement jamais été abordée par manque de données, très peu de budgets globaux ayant été établis pour les cycles des nutriments au sein des co-

Figure 13 | Métabolisme du phosphore dans la symbiose (*suite de la légende*)
La figure illustre également l'une des contraintes de la vie en symbiose pour les zooxanthelles : le phosphore absorbé par les symbiotes ne provient pas directement de l'eau de mer, il transite obligatoirement par le cytoplasme des cellules de l'hôte. Mais la vie en symbiose est également un avantage pour les zooxanthelles, qui ont accès à des sources de nutriments supplémentaires provenant du métabolisme des cellules animales. Les flux sont néanmoins très contrôlés par l'hôte, notamment au niveau de la vacuole périsymbiotique (non représentée sur ce schéma pour plus de simplicité). Enfin, la figure illustre également le fait que l'hôte ne reçoit *a priori* pas de molécules phosphorées de la part de ses symbiotes.

raux ou même des récifs (page 54). Les études utilisant les approches 1, 2 et 3 sont par contre plus nombreuses. Curieusement cependant, selon l'approche employée, les études ont conclu à la limitation par l'un ou par l'autre des deux nutriments, chez les zooxanthelles ou chez l'hôte.

Hypothèse d'une limitation en azote

Les partisans de la limitation par l'azote se basent principalement sur l'approche 3 (Muscatine *et al.*, 1989a; Rees, 1991; Falkowski *et al.*, 1993). Ces études ont surtout envisagé la problématique de la limitation sous l'angle suivant : comment l'hôte réussit-il à obtenir un maximum de photosynthétats tout en limitant la croissance des zooxanthelles dans ses tissus ?

Lors d'expériences d'enrichissement du milieu en azote inorganique dissous (sous forme d'ions ammonium, NH_4^+), les concentrations en zooxanthelles ont augmenté d'un facteur 1,8 à 2,5 dans les tissus coralliens (Muscatine *et al.*, 1989a; Falkowski *et al.*, 1993). La conclusion a donc été que les zooxanthelles *in vivo* sont limitées en azote, vu qu'un enrichissement de l'eau de mer par cet élément a augmenté leur taux de croissance. On a supposé que cette limitation était due à un contrôle strict des flux d'azote excrété par l'hôte vers le symbiote (Falkowski *et al.*, 1993), cette excrétion étant considérée comme trop faible pour permettre aux zooxanthelles d'atteindre leur taux de croissance maximal. La prolifération des symbiotes au sein des tissus coralliens est ainsi limitée et contrôlée.

Lorsque les expériences d'enrichissement ont été réalisées avec du phosphate, la densité des symbiotes n'a généralement pas été modifiée (Muscatine *et al.*, 1989a; Stambler *et al.*, 1991; Koop *et al.*, 2001), ce qui a conforté l'hypothèse de la limitation unique par l'azote. Néanmoins, cette limitation en azote a été controversée. En effet, Miller et Jackson (1989), par exemple, suggèrent que les zooxanthelles *in vivo* présentent de faibles taux d'absorption d'ammonium comparativement à des algues non symbiotiques. Elles présentent aussi une faible activité des enzymes responsables de l'assimilation de l'azote. Or, une limitation en azote se caractérise par une expression forte de ces deux derniers paramètres. Ils concluent ainsi que la limitation de la population de zooxanthelles *in vivo* par l'azote est peu probable.

Hypothèse d'une limitation en phosphore

Les partisans de la limitation par le phosphore se basent quant à eux principalement sur les approches 1 et 2 (Jackson *et al.*, 1989; Miller et Yellowlees, 1989). Cette conclusion vient en effet surtout des résultats de mesures physiologiques, du rapport C:P des coraux, et de leur taux d'absorption de phosphore. De plus, il a également parfois été observé une augmentation de la densité des zooxanthelles en présence de phosphate (Steven et Broadbent, 1997; Koop *et al.*, 2001). Les études concernées envisagent aussi bien une limitation de la croissance des symbiotes par l'hôte *in vivo*, qu'une limitation de la croissance de l'hôte.

Concernant la limitation des symbiotes tout d'abord, la plupart des études ont mesuré une forte absorption de phosphore sous forme de PID (D'Elia, 1977; Sorokin, 1992) et de POD (Jackson *et al.*, 1989), ce qui serait en faveur d'une limitation des zooxanthelles par le phosphore. De plus, les rapports C:P et N:P mesurés dans les zooxanthelles sont généralement forts, ty-

piquement supérieurs aux rapports de Redfield de 106 et 16. Ainsi, les zooxanthelles du corail *P. damicornis* présentent un rapport C:P de 355 à 500, et un rapport N:P de 21 à 56 (Muller-Parker *et al.*, 1994; Snidvongs et Kinzie, 1994). Or, des rapports C:P et N:P supérieurs au rapport de Redfield indiquent que les zooxanthelles contiennent peu de phosphore, ce qui est également en faveur d'une limitation des symbiotes par le phosphore.

Chez les bénitiers[22], des résultats similaires ont mené aux conclusions que les symbiotes sont plus fortement limités en phosphore que le phytoplancton libre, que la déficience en phosphore est plus forte que celle en azote, et que c'est majoritairement via les flux de phosphore que l'hôte contrôle la population des symbiotes (Belda *et al.*, 1993).

Concernant la limitation de l'hôte enfin, l'une des seules études concluant sur ce point rapporte qu'un enrichissement en phosphore diminue le rapport C:P de l'hôte, chez les bénitiers. Cela a été interprété comme une capacité de l'hôte à accumuler du phosphore, indicatrice d'une certaine limitation. Par contre, ce phosphore stocké ne semblait pas être utilisé directement par l'hôte, ainsi que l'indiquent l'absence d'augmentation de sa biomasse et de sa calcification (Belda *et al.*, 1993).

[22] Les **bénitiers géants**, ou tridacnes géants, appartiennent à l'embranchement des Mollusques. Comme les coraux, ils abritent également des zooxanthelles symbiotiques. La différence réside cependant dans la localisation des symbiotes : intracellulaires chez les coraux, ils sont extracellulaires chez les bénitiers (tableau 2).

Hypothèse d'une limitation conjointe en phosphore et azote

Il se dégage de ce bilan sur l'azote et le phosphore qu'il persiste de nombreuses incertitudes quant à la limitation par l'un ou par l'autre de ces nutriments dans la symbiose. Il est en fait probable que les deux nutriments puissent limiter la symbiose, ensemble ou à tour de rôle (Miller et Yellowlees, 1989). Chez les bénitiers, l'hypothèse avancée est que la limitation en azote des zooxanthelles est fonction de la disponibilité en ammonium dans le milieu, et est donc variable. La limitation en phosphore semble quant à elle plus constitutive et relativement indépendante de la présence de phosphate dans l'eau (Belda *et al.*, 1993).

Il est de plus vraisemblable que les voies métaboliques touchées par la limitation diffèrent dans le cas de l'azote et du phosphore. La répartition de ces deux éléments au sein des biomolécules donne des indices sur les voies métaboliques les plus plausibles. Concernant l'azote, majoritairement présent dans les acides aminés, la limitation se situe probablement au niveau de la synthèse de protéines, chez les zooxanthelles (Falkowski *et al.*, 1993) comme chez l'hôte (Muscatine *et al.*, 1989b; Belda *et al.*, 1993). Cela peut avoir une conséquence directe sur la biomasse corallienne, largement dépendante de la synthèse protéique. Concernant le phosphore, abondant dans l'ATP et les ARN, la limitation se situe probablement au niveau du métabolisme énergétique et de la production d'ARN (Belda *et al.*, 1993). Ceci devrait *a priori* avoir peu d'influence sur la biomasse, car le phosphore intervient très peu dans les protéines.

Enfin, le bilan précédent fait apparaître que la problématique de la limitation est très généralement centrée sur les zooxanthelles, et sur le contrôle qu'exerce l'hôte sur leur limitation. Au contraire, très peu d'études ont envisagé cette problématique chez l'hôte. Pourtant, malgré la diversité des sources nutritives qu'utilise l'hôte corallien, rien n'exclut que son métabolisme puisse être limité par le phosphore ou l'azote.

Les incertitudes sur l'absorption du phosphore dissous par la symbiose

L'absorption du PID et du POD par les coraux et leurs symbiotes a été relativement peu étudiée, et étonnamment, elle n'a pas encore été caractérisée de manière approfondie, notamment aux faibles concentrations présentes dans le milieu naturel. De plus, l'importance de nombreux paramètres environnementaux sur cette absorption reste relativement peu connue, notamment pour le PID.

L'absorption de PID

Pour le PID, plusieurs études ont montré que, à l'échelle de récifs entiers, le phosphate est absorbé efficacement par les communautés benthiques (Atkinson, 1987b; Sorokin, 1992). Cette absorption est généralement proportionnelle à la concentration du phosphate dans l'eau (pour des concentrations de 1 à 7 µmol L^{-1} ; Atkinson 1987a). D'autres études ont mesuré l'absorption de PID sur des organismes symbiotiques isolés, tels que l'anémone tropicale *Aiptasia pallida*, le bénitier *Tridacna gigas*, ou la méduse *Cassiopea xamachana* (Muller-Parker *et al.*, 1990; Belda et Yellowlees, 1995; Todd *et al.*, 2006). Toutes ont conclu que les zooxanthelles de ces organismes sont responsables de l'absorption de PID. Pour les coraux, seules quatre études se sont intéressées à l'absorption de PID, dont deux seulement par l'association symbiotique (D'Elia, 1977; Sorokin, 1992) et deux par les zooxanthelles, isolées (Jackson et Yellowlees, 1990) et en culture (Deane et O'Brien, 1981).

Les expériences sur les coraux entiers ont démontré qu'à de faibles concentrations ambiantes, les coraux absorbent et relarguent le PID de manière concomitante (D'Elia, 1977; Sorokin, 1992). Le mode de transport du PID reste par contre relativement peu caractérisé. S'il a été établi que le transport est actif[23] au niveau de la membrane des zooxanthelles (Jackson et Yellowlees, 1990), le caractère actif ou passif de l'absorption au niveau de la membrane de l'hôte en contact avec l'eau de mer reste sujet à débat (D'Elia, 1977; Miller et Yellowlees, 1989).

Le rôle des zooxanthelles dans l'absorption du PID par la symbiose a été suggéré par l'effet positif de la lumière sur l'absorption par les coraux entiers et par les zooxanthelles isolées (D'Elia, 1977; Jackson et Yellowlees, 1990). Enfin, l'effet de la température sur les flux de PID chez le corail *Porites compressa* a été étudié, mais seulement à des températures relativement basses (6 à 22°C), peu représentatives de l'environnement de ce corail tropical (D'Elia, 1977).

[23] Le **transport actif** désigne le passage d'un ion ou d'une molécule à travers une membrane cellulaire contre son gradient de concentration. Ce type de transport nécessite un apport d'énergie. Le **transport passif** désigne un passage par diffusion, sans apport d'énergie.

L'absorption de POD

Pour le POD, deux études seulement se sont concentrées sur son absorption, et ce uniquement pour les zooxanthelles, isolées ou en culture (Jackson *et al.*, 1989; Annis et Cook, 2002). Il a été montré qu'une forte absorption de POD est un bon indicateur d'une déficience en PID, chez les zooxanthelles (Jackson *et al.*, 1989; Annis et Cook, 2002) comme chez diverses algues benthiques (Lapointe et O'Connell, 1989) ou planctoniques (Yentsch *et al.*, 1972; Møller *et al.*, 1975; Wynne et Rhee, 1988). Il a également été démontré qu'il existe un optimum de température et de pH pour l'absorption du POD chez les zooxanthelles.

Chez l'hôte corallien au contraire, l'absorption de POD n'a pas été étudiée de manière approfondie, même si elle est mentionnée dans quelques études (Goreau, 1956; Hayes et Goreau, 1977; Brahmi *et al.*, 2009). Pourtant, l'absorption de POD représente une source alternative de phosphore pour l'hôte, qui peut potentiellement avoir son importance en cas de niveaux très faibles de PID. La contribution de l'hôte à l'absorption de POD par la symbiose reste ainsi à caractériser.

Les incertitudes sur le devenir du phosphore dans la symbiose

Le devenir du phosphore absorbé par la symbiose reste également relativement flou. D'une part, la plupart des études à propos de l'effet des nutriments sur la physiologie de la symbiose se sont concentrées sur l'azote, seul ou combiné au phosphore. Ainsi, le phosphore a rarement été étudié seul. D'autre part, l'effet d'un apport de phosphore sur les divers paramètres physiologiques (calcification, photosynthèse, biomasse, respiration, etc.) n'a pas été étudié de façon globale, en prenant en compte tous les paramètres en même temps chez une même espèce de corail. Seule une étude, réalisée en Australie sur des mini-récifs expérimentaux, à été relativement exhaustive, en s'intéressant à une dizaine de paramètres physiologiques, mesurés sur 1 à 5 espèces selon les paramètres (Koop *et al.*, 2001). Les autres études sur le phosphore rapportent en moyenne seulement 2 à 3 paramètres physiologiques en même temps (Rasmussen, 1988; Muscatine *et al.*, 1989a; Rasmussen et Cuff, 1990; Stambler *et al.*, 1991; Snidvongs et Kinzie, 1994; Steven et Broadbent, 1997; Bucher et Harrison, 2000; Ferrier-Pagès *et al.*, 2000; Koop *et al.*, 2001; Renegar et Riegl, 2005), ce qui rend impossible la construction d'un bilan.

De plus, toutes ces études ont rapporté des résultats contradictoires. En effet, si l'on prend l'exemple de la calcification, un enrichissement en phosphate a parfois diminué les taux de croissance des coraux (Rasmussen et Cuff, 1990; Ferrier-Pagès *et al.*, 2000; Koop *et al.*, 2001; Renegar et Riegl, 2005), ou les a augmentés (Rasmussen et Cuff, 1990; Steven et Broadbent, 1997; Koop *et al.*, 2001), ou encore n'a eu aucun effet (Stambler *et al.*, 1991; Koop *et al.*, 2001). Les résultats ont ainsi été très variables selon la concentration de phosphate utilisée pour l'enrichissement, selon l'espèce de corail étudiée, et selon la technique utilisée pour mesurer la calcification.

Objectifs et problématiques de la thèse

L'enjeu majeur de cette thèse a été d'évaluer les besoins en phosphore des coraux scléractiniaires, et l'utilisation des

différentes formes dissoutes du phosphore. Les approches 1 à 3 (page 58) ont été utilisées au cours des diverses expériences, afin d'aborder la problématique de la limitation de manière aussi complète que possible, tant en laboratoire que sur le terrain. Trois objectifs précis ont été dégagés pour explorer successivement ces approches. Le premier objectif a été d'examiner l'absorption de phosphore inorganique et organique dissous par les coraux sous diverses conditions environnementales (approche 1, physiologique et biochimique). Le second objectif a été de déterminer la composition en phosphore de l'hôte et des symbiotes (approche 2, stœchiométrique). Le troisième objectif a été de déterminer les paramètres physiologiques intervenant dans le devenir du phosphore absorbé par la symbiose (approche 3, expérimentale).

Les cinq paragraphes qui suivent exposent brièvement la logique expérimentale ayant permis de répondre à ces objectifs dans les chapitres 2 à 6.

Chapitre 2 | L'absorption de phosphore inorganique dissous

Les premières expériences de cette thèse ont visé à déterminer quels sont les mécanismes cellulaires d'absorption du phosphate (PID) par les coraux et leurs symbiotes, et quels sont les effets de divers facteurs environnementaux sur cette absorption : lumière, acclimatation à des concentrations élevées de phosphate, nutrition hétérotrophe, présence ou absence d'azote (azote inorganique dissous fourni sous forme d'ammonium, NH_4^+, ou de nitrate, NO_3^-). La problématique du changement global a été abordée au travers d'une expérience où la température et le pH de l'eau ont été manipulés.

Chapitre 3 | L'absorption de phosphore organique dissous

Dans un second temps, les expériences ont visé à déterminer quelles sont les conditions d'absorption du POD, en examinant tout d'abord les rôles respectifs de l'hôte et des symbiotes dans cette absorption. De même que pour le chapitre 2, l'importance de la lumière et de la nutrition hétérotrophe ont ensuite été testées, et le rôle des changements globaux a été examiné au travers d'expériences de blanchissement des coraux.

Chapitre 4 | Étude par RMN du ^{31}P de la composition en phosphore de la symbiose

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de chimie analytique qui repose sur les propriétés magnétiques du noyau de certains éléments chimiques. Dans le cas du phosphore, cette technique permet de détecter simultanément un très grand nombre de molécules phosphorées, en les distinguant selon des grands groupes (ceux présentés dans le tableau 4 par exemple). La problématique de ce chapitre a été de mettre au point une méthode permettant d'utiliser cet outil sur les coraux, afin d'identifier les composés phosphorés présents dans la symbiose, voire de quantifier certains d'entre eux.

Chapitre 5 | Devenir du phosphore absorbé au sein de la symbiose

Après avoir examiné l'absorption du phosphore par les coraux et les formes sous lesquelles il est présent dans la symbiose, la problématique suivante a concerné l'influence d'un enrichissement en PID sur la physiologie de l'hôte et des symbiotes. Une expérience d'enrichissement en phosphate

sur le long terme (15 semaines) a été mise en place pour compléter les données existantes sur l'importance du phosphore pour le métabolisme et la stœchiométrie de la symbiose. Cette expérience a également permis de compléter les résultats des précédents chapitres quant aux outils utiles pour l'étude de la limitation en phosphore ou en azote.

Chapitre 6 | Application sur le terrain : limitation sur un récif mésotrophe

Une fois tous ces outils examinés lors des expériences en laboratoire, une mission en Polynésie Française a permis d'aller les tester directement sur le terrain. Un récif de l'île de Moorea, dans l'archipel de la Société, a été choisi pour cette étude. Le récif étudié est dit mésotrophe, car il présente des concentrations en nutriments dissous intermédiaires entre un récif oligotrophe et un récif pollué (dit eutrophe, car très riche en nutriments).

4 Démarche expérimentale

Cette section expose brièvement la démarche expérimentale suivie afin de répondre aux objectifs et problématiques de cette thèse. Le matériel biologique utilisé a été présenté au début de ce chapitre (pages 45-48). Les techniques expérimentales employées sont pour la plupart standard en physiologie corallienne et ne seront pas expliquées plus en détail dans cette thèse, des protocoles plus précis pouvant être trouvés dans les articles inclus dans cette thèse ou dans la littérature qui y est référencée.

Maintenance des coraux en aquarium

Les coraux ont été utilisés sous forme de petites boutures (une branche de 1 à 5 cm de long) ou de grosses colonies mères (une dizaine de branches). Elles ont été préparées environ 1 à 2 mois avant chaque expérience, et cultivées dans des aquariums maintenus à 26 ou 18°C (coraux tropicaux et méditerranéens respectivement), avec de l'eau de mer méditerranéenne (salinité 38) relativement pauvre en nutriments (PID < 0,05 µmol L^{-1}, POD < 0,10 µmol L^{-1}, nitrate < 0,4 µmol L^{-1}, et ammonium < 0,5 µmol L^{-1}). Les aquariums ont été soumis à un cycle de lumière jour:nuit de 12h:12h, avec un éclairement de 150 µmol m^{-2} s^{-1} de rayonnement photosynthétiquement actif[24]. Les coraux ont été nourris une à deux fois par semaine avec des nauplii d'*Artemia salina*, sauf pour certaines expériences des chapitres 2 à 5, où ils n'ont pas été nourris durant les quelques semaines précédant les expériences. Les algues qui poussent dans les aquariums ont été nettoyées une fois par semaine.

Parmi les expériences réalisées, deux ont nécessité des changements dans les conditions de culture sur un moyen ou un long terme. Pour la première, des boutures ont

[24] Le **rayonnement photosynthétiquement actif** (RPA), ou PAR en anglais (pour Photosynthetically Active Radiation), désigne la bande spectrale comprise entre 400 et 700 nm, que la majorité des organismes photosynthétiques peuvent utiliser pour leur photosynthèse. Le RPA s'exprime en µmol (sous-entendu, de photons) m^{-2} s^{-1}, qui est une mesure de la densité du flux de photons photosynthétiquement actifs. Les photons de longueurs d'ondes plus courtes (< 400 nm, i.e. ultraviolet) sont généralement trop énergétiques et occasionnent des dommages cellulaires (ils sont toutefois largement filtrés par la couche d'ozone dans l'atmosphère). Les photons de longueurs d'ondes plus grandes (> 700 nm, i.e. infrarouge) sont quant à eux trop peu énergétiques pour que la photosynthèse ait lieu.

été soumises durant 10 jours à une élévation de la température et/ou à une baisse du pH pour étudier l'action du changement global sur le métabolisme des nutriments (chapitre 2). Pour la seconde, des coraux ont été enrichis en phosphate durant 15 semaines, selon un dispositif détaillé dans le chapitre 5.

Isolement des zooxanthelles

Certaines expériences des chapitres 2, 3, 4 et 6 ont été réalisées sur des zooxanthelles fraîchement isolées de leur hôte corallien. L'étude des zooxanthelles fraîchement isolées permet d'inférer le fonctionnement de ces mêmes zooxanthelles en symbiose au sein des tissus de l'hôte. Il convient néanmoins de rester conscients que, comme c'est le cas lors de toute tentative de reconstitution d'un système biologique complexe à partir de l'étude de ses différents constituants isolés, l'extrapolation des résultats obtenus sur les symbiotes isolés au fonctionnement des symbiotes *in hospite* constitue nécessairement une simplification. Les résultats obtenus sur les zooxanthelles fraîchement isolées doivent donc être analysés en conservant cela à l'esprit.

Les zooxanthelles fraîchement isolées ont été préparés en détachant les tissus du squelette du corail avec un jet d'eau de mer ou d'air sous pression, en broyant ces tissus pour libérer les zooxanthelles des cellules animales, puis en récupérant les symbiotes[25] par centrifugation (les tissus animaux plus légers flottent lorsque l'on centrifuge un broyat de cellules de corail). Ces symbiotes fraîchement isolés ont été utilisés au maximum 3 heures après leur préparation.

Culture des zooxanthelles

Des expériences du chapitre 4 ont été réalisées avec des zooxanthelles cultivées au laboratoire, initialement isolées de l'hôte *S. pistillata*. De même que pour les zooxanthelles fraîchement isolées, les zooxanthelles en culture permettent d'étudier de manière approfondie le fonctionnement des zooxanthelles, tout en gardant à l'esprit que leur métabolisme en culture est très différent de celui des zooxanthelles symbiotiques.

Les zooxanthelles cultivées au laboratoire sont maintenues dans des fioles de culture en milieu liquide (milieu ASP-8A, contenant 0,02 µmol L^{-1} de phosphate, d'ammonium et de nitrate) (Blank, 1987), à 25°C avec un cycle jour:nuit de 14h:10h, et constituent des cultures clonales. Les zooxanthelles ont été récupérées par centrifugation juste avant chaque expérience.

Mesure des taux d'absorption de phosphore

Les taux d'absorption de phosphore (et d'azote dans certains cas) ont été mesurés par des expériences de déplétion (chapitres 2, 3 et 6). Le dispositif expérimental utilisé est présenté sur la figure 14. Au début de chaque incubation, l'eau de mer a été enrichie avec une quantité connue de phosphore ou d'azote. La concentration en nutriments a été ensuite mesurée à intervalles réguliers durant une à sept heures par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie, selon des techniques standard d'analyse en chimie marine pour le phosphate (Murphy

[25] Les **zooxanthelles** sont relativement solides, et un passage au broyeur manuel de Dounce dans l'eau de mer les laisse intactes, alors que les cellules animales, plus fragiles, sont détruites.

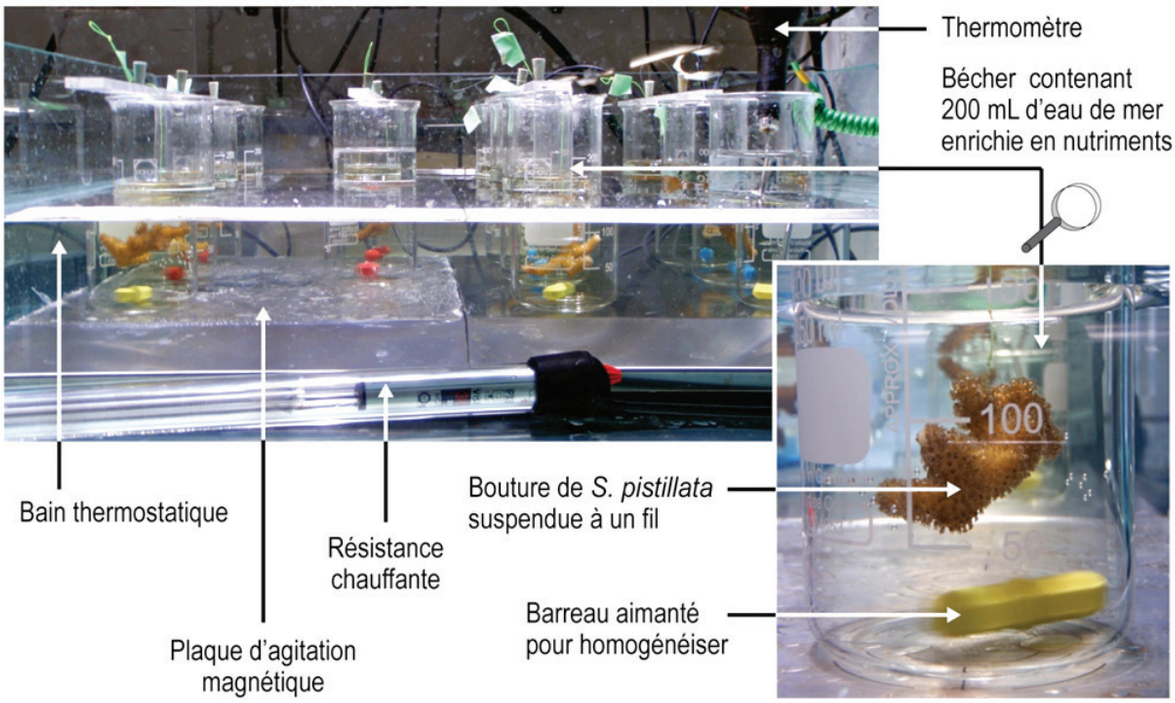


Figure 14 | Dispositif de mesure des taux d'absorption de nutriments
La grande photographie présente le dispositif utilisé avec 10 béchers contenant une bouture de corail, et 2 béchers contenant uniquement de l'eau (contrôles) | La petite photographie présente le détail d'une colonie de *S. pistillata* dans son bécher lors d'une incubation. On peut remarquer que les polypes sont bien ouverts, preuve que l'expérience n'incommode pas sensiblement la bouture.

et Riley, 1962), pour le POD (Kuenzler et Perras, 1965), pour l'ammonium (Holmes *et al.*, 1999) et pour le nitrate (Aminot et Kérouel, 2007). Les taux d'absorption[26] ont été calculés comme la quantité de nutriment disparaissant de l'eau (c.à.d. absorbés par le corail) en une heure d'incubation, et ont été normalisés par la surface ou la biomasse de chaque corail (contenu en protéines, en chlorophylles, ou en zooxanthelles).

[26] Cette technique permet uniquement de mesurer des **taux d'absorption nets**. Pour obtenir des flux bruts, c.à.d. tenant compte d'un éventuel relargage concomitant de nutriments, il eut fallu utiliser des techniques de radioactivité pour séparer flux entrants et flux sortants. Cela n'a pas été possible durant cette thèse.

Mesure du contenu en phosphore

La quantité totale de phosphore dans les tissus animaux, les zooxanthelles et le squelette, a été mesurée afin de déterminer les compartiments accumulant le phosphore dans la symbiose dans l'expérience d'enrichissement du chapitre 5. Les protocoles utilisés sont décrits dans les articles 1 et 6.

Afin de déterminer les grands groupes de molécules phosphorées qui composent ces stocks de phosphore dans les tissus animaux et les zooxanthelles, un protocole de mesure par spectroscopie RMN a été entièrement développé durant cette thèse, en collaboration avec la plate-forme techno-

logique de chimie de l'Université de Nice. Ce protocole nouveau est détaillé dans le chapitre 4 et l'article 5.

Mesure des paramètres physiologiques

Afin d'obtenir l'effet du phosphore sur la physiologie de l'association symbiotique, la respiration, la photosynthèse et le taux de croissance squelettique ont été mesurés pour les coraux utilisés dans le chapitre 5. Les mesures de photosynthèse ont aussi servi pour les coraux placés dans l'expérience de changement global du chapitre 2.

Les échanges de dioxygène O_2 liés à la respiration (consommation d'O_2) et à la photosynthèse (production d'O_2) ont été mesurés à l'aide de chambres respirométriques contenant une électrode à oxygène (modifié d'après Ferrier-Pagès *et al.*, 2000). Les performances photosynthétiques du photosystème II (PSII) des zooxanthelles ont été mesurées par fluorimétrie à pulsations d'amplitude modulée (PAM-fluorimétrie, selon des techniques mises au point au Centre Scientifique de Monaco par Richard, 2006). Le taux de croissance squelettique a été mesuré par des pesées dans l'eau des coraux, effectuées à quelques jours ou semaines d'intervalle, selon la technique du "buoyant weight" (Jokiel *et al.*, 1978).

Mesures de biomasse

Pour normaliser les résultats d'absorption de nutriments des chapitres 2 et 3, ainsi que pour normaliser les paramètres physiologiques du chapitre 5, les paramètres suivants ont été mesurés sur les coraux utilisés dans chaque expérience. La surface a été mesurée à l'aide d'une technique d'enrobage à la cire décrite par Stimson et Kinzie (1991). Le contenu en protéines des tissus a été mesuré par spectrophotométrie après extraction à la soude selon une technique décrite par Hoogenboom *et al.* (2010). Le contenu en chlorophylles *a* et *c2* des zooxanthelles a été mesuré par spectrophotométrie après extraction à l'acétone et calculé selon les équations trichromatiques de Jeffrey et Humphrey (1975). Enfin, le contenu en zooxanthelles des coraux a été mesuré par des comptages au microscope (Hoogenboom *et al.*, 2010).

Chapter 2

The uptake of dissolved inorganic phosphorus

Abstract

Despite the importance of DIP for corals, conditions and regulation of its uptake have not been extensively examined to date. The objectives of the work presented in this chapter were to characterize the cellular mechanisms involved in DIP uptake by corals and their symbiotic zooxanthellae, and to examine the impact of various environmental parameters on this uptake, in order to better understand the capacity of adaptation of corals to their changing environment. The results obtained proved that DIP uptake is an active phenomenon, both at the host and symbiont membranes. This work led to the characterization of the transporter situated at the host membrane, a sodium/phosphate symporter. DIP uptake was dependent upon ambient DIP concentrations over a short and long term, upon the availability of POP sources from the heterotrophic feeding of the host, and upon internal phosphorus stocks located within the zooxanthellae. The positive effect of light led to the hypothesis of a link with zooxanthellae photosynthesis, a process which consumes phosphate. This work also evidenced that the cumulative impacts of ocean warming and acidification had negative consequences for DIP uptake, particularly in *S. pistillata*, a species that seems to have a high metabolic demand for phosphorus. Finally, an effective and rapid tool was designed for the investigation of phosphorus and nitrogen limitation within the symbiosis under given experimental conditions. Results obtained with this double enrichment technique showed that DIP uptake is not enhanced by the presence of dissolved inorganic nitrogen, while ammonium uptake is enhanced in the presence of DIP. This result is in favor of a greater limitation by phosphorus than by nitrogen in the symbiosis.

Chapitre 2

L'absorption de phosphore inorganique dissous

Résumé

En dépit de l'importance du PID pour le métabolisme des coraux, les conditions de son absorption restent relativement peu connues. L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été de caractériser les mécanismes cellulaires de son absorption par les coraux et leurs symbiotes, ainsi que l'effet de divers facteurs environnementaux, afin de mieux connaître les capacités d'adaptation des coraux aux changements environnementaux. Les résultats obtenus ont prouvé que le transport de PID est actif, à la fois à la membrane des symbiotes et de l'hôte. Les travaux réalisés ont de plus permis de caractériser le type de transporteur de PID de l'hôte, un symporteur sodium/phosphate. L'absorption de PID est dépendante des concentrations ambiantes de PID à court et long terme, de l'apport de POP par la nutrition hétérotrophe de l'hôte, ainsi que de stocks internes de phosphore situés dans les zooxanthelles. L'effet positif de la lumière sur cette absorption a de plus permis de suggérer un lien avec l'activité photosynthétique des zooxanthelles, un processus consommant du phosphore. Il a également été mis en évidence que les effets cumulatifs du réchauffement et de l'acidification des océans diminuent l'absorption du PID chez les coraux, et par là même affectent leur métabolisme, particulièrement celui de *S. pistillata*, qui semble avoir de forts besoins métaboliques en phosphore. Enfin, un outil a été mis en place pour déterminer de manière rapide et efficace le nutriment limitant pour la symbiose, entre azote et phosphore, dans des conditions expérimentales données. Les résultats obtenus par cette technique, basée sur un double enrichissement, ont montré que l'absorption de PID n'est pas augmentée en présence d'azote inorganique dissous. À l'inverse, l'absorption d'ammonium augmente en présence de PID chez *S. pistillata*. Ce résultat est donc en faveur d'une plus forte limitation de la symbiose par le phosphore que par l'azote.

Figure 15 | Bouture de *Stylophora pistillata*
Photographie d'une bouture lors d'une expérience d'absorption de phosphate.

1 Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude

Comme présenté dans le préambule et dans le chapitre précédent, le phosphore inorganique dissous (ou phosphate, ou PID) est l'une des trois sources de phosphore auquel les coraux ont accès dans la colonne d'eau. Dans les récifs, il présente des concentrations typiquement comprises entre 0,05 et 0,50 µmol L^{-1} (Kinsey et Davies, 1979; Atkinson, 1987b; Furnas, 1991; Atkinson *et al.*, 1995; Charpy, 2001). En dépit de son importance pour les coraux, les conditions de son absorption restent relativement peu connues. Il apparaît que la plupart des études se sont concentrées sur le rôle des zooxanthelles dans l'absorption du PID (Deane et O'Brien, 1981; Jackson et Yellowlees, 1990; Muller-Parker *et al.*, 1990; Belda et Yellowlees, 1995; Todd *et al.*, 2006), tandis que le rôle de l'hôte reste assez méconnu (D'Elia, 1977; Sorokin, 1992).

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été de caractériser les mécanismes cellulaires d'absorption du PID par les coraux et leurs symbiotes, ainsi que l'effet de divers facteurs environnementaux sur cette absorption. Les paramètres suivant ont été testés : lumière, acclimatation à des concentrations élevées de phosphate, nutrition hétérotrophe, effet du changement global, et présence ou absence d'azote (azote inorganique dissous fourni sous forme d'ammonium, NH_4^+, ou de nitrate, NO_3^-).

Ces travaux se basent sur les hypothèses suivantes. 1) L'absorption du PID est probablement active à la membrane de l'hôte, car le phosphate est un élément chargé, qui ne diffuse donc *a priori* pas librement au travers des membranes biologiques, et 2) la lumière a vraisemblablement un effet positif sur l'absorption de PID à la fois par les zooxanthelles et par l'hôte, car la lumière a aussi un effet positif global sur le métabolisme du corail. Il est de plus attendu 3) qu'une forte concentration en PID dans l'eau ou un fort taux de nutrition aient à terme un effet inhibiteur sur l'absorption de PID, car les coraux auront atteint un état de réplétion en phosphore. On s'attend de plus à ce que 4) le stress associé au changement global ait un effet relativement négatif sur l'absorption du PID, comme pour les autres paramètres métaboliques majeurs. Enfin, 5) un enrichissement en azote peut avoir un effet positif sur l'absorption de PID si les coraux sont effectivement limités [27] par l'azote pour leur croissance. Néanmoins, si la limitation la plus directe des coraux se situe au niveau du métabolisme énergétique, il est attendu que le phosphore soit plus limitant que l'azote, et donc qu'un enrichissement en azote ne permette pas d'améliorer l'absorption de PID.

Les paragraphes qui suivent résument les principaux résultats obtenus lors de cette thèse et découlant de ces objectifs et hypothèses. Ces résultats, obtenus pour des boutures du corail tropical *S. pistillata* (figure 15), ont fait l'objet de trois publications dans des revues à comité de lecture

[27] On rappelle que la répartition de l'azote et du phosphore au sein des biomolécules semble en faveur d'une **limitation** de la synthèse protéique et de la croissance par l'azote, et d'une limitation de la synthèse d'ATP et d'ARN, et donc du métabolisme énergétique, par le phosphore.

international (articles 1 à 3), au sein desquelles ils sont discutés en détail.

2 Mécanisme d'absorption du phosphate

Effet de la concentration en phosphate

La vitesse d'absorption du phosphate dépend de sa concentration

Les résultats obtenus durant cette thèse ont confirmé que l'absorption du PID est dépendante de la concentration de PID dans l'eau pour les zooxanthelles isolées (Deane et O'Brien, 1981; Jackson et Yellowlees, 1990) et pour l'hôte (D'Elia, 1977). Il a été montré que cette absorption sature pour des concentrations supérieures à 2,0 µmol L^{-1} dans les conditions expérimentales utilisées (article 1, figure 2, et article 2, figure 1). La relation entre concentration en PID et vitesse d'absorption du PID suit dans les deux cas un modèle mathématique de type cinétique de Monod, dans l'intervalle des concentrations en PID testées (0 à 8,0 µmol L^{-1}). Ce modèle est basé sur l'équation de Michaelis-Menten pour les cinétiques enzymatiques :

$$V_0 = \frac{V_{max}\ [P]}{[P] + K} \qquad \text{(Eqn. 1)}$$

avec les variables V_0 et [P], où V_0 est la vitesse initiale d'absorption du PID (mesurée sur une heure), et [P] est la concentration initiale en PID introduite dans le milieu lors de l'expérience. Les deux constantes cinétiques calculés dans ce modèle sont V_{max}, le taux d'absorption maximal du PID, et K, la concentration à laquelle le taux d'absorption du PID est égal à la moitié de V_{max}. La constante K, dite constante de Michaelis-Menten, représente en fait l'inverse de l'affinité d'un transporteur donné pour son substrat, ici le PID. Plus K est faible, plus le transport se fait efficacement aux faibles concentrations. À l'inverse, plus K est élevé, plus il faut des concentrations élevées pour que le transport soit efficace.

Le transport de phosphate est actif

D'après les lois de la thermodynamique régissant le transport des ions au travers des membranes biologiques, ce résultat exclut la possibilité d'une diffusion passive du PID au travers des membranes des zooxanthelles et de l'hôte, et implique nécessairement soit la présence d'un transport de type facilité (par des perméases[28]), soit la présence d'un mécanisme actif[29] (par des pompes ou des cotransporteurs).

S'il est acquis dans la littérature que le transport du PID est actif à la membrane des zooxanthelles (Jackson et Yellowlees, 1990), ce point reste sujet à débat dans le cas de l'hôte (D'Elia, 1977; Miller et

[28] Les **perméases** sont des transporteurs qui interagissent de façon spécifique avec l'ion qu'ils transportent, et changent de conformation pour permettre ce transport au travers d'une membrane biologique. La diffusion facilitée par les perméases est un processus saturable, régi par une cinétique de type Michaelis-Menten. Ce transport se fait dans le sens du gradient de concentration de l'ion, c'est à dire du compartiment où l'ion est le plus concentré vers celui où il est le moins concentré.

[29] Le **transport actif** se fait quant à lui dans le sens opposé au gradient de concentration d'un ion, c'est à dire du compartiment le moins concentré vers le plus concentré en cet ion. Ce transfert n'étant pas spontané, il nécessite un apport d'énergie. Dans le cas des **pompes**, il y a intervention d'ATP pour libérer de l'énergie, et dans le cas des **cotransporteurs**, le transport actif de l'ion est couplé au passage exergonique d'un autre ion dans le sens de son gradient de concentration.

Yellowlees, 1989). D'après les résultats obtenus, l'hypothèse avancée dans les travaux de D'Elia (1977) d'un transport passif au travers de la membrane de l'hôte est infirmée. Reste maintenant à trancher entre un transport facilité par des perméases et un mécanisme actif. Pour ce faire, il faut connaître le gradient de concentration en jeu pour le PID lors de son transfert de l'eau de mer vers l'intérieur des cellules hôtes. Malheureusement, à ce jour, aucune étude n'a permis de déterminer les concentrations en PID à l'intérieur des cellules de corail. Néanmoins, si l'on se réfère aux concentrations typiquement présentes dans des cellules animales, à savoir 1 à 10 mmol L^{-1} (Lehninger, 1985; Miller et Yellowlees, 1989), on s'attend vraisemblablement à trouver des concentrations de PID du même ordre de grandeur dans le cytoplasme des cellules coralliennes. Ainsi, la comparaison avec les concentrations micromolaires de PID dans l'eau des récifs fait apparaître que le gradient de concentration est opposé au transport du phosphate vers l'intérieur des cellules hôtes. L'hypothèse d'un transport facilité par des perméases est donc abandonnée au profit de celle d'un transport actif.

Caractérisation du transporteur de phosphate de l'hôte

Dans ce contexte, une approche pharmacologique a été choisie pour tenter d'élucider le type de transporteur actif impliqué dans le transport du PID à la membrane hôte. Chez la plupart des animaux, le transporteur mis en jeu appartient à la catégorie des cotransporteurs sodium/phosphate (Virkki *et al.*, 2007; Markovich, 2010). C'est donc cette hypothèse qui a été retenue et testée durant cette thèse.

L'utilisation d'eau de mer sans sodium[30] a permis de confirmer que le PID est vraisemblablement absorbé par un cotransporteur de type sodium/phosphate chez le corail tropical *S. pistillata* (figure 16 et article 2, figure 2). Des cotransporteurs de ce type ont auparavant été caractérisés de manière similaire chez deux autres invertébrés marins, un mollusque du genre *Aplysia* et un oursin (Schneider, 1985; Gerencser *et al.*, 2002).

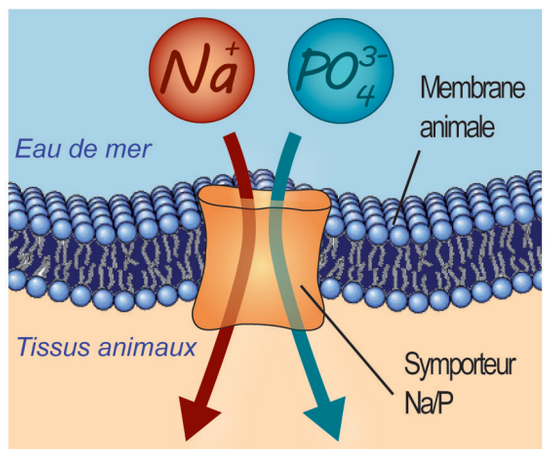


Figure 16 | Transporteur de phosphate de l'hôte
Représentation schématique du cotransporteur sodium/phosphate, de type symporteur, trouvé à la membrane hôte. La stœchiométrie de ce transporteur n'est pas connue.

Comparaison des coraux entiers et des zooxanthelles fraîchement isolées

La comparaison des paramètres cinétiques obtenus pour l'hôte et pour les zooxanthelles fraîchement isolées a démontré que les zooxanthelles présentent une affinité plus forte pour le PID que l'hôte, car elles

[30] Bien que l'ion **sodium**, Na^+, soit l'un des constituants majeurs de l'eau de mer, une approche pharmacologique permet de s'en affranchir en préparant de l'eau de mer artificielle avec son équivalent osmotique, la choline, $C_5H_{14}NO$.

ont un *K* quasiment deux fois plus faible que l'hôte (0,57 ± 0,18 µmol L^{-1} contre 1,08 ± 0,42 µmol L^{-1}; article 1, figure 2).

De manière générale, on considère qu'un transporteur présente une constante de Michaelis-Menten *K* du même ordre de grandeur que la concentration à laquelle il est habituellement confronté pour l'ion considéré (Wright, 1982). Ainsi, ces résultats confirment que les coraux et leurs zooxanthelles semblent effectivement relativement bien adaptés pour une absorption efficace des faibles niveaux de PID présents dans l'eau de mer. De plus, l'affinité plus forte des zooxanthelles semble indiquer qu'elles sont généralement confrontées à une concentration micromolaire de PID au sein de la vacuole périsymbiotique [31], voire à une concentration plus faible que celle à laquelle l'hôte est confronté dans l'eau de mer.

3 Effets de facteurs environnementaux

L'absorption efficace du PID par les coraux et leurs zooxanthelles peut néanmoins être remise en question ou amplifiée par les conditions environnementales. Ainsi, il a auparavant été démontré que la température (D'Elia, 1977) et la lumière (D'Elia, 1977; Jackson et Yellowlees, 1990; Sorokin, 1992) ont un effet positif sur cette absorption chez les coraux et leurs zooxanthelles, tandis que l'apport de phosphore par la nutrition hétérotrophe de l'hôte diminue l'absorption de PID chez l'anémone de mer *Aiptasia pallida* (Muller-Parker *et al.*, 1990). Dans ce contexte, après avoir déterminé les vitesses d'absorption du PID dans des conditions contrôle, l'influence de plusieurs paramètres environnementaux a été testée.

Effet de la lumière, rôle des symbiotes

La mesure de l'absorption du PID à différents éclairements a permis de constater que l'absorption se fait à la fois à l'obscurité et à la lumière, avec un effet positif de l'éclairement autant pour les zooxanthelles que pour l'hôte (article 1, figure 3). Ces résultats permettent de mettre en avant un lien probable avec la photosynthèse des symbiotes, qui est un processus consommant du phosphate pour générer de l'ATP.

Effet d'une acclimatation au phosphate

La culture de boutures durant 8 semaines dans des aquariums continuellement enrichis en PID (selon un dispositif décrit dans le chapitre 5) a permis de montrer que le taux d'absorption du PID diminue avec l'enrichissement. En effet, le PID a été absorbé respectivement 5,3 et 4,9 fois plus rapidement par des coraux cultivés sans ajout de PID que par des coraux cultivés avec 0,5 et 2,5 µmol L^{-1} de PID (article 1, figure 4).

Une telle acclimatation aux niveaux ambiants de phosphate a déjà été observée chez le bénitier et la méduse (Belda et Yellowlees, 1995; Todd *et al.*, 2006), mais pas chez les coraux. Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse qu'il existe probablement un contrôle des taux d'absorption de PID de la symbiose par l'état de

[31] Bien que la **concentration de PID** soit probablement d'ordre millimolaire au sein du cytoplasme des cellules de l'hôte, comme discuté en page précédente, la concentration au sein de la vacuole périsymbiotique semble donc quant à elle bien plus faible. Ceci rejoint les hypothèses de Cook et D'Elia (1988) et Miller et Yellowlees (1989) à ce sujet.

réplétion de stocks internes de phosphore. Ces stocks pourraient être localisés au sein des zooxanthelles. En effet, une mesure du contenu en phosphore total des zooxanthelles des coraux de cette expérience a montré que les symbiotes issus de coraux enrichis en PID sont plus riches en phosphore que ceux issus de coraux contrôles (article 1, figure 5, et chapitre 5). À l'inverse, le contenu en phosphore des cellules de l'hôte reste constant.

Effet de la nutrition

L'utilisation de coraux non nourris durant 1, 3 ou 21 jours a permis de démontrer que le taux d'absorption de PID diminue avec la proximité dans le temps des repas de l'hôte (article 2, figure 4). Il est probable que l'enrichissement en phosphore particulaire apporté par la nutrition soit directement à l'origine de la diminution de l'absorption du PID chez les coraux nourris. Il a de plus été constaté que cet effet de la nutrition s'atténue dès 3 jours sans nourriture (article 2, figure 4), ce qui implique que la vidange des stocks de phosphore apportés par la nutrition hétérotrophe se produit relativement rapidement.

Effet des changements globaux

Le chapitre 1 a été l'occasion d'aborder les effets du changement global sur les récifs coralliens, et notamment la menace que peuvent représenter l'élévation de la température de surface des océans et leur acidification. Outre ces menaces directes pour les coraux, le changement global peut également affecter les cycles biogéochimiques des nutriments comme le phosphore et l'azote (Hutchins *et al.*, 2007; Levitan *et al.*, 2007; Hutchins et Fu, 2008; Beman *et al.*, 2011), ce qui représente un risque potentiel supplémentaire pour les récifs. En effet, la température de l'eau peut influer sur la vitesse de nombreux équilibres chimiques et processus métaboliques. L'acidification influe quant à elle sur la chimie des ions phosphate de l'eau de mer, qui dépend du pH (figure 17). Ainsi, lors d'une acidification depuis le pH actuel de 8,1 à un pH de 7,5, l'abondance relative de HPO_4^{2-} augmente de 82 à 92%, tandis que l'abondance relative du PO_4^{3-} diminue de 18 à 5% (l'abondance relative de $H_2PO_4^-$ restant toujours négligeable). Or, même si le symporteur sodium/phosphate de l'hôte corallien n'a pas été caractérisé plus avant, il est toutefois possible qu'il soit affecté par des changements de la chimie des ions phosphate. En effet, chez les Vertébrés où plus de choses sont connues sur les symporteurs sodium/phosphate, il existe trois familles de symporteurs qui présentent des

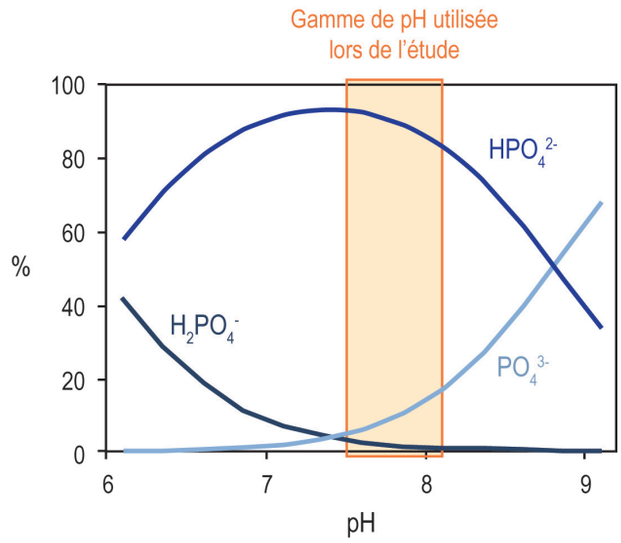


Figure 17 | Chimie des ions phosphate dans l'eau de mer
Abondance relative des différents ions phosphate dans une eau de mer de salinité 35. D'après Millero et Sohn (1992).

affinités distinctes pour les différentes formes de phosphate[32]. Il est donc possible que le symporteur de l'hôte corallien soit également capable de discriminer entre les différentes formes ioniques du phosphate, et donc que son efficacité soit affectée par l'acidification.

Dans ce contexte, afin de tester les effets du changement global sur l'absorption de nutriments par la symbiose corallienne, des boutures ont été cultivées durant 10 jours sous i) trois conditions de pH (8,1, 7,8 et 7,5) à température normale (26°C), ii) trois températures différentes (26, 29 et 33°C) à pH normal (8,1), et iii) trois conditions de pH (8,1, 7,8 et 7,5) à température élevée (33°C). Une durée de culture courte a été délibérément choisie afin d'éviter que les coraux ne blanchissent sous l'effet de l'acidification ou de l'élévation de la température, et d'éviter ainsi les importants stress métaboliques associés à ce phénomène qui pourraient masquer la réponse en terme de besoins en nutriments des coraux. À l'issue des 10 jours d'incubation, le taux d'absorption de PID des boutures a été mesuré[33].

Les résultats obtenus ont révélé que le taux d'absorption de PID n'est pas affecté par un changement du pH seul (article 3, figure 4). À l'inverse, une augmentation de température seule (33°C) a entraîné un accroissement de l'absorption de PID. La combinaison d'une température élevée (33°C) et d'un pH faible (7,5) a entraîné une diminution significative de l'absorption de PID en comparaison avec les taux mesurés dans les conditions contrôle (26°C, pH = 8,1).

L'effet négatif du pH manifesté à température élevée pourrait traduire une préférence du symporteur sodium/phosphate de l'hôte pour l'une ou l'autre des formes ioniques du phosphate, et en particulier pour la forme PO_4^{3-}, dont l'abondance relative diminue avec l'acidification. D'ailleurs, la diminution par 3,6 de l'abondance relative des ions PO_4^{3-} entre un pH de 8,1 et un pH de 7,5 correspond à la diminution par 4 des taux d'absorption de PID entre ces deux pH (article 3, figure 4). Néanmoins, la préférence du symporteur sodium/phosphate de l'hôte reste inconnue à ce jour, et cette hypothèse reste à vérifier. De plus, l'absence d'effet du pH seul à température contrôle (26°C), un phénomène qui a déjà été observé pour le phytoplancton et des macroalgues auparavant (Xu *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2008), peut sembler en contradiction avec cette hypothèse. Néanmoins, une étude réalisée sur la calcification de *S. pistillata* a montré que les effets négatifs de l'acidification ne se manifestent parfois qu'à température élevée (Reynaud *et al.*, 2003).

Quoiqu'il en soit, et bien qu'obtenus lors d'une expérience à relativement court terme, ces résultats indiquent que les effets cumulatifs du réchauffement des océans et de leur acidification pourraient avoir des conséquences négatives pour le métabolisme du phosphore inorganique chez les coraux.

---

[32] Les **symporteurs sodium/phosphate** de la famille de type II présentent une affinité plus forte pour l'ion divalent HPO_4^{2-}, tandis que ceux de la famille de type III présentent une affinité plus forte pour l'ion monovalent $H_2PO_4^-$ (Virkki *et al.*, 2007; Markovich, 2010)

[33] Les **taux d'absorption de nitrate et d'ammonium** ont également été mesurés. Ils ne seront pas discutés ici, mais sont présentés dans l'article 3 et dans l'annexe A.

Effet d'un enrichissement en azote

Cette dernière expérience a visé à aborder de manière directe la question de la limitation par le phosphore ou l'azote dans la symbiose. Pour ce faire, l'absorption de PID a été mesurée en présence de deux formes d'azote inorganique dissous [34], l'ammonium NH_4^+ et le nitrate NO_3^-.

Les résultats obtenus ont montré que l'absorption de PID n'est pas influencée par la présence d'azote inorganique dissous dans le milieu (article 2, figure 3). Ce résultat permet d'affirmer que, dans les conditions de culture testées, la présence d'azote ne permet pas d'améliorer l'utilisation du PID dans le milieu. Ainsi, l'azote n'est pas limitant, ou pas suffisamment limitant, pour que la symbiose modifie ses besoins en phosphore, et donc son métabolisme énergétique, en présence d'azote.

À l'inverse, les résultats présentés dans l'article 2 et dans l'annexe A ont montré que l'absorption d'ammonium était améliorée en présence de PID, ce qui confirme l'hypothèse que le phosphore semble plus limitant que l'azote pour la symbiose.

4 Schéma bilan

La figure 18 présente un bilan des résultats obtenus dans ce chapitre.

[34] De même, les **taux d'absorption de nitrate et d'ammonium** ont également été mesurés, en présence de phosphate. Ils ne seront que très peu discutés ici, mais sont présentés dans l'article 2 et dans l'annexe A.

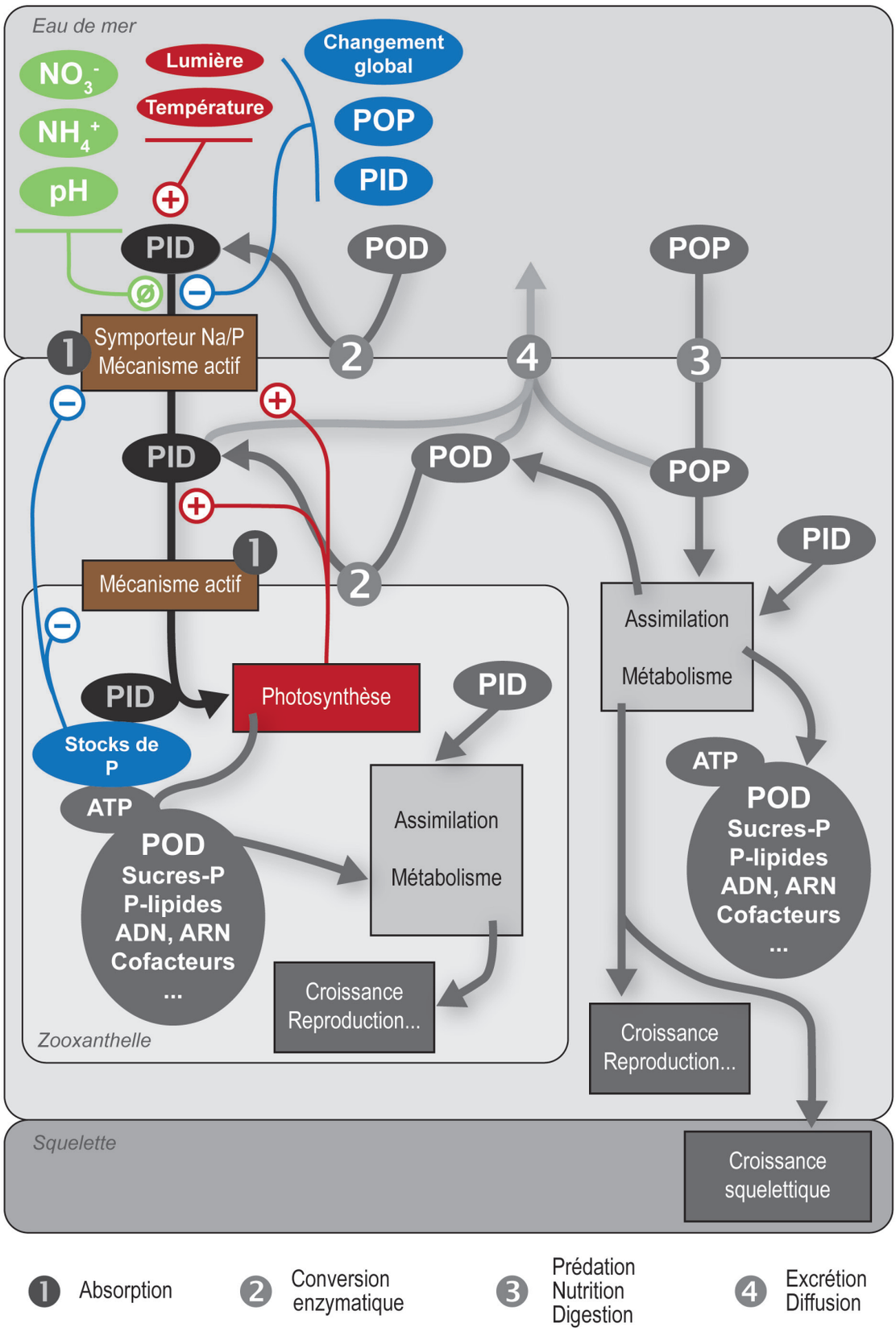


Figure 18 | Bilan de l'absorption du PID dans la symbiose
Les résultats acquis dans le chapitre 2 sont résumés en couleur, sur la base de la Figure 13 (passée en tons de gris pour plus de lisibilité). Vert : paramètre n'ayant pas d'effet. Rouge : paramètre ayant un effet positif. Bleu : paramètre ayant un effet négatif. Noir : voie métabolique considérée.

5

Article 1
Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*

Limnology and Oceanography | 2009

Résumé

Les taux d'absorption de phosphate par le corail tropical *Stylophora pistillata* et ses zooxanthelles symbiotiques sous diverses conditions environnementales ont été mesurés grâce à des expériences de déplétion. Les cinétiques d'absorption de phosphate, de type Michaelis-Menten, ont montré la présence de transporteurs actifs de phosphate à la fois au niveau des membranes animales et des zooxanthelles. Les transporteurs de l'animal et des zooxanthelles ont présenté une affinité différente pour le phosphate, avec une constante de Michaelis-Menten plus grande dans le compartiment animal que dans les symbiotes isolés (K = 1,08 ± 0,42 vs. 0,57 ± 0,18 µmol L^{-1}). La vitesse d'absorption du phosphate a augmenté avec l'intensité lumineuse, suggérant un rapport avec la photosynthèse des zooxanthelles. Une corrélation a été trouvée entre la vitesse d'absorption de phosphate et le passif nutritif, organique ou inorganique, de l'hôte. Des taux d'absorption de phosphate 4,6 fois plus élevés ont en effet été mesurés pour des coraux non nourris durant 8 semaines que pour des coraux nourris. Ces taux étaient également dépendants du taux de réplétion des stocks internes de phosphore des symbiotes. Enfin, cette étude apporte des indices prouvant que les zooxanthelles se comportent comme un puits de phosphore dans la symbiose.

Article 1

Limnol. Oceanogr., 54(5), 2009, 1627–1633
© 2009, by the American Society of Limnology and Oceanography, Inc.

Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*

C. Godinot,* C. Ferrier-Pagès, and R. Grover

Centre Scientifique de Monaco, CSM, Monaco

Abstract

Depletion experiments were used to assess the uptake rates of phosphate by the tropical coral *Stylophora pistillata* and its symbiotic zooxanthellae under different conditions. Our results showed the presence of active phosphate carriers both in the animal and the algal fractions, since uptake kinetics followed uniphasic saturation curves in both compartments (Michaelis–Menten shape). Transporters in the animal and the algae presented different affinities for phosphate, with higher half-saturation constants for the animal compartment than for the isolated zooxanthellae (K = 1.08 ± 0.42 vs. 0.57 ± 0.18 μmol L^{-1}). The velocity of phosphate absorption increased in the light, suggesting a relationship with the photosynthetic activity of the zooxanthellae. A correlation was found between phosphate uptake rates and the organic or inorganic feeding history of the corals; rates were indeed 4.6 times higher in 8-week starved than in fed corals and depended on the repletion status of phosphorus stocks within the symbionts. We report evidence showing that zooxanthellae act as a sink of phosphate within the symbiosis.

Coral reefs mainly thrive in shallow oligotrophic coastal areas of tropical and subtropical seas (Bythell 1990; Furnas 1991; Szmant 2002). Even though concentrations of nutrients such as nitrogen and phosphorus are usually below 0.5 μmol L^{-1} in the surrounding waters (Atkinson 1987; Furnas 1991; Atkinson et al. 1995), reefs represent a large biomass and are considered to be oases in a blue desert. One of the explanations lies in the fact that corals harbor endosymbiotic dinoflagellates called zooxanthellae (zoox; Muscatine 1980), which actively take up dissolved nutrients (Pomeroy and Kuenzler 1967; Muscatine 1980) and transform them into organic molecules through their photosynthesis. Photosynthates are in turn transferred to the host for its own metabolism (Muscatine and Porter 1977). Knowledge of nutrient uptake rates by scleractinian corals is therefore crucial for a better understanding of the functioning of reefs.

Phosphorus is one of these key nutrients in marine environments (Benitez-Nelson 2000; Elser et al. 2007) because it enters into the composition of many biological molecules (deoxyribonucleic acids, ribonucleic acids, phospholipids) and has a role in most biochemical mechanisms (e.g., via the energetic role of adenosine triphosphate). It occurs in the form of dissolved orthophosphates (P_i), condensed phosphates (pyrophosphate, metaphosphate, and other polyphosphates), and phosphorus bound to organic molecules (phosphate esters, phosphonates) either in dissolved or particulate forms (detritus and in the body of aquatic organisms; Karl and Björkman 2002). Autotrophs can mainly use the biologically available phosphorus, which consists in P_i and a small biolabile fraction of dissolved organic phosphorus (Karl and Björkman 2002).

In the oligotrophic waters surrounding coral reefs, inorganic forms of phosphorus display a characteristic depletion (Baturin 2003), and concentrations are well below 0.5 μmol L^{-1} (Furnas 1991). Several studies performed at the community level (integrating multiple compartments such as coral species, macro and microalgae, invertebrates, sponges, and bottom sediment) have shown that phosphorus is a key nutrient (Atkinson 1987; Sorokin 1992; Atkinson et al. 1995) since it is efficiently absorbed, generally in direct proportion to its ambient concentration in seawater (for phosphate concentrations of 1–7 μmol L^{-1}; Atkinson 1987). Some studies have also assessed the uptake rates of phosphate in specific symbiotic organisms such as in the sea anemone *Aiptasia pallida* (Verril 1864; Muller-Parker et al. 1990), the giant clam *Tridacna gigas* (Linné 1758; Belda and Yellowlees 1995), or the jellyfish *Cassiopea xamachana* (Bigelow 1892; Todd et al. 2006), all showing that phosphorus is taken up by the dinoflagellates living in symbiosis with those organisms. Uptake of phosphate by specific scleractinian corals has attracted much less attention than the whole reef community, and most studies focused on phosphate uptake by isolated zooxanthellae (cultured or freshly isolated; Deane and O'Brien 1981; Jackson and Yellowlees 1990; R. Kelty unpubl. data) rather than by the entire coral colony (D'Elia 1977). In the only studies on isolated corals, D'Elia (1977) and Sorokin (1992) showed that, at low ambient phosphorus concentrations, symbiotic corals took up and concomitantly released phosphorus. Uptake was light sensitive, suggesting that zooxanthellae influenced the phosphorus fluxes in their host. An active transport was also suggested, with a half-saturation constant K equal to 0.375 μmol L^{-1} (D'Elia 1977), but the location of the active transport sites could not be determined. The light enhancement of phosphorus uptake and the active transport of phosphorus were not confirmed in the other symbiotic association of *A. pallida* (Muller-Parker et al. 1990).

This study provides additional and new information concerning phosphate uptake by the scleractinian coral *Stylophora pistillata* (Esper 1797). Parallel experiments

* Corresponding author: cgodinot@centrescientifique.mc

Article 1

5

Article 1

Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*

C. Godinot[1,2], C. Ferrier-Pagès[1], and R. Grover[1]

Limnology and Oceanography | 2009

Abstract

Depletion experiments were used to assess the uptake rates of phosphate by the tropical coral *Stylophora pistillata* and its symbiotic zooxanthellae under different conditions. Our results showed the presence of active phosphate carriers both in the animal and the algal fractions, since uptake kinetics followed uniphasic saturation curves in both compartments (Michaelis–Menten shape). Transporters in the animal and the algae presented different affinities for phosphate, with higher half-saturation constants for the animal compartment than for the isolated zooxanthellae (K = 1.08 ± 0.42 vs. 0.57 ± 0.18 µmol L^{-1}). The velocity of phosphate absorption increased in the light, suggesting a relationship with the photosynthetic activity of the zooxanthellae. A correlation was found between phosphate uptake rates and the organic or inorganic feeding history of the corals; rates were indeed 4.6 times higher in 8-week starved than in fed corals and depended on the repletion status of phosphorus stocks within the symbionts. We report evidence showing that zooxanthellae act as a sink of phosphate within the symbiosis.

Running head | Phosphate uptake by corals

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc

Introduction

Coral reefs mainly thrive in shallow oligotrophic coastal areas of tropical and subtropical seas (Bythell 1990; Furnas 1991; Szmant 2002). Even though concentrations of nutrients such as nitrogen and phosphorus are usually below 0.5 µmol L^{-1} in the surrounding waters (Atkinson 1987; Furnas 1991; Atkinson et al. 1995), reefs represent a large biomass, and are considered as oases in a blue desert. One of the explanations lies in the fact that corals harbor endosymbiotic dinoflagellates called zooxanthellae (zoox; Muscatine 1980), which actively take up dissolved nutrients (Pomeroy and Kuenzler 1967; Muscatine 1980), and transform them into organic molecules through their photosynthesis. Photosynthates are in turn transferred to the host for its own metabolism (Muscatine and Porter 1977). Knowledge of nutrient uptake rates by scleractinian corals is therefore crucial for a better understanding of the functioning of reefs.

Phosphorus is one of these key nutrients in marine environments (Benitez-Nelson 2000; Elser et al. 2007), because it enters into the composition of many biological molecules (deoxyribonucleic acids, ribonucleic acids, phospholipids) and has a role in most biochemical mechanisms (e.g., via the energetic role of adenosine triphosphate (ATP)). It occurs in the form of dissolved orthophosphates (P_i), condensed phosphates (pyro-, meta-, and other polyphosphates), and phosphorus bound to organic molecules (phosphate esters, phosphonates…), either in dissolved or particulate forms (detritus and in the body of aquatic organisms; Karl and Björkman 2002). Autotrophs can mainly use the 'biologically available phosphorus' (BAP), which consists in P_i and a small biolabile fraction of dissolved organic phosphorus (Karl and Björkman 2002).

In the oligotrophic waters surrounding coral reefs, inorganic forms of phosphorus display a characteristic depletion (Baturin 2003), and concentrations are well below 0.5 µmol L^{-1} (Furnas 1991). Several studies, performed at the community level (integrating multiple compartments such as coral species, macro and microalgae, invertebrates, sponges, and bottom sediment) have shown that phosphorus is a key nutrient (Atkinson 1987; Sorokin 1992; Atkinson et al. 1995), since it is efficiently absorbed, generally in direct proportion to its ambient concentration in seawater (for phosphate concentrations of 1-7 µmol L^{-1}; Atkinson 1987). Some studies have also assessed the uptake rates of phosphate in specific symbiotic organisms such as in the sea anemone *Aiptasia pallida* (Verril 1864; Muller-Parker et al. 1990), the giant clam *Tridacna gigas* (Linné 1758; Belda and Yellowlees 1995), or the jellyfish *Cassiopea xamachana* (Bigelow 1892; Todd et al. 2006), all showing that phosphorus is taken up by the dinoflagellates living in symbiosis with those organisms. Uptake of phosphate by specific scleractinian corals has attracted much less attention than the whole reef community, and most studies focused on phosphate uptake by isolated zooxanthellae (cultured or freshly isolated; Deane and O'Brien 1981; Jackson and Yellowlees 1990; R.

Kelty unpubl.) rather than by the entire coral colony (D'Elia 1977). In the only studies on isolated corals, D'Elia (1977) and Sorokin (1992) showed that, at low ambient phosphorus concentrations, symbiotic corals took up and concomitantly released phosphorus. Uptake was light sensitive, suggesting that zooxanthellae influenced the phosphorus fluxes in their host. An active transport was also suggested, with a half-saturation constant *K* equal to 0.375 µmol L^{-1} (D'Elia 1977), but the location of the active transport sites could not be determined. The light enhancement of phosphorus uptake and the active transport of phosphorus were not confirmed in the other symbiotic association of *A. pallida* (Muller-Parker et al. 1990).

This study provides additional and new information concerning phosphate uptake by the scleractinian coral *Stylophora pistillata* (Esper 1797). Parallel experiments were performed with the entire coral association and with zooxanthellae freshly isolated from the same coral colonies (FIZ) to understand the respective role of the host and symbionts in the uptake of phosphate, localize the active uptake sites, and compare the kinetics parameters between the two models. The *K* value, for example, differs widely from one study to another: for FIZ, it ranged from < 0.02 µmol L^{-1} (Deane and O'Brien 1981) to 14 µmol L^{-1} (Jackson and Yellowlees 1990). We specified the effect of light on the phosphate uptake by FIZ, since both a dark (Deane and O'Brien 1981) and a light-enhancement (Jackson and Yellowlees 1990) were observed. Finally, we highlighted some effects of inorganic and organic supply of phosphorus on the uptake rates of phosphate by *S. pistillata*. The results obtained bring new insights into the location of phosphorus pools in the colony and on the importance of feeding in getting phosphorus from the environment.

Methods

Organisms and culture conditions

Colonies of the zooxanthellate coral *S. pistillata* were obtained from the Red Sea, and maintained at the Centre Scientifique de Monaco (CSM) under controlled conditions in aquaria (26°C, Hydrargyrum Quartz Iodide lights (HQI), with a 12 h:12 h dark:light cycle, salinity of 38). Aquaria were continuously provided with unfiltered seawater pumped at 50 m depth. The 120 nubbins (i.e., branch tips) used during the experiments were prepared by cutting branches (2.5 ± 1.0 cm long and 0.6 ± 0.3 cm in diameter) of about ten parent colonies with pliers (E. Tambutté unpubl.), 1.5 month before the experiments. Nubbins were attached on nylon wires and suspended in aquaria until tissue fully covered the skeleton. They were lightly fed (once a week) with *Artemia salina* (Linné 1758) nauplii.

Phosphate uptake by coral nubbins

Phosphate uptake by coral nubbins was studied with a series of 3 experiments, in which the depletion of phosphate was followed over time in phosphate-enriched beakers. Unless otherwise specified, all depletion experiments were performed under the following conditions. Six 200 mL beakers were maintained in a water bath at 26°C, under a photosynthetic active radiation (PAR) of 220 µmol m^{-2} s^{-1} supplied by 400W HQI lights and measured

using a spherical quantum sensor (LiCor LI-193). Five coral nubbins, each suspended to a nylon wire, were introduced in separate beakers. A beaker without coral served as a control for changes in phosphate concentrations due to adsorption onto the beaker surface or to consumption by microbial activity. 30 min after nubbins were placed in the beakers (acclimatization period), a buffer solution of KH_2PO_4 (10 mmol L^{-1}) was added to reach the desired initial phosphate concentration. Magnetic stirring bars ensured proper phosphate homogenization. A 10 mL water sample was taken from each beaker immediately after enrichment and then every 15 min for 90 min. Samples were frozen right away, and phosphate concentrations were measured no longer than a week after sampling. Levels of phosphate were determined by spectrophotometry on thawed samples, using the ascorbic acid technique (Murphy and Riley 1962).

Initial uptake rates of phosphate (V_0) were calculated from the quantity absorbed by each nubbin in 60 min, after correction of phosphate concentrations for the diminution of the beaker volume. Uptake rates were normalized to the total chlorophyll (Chl) content, or the zooxanthellae concentration, or the surface area of the nubbins. Surface area was measured using the wax technique (Stimson and Kinzie 1991). Chlorophyll *a* and *c2* were extracted twice in 99% acetone (24 h at 4°C). The extracts were centrifuged at 11,000 x *g* for 10 min at 4°C and the absorbances measured at 630, 663, and 750 nm. Chlorophyll contents were computed according to the 100% acetone equations of Jeffrey and Humphrey (1975). Zooxanthellae were removed with a Water-Pik and counted using a counting chamber and an improved version of the Histolab v.5.2.3 image analysis software (Microvision).

Concentration dependence of phosphate uptake

Uptake rates of phosphate were measured at the following concentrations: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, and 3.5 µmol L^{-1}. Five nubbins were used for each concentration tested.

Light effect on phosphate uptake rates

Coral nubbins were incubated in 3.0 µmol L^{-1} phosphate either in light (200 or 300 µmol m^{-2} s^{-1}) or dark conditions. For each condition, 5 nubbins were considered. During dark measurements, nubbins were collected shortly after the end of the dark cycle in the culture room.

Phosphate uptake by freshly isolated zooxanthellae (FIZ)

FIZ were extracted from coral nubbins maintained under the above regular conditions. Tissue was separated from the skeleton using a Water-Pik and zooxanthellae were further purified by repeated centrifugations (2000 rpm for 5 min at 25°C) and re-suspension in seawater (Johannes and Weibe 1970). Three washes were necessary to obtain clean zooxanthellae. Before each experiment, zooxanthellae were isolated from 3 nubbins, and pooled in order to minimize variability among nubbins. They were then re-suspended together in seawater and the mixture was used to inoculate 3 phosphate-enriched beakers. Subsamples of this solution were used to determine zooxanthellae concentrations (as described above). Initial uptake rates of phosphate were calculated as the quantity of phosphate absorbed by each zooxanthella in 60 min.

Concentration dependence of phosphate uptake

Uptake rates of phosphate by FIZ were measured at the following concentrations: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, and 8.0 µmol L^{-1}. A beaker without FIZ served as a control for changes in phosphate levels due to microbial activity or adsorption. A water sample of 10 mL was taken from each beaker immediately after enrichment and then every 20 min for 60 min. Samples were immediately filtered (0.45 µm membrane filters) in order to separate FIZ from the water, and filtrates frozen. Levels of phosphate were determined on thawed filtrates as described previously. Preliminary tests showed that filtration of the samples did not induce any contamination and that phosphate retention on filters was negligible.

Light effect on phosphate uptake rates

FIZ were incubated in 3.0 µmol L^{-1} phosphate either in light (200 and 300 µmol m^{-2} s^{-1}) or dark conditions. During dark measurements, FIZ were isolated shortly after the end of the dark cycle in the culture room. Samples were filtered as described above.

Effects of long-term phosphate exposure on corals

Nubbins were cultured for 8 weeks in a separate experimental design of 6 tanks (3 duplicates), in which concentrated buffer solutions of phosphate were continuously pumped with a peristaltic pump. Seawater with trace phosphate concentration (< 0.05 µmol L^{-1}) was also continuously pumped, in order to obtain final phosphate concentrations of c.a. 0, 0.5, or 2.5 µmol L^{-1}. The seawater flow rate was ca. 1.2 L h^{-1}. Temperature, irradiance, and salinity were the same as previously described. Nubbins were not fed. Phosphate uptake rates were assessed after 8 weeks of incubation for 5 nubbins per condition (as described above), and zooxanthellae density as well as phosphorus contents within host tissue and algal cells were measured on 3 nubbins per condition. For this purpose, coral tissue was isolated from the skeleton using a Water-Pik, and was then homogenized using a Potter grinder. Subsamples of this solution were used to determine zooxanthellae concentrations (as described above). Homogenates were filtered on pre-heated GF/C filters (500°C for 1 h) in order to separate zooxanthellae from animal tissue in solution. Filtrates and filters were then treated as follows, in order to transform organic phosphorus into dissolved phosphate. Filtrates were acidified to a pH<2 with concentrated hydrochloric acid, and were then photo-oxidized (ultraviolet for 20 min). Filters were ashed in a muffle furnace (500°C for 1 h), dissolved in boiling hydrochloric acid (105°C for 2 h), and the obtained solutions were then filtered using 0.45 µm membrane filters. Levels of phosphate were determined on both filtrates as described previously. Results were normalized to the surface area of the nubbins and to the zooxanthellae concentrations, measured as described above.

Statistical analyses

Normality and homoscedasticity of data were tested using frequency histograms and Shapiro-Wilk tests (R version 2.2.0). Concentration dependence of phosphate uptake was studied using GraphPad Prism (version 5.0). K and V_{max} were compared between nubbins and FIZ using t-tests (StatView version 5.0). 1-way analysis of variance (ANOVA) tests, followed by

protected least significant difference (PLSD) Fisher tests, were performed to identify the effect of long-term phosphate acclimatization on its absorption by nubbins. Light dependence of phosphate uptake in FIZ and nubbins was tested using a 2-way ANOVA. As the normality assumption was not met for phosphorus and zooxanthellae concentrations inside the corals, those data were compared using non parametric Kruskal-Wallis tests, followed by Man-Whitney post hoc tests. Data from the 8-week enrichment did not differ among duplicate aquaria from the same treatment, and obtained results from those duplicates were pooled together for statistical analysis.

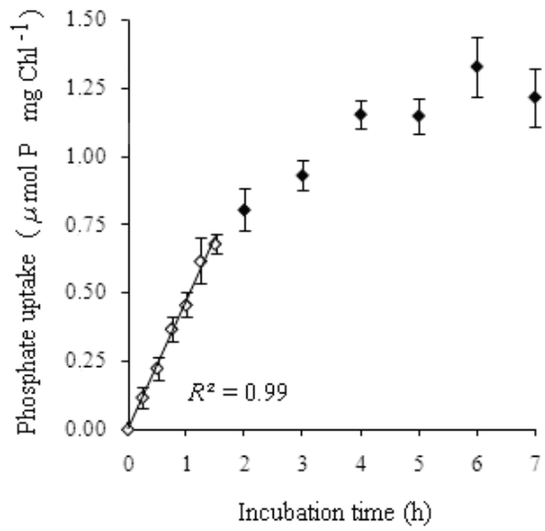


Figure 1 | Phosphate uptake (μmol P mg total Chl^{-1}) for *S. pistillata* during a 7 h incubation in 3.0 μmol L^{-1} phosphate. The curve presents a linear portion between 0 and 90 min (white dots). Each point represents the mean ± SE of 5 nubbins.

Results

Phosphate uptake by nubbins and FIZ

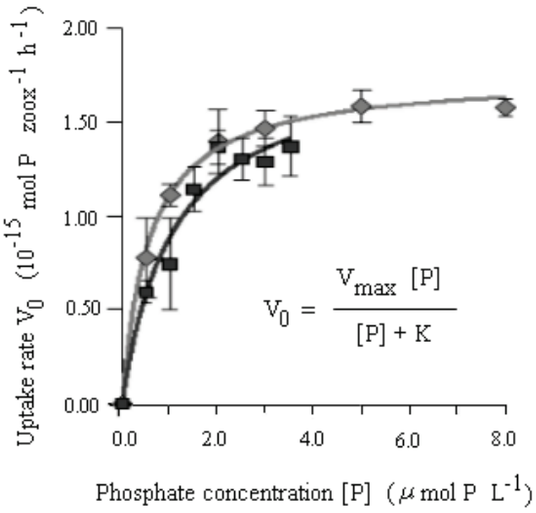
During each depletion experiment, phosphate uptake was linear during more than 60 min both for whole colonies (nubbins; Fig. 1) and FIZ. Kinetics experiments (Fig. 2) revealed that uptake of phosphate occurred via an active carrier-mediated mechanism in both colonies and FIZ, since initial uptake rates (V_0) followed a Michaelis-Menten model:

$$V_0 = \frac{V_{max}\ [P]}{[P] + K} \qquad \text{(Eqn. 1)}$$

where [P] is the initial phosphate concentration, V_{max} the maximum phosphate uptake rate and K the concentration at which phosphate uptake is half-maximal. K represents the inverse of the affinity of the active carrier-mediated mechanism towards phosphate. From the Michaelis-Menten fitting, uptake rates of whole colonies (1.85 ± 0.25 x 10^{-15} mol zoox^{-1} h^{-1}) and isolated zooxanthellae (1.75 ± 0.12 x 10^{-15} mol zoox^{-1} h^{-1}) were similar (*t*-test, p = 0.07, df = 3; Fig. 2). However, affinity constants differed significantly (*t*-test, p < 0.001, df = 3; Fig. 2), as the K calculated for FIZ (0.57 ± 0.18 µmol L^{-1}) was almost twice lower than that of nubbins (1.08 ± 0.42 µmol L^{-1}). In both cases, phosphate uptake saturated for concentrations of ca. 2.0 µmol L^{-1}.

Phosphate uptake occurred both in the dark and in the light (Fig. 3), but with significantly higher rates in the light (2 way-ANOVA, p < 0.001, F_2=84.9), both in nubbins and FIZ. Dark uptake rates (0.19 and 0.26 µmol mg Chl^{-1} h^{-1} for nubbins and

Article 1



	FIZ	Corals
V_{max}	1.75 ± 0.12	1.85 ± 0.25
K	0.57 ± 0.18	1.08 ± 0.42

Figure 2 | Concentration-dependent uptake of phosphate (10^{-15} mol P zoox^{-1} h^{-1}) in freshly isolated zooxanthellae (FIZ, light grey dots) and whole *S. pistillata* nubbins (dark grey squares). Each point represents the mean ± SE of 5 nubbins or 3 FIZ. Corresponding kinetics parameters are indicated in the table below. V_{max} is the maximum phosphate uptake rate (10^{-15} mol P zoox^{-1} h^{-1}) and K the solute concentration at which phosphate uptake is half-maximal (μmol L^{-1} phosphate).

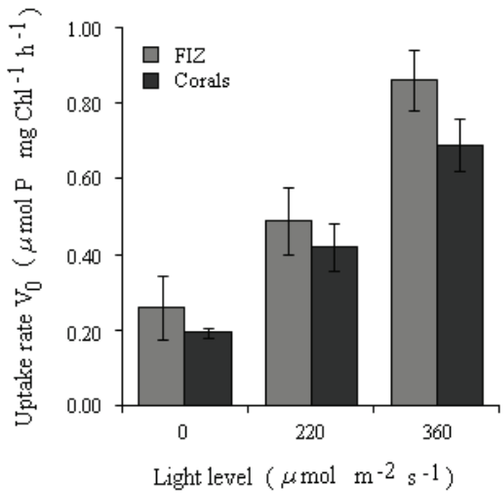


Figure 3 | Light-dependent uptake of phosphate (µmol P mg total Chl^{-1}) in *S. pistillata* nubbins and FIZ incubated in 3.0 µmol L^{-1} phosphate. Each bar represents the mean ± SE of 5 nubbins or 3 FIZ. Light was measured using a Li-Cor instrument and is expressed as μmol m^{-2} s^{-1} PAR.

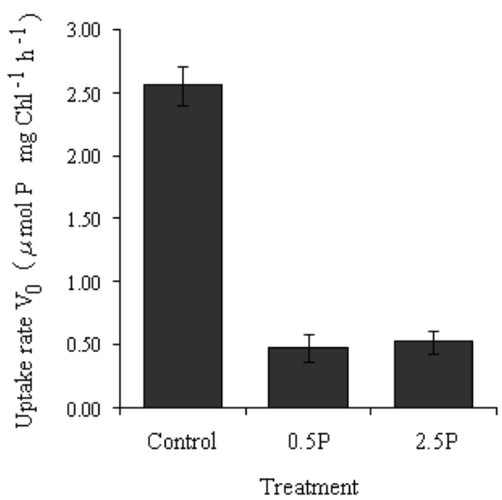


Figure 4 | Effect of the phosphate past history on initial phosphate uptake rates (μmol P mg total Chl^{-1}) in *S. pistillata*. Incubations were performed with 3.0 µmol L^{-1} phosphate after a long-term acclimatization, performed as a continuous phosphate enrichment of 0, 0.5, or 2.5 µmol L^{-1} phosphate (Control, 0.5 P, and 2.5 P, respectively) during 8 weeks. Each bar represents the mean ± SE of 5 nubbins.

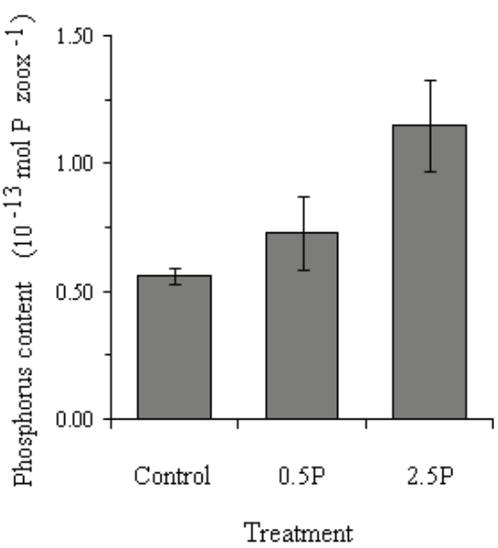


Figure 5 | Phosphorus content per zooxanthellae of *S. pistillata* nubbins maintained during 8 weeks under continuous phosphate enrichments of 0, 0.5, or 2.5 µmol L^{-1} (Control, 0.5 P, and 2.5 P, respectively). Each bar represents the mean ± SE of 3 nubbins.

FIZ respectively; Fig. 3) represented 46% and 53% of uptake rates measured at 220 µmol photons m^{-2} s^{-1} (0.42 and 0.49 µmol mg Chl^{-1} h^{-1} for nubbins and FIZ respectively). A 63.6% light increase between 220 and 360 µmol photons m^{-2} s^{-1} led to a corresponding 64.3% and 69.0% increase in V_0 for nubbins and FIZ respectively. For each light level, uptake rates of FIZ and nubbins were not significantly different (2 way-ANOVA, p =0.054, F_2=10.7).

Effects of long-term phosphate exposure on corals

Corals exposed 8 weeks to phosphate-enriched seawater significantly changed their uptake rates of phosphate. Indeed, a solution of 3.0 µmol L^{-1} phosphate was taken up 5.3 and 4.9 times faster by control corals cultured without phosphate addition than by corals cultured either with 0.5 or 2.5 µmol L^{-1} phosphate (1-way ANOVA, $p < 0.0001$, $F_2 = 99.68$; Fig. 4). Uptake rates of enriched corals were not significantly different (PLSD Fisher test, $p = 0.79$, df = 8).

Corals exposed to phosphate-enriched seawater however presented the same phosphorus content per skeletal surface area in the animal tissue (0.15 ± 0.01 µmol P cm^{-2}; Kruskal-Wallis test, $p = 0.30$, df = 2). On the contrary, phosphorus content was significantly higher in zooxanthellae of the 2.5 µmol L^{-1} phosphate-enriched corals, than in zooxanthellae from the control treatment (Mann-Whitney test, $p < 0.05$, df = 5), both when normalized per zooxanthellae cell (Fig. 5) and per skeletal surface area (0.24 ± 0.02 and 0.34 ± 0.05 µmol P cm^{-2} for zooxanthellae from the control and 2.5 µmol L^{-1} P treatment respectively). The phosphorus content of the zooxanthellae from the lowest phosphate enrichment and the control were not significantly different (Mann-Whitney test, p = 0.51; Fig. 5). Zooxanthellae levels were also not significantly different between the treatments (3.80 ± 0.27 x 10^6 cells cm^{-2}; Kruskal Wallis tests, $p = 0.30$, df = 2).

Discussion

This paper presents the kinetics of phosphate uptake by the entire symbiotic association and the isolated zooxanthellae of the scleractinian coral *S. pistillata*. Such comparison of the two systems under the same experimental conditions brings new insights into the functioning of the symbiosis, and confirmed the previous observations made separately on corals (D'Elia 1977) and isolated zooxanthellae (Deane and O'Brien 1981; Jackson and Yellowlees 1990), that phosphate uptake displays saturation kinetics, indicating that it is mediated by carriers. Our results however showed that carriers were present both in the animal and the algal fractions, since uptake kinetics followed uniphasic saturation curves in both compartments (Michaelis-Menten shape). This result is different from the first conclusions of D'Elia (1977), who suggested that active transport uptake sites were located only in the zooxanthellae, with a diffusion of phosphate through coral tissue. However, the fact 1) that phosphate is an anion at seawater and physiological pH, 2) that membrane potential across the plasma membrane, the symbiosome, and the zooxanthellae membrane is negative, and that 3) phosphate concentrations in animal cells typically range from 1 to 10 mmol L^{-1} (Lehninger

1985; Miller and Yellowlees 1989), does not support a diffusion of phosphate through the animal membranes or a passive transport along an electrochemical gradient. Carrier-mediated uptake of phosphate should therefore be active both in animal cells and FIZ. Active uptake implies the presence of pumps or ionic exchange transporters allowing organisms to retrieve phosphate ions from the external medium and transport them across biological membranes. The nature of the transporters remains to be characterized, using either pharmacological or molecular approaches. If we refer to the observations made in marine invertebrates (Gerencser et al. 2002), an active sodium-stimulated phosphate transport across coral membranes might be involved.

Our study also showed that transporters in the animal and the algae presented different affinities for phosphate, since the half-saturation constants *K* of the two systems were significantly different. The animal compartment indeed presented a lower affinity than the isolated zooxanthellae (K = 1.08 ± 0.42 vs. 0.57 ± 0.18 µmol L^{-1}). Though phosphate concentrations may be in the millimolar range in coral and zooxanthellae cells, concentrations adjacent to the zooxanthellae in hospite, (i.e., in perisymbiotic vesicles), are not known. If we draw an analogy with most transporter systems, which usually display half-saturation constant values close to substrate concentrations in their environment (Wright 1982), the very low *K* of isolated zooxanthellae may indicate that they are subjected to micromolar phosphate levels. There might therefore be a limitation of phosphate fluxes toward zooxanthellae by the host via the activity of phosphate carriers present on perisymbiotic membranes; but this speculative suggestion needs to be verified, as FIZ may behave differently than in hospite zooxanthellae.

The half-saturation constant calculated in the present study for the coral colony (1.08 ± 0.42 µmol L^{-1}) is slightly higher, but in the same range, as those measured for 3 other scleractinian corals (0.38 µmol L^{-1}; D'Elia 1977). The V_{max} is similar in both studies, equal to 0.29 (D'Elia 1977) and 0.38 (this study) µmol P mg Chl^{-1} h^{-1}. Overall, these parameters demonstrate that corals are indeed well adapted for a rapid acquisition of phosphate. This sub-optimal uptake rate measured at phosphate concentrations typically occurring in tropical oligotrophic waters (V_0(0,5 µmol L^{-1}) < V_{max}) can be linked to the hypothesis expressed by Jackson and Yellowlees (1990), who suggested that zooxanthellae are adapted for rapid uptake in the presence of transient phosphate enrichment.

The *K* obtained with the FIZ (0.57 ± 0.18 µmol L^{-1}) is 10 times higher than the values measured by Deane and O'Brien (1981) on cultured zooxanthellae, but also 30 times lower than the value obtained by Jackson and Yellowlees (1990) with zooxanthellae freshly isolated from the coral *Acropora formosa* (Dana 1846). This large discrepancy can be due to different phosphorus pools in the zooxanthellae considered. Indeed, several authors already observed a decrease in uptake rates of isolated or cultured zooxanthellae following exposure to phosphate (Deane and O'Brien 1981; Jackson and Yellowlees 1990; R. Kelty unpubl.). Such 'acclimatization' to phosphate was also observed in the entire coral colony (this work ; Fig. 4) and in two other symbioses, such as in the clam *T. gigas* (Belda and Yellowlees 1995) or the jellyfish *C. xamachana* (Todd et al.

2006). Those results suggest the adaptation of uptake rates to the repletion status of phosphorus pools inside the symbiotic association.

Measurements of the phosphorus content of nubbins after 8 weeks of exposure to phosphate showed that only zooxanthellae were phosphorus-enriched at the end of the experiment, thus demonstrating that zooxanthellae represent the only sink of inorganic phosphorus within the symbiotic association, while animal cells present a homeostatic regulation of phosphorus levels. Similar results were reported for dissolved inorganic forms of nitrogen in *S. pistillata*, with a rapid translocation of nitrate and ammonium toward the zooxanthellate fraction. This seems logical when we consider that animals in general, and non-symbiotic cnidarians in particular, are not able to effect net uptake of external inorganic nutrients (Muller-Parker et al. 1990) and generally excrete those nutrients into the surrounding water (D'Elia 1977; Muscatine and D'Elia 1978; Muscatine et al. 1979). In contrast, symbiotic cnidarians, owing to the presence of algae in their tissue, are able to take up, retain, and incorporate inorganic nutrients from seawater at micromolar or even nanomolar concentrations.

This paper also highlights the effects of two other parameters on phosphate uptake, light and particulate feeding. The velocity of phosphate absorption by *S. pistillata* nubbins and its FIZ increased in the light. Except two contrary results obtained by Muller-Parker et al. (1990) on the starved sea anemone *A. pallida* and Deane and O'Brien (1981) on cultured and freshly isolated zooxanthellae, light-enhancement is a general trend observed in several phytoplankton species (Reshkin and Knauer 1979; Nalewajko and Lee 1983), in zooxanthellae isolated from corals (Jackson and Yellowlees 1990), as well as in hermatypic corals (D'Elia 1977; Sorokin 1992). Stimulation of phosphate absorption by light in corals and FIZ confirms the major role of zooxanthellae in this process, via their photosynthetic activity. Concerning the feeding effect, even though this effect on phosphate uptake has not been directly tested in the present study, the comparison of results obtained for nubbins used during phosphate uptake experiments and those of control corals from the 8-week enrichment indirectly demonstrates the influence of particulate feeding (zooplankton) on phosphate uptake by *S. pistillata*: the first corals were lightly fed (once a week) with *A. salina* nauplii, while the latter were starved during the 8 weeks of enrichment. Phosphate uptake rates were 4.6 times higher for starved corals, indicating that those corals became phosphorus-depleted over 8 weeks. A similar trend was observed in another cnidarian, *A. pallida* (Muller-Parker et al. 1990), with uptake rates 10-50 times higher in 1 month-starved anemones than in daily-fed animals. Effects of light and particulate feeding underline the fact that phosphate acquisition from the surrounding seawater is controlled both by zooxanthellae and by their coral hosts. One remaining question is to know if organic forms of phosphorus are stocked in the tissue of the coral animal, or, like inorganic phosphorus, are transferred to the zooxanthellae.

Even if phosphate represents an important source of phosphorus for zooxanthellae, it is not the only form available in coral reefs. Several studies have shown the importance of organic phosphorus for the coral hosts (Johannes et al. 1970) and their

symbionts (Jackson et al. 1989; Annis and Cook 2002). Organic phosphorus can be taken up by corals via particulate feeding (zooplankton and other forms of particulate organic matter; Johannes et al. 1970) or via the activity of excreted alkaline phosphatases (APA; Annis and Cook 2002) or acid phosphatases (Jackson et al. 1989), for which the existence was shown in isolated zooxanthellae. In order to better understand how the host can regulate its symbionts' phosphate uptake, and whether or not hosts can be responsible of a phosphorus limitation for their zooxanthellae, it seems important to further this study by a quantification of the importance of organic phosphorus uptake as compared to that of phosphate.

Acknowledgements

We thank Denis Allemand for useful comments on this manuscript. We are grateful to Cécile Rottier and Nicolas Tolstoï for assistance in phosphate measurements and aquaria maintenance. We also thank two anonymous reviewers for useful comments on this manuscript. Financial support was provided by funds from the Ecole Normale Supérieure to C. Godinot and from the Centre Scientifique de Monaco.

References

Atkinson, M. J. 1987. Rates of phosphate uptake by coral reef flat communities. Limnol. Oceanogr. **32:** 426-435.

Atkinson, M. J., B. Carlson, and G. L. Crow. 1995. Coral growth in high-nutrient, low-pH seawater: a case study of corals cultured at the Waikiki Aquarium, Honolulu, Hawaii. Coral Reefs **14:** 215-223.

Belda, C. A., and D. Yellowlees. 1995. Phosphate acquisition in the giant clam-zooxanthellae symbiosis. Marine Biology **124:** 261-266.

Benitez-Nelson, C. R. 2000. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. Earth-Science Reviews **51:** 109-135.

Bythell, J. C. 1990. Nutrient uptake in the reef-building coral *Acropora palmata* at natural environmental concentrations. Mar. Ecol. Prog. Ser. **68:** 65-69.

D'Elia, C. F. 1977. The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. Limnol. Oceanogr. **22:** 301-315.

Deane, E. M., and R. W. O'Brien. 1981. Uptake of phosphate by symbiotic and free-living dinoflagellates. Arch. Microbiol. **128:** 307-310.

Elser, J. J., M. E. Bracken, E. E. Cleland, D. S. Gruner, W. S. Harpole, H. Hillebrand, J. T. Ngai, E. W. Seabloom, J. B. Shurin, and J. E. Smith. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. Ecol. Lett. **10:** 1135-1142.

Furnas, M. J. 1991. Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. Limnol. Oceanogr. **36:** 13-29.

Gerencser, G. A., R. Levin, and J. Zhang. 2002. Sodium-phosphate symport by *Aplysia Californica* gut (physiology). Zool. Sci. (Tokyo) **19:** 163-166.

Jackson, A. E., and D. Yellowlees. 1990. Phosphate uptake by zooxanthellae isolated from corals. Proceedings of the Royal Society of London, Series B **242:** 201-204.

Jeffrey, S. W., and G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. Biochemistry and Physiology Pflanz **167:** 191-194.

Karl, D. M., and K. Björkman. 2002. Dynamics of DOP, p. 249-258. *In* D. A. Hansell and C. A. Carlson [eds.]. Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Elsevier Science.

Lehninger, A. L. 1985. ATP and cellular bioenergetics, p. 361-396. *In* Flammarion [eds.], Principles of biochemistry, 1st Edition (written in French).

Miller, D. J., and D. Yellowlees. 1989. Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine cnidarians : a critical review. Proc. R. Soc. Lond. **237B:** 109-125.

Muller-Parker, G., C. B. Cook, and C. F. D'Elia. 1990. Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida.* Mar. Ecol. Prog. Ser. **60:** 283-290.

Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta **27:** 31-36.

Muscatine, L. 1980. Productivity of zooxanthellae, p. 381-402. *In* P. G. Falkowski [ed.], Primary productivity in the sea. Plenum.

Muscatine, L., and C. F. D'Elia. 1978. The uptake, retention and release of ammonium by reef corals. Limnol. Oceanogr. **23:** 725-734.

Muscatine, L., H. Masuda, and R. Burnap. 1979. Ammonium uptake by symbiotic and aposymbiotic reef corals. Bull. Mar. Sci. **29:** 572-575.

Muscatine, L., and J. W. Porter. 1977. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. Bioscience **27:** 454-460.

Pomeroy, L. R., and E. J. Kuenzler. 1967. Phosphorus turnover by coral reef animals, p. 474-482. *In* D. J. Nelson and C. F. Evans [eds.] Symposium on radioecology. Nat. Tech. Info. Serv.

Sorokin, Y. I. 1992. Phosphorus metabolism in coral reef communities: exchange between the water column and bottom biotopes. Hydrobiologia **242:** 105-114.

Stimson, J., and R. A. Kinzie. 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.

Szmant, A. M. 2002. Nutrient enrichment on coral reefs: Is it a major cause of coral reef decline? Estuaries **25:** 743-766.

Todd, B. D., D. J. Thornhill, and W. K. Fitt. 2006. Patterns of inorganic phosphate uptake in *Cassiopea xamachana*: A bioindicator species. Mar. Pollut. Bull. **52:** 515-521.

Wright, S. H. 1982. A nutritional role for amino acid transport in filter-feeding marine invertebrates. Am. Zool. **22:** 621-634.

6

Article 2
High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*

Journal of Experimental Biology | 2011

Résumé

Plusieurs aspects inconnus du contrôle de l'absorption des nutriments inorganiques dissous ont été examinés à l'aide d'expériences de déplétion chez le corail symbiotique *Stylophora pistillata*. L'inhibition totale de l'absorption de phosphate dans une eau de mer artificielle sans sodium a révélé l'implication probable d'un symporteur sodium/phosphate pour le transfert du phosphate au travers des membranes de l'hôte. L'ajout d'ammonium ou de nitrate (jusqu'à 6,0 µmol L^{-1}) n'a pas entraîné d'augmentation des taux d'absorption à saturation de phosphate. Ce résultat indique que les coraux, ou leurs zooxanthelles symbiotiques, n'étaient pas, ou pas suffisamment, limités par l'azote pour modifier leurs besoins en phosphore. À l'inverse, le taux d'absorption d'ammonium à saturation a été multiplié par 2,5 en présence de 3,0 µmol L^{-1} de phosphate. Ce résultat indique quant à lui que les coraux ou leurs symbiotes manquaient de phosphate pour pouvoir tirer pleinement parti de l'azote inorganique dissous dans le milieu. En résumé, ces résultats mettent en avant le fait que la limitation en phosphore semble plus prononcée que celle en azote. Enfin, le taux d'absorption de phosphate a diminué avec la nutrition particulaire de l'hôte (source, entre autre, de phosphore organique). En effet, des coraux non nourris pendant 21 jours ont absorbé le phosphate respectivement 42 et 19% plus rapidement que des coraux nourris 1 ou 3 jours avant. Ce résultat est un autre indicateur de limitation en phosphore du corail *S. pistillata*. Cette étude apporte donc de nouvelles perspectives sur les rapports entre les coraux symbiotiques et les nutriments, et fournit un outil potentiellement rapide et efficace pour déterminer lequel, du phosphore ou de l'azote, est le plus limitant pour le métabolisme corallien dans des conditions données.

Article 2

The Journal of Experimental Biology 214, 2749-2754
© 2011. Published by The Company of Biologists Ltd
doi:10.1242/jeb.054239

RESEARCH ARTICLE

High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*

Claire Godinot*, Renaud Grover, Denis Allemand and Christine Ferrier-Pagès
Centre Scientifique de Monaco (CSM), Avenue Saint-Martin, 98000, Monaco and Laboratoire Européen Associé "Biosensib" CNRS-CSM, Monaco
*Author for correspondence (cgodinot@centrescientifique.mc)

Accepted 22 May 2011

SUMMARY

Several untested aspects of the regulation of inorganic nutrient uptake were examined using nutrient depletion experiments with the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. The total inhibition of phosphate uptake in artificial seawater lacking sodium indicates the involvement of a sodium/phosphate symporter for the uptake of phosphate across host membranes. Addition of ammonium or nitrate (up to 6.0 μmol l^{-1}) did not enhance saturated phosphate uptake rates, thus indicating that corals, or their symbiotic algae, were not, or not sufficiently, nitrogen limited to modify their phosphate needs. Conversely, the saturated uptake rate of ammonium increased by 2.5-fold in the presence of 3.0 μmol l^{-1} of phosphate, thus indicating that the corals or their symbionts were lacking intracellular phosphate to take advantage of the inorganic nitrogen compounds dissolved in their surrounding medium. Overall, these results highlight some greater limitation in phosphate rather than in nitrogen. Finally, the rate of phosphate uptake decreased with particulate feeding of the host (organic phosphate source). Indeed, corals that were fed 1 and 3 days before the uptake experiment took up phosphate 42 and 19% slower, respectively, than corals that were fed 21 days before. This result provides additional evidence of phosphate limitation in *S. pistillata*. This study therefore brings new insights into the relationships between nutrients and symbiotic corals, and may provide a rapid and effective tool to investigate which nutrient is the most limiting for coral metabolism.

Key words: coral, nutrients, uptake, cotransporter, limitation.

INTRODUCTION

Phosphorus and nitrogen compounds are key nutrients for marine organisms (Benitez-Nelson, 2000; Elser et al., 2007) because they enter into the composition of many biological molecules (e.g. DNA, RNA, proteins and phospholipids) and have a role in biochemical mechanisms. In the oligotrophic surface reef waters, phosphate and inorganic forms of nitrogen (ammonium and nitrate) display a characteristic depletion, with concentrations often well below 0.5 μmol l^{-1} (Atkinson, 1987; Atkinson et al., 1995; Furnas, 1991). Zooxanthellae, the dinoflagellates living in symbiosis with corals, are known to take up from their host and concentrate, through active transport, dissolved nutrients, which are then transformed into organic molecules (Badgley et al., 2006; Bythell, 1990; D'Elia and Cook, 1988; D'Elia et al., 1983; Domotor and D'Elia, 1984; Godinot et al., 2009; Muscatine and D'Elia, 1978) and transferred back to the host for its metabolism (Muscatine and Porter, 1977). Such nutrient recycling within the symbiosis is often used to explain the success of corals in nutrient-poor environments. Knowledge of nutrient fluxes, and of their regulation, is therefore crucial for a better understanding of coral reef functioning. Although a lot of studies have investigated nutrient uptake by diverse scleractinian symbiotic coral species, most of them have focused on compounds of nitrogen rather than phosphate, and many questions remain unsolved.

The present study focused on three main questions regarding phosphate uptake that were untested in previous studies. First, even though phosphate uptake through the animal membranes is known to be mediated *via* active transport (phosphate is a charged species at seawater and physiological pHs and its uptake displays saturation kinetics in coral holobionts) (D'Elia, 1977; Godinot et al., 2009), the transporter involved at the host membrane has not been characterized for reef corals. Although phosphate uptake occurs *via* ATP-binding cassette transporters from the PhoT family in prokaryotes (Higgins, 1992) and *via* proton–phosphate cotransporters from the Pht family in plants (Raghothama, 1999; Smith et al., 2003), an active sodium-dependent phosphate co-transporter is more commonly found in animals (Markovich, 2010; Virkki et al., 2007), such as in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Schneider, 1985) or in the marine mollusc *Aplysia californica* (Gerencser et al., 2002). This sodium-dependent transport was demonstrated by a lack of phosphate uptake in sodium-free seawater (Gerencser et al., 2002; Schneider, 1985). Using similar techniques, the first goal of this study was to assess whether such a transporter was involved in the uptake of phosphate by the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. The second goal of this study was to test whether phosphate uptake decreases with particulate feeding, as previously observed for this nutrient in sea anemones (Muller-Parker et al., 1990) and for ammonium and nitrate in corals (D'Elia and Cook, 1988; Grover et al., 2002). The third aim of this study was to test whether ammonium or nitrate enrichment could enhance the uptake of phosphate. This mechanism has never been investigated before, but might have great implications for coral metabolism if a limitation by one or both nutrients exists in the coral–zooxanthellae symbiosis, as was hypothesized in several studies (Falkowski et al., 1993; Miller and Yellowlees, 1989; Muscatine et al., 1989; Rees, 1991). Therefore, if the uptake mechanisms of phosphate and nitrogen compounds are competing for limited energy resources, it could lead to the preferential uptake of one of the two nutrients, as in some phytoplankton species (Terry,

Article 2

6

Article 2
High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*

C. Godinot[1,2,3], R. Grover[1,2], D. Allemand[1,2], and C. Ferrier-Pagès[1,2]

Journal of Experimental Biology | 2011

Abstract

Several untested aspects of the regulation of inorganic nutrient uptake were examined using nutrient depletion experiments with the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. The total inhibition of phosphate uptake in artificial seawater lacking sodium indicates the involvement of a sodium/phosphate symporter for the uptake of phosphate across host membranes. Addition of ammonium or nitrate (up to 6.0 µmol L^{-1}) did not enhance saturated phosphate uptake rates, thus indicating that corals, or their symbiotic algae, were not, or not sufficiently, nitrogen limited to modify their phosphate needs. Conversely, the saturated uptake rate of ammonium increased by 2.5-fold in the presence of 3.0 µmol L^{-1} of phosphate, thus indicating that the corals or their symbionts were lacking intracellular phosphate to take advantage of the inorganic nitrogen compounds dissolved in their surrounding medium. Overall, these results highlight some greater limitation in phosphate rather than in nitrogen. Finally, the rate of phosphate uptake decreased with particulate feeding of the host (organic phosphate source). Indeed, corals that were fed 1 and 3 days before the uptake experiment took up phosphate 42 and 19% slower, respectively, than corals that were fed 21 days before. This result provides additional evidence of phosphate limitation in *S. pistillata*. This study therefore brings new insights into the relationships between nutrients and symbiotic corals, and may provide a rapid and effective tool to investigate which nutrient is the most limiting for coral metabolism.

Running head | Nutrient uptake regulation in corals

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] LEA CSM-CNRS 647 'Biosensib', Monaco, Principality of Monaco
[3] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc

Introduction

Phosphorus and nitrogen compounds are key nutrients for marine organisms (Benitez-Nelson, 2000; Elser et al., 2007) because they enter into the composition of many biological molecules (e.g. DNA, RNA, proteins and phospholipids) and have a role in biochemical mechanisms. In the oligotrophic surface reef waters, phosphate and inorganic forms of nitrogen (ammonium and nitrate) display a characteristic depletion, with concentrations often well below 0.5 µmol L^{-1} (Atkinson, 1987; Atkinson et al., 1995; Furnas, 1991). Zooxanthellae, the dinoflagellates living in symbiosis with corals, are known to take up from their host and concentrate, through active transport, dissolved nutrients, which are then transformed into organic molecules (Badgley et al., 2006; Bythell, 1990; D'Elia and Cook, 1988; D'Elia et al., 1983; Domotor and D'Elia, 1984; Godinot et al., 2009; Muscatine and D'Elia, 1978) and transferred back to the host for its metabolism (Muscatine and Porter, 1977). Such nutrient recycling within the symbiosis is often used to explain the success of corals in nutrient-poor environments. Knowledge of nutrient fluxes, and of their regulation, is therefore crucial for a better understanding of coral reef functioning. Although a lot of studies have investigated nutrient uptake by diverse scleractinian symbiotic coral species, most of them have focused on compounds of nitrogen rather than phosphate, and many questions remain unsolved.

The present study focused on three main questions regarding phosphate uptake that were untested in previous studies. First, even though phosphate uptake through the animal membranes is known to be mediated *via* active transport (phosphate is a charged species at seawater and physiological pHs and its uptake displays saturation kinetics in coral holobionts) (D'Elia, 1977; Godinot et al., 2009), the transporter involved at the host membrane has not been characterized for reef corals. Although phosphate uptake occurs *via* ATP-binding cassette transporters from the PhoT family in prokaryotes (Higgins, 1992) and *via* proton–phosphate cotransporters from the Pht family in plants (Raghothama, 1999; Smith et al., 2003), an active sodium-dependent phosphate cotransporter is more commonly found in animals (Markovich, 2010; Virkki et al., 2007), such as in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Schneider, 1985) or in the marine mollusc *Aplysia californica* (Gerencser et al., 2002). This sodium-dependent transport was demonstrated by a lack of phosphate uptake in sodium-free seawater (Gerencser et al., 2002; Schneider, 1985). Using similar techniques, the first goal of this study was to assess whether such a transporter was involved in the uptake of phosphate by the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. The second goal of this study was to test whether phosphate uptake decreases with particulate feeding, as previously observed for this nutrient in sea anemones (Muller-Parker et al., 1990) and for ammonium and nitrate in corals (D'Elia and Cook, 1988; Grover et al., 2002). The third aim of this study was to test whether ammonium or nitrate enrichment could enhance the

uptake of phosphate. This mechanism has never been investigated before, but might have great implications for coral metabolism if a limitation by one or both nutrients exists in the coral–zooxanthellae symbiosis, as was hypothesized in several studies (Falkowski et al., 1993; Miller and Yellowlees, 1989; Muscatine et al., 1989; Rees, 1991). Therefore, if the uptake mechanisms of phosphate and nitrogen compounds are competing for limited energy resources, it could lead to the preferential uptake of one of the two nutrients, as in some phytoplankton species (Terry, 1982a; Terry, 1982b). If, rather, there is a co-limitation between the two nutrients, it could lead to greater uptake rates of phosphate when nitrogen is fully available, as has also been shown in other phytoplankton studies (e.g. Suttle and Harrison, 1988).

If phosphate uptake can be limited by availability of nitrogen, the opposite is also true. However, the effect of phosphate limitation on ammonium or nitrate uptake has, to the best of our knowledge, never been investigated in corals. On the contrary, it is well-known, for example, that nitrate uptake is generally inhibited in the presence of ammonium (Badgley et al., 2006; Domotor and D'Elia, 1984; Grover et al., 2003), either through a repression of the nitrate reductase (Berges and Harrison, 1995; Guerrero et al., 1981; Syrett, 1981; Vergara et al., 1998) or a competition of ammonium and nitrate uptake mechanisms for energy resources, leading to the preferential uptake of ammonium (Terry, 1982a; Terry, 1982b). Therefore, we tested two additional questions. As phosphate has been suggested to be a limiting nutrient for zooxanthellae (Miller and Yellowlees, 1989), our fourth aim was to test whether the lack of phosphate is critical for ammonium uptake. Finally, we also tested whether the uptake of nitrate, the other form of inorganic nitrogen available for corals, was limited by phosphate availability in *S. pistillata*, as the two studies performed to date on *S. pistillata* have found no (Muscatine et al., 1984), or a very low (Grover et al., 2003), nitrate uptake rate by this species.

Answering these questions could give a better understanding of the regulation of nutrient uptake by corals. Such data could be used in future models of nutrient cycles within the coral–zooxanthellae symbiosis.

Materials and methods

Coral culture conditions

Colonies of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata* Esper 1797 were obtained from the Red Sea and maintained in open flow aquaria under controlled conditions (26°C, salinity of 38). Light was provided by hydrargyrum quartz iodide lights at a photosynthetic active radiation level of 220 µmol m^{-2} s^{-1} (measured using a spherical quantum sensor; LiCor LI-193, Lincoln, NE, USA), with a 12 h:12 h dark:light cycle. Two months before the experiments began, the apical branches of 10 parent colonies were cut using pliers to generate 200 nubbins (2.5±1.0 cm long and 0.6±0.3 cm in diameter). Nubbins were attached to nylon wires and suspended in aquaria until tissue fully covered the skeleton. They were lightly fed (once a week) with *Artemia salina* (Linnaeus 1758) nauplii during this maintenance period and were starved for 4 days before each experiment (unless otherwise specified). Sea-

water in the aquaria contained trace concentrations of phosphate (< 0.05 µmol L^{-1}), nitrate (< 0.4 µmol L^{-1}) and ammonium (< 0.5 µmol L^{-1}), thus corals were considered to be maintained under oligotrophic conditions concerning inorganic nutrients.

Kinetic characteristics of nutrient transport in corals

As a preliminary step, we first examined the uptake kinetics of each inorganic nutrient in order to select the concentration that gave a maximal uptake rate of phosphate, nitrate or ammonium, which was used in subsequent uptake interaction experiments. For this purpose, we performed a series of three experiments, in which the depletion of phosphate, ammonium or nitrate was followed over time in stirred beakers enriched with the corresponding nutrient. Uptake rates were measured with six different concentrations of phosphate (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 µmol L^{-1}), ammonium (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.5 µmol L^{-1}) or nitrate (0, 0.5, 1.5, 3.5, 5.0 and 9.0 µmol L^{-1}). Five nubbins were used for each concentration tested. Uptake rates were performed as described in Godinot et al. (Godinot et al., 2009), using stock solutions of KH_2PO_4, NH_4Cl or KNO_3 (10 mmol L^{-1}) to reach the desired initial nutrient concentration, with water samplings every 15 min for 90 min. During each depletion experiment, nutrient concentrations decreased linearly over time for at least 60 min, as shown in Godinot et al. for phosphate (Godinot et al., 2009). Ammonium samples were treated with 1 ml of combined ammonium reagent immediately after sampling, and were kept in the dark for 3 h before manual determination by spectrofluorimetry according to Holmes et al. (Holmes et al., 1999). Phosphate and nitrate samples were frozen right away, and were measured no longer than 1 week after sampling. Phosphate concentrations were determined using the ascorbic acid method (Murphy and Riley, 1962). Nitrate concentrations were measured using an autoanalyzer (Axflow, Plaisir, France) and according to Aminot and Kérouel (Aminot and Kérouel, 2007). Initial uptake rates (V_0) were calculated from the quantity taken up by each nubbin in 60 min. Uptake rates were normalized to the total chlorophyll (chl) content, zooxanthellae concentration and surface area of the nubbins (see below).

Phosphate uptake: interaction with sodium, particulate food and nitrogen

In the second experiment, we characterized the phosphate transporter involved and assessed the effect of feeding and inorganic nitrogen enrichment on the uptake of phosphate.

Effect of sodium on phosphate uptake

To test for the presence of an active sodium-phosphate symporter, we incubated corals in sodium-free artificial seawater (ASW) containing 3.0 µmol L^{-1} P (the concentration giving the maximal uptake rate in the kinetic curves). Such an ASW protocol has often been used to test sodium-dependent transporters (Gerencser et al., 2002; Schneider, 1985), using various sodium osmotic equivalents in many models, including choline in scleractinian corals (Al-Moghrabi et al., 1993; Al-Moghrabi et al., 1996; Allemand et al., 1984). Phosphate uptake was therefore measured using ASW in which sodium had been replaced by its osmotic equivalent choline (0 Na ASW). Controls were performed with ASW in which sodium was present

(control ASW). ASW was prepared freshly, following the simplified synthetic seawater recipe of Dickson et al. (Dickson et al., 2007), modified to achieve a salinity of 38.5 and to replace sodium with choline (using choline chloride and choline bicarbonate). The following final concentrations were achieved: 600 mmol kg^{-1} Cl^-, 31 mmol kg^{-1} SO_4^{2-}, 58 mmol kg^{-1} Mg^{2+}, 11 mmol kg^{-1} Ca^{2+}, 11 mmol kg^{-1} K^+, 2 mmol kg^{-1} HCO_3^- and 511 mmol kg^{-1} of either choline$^+$ or Na^+ Osmolarity was 1122 ± 10 mOsmL^{-1}, alkalinity was 2233 ± 16 mequiv kg^{-1} and pH was 8.05 ± 0.05. Coral coelenterons were rinsed during a 20 min acclimation in ASW before experiments started, and phosphate uptake rate was measured on five nubbins per ASW treatment (control and 0 Na ASW) under the same conditions as before, with water samplings every 15 min for 60 min. Choline chloride and choline bicarbonate have been widely used to prepare sodium-free seawater (e.g. Baker et al., 1969; Ettensohn et al., 2004; Hodgkin and Katz, 1949; Lee, 1984) and, as was observed previously in experiments involving corals (D.A., personal observation) (Al-Moghrabi et al., 1993; Al-Moghrabi et al., 1996), nubbins had their polyps fully expanded during the entire incubation period and mucus production was minimal.

Effect of feeding on phosphate uptake

To evaluate the impact of heterotrophy (organic phosphate supply) on phosphate uptake, phosphate uptake rates were measured over 2h in experiments on five corals fed *A. salina* nauplii 1, 3 or 21 days before. Phosphate concentration was set to 3.0 µmol L^{-1} P, the concentration giving maximal uptake rates in our kinetic curves. Rates were measured under the same conditions as described before.

Effect of inorganic nitrogen enrichment on phosphate uptake

Results from the kinetics experiments were used to assess uptake rates of phosphate in the presence of ammonium or nitrate. The initial concentration of phosphate was chosen in order to match the maximal uptake rate (V_{max}) measured in the kinetics experiments, i.e. 3.0 µmol L^{-1}. Concentrations of ammonium or nitrate were chosen so as to have: (1) a low concentration close to levels relevant in the field, (2) a concentration representing eutrophic conditions in the field and (3) a high concentration (roughly matching V_{max}). A control was performed in which phosphate uptake was examined alone, without nitrogen compound enrichments. Thus, uptake rates of phosphate (3.0 µmol L^{-1}) were measured for five nubbins in the presence of 0, 0.5, 1.0 and 4.0 µmol L^{-1} ammonium or 0, 0.5, 2.5 and 6.0 µmol L^{-1} nitrate, under the same conditions as described above. One additional sample was taken at the beginning of each sampling period in order to verify the enrichment performed with the added nitrogen.

Inorganic nitrogen uptake: effect of phosphate enrichment

In this third set of experiments, results from the uptake kinetics were used to assess the impact of three phosphate enrichments on ammonium and nitrate uptake rates. Initial concentrations of nitrogen compounds were chosen in order to match the V_{max} measured in the previous experiments, i.e. 4.0 µmol L^{-1} for ammonium and 6.0 µmol L^{-1} for nitrate. Concentrations of phosphate were chosen using the same

rationale as for testing the nitrogen impact on phosphate uptake. Controls were performed by measuring ammonium or nitrate uptake without phosphate enrichment. Thus, uptake rates of ammonium (4.0 µmol L^{-1}) or nitrate (6.0 µmol L^{-1}) were both measured in the presence of 0, 0.1, 0.5 and 3.0 µmol L^{-1} phosphate. Five nubbins were used for each experiment, under the same conditions as described above. One additional sample was taken at the beginning of each sampling period in order to verify the enrichment performed with the added nutrient.

Measurements of physiological parameters

At the end of the experiments, corals were frozen for subsequent normalization of the uptake rates. Data were normalized to the total chlorophyll and zooxanthellae content [using the methods described in Godinot et al. (Godinot et al., 2009)] and to the surface area of the nubbins [using the method described in Stimson and Kinzie (Stimson and Kinzie, 1991)].

Statistical analyses

Concentration-dependent nutrient uptake rates were studied using GraphPad Prism (version 5.0; San Diego, CA, USA) to obtain bestfit values for K (see Eqn 1) and V_{max}. StatView (version 5.0; Cary, NC, USA) was used to perform an unpaired *t*-test to test the sodium dependence of phosphate uptake, and to perform one-way ANOVAs, followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) tests, to identify the effect of feeding on phosphate uptake. Linear regressions were performed with GraphPad Prism to examine nutrient uptake under nutrient enrichment, and Fisher's PLSD tests were used to determine which uptake rates were significantly impacted by the presence of another nutrient (i.e. slope is significantly different from zero).

Results

Kinetic characteristics of nutrient transport in corals

For each nutrient when examined alone, initial uptake rates (V_0) *versus* nutrient concentration conformed to the Monod kinetics, based upon the Michaelis–Menten equation for enzymes (Fig. 1):

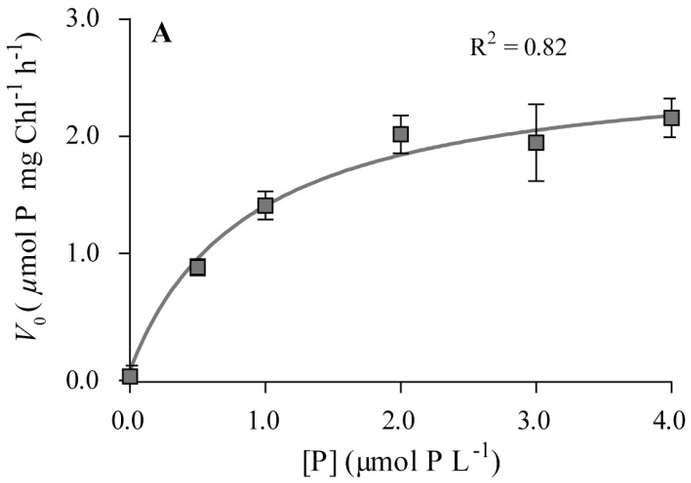
$$V_0 = \frac{V_{max}\,[X]}{[X] + K} \quad \text{(Eqn. 1)}$$

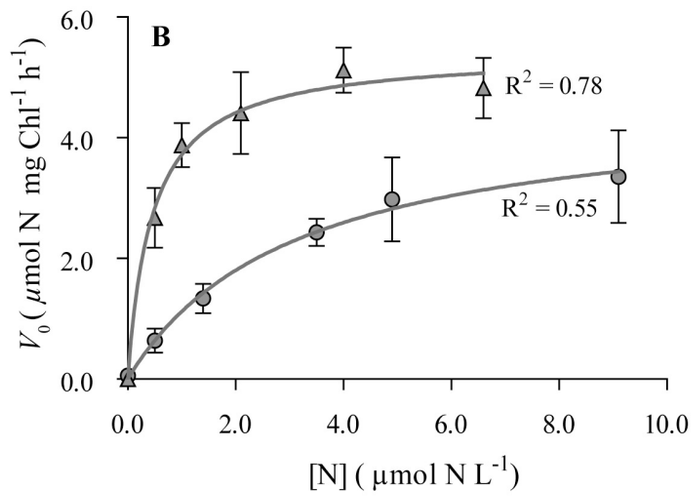
where [X] is the initial concentration of either phosphate (P) or nitrogen (N, in the form of ammonium NH_4^+ or nitrate NO_3^-), K is the nutrient concentration at which uptake is half-optimal and V_{max} is the maximum uptake rate. For each nutrient considered, K corresponds to the inverse of the affinity of the carrier towards this nutrient. As a result, *S. pistillata* presented an affinity 2.0 and 6.8 times higher for ammonium than for phosphate or nitrate, respectively (Table 1). V_{max} was 1.7 to 2.0 times higher for nitrogen (for nitrate and ammonium, respectively) than for phosphate (Table 1).

Phosphate uptake: interaction with sodium, particulate food and nitrogen

In the control ASW, phosphate uptake rate (3.07 ± 0.79 µmol P mg^{-1} chl h^{-1}) was in

Article 2

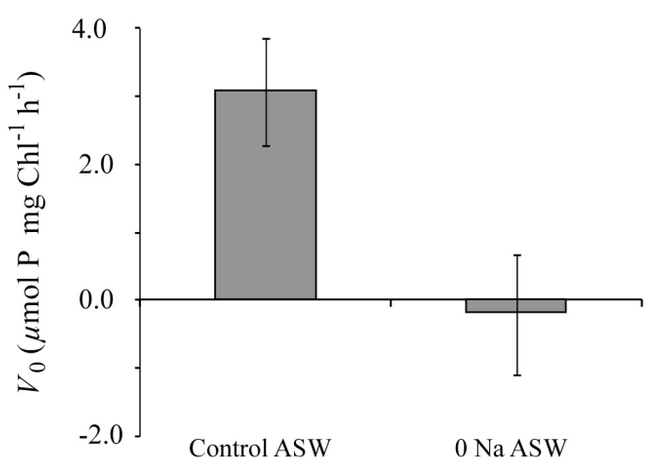




Nutrient	V_{max}	K
PO_4^{3-}	2.69 ± 0.30	0.94 ± 0.32
NH_4^+	5.42 ± 0.41	0.46 ± 0.16
NO_3^-	4.63 ± 4.17	3.14 ± 1.97

Table 1 | Calculated kinetics parameters for the uptake of PO_4^{3-}, NH_4^+ and NO_3^- by *Stylophora pistillata*. Data are means ± s.e.m. V_{max}, maximum uptake rate (µmol mg^{-1} chl h^{-1}); K, affinity constant (µmol L^{-1}).

◄ **Figure 1 |** Concentration-dependent uptake (V_0) of (**A**) phosphate (squares) and (**B**) ammonium (triangles) and nitrate (circles) in *Stylophora pistillata*.



◄ **Figure 2 |** Uptake of 3.0 µmol L^{-1} phosphate in artificial seawater (ASW) containing (control ASW) or lacking (0 Na ASW) sodium. In the latter case, sodium was replaced by choline. Data are mean ± s.e.m. uptake rates of five nubbins.

Article 2

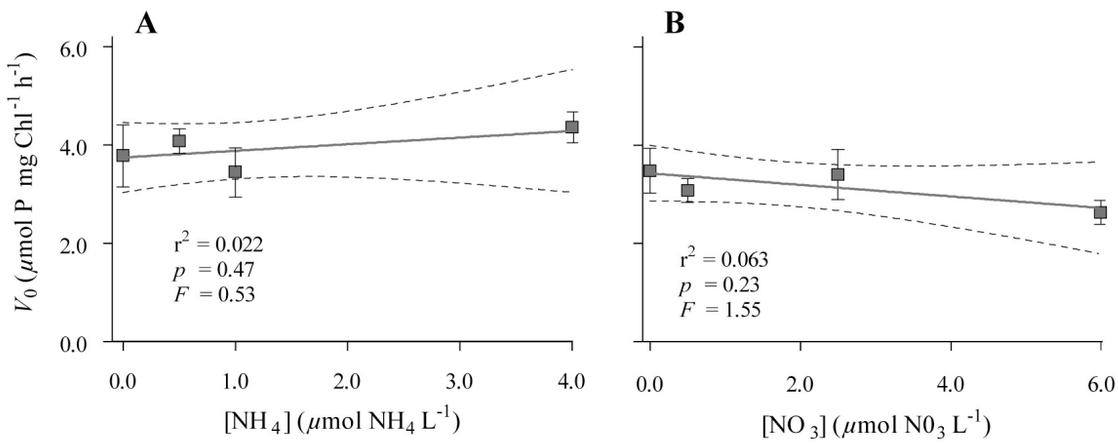
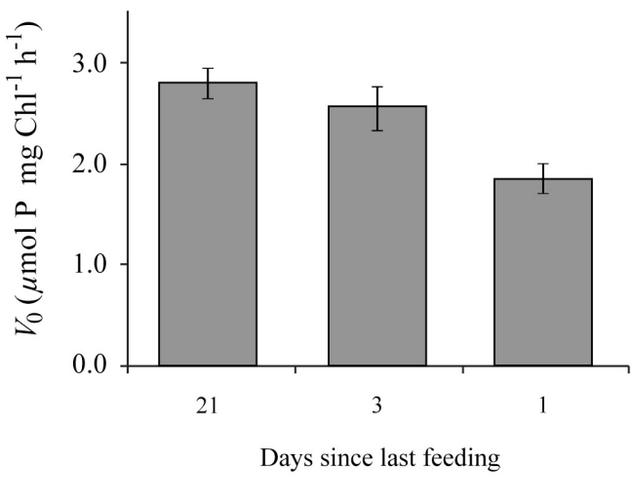
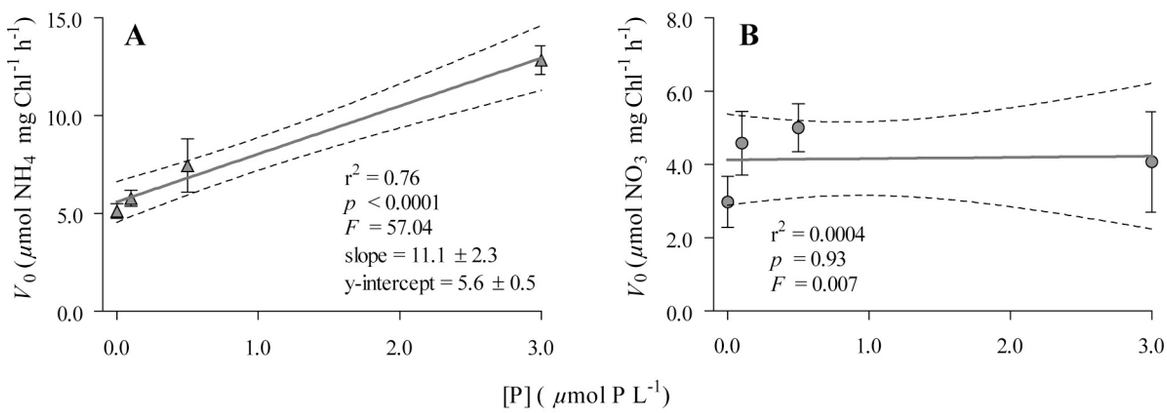


Figure 3 | Uptake rates of phosphate (3 µmol L^{-1}) with different enrichments of nitrogen: (**A**) nitrogen as ammonium, (**B**) nitrogen as nitrate. Best-fit linear regression lines (solid lines) are represented along with the 95% confidence intervals (dashed lines). Data are mean ± s.e.m. uptake rates of five nubbins.



◄ **Figure 4 |** Effect of heterotrophy on phosphate uptake by the coral *Stylophora pistillata*. Initial phosphate concentration was 3.0 µmol L^{-1} for each uptake measurement. Data are mean ± s.e.m. uptake rates of five nubbins.

▼ **Figure 5 |** Uptake rates of nitrogen with different enrichments of phosphate: (A) uptake of ammonium (4 µmol L^{-1}) in the presence of phosphate, and (B) uptake of nitrate (6 µmol L^{-1}) in the presence of phosphate. Best-fit linear regression lines (solid lines) are represented along with the 95% confidence intervals (dashed lines). Data are mean ± s.e.m. uptake rates of five nubbins.



the same range as values measured during the previous experiments in natural seawater, confirming that corals behaved normally in ASW (e.g. Figs 3 and 4). In 0 Na ASW, the phosphate uptake rate was close to zero (- 0.20 ± 1.46 µmol P mg^{-1} chl h^{-1}) and significantly different than in the presence of sodium (unpaired *t*-test, t=2.75, P=0.025; Fig. 2), suggesting strict sodium dependence.

The maximal uptake rate of phosphate was not significantly affected by any of the ammonium or nitrate enrichments tested (P=0.47 for ammonium, P=0.23 for nitrate; Fig. 3). Conversely, phosphate uptake decreased with proximity of feeding in time (Fisher's PLSD, F=8.232, P=0.006): corals that were fed 1 and 3 days before the uptake experiment took up phosphate 42 and 19% slower, respectively, than corals that were unfed for 21 days (Fig. 4).

Inorganic nitrogen uptake: effect of phosphate enrichment

The uptake rate of ammonium was significantly increased in the presence of 0.5 and 3.0 µmol L^{-1} phosphate (r^2=0.76, F=57.04, P<0.0001; Fisher's PLSD, both P<0.05; Fig. 5A). Linear regression followed by Fisher's PLSD revealed that, overall, nitrate uptake rate was not impacted by phosphate availability (P=0.93; Fig. 5B), although an unpaired *t*-test revealed that nitrate uptake was significantly enhanced by a low phosphate enrichment (0.5 µmol L^{-1}; unpaired *t*-test, t=- 2.45, P=0.049).

Discussion

First, this study tested the involvement of a sodium/phosphate symporter in the uptake of phosphate across the host membrane, an uptake that has previously been demonstrated to be active in corals (D'Elia, 1977; Godinot et al., 2009) but for which the transporter is unknown. Such cotransport is one of the most common in the animal kingdom. It has indeed been found in vertebrates, for which three families of Na/Pi symporters have been characterized (Markovich, 2010; Virkki et al., 2007), in marine invertebrates, such as the mollusc *Aplysia californica* (Gerencser et al., 2002) and the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Schneider, 1985), and in the phycomycete *Thraustochytrium roseum* (Siegenthaler et al., 1967; Siegenthaler et al., 1966) and the cyanobacteria *Anabaena* (Valiente and Avendano, 1993). Although the use of 0 Na ASW can theoretically lead to the inhibition of all sodium-dependent co-transports, which includes some amino acids, glucose, lactate and protons (Preston, 1993; Scott, 1987), and therefore alter the cell physiology over the course of long-term experiments, it is likely that during short-term incubations, as used in the present study (less than 2 h), the primary effect of the absence of sodium in the external medium is the direct *cis*-inhibition of substrate transport. Such a short period of time did not allow, for example, significant changes in sodium-independent processes in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*, such as the photosynthesis and respiration of zooxanthellae freshly isolated from that coral (Al-Moghrabi et al., 1996), or the sodium-independent component of valine uptake (Al-Moghrabi

et al., 1993). We thus conclude that the total inhibition of phosphate uptake in 0 Na ASW is a strong evidence for the involvement of a sodium/phosphate symporter at the host membrane of the symbiotic coral *S. pistillata*.

The main objective of this study was to determine whether ammonium or nitrate availability limited phosphate uptake, or the contrary, whether phosphate availability limited ammonium and nitrate uptake in the scleractinian coral *S. pistillata*. Such a limitation would suggest that one nutrient is essential to the use of the other and is, therefore, lacking within the symbiosis. Under the experimental conditions of this study (no heterotrophic input, no light stress or temperature stress), ammonium and nitrate availability did not change the uptake rates of phosphate, suggesting that corals, or their symbiotic algae, were not, or not sufficiently, nitrogen limited to change their needs in phosphate. This result does not exclude that the growth of the zooxanthellae was nitrogen limited, as previously demonstrated (Falkowski et al., 1993; Muscatine et al., 1989), but suggests that the zooxanthellae did not need more nitrogen to use all of the phosphate available in the incubation medium (with low to high concentrations of nitrogen). Conversely, we observed enhanced uptake rates of ammonium with phosphate enrichment (Fig. 5), suggesting in this case that the corals or their symbionts were lacking sufficient intracellular phosphate to take advantage of the inorganic nitrogen compounds dissolved in their surrounding medium. Overall, these results highlight some greater limitation in phosphate rather than in nitrogen compounds, and are in agreement with (1) the high activity levels of the zooxanthellae alkaline phosphatase (Annis and Cook, 2002; Jackson et al., 1989) and (2) previous physiological data suggesting that algal growth within the symbiosis was more limited by phosphorus than by nitrogen (Jackson et al., 1989; Miller and Yellowlees, 1989).

The negative effect of feeding on inorganic phosphate uptake is additional evidence of phosphate limitation in the symbiotic association. When corals acquired organic phosphate from zooplankton, they lowered the uptake rates of phosphate compared with unfed corals because of a downregulation of phosphate uptake and/or a greater release of phosphate in the incubation medium. Both processes can occur in corals. Indeed, regulation of phosphate uptake was previously observed in cultured and isolated zooxanthellae, in which the activity of alkaline and acid phosphatases decreased in presence of dissolved organic phosphate in seawater (Annis and Cook, 2002; Jackson et al., 1989). Similarly, in the sea anemone *Aiptasia pallida*, phosphate uptake increased by 10 to 50 times in anemones starved for 1 month compared with those given a daily feeding (Muller-Parker et al., 1990). *Stylophora pistillata*, however, differs from *A. pallida* because it took up phosphate at a significant rate (1.84 ± 0.14 µmol P mg^{-1} chl $h^{-1}$for a phosphate concentration of 3 µmol L^{-1}) even when it was heterotrophically starved just for 1 day. This suggests that *S. pistillata* requires a high concentration of phosphate to sustain its metabolism. Nonetheless, it is also possible that phosphate uptake rates decreased because of a release of phosphate. Indeed, D'Elia reported that symbiotic corals can release organic phosphate in the light, and both inorganic and organic phosphate in the dark (D'Elia, 1977). Although organic

phosphate fluxes were not measured in the present study, and all rates reported were measured in the light, we cannot exclude the possibility that phosphate was released, or was released in greater quantities, in fed than in starved corals. This hypothesis remains to be investigated.

Finally, results obtained with the kinetics of nitrate uptake give insight into the capacity of *S. pistillata* to use this source of nitrogen for its metabolism. Despite its relatively high abundance in reef waters compared with ammonium (D'Elia et al., 1981; Lapointe and Clark, 1992), nitrate remains a much less significant source of nitrogen than ammonium for corals (D'Elia et al., 1983; Domotor and D'Elia, 1984; Grover et al., 2003; Wilkerson and Trench, 1986). Indeed, in the first study performed with zooxanthellae freshly isolated from field-collected corals (Muscatine et al., 1984), it was concluded that *S. pistillata* was not able to use nitrate as a nitrogen source because no activity of the nitrate reductase, which is the enzyme necessary for the assimilation of nitrate, could be detected in the samples. In a later study, Grover et al. (Grover et al., 2003) found that nitrate uptake rates of cultured *S. pistillata* nubbins were significant (0.1 and 0.4 nmol N cm^{-2} h^{-1} for 0.9 and 3.9 µmol L^{-1} NO_3^- in seawater, respectively), although much lower (10 to 50 times lower) than those measured in the present study (e.g. 2.8 and 13 nmol N cm^{-2} h^{-1} for 0.5 and 3.5 µmol L^{-1} NO_3^- in seawater, respectively) and from other coral species (from 2.5 to 20 nmol N cm^{-2} h^{-1} for NO_3^- concentrations of 0.5 to 4 µmol L^{-1}) (reviewed in Badgley et al., 2006). Because the uptake of nitrate is clearly inhibited by the presence of ammonium in phytoplankton (Berges and Harrison, 1995; Guerrero et al., 1981; Syrett, 1981; Vergara et al., 1998) and corals (Grover et al., 2003), the discrepancies among the results might be linked to the ammonium supply of the colonies (which was relatively low in the present study, <0.5 µmol L^{-1}), as well as to the ammonium content of the cells, although this point remains to be further investigated. The discrepancies may also be linked to the availability of phosphate in the seawater and in the coral cells, if nitrate uptake is phosphate limited. Contrary to uptake of ammonium, nitrate uptake was not enhanced by a 3.0 µmol L^{-1} phosphate addition. However, in the presence of a lower phosphate concentration (0.5 µmol L^{-1}), nitrate uptake significantly increased, suggesting that nitrate uptake was not totally independent of phosphate presence. This increase in nitrate uptake at only the lowest phosphate concentrations needs more investigation.

In conclusion, measurements of phosphate or nitrogen compounds uptake in presence/absence of the other nutrient has proven to be a rapid and effective tool to investigate which of the two nutrients is the most limiting for coral metabolism. Such studies have never been performed with corals, but could be used in the field, perhaps in addition to alkaline phosphatase activity measurements (Annis and Cook, 2002), to assess the nutrient deficiency of corals in the natural environment. Results obtained here also highlight a regulation of the phosphate internal pools according to the trophic status of the colonies, or certainly, but this remains to be tested, by the external concentrations of organic phosphate. Finally, phosphate seems to be taken up *via* a sodium–phosphate transporter, as in the majority of animals, and it was demonstrated that *S. pistillata* can use ni-

trate at the same rate as some other coral species. The conditions for the uptake of nitrate by *S. pistillata*, or the lack thereof, remain to be determined.

Acknowledgements

We thank Séverine Sikorski and Cécile Rottier for assistance in physiological measurements at the CSM, as well as Stéphanie Reynaud for her guidance in artificial seawater preparation. We are grateful to Patrick Rolland from the Direction de l'Environnement (Monaco) for the use of his autoanalyzer for nitrate determination. We also thank two anonymous reviewers for their helpful comments. This research was supported by the government of the Principality of Monaco. Financial support to C.G. was provided by the École Normale Supérieure and the Centre Scientifique de Monaco.

References

Al-Moghrabi, S., Allemand, D. and Jaubert, J. (1993). Valine uptake by the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*: characterization and effect of light and nutritional status. J. Comp. Physiol. B **163**, 355-362.

Al-Moghrabi, S., Goiran, C., Allemand, D., Speziale, N. and Jaubert, J. (1996). Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral/ dinoflagellate association. II. Mechanisms for bicarbonate uptake. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **199**, 227-248.

Allemand, D., De Renzis, G., Ciapa, B., Girard, J. P. and Payan, P. (1984). Characterization of valine transport in sea urchin eggs. Biochim. Biophys. Acta **772**, 337-346.

Aminot, A. and Kérouel, R. (2007). Dosage Automatique des Nutriments Dans les Eaux Marines: Méthodes en Flux Continu. Brest, France: Quæ éditions.

Annis, E. R. and Cook, C. B. (2002). Alkaline phosphatase activity in symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) as a biological indicator of environmental phosphate exposure. Mar. Ecol. Prog. Ser. **245**, 11-20.

Atkinson, M. J. (1987). Rates of phosphate uptake by coral reef flat communities. Limnol. Oceanogr. **32**, 426-435.

Atkinson, M. J., Carlson, B. and Crow, G. L. (1995). Coral growth in high-nutrient, low-pH seawater: a case study of corals cultured at the Waikiki Aquarium, Honolulu, Hawaii. Coral Reefs **14**, 215-223.

Badgley, B. D., Lipschultz, F. and Sebens,. P. (2006). Nitrate uptake by the reef coral Diploria strigosa: effects of concentration, water flow, and irradiance. Mar. Biol. **149**, 327-338.

Baker, P. F., Blaustein, M. P., Hodgkin, A. L. and Steinhardt, R. A. (1969). The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. J. Physiol. **200**, 431-458.

Benitez-Nelson, C. R. (2000). The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. Earth Sci. Rev. **51**, 109-135.

Berges, J. A. and Harrison, P. J. (1995). Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr. **40**, 82-93.

Bythell, J. C. (1990). Nutrient uptake in the reef-building coral *Acropora palmata* at natural environmental concentrations. Mar. Ecol. Prog. Ser. **68**, 65-69.

D'Elia, C. F. (1977). The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. Limnol. Oceanogr. **22**, 301-315.

D'Elia, C. F. and Cook, C. B. (1988). Methylamine uptake by zooxanthellae-invertebrate symbioses: insights into host ammonium environment and nutrition. Limnol. Oceanogr. **33**, 1153-1165.

D'Elia, C. F., Webb, K. L. and Porter, J. W. (1981). Nitrate-rich groundwater inputs to Discovery Bay, Jamaica: a significant source of N to local coral reefs? Bull. Mar. Sci. **31**, 903-910.

D'Elia, C. F., Domotor, S. L. and Webb, K. L. (1983). Nutrient uptake kinetics of fresh-

ly isolated zooxanthellae. Mar. Biol. **75**, 157-167.

Dickson, A. G., Sabine, C. L. and Christian, J. R. (2007). Guide to Best Practices for Ocean CO2 Measurements. Sydney: North Pacific Marine Science Organization.

Domotor, S. L. and D'Elia, C. F. (1984). Nutrient uptake kinetics and growth of zooxanthellae maintained in laboratory culture. Mar. Biol. **80**, 93-101.

Elser, J. J., Bracken, M. E., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B. and Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. Ecol. Lett. **10**, 1135-1142.

Ettensohn, C. A., Gray, G. A. and Wessel, G. M. (2004). Development of Sea Urchins, Ascidians, and Other Invertebrate Deuterostomes: Experimental Approaches. San Diego: Elsevier Academic Press.

Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L. and McCloskey, L. (1993). Population control in symbiotic corals. Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. Bioscience **43**, 606-611.

Furnas, M. J. (1991). Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. Limnol. Oceanogr. **36**, 13-29.

Gerencser, G. A., Levin, R. and Zhang, J. (2002). Sodium-phosphate symport by *Aplysia californica* gut (physiology). Zool. Sci. **19**, 163-166.

Godinot, C., Ferrier-Pagès, C. and Grover, R. (2009). Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol. Oceanogr. **54**, 1627-1633.

Grover, R., Maguer, J.-F., Reynaud-Vaganay, S. and Ferrier-Pagès, C. (2002). Uptake of ammonium by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: effect of feeding, light, and ammonium concentrations. Limnol. Oceanogr. **47**, 782-790.

Grover, R., Maguer, J.-F., Allemand, D. and Ferrier-Pagès, C. (2003). Nitrate uptake in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol. Oceanogr. **48**, 2266-2274.

Guerrero, M. G., Vega, J. M. and Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. **32**, 169-204.

Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. Annu. Rev. Cell Biol. **8**, 67-113.

Hodgkin, A. L. and Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. **108**, 37-77.

Holmes, R. M., Aminot, A., Kérouel, R., Hooker, B. A. and Peterson, B. J. (1999). A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **56**, 1801-1808.

Jackson, A. E., Miller, D. J. and Yellowlees, D. (1989). Phosphorus metabolism in the coral-zooxanthellae symbiosis: characterization and possible roles of two acid phosphatases in the algal symbiont Symbiodinium sp. Proc. R. Soc. Lond. B **238**, 193-202.

Lapointe, B. and Clark, M. (1992). Nutrient inputs from the watershed and coastal eutrophication in the Florida keys. Estuaries Coasts **15**, 465-476.

Lee, H. C. (1984). Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa. J. Biol. Chem. **259**, 4957-4963.

Markovich, D. (2010). Sulfate and phosphate transporters in mammalian renal and gastrointestinal systems. In Epithelial Transport Physiology (ed. G. A. Gerencser), pp. 165-193. New York: Springer.

Miller, D. J. and Yellowlees, D. (1989). Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine cnidarians: a critical review. Proc. R. Soc. Lond. B **237**, 109-125.

Muller-Parker, G., Cook, C. B. and D'Elia, C. F. (1990). Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **60**, 283-290.

Murphy, J. and Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta **27**, 31-36.

Muscatine, L. and D'Elia, C. F. (1978). The uptake, retention and release of ammonium by reef corals. Limnol. Oceanogr. **23**, 725-734.

Muscatine, L. and Porter, J. W. (1977). Reef corals: mutualistic symbioses adapted to

nutrient-poor environments. Bioscience **27**, 454-460.

Muscatine, L., Falkowski, P. G., Porter, J. W. and Dubinsky, Z. (1984). Fate of photosynthetic fixed carbon in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. Proc. R. Soc. Lond. B **222**, 181-202.

Muscatine, L., Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Cook, P. A. and McCloskey, L. R. (1989). The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral. Proc. R. Soc. Lond. B **236**, 311-324.

Preston, R. L. (1993). Transport of amino acids by marine invertebrates. J. Exp. Zool. **265**, 410-421.

Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**, 665-693.

Rees, T. A. V. (1991). Are symbiotic algae nutrient deficient? Proc. R. Soc. Lond. B **243**, 227-233.

Schneider, E. G. (1985). Activation of Na+-dependent transport at fertilization in the sea urchin: requirements of both an early event associated with exocytosis and a later event involving increased energy metabolism. Dev. Biol. **108**, 152-163.

Scott, D. M. (1987). Sodium cotransport systems: cellular, molecular and regulatory aspects. BioEssays **7**, 71-78.

Siegenthaler, P. A., Bielsky, M. M. and Goldstein, S. (1966). Phosphate uptake in an obligately marine fungus: a specific requirement for sodium. Science **155**, 93-94.

Siegenthaler, P. A., Belsky, M. M., Goldstein, S. and Menna, M. (1967). Phosphate uptake in an obligately marine fungus II. Role of culture conditions, energy sources, and inhibitors. J. Bacteriol. **93**, 1281-1288.

Smith, F. W., Mudge, S. R., Rae, A. L. and Glassop, D. (2003). Phosphate transport in plants. Plant Soil **248**, 71-83.

Stimson, J. and Kinzie, 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.

Suttle, C. A. and Harrison, P. J. (1988). Ammonium and phosphate uptake rates, N:P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes. Limnol. Oceanogr. **33**, 186-202.

Syrett, P. J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. **210**, 182-210.

Terry, K. L. (1982a). Nitrate and phosphate uptake interactions in a marine prymnesiophyte. J. Phycol. **18**, 79-86.

Terry, K. L. (1982b). Nitrate uptake and assimilation in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricornutum*: interactions with photosynthesis and with the uptake of other ions. Mar. Biol. **69**, 21-30.

Valiente, E. F. and Avendano, M. C. (1993). Sodium-stimulation of phosphate uptake in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119. Plant Cell Physiol. **34**, 201-207.

Vergara, J. J., Berges, J. A. and Falkowski, P. G. (1998). Diel periodicity of nitrate reductase activity and protein levels in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (bacillariophyceae). J. Phycol. **34**, 952-961.

Virkki, L. V., Biber, J., Murer, H. and Forster, I. C. (2007). Phosphate transporters: a tale of two solute carriers. Am. J. Physiol. Renal Physiol. **293**, 643-654.

Wilkerson, F. P. and Trench, R. K. (1986). Uptake of dissolved inorganic nitrogen by the symbiotic clam *Tridacna gigas* and the coral *Acropora* sp. Mar. Biol. **93**, 237-246.

7

Article 3
Coral uptake of inorganic phosphorus and nitrogen negatively affected by simultaneous changes in temperature and pH

PLOS One | 2011

Résumé

Les effets de l'acidification et de l'élévation de la température des océans sur la calcification et la photosynthèse des coraux ont fait l'objet de nombreuses études scientifiques au cours des deux dernières décennies. Au contraire, leurs effets sur l'absorption des nutriments par les coraux restent inconnus, et ce malgré l'importance de l'acquisition d'éléments nutritifs dans le métabolisme de la symbiose. Dans ce contexte, l'objet de cette étude a été d'examiner les effets séparés et combinés d'une élévation de la température et de la pCO_2 sur l'absorption de phosphate, d'ammonium et de nitrate par le corail scléractiniaire *Stylophora pistillata*. Trois expériences ont été réalisés, au cours desquelles des coraux ont été cultivés durant 10 jours sous i) trois conditions de pH (8,1, 7,8 et 7,5) à température normale (26°C), ii) trois températures différentes (26, 29 et 33°C) à pH normal (8,1), et iii) trois conditions de pH (8,1, 7,8 et 7,5) à température élevée (33°C). Après 10 jours d'incubation, les coraux n'ont pas blanchi, et leur contenu en protéines, chlorophylle et zooxanthelles était le même dans les neuf traitements. Cependant, les taux de photosynthèse ont significativement diminué à 33°C, avec une réduction encore plus conséquente à pH 7,5. L'efficacité photosynthétique du photosystème II n'a été diminuée que par la température. Les taux d'absorption de nutriments n'ont pas été affectés par un changement du pH seul. À l'inverse, une augmentation de la seule température (33°C) a entraîné un accroissement du taux d'absorption de phosphate, et une forte diminution des taux d'absorption de nitrate et d'ammonium, conduisant même à une excrétion d'azote dans l'eau. La combinaison d'une température élevée (33°C) et d'un pH faible (7,5) a entraîné une diminution significative des taux d'absorption de phosphate et de nitrate en comparaison avec les taux mesurés dans les conditions contrôle (26°C, pH = 8,1). Ces résultats indiquent que les effets cumulatifs du réchauffement des océans et de leur acidification pourraient avoir des conséquences négatives pour le métabolisme du phosphore et de l'azote inorganiques chez les coraux.

Article 3

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Coral Uptake of Inorganic Phosphorus and Nitrogen Negatively Affected by Simultaneous Changes in Temperature and pH

Claire Godinot[1]*, Fanny Houlbrèque[2,3], Renaud Grover[1]◔, Christine Ferrier-Pagès[1]◔

1 Ecophysiology, Centre Scientifique de Monaco, Monaco, Monaco, **2** Marine Environment Laboratories, International Atomic Energy Agency, Monaco, Monaco, **3** Institut de Recherche pour le Développement, Coreus, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Abstract

The effects of ocean acidification and elevated seawater temperature on coral calcification and photosynthesis have been extensively investigated over the last two decades, whereas they are still unknown on nutrient uptake, despite their importance for coral energetics. We therefore studied the separate and combined impacts of increases in temperature and pCO_2 on phosphate, ammonium, and nitrate uptake rates by the scleractinian coral *S. pistillata*. Three experiments were performed, during 10 days i) at three pH_T conditions (8.1, 7.8, and 7.5) and normal temperature (26°C), ii) at three temperature conditions (26°, 29°C, and 33°C) and normal pH_T (8.1), and iii) at three pH_T conditions (8.1, 7.8, and 7.5) and elevated temperature (33°C). After 10 days of incubation, corals had not bleached, as protein, chlorophyll, and zooxanthellae contents were the same in all treatments. However, photosynthetic rates significantly decreased at 33°C, and were further reduced for the pH_T 7.5. The photosynthetic efficiency of PSII was only decreased by elevated temperature. Nutrient uptake rates were not affected by a change in pH alone. Conversely, elevated temperature (33°C) alone induced an increase in phosphate uptake but a severe decrease in nitrate and ammonium uptake rates, even leading to a release of nitrogen into seawater. Combination of high temperature (33°C) and low pH_T (7.5) resulted in a significant decrease in phosphate and nitrate uptake rates compared to control corals (26°C, $pH_T = 8.1$). These results indicate that both inorganic nitrogen and phosphorus metabolism may be negatively affected by the cumulative effects of ocean warming and acidification.

Citation: Godinot C, Houlbrèque F, Grover R, Ferrier-Pagès C (2011) Coral Uptake of Inorganic Phosphorus and Nitrogen Negatively Affected by Simultaneous Changes in Temperature and pH. PLoS ONE 6(9): e25024. doi:10.1371/journal.pone.0025024

Editor: Peter Roopnarine, California Academy of Sciences, United States of America

Received February 15, 2011; **Accepted** August 26, 2011; **Published** September 16, 2011

Copyright: © 2011 Godinot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by the government of the Principality of Monaco, the CSM (http://www.centrescientifique.mc/), and the IAEA (http://www.iaea.org/). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cgodinot@centrescientifique.mc

◔ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Ocean acidification is the result of anthropogenic carbon dioxide (CO_2) emissions partially dissolving into seawater and progressively declining its pH [1]: over the 20th century, the oceans' average pH_T (total scale) has decreased by 0.1 unit from 8.21 to 8.10 [2,3], and it is predicted to further decrease by 0.3-0.5 unit by the end of this century [2,4]. The majority of calcifying organisms, and particularly scleractinian corals, are negatively affected by ocean acidification, as shown by the decrease in calcification, which is one of the main processes, with photosynthesis, studied up to now in this context. A drop in pH is indeed known to affect the carbonate cycle [4 6], reducing carbonate ions that corals use to build their skeleton, and leading to reduced coral calcification rates [1,7 10].

Beyond its impact on the carbonate cycle, ocean acidification also alters other elemental cycles, such as those of nitrogen and phosphorus [11 14]. Both nutrients are however essential for coral metabolism. Indeed, reef-building corals are living in nutrient-poor tropical waters, where the supply of available nutrient sources (zooplankton, dissolved and particulate organic matter, inorganic nutrients) is generally low [15]. Yet, by an efficient nutrient recycling between reef biota, coral reefs retain a high productivity. Corals have for instance adapted to their oligotrophic environment by developing a symbiosis with dinoflagellates of the genus *Symbiodinium*, commonly called zooxanthellae. These symbionts largely contribute to the nutrition of their animal host by providing 1) photosynthesis-derived carbon to the animal tissue [16]; and 2) essential nutrients, such as nitrogen and phosphorus, either directly taken up from the external environment or recycled from the animal wastes [17]. These nutrients are combined to the products of photosynthesis and are transferred back to the host, mainly in the form of essential amino acids for nitrogen [18]. It has been calculated that uptake of inorganic nitrogen, at natural concentrations, contributes approximately 30% to the daily nitrogen requirement of the species *Acropora palmata* for gamete and mucus production, growth, and tissue repair [19]. In another coral species, *Pocillopora damicornis*, uptake of ammonium could even completely satisfy the nitrogen demand of this coral at field concentrations [20]. Concerning phosphorus, it enters into the composition of many biological molecules (DNA, RNA, phospholipids) and has a role in several biochemical mechanisms (through ATP). It controls in part coral growth and zooxanthellae photosynthesis [21,22]. The issue of nutrient limitation of corals

Article 3

7

Article 3
Coral uptake of inorganic phosphorus and nitrogen negatively affected by simultaneous changes in temperature and pH

C. Godinot[1,2], F. Houlbrèque[3,4], R. Grover[1], and C. Ferrier-Pagès[1]

PLOS One | 2011

Abstract

The effects of ocean acidification and elevated seawater temperature on coral calcification and photosynthesis have been extensively investigated over the last two decades, whereas they are still unknown on nutrient uptake, despite their importance for coral energetics. We therefore studied the separate and combined impacts of increases in temperature and pCO_2 on phosphate, ammonium, and nitrate uptake rates by the scleractinian coral S. pistillata. Three experiments were performed, during 10 days i) at three pH_T conditions (8.1, 7.8, and 7.5) and normal temperature (26°C), ii) at three temperature conditions (26°, 29°C, and 33°C) and normal pH_T (8.1), and iii) at three pH_T conditions (8.1, 7.8, and 7.5) and elevated temperature (33°C). After 10 days of incubation, corals had not bleached, as protein, chlorophyll, and zooxanthellae contents were the same in all treatments. However, photosynthetic rates significantly decreased at 33°C, and were further reduced for the pH_T 7.5. The photosynthetic efficiency of PSII was only decreased by elevated temperature. Nutrient uptake rates were not affected by a change in pH alone. Conversely, elevated temperature (33°C) alone induced an increased in phosphate uptake but a severe decrease in nitrate and ammonium uptake rates, even leading to a release of nitrogen into seawater. Combination of high temperature (33°C) and low pH_T (7.5) resulted in a significant decrease in phosphate and nitrate uptake rates compared to control corals (26°C, pH_T = 8.1). These results indicate that both inorganic nitrogen and phosphorus metabolism may be negatively affected by the cumulative effects of ocean warming and acidification.

Running head | Global change impacts on coral nutrient uptake

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc
[3] Marine Environment Laboratories, International Atomic Energy Agency, Monaco, Monaco
[4] Institut de Recherche pour le Développement, Coreus, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Introduction

Ocean acidification is the result of anthropogenic carbon dioxide (CO_2) emissions partially dissolving into seawater and progressively declining its pH [1]: over the 20th century, the oceans' average pH_T (total scale) has decreased by 0.1 unit from 8.21 to 8.10 [2,3], and it is predicted to further decrease by 0.3-0.5 unit by the end of this century [2,4]. The majority of calcifying organisms, and particularly scleractinian corals, are negatively affected by ocean acidification, as shown by the decrease in calcification, which is one of the main processes, with photosynthesis, studied up to now in this context. A drop in pH is indeed known to affect the carbonate cycle [4-6], reducing carbonate ions that corals use to build their skeleton, and leading to reduced coral calcification rates [1,7-10].

Beyond its impact on the carbonate cycle, ocean acidification also alters other elemental cycles, such as those of nitrogen and phosphorus [11-14]. Both nutrients are however essential for coral metabolism. Indeed, reef-building corals are living in nutrient-poor tropical waters, where the supply of available nutrient sources (zooplankton, dissolved and particulate organic matter, inorganic nutrients) is generally low [15]. Yet, by an efficient nutrient recycling between reef biota, coral reefs retain a high productivity. Corals have for instance adapted to their oligotrophic environment by developing a symbiosis with dinoflagellates of the genus *Symbiodinium*, commonly called zooxanthellae. These symbionts largely contribute to the nutrition of their animal host by providing 1) photosynthesis-derived carbon to the animal tissue [16]; and 2) essential nutrients, such as nitrogen and phosphorus, either directly taken up from the external environment or recycled from the animal wastes [17]. These nutrients are combined to the products of photosynthesis and are transferred back to the host, mainly in the form of essential amino acids for nitrogen [18]. It has been calculated that uptake of inorganic nitrogen, at natural concentrations, contributes approximately 30% to the daily nitrogen requirement of the species *Acropora palmata* for gamete and mucus production, growth, and tissue repair [19]. In another coral species, *Pocillopora damicornis*, uptake of ammonium could even completely satisfy the nitrogen demand of this coral at field concentrations [20]. Concerning phosphorus, it enters into the composition of many biological molecules (DNA, RNA, phospholipids) and has a role in several biochemical mechanisms (through ATP). It controls in part coral growth and zooxanthellae photosynthesis [21,22]. The issue of nutrient limitation of corals and their symbionts is therefore of prime interest, as nutrient provision sustains corals' metabolism in general, and in particular during thermal bleaching events. It has indeed been shown that nutrient-repleted corals, with higher zooxanthellae density and photosynthetic rates, are less susceptible to bleaching or nutrient shortage [23,24]. Provision of nutrient to corals is also important for the entire reef, because healthy corals sustain a high reef biomass production.

Despite the importance of nutrient provision for coral physiology and coral reef functioning, and its potential alteration by ocean acidification, only three studies have reported on the impacts of pH on nutrient uptake by symbionts or symbiotic cnidarians, and none of them have considered these effects in the view of ocean acidification. Rahav et al. [25] showed that the activity of glutamate dehydrogenase, an enzyme involved in the assimilation of ammonium, was higher at pH_T 7.3 than at pH_T 8.1 in the coral *S. pistillata*. D'Elia et al. [26] reported that ammonium uptake was insensitive to a pH_T decrease between 8.8 and 7.8 in zooxanthellae freshly isolated from the giant clam *Tridacna crocea*. A final study showed that ammonium accumulated more in the hemolymph of the giant clam *Tridacna gigas* at pH_T 7.4 than at pH_T 7.9 [27]. Therefore, the first aim of our study was to test if a decrease in external pH changed the uptake rates of inorganic nitrogen and phosphorus by the scleractinian coral *S. pistillata*. The impacts might be due to changes in the coral metabolism with acidification, which would in turn i) modify nutrient requirements as known in phytoplankton [13,28] and higher plants [29-31], or ii) decrease the energy expended for nutrient uptake, as may be the case if more energy is used for calcification under acidified conditions [32,33]. The impacts may also be related to changes in the relative abundances of the protonated species of nitrogen and phosphorus. Indeed, phosphate is transported via a sodium/phosphate symporter in the coral *Stylophora pistillata* [34], but the ability of this transporter to discriminate among the protonated species is still unknown. For nitrogen, no studies to date have elucidated the transporters involved in ammonium and nitrate uptake in corals. However, the potential impact of speciation changes on nutrient transport cannot be neglected.

Besides oceanic acidification, anthropogenic CO_2 emissions have also driven an increase in the oceans' average temperature by 0.4-1.0°C in the past four decades [2,35]. Seawater temperatures are predicted to further rise, and cause several mass coral mortalities over the century [36,37]. Indeed, as tropical corals usually live close to their upper thermal limit, they are very sensitive to exposure to elevated temperature [36,38-40]. One of the first responses of corals to thermal stress is bleaching, the disruption of the symbiotic association and the expulsion of the zooxanthellae [36,40-43], which in turn affects coral calcification [7,9,44,45] and photosynthesis [9,41,46-48]. As for acidification, the impacts of elevated seawater temperature on the above two processes have been extensively studied in the last thirty years, but the effects on the nutrient requirements have never been examined. As temperature controls enzymatic activities, ocean warming could potentially impact nutrient uptake in corals. The second aim of this study was therefore to test the effects of a thermal stress on the uptake rates of inorganic nitrogen and phosphorus by the coral *S. pistillata*. Finally, we also tested both effects of oceanic acidification and elevated temperature on these uptake rates, since the two stressors are likely to act simultaneously on reefs in the future [48].

The general aim of the present study was to test, for the first time, the effects of increases in temperature and pCO_2 of magnitudes similar to those expected by 2100 and beyond on the nutrient uptake rates of the scleractinian coral *S. pistillata*. This

study thus enriches our existing predictive capabilities on corals' response to future changes.

Methods

Organisms and culture conditions

Colonies of the zooxanthellate coral *S. pistillata* were initially obtained from the Red Sea. Methods of collection were reviewed and approved by CITES under the permit number DCI/89/32, and importation was performed under CITES permit number 125/SPV. Colonies were then cultured at the Centre Scientifique de Monaco (CSM), under controlled conditions (26°C, salinity of 38). 1.5 month before the start of the experiment, the ca. 220 nubbins (i.e. branch tips) used during the experiment were prepared by cutting branches (2.5 ± 1.0 cm long and 0.6 ± 0.3 cm in diameter) of about twenty parent colonies with pliers after Tambutté et al. [49]. Nubbins were attached on nylon wires and suspended in aquaria until tissues fully covered the skeleton. They were lightly fed once a week with *Artemia salina* nauplii. In order to avoid the additional and undesired effects of bleaching on the impacts of a pH- and/or a temperature-stress, corals were maintained under a low photosynthetic active radiation (PAR) of 110 μmol m^{-2} s^{-1},using metal halid lamps (Philips, HPIT, 400W, Eindhoven, The Nederlands), with a photoperiod of 12h:12h light:dark, and measured using a spherical quantum sensor (LiCor LI-193), with a 12 h:12 h dark:light cycle. Nubbins were then randomly assigned to their experimental 40-L tanks and allowed to acclimate for a week. Temperature was individually regulated in each aquarium at 26.0 ± 0.1°C during the acclimation period, and pH was 8.1. Aquaria were continuously provided with unfiltered seawater, with a flow rate of ca. 40 L day^{-1}.

Experimental design

To examine the effects of exposure to lowered pH and/or elevated temperatures on the uptake rates of ammonium, nitrate, and phosphate by *S. pistillata*, three experiments were performed, in which nubbins were incubated for 10 days i) at three pH_T conditions (8.1, 7.8, and 7.5) at normal temperature (26°C), ii) at three temperature conditions (26°, 29°C, and 33°C) at normal pH_T (8.1), and iii) at three pH_T conditions (8.1, 7.8, and 7.5) at elevated temperature (33°C). A short-term exposure of 10 days was chosen to be able to compare our results with previous ones. Indeed, it is usually the length of a thermal stress above 30°C, either observed *in-situ* [50] or applied in laboratory experiments [23,51,52]. A longer thermal stress generally induces a complete bleaching of the corals (and therefore a complete change in their physiology) and might lead to their death. A pCO_2 stress of 10 days also ranges in the mean culture length of previous experiments (mean of 12 days in the comprehensive Table 2 from Erez et al. 2011 if studies lasting over a c.a. year are excluded) [33].

Corals were not fed during the 10-day incubations, in order to minimize the impact of organic nutrients on uptake rates. To avoid any undesirable "tank" effects, the aquaria were carefully cleaned once a week to minimize algal growth on the walls and nylon wires. Salinity and irradiance were also monitored during the course of the experiments. This mainte-

nance ensured that similar conditions prevailed in all the tanks, except for the fixed parameters (pH and seawater temperature). The three experiments were set up using 3 conditions with duplicated aquaria.

In experiment i), aquaria were maintained at 26 ± 0.2°C and 3 different pHs (a normal pH_T: 8.09 ± 0.04, i.e. 378 μatm CO_2; a pH_T level projected for the end of the century: 7.78 ± 0.06, i.e. 903 μatm CO_2; and a very low pH_T level: 7.46 ± 0.04, i.e. 2039 μatm CO_2). The pH was controlled using a pH-stat system (IKS, Karlsbad, accuracy ± 0.05 pH_T unit) by bubbling independently pure CO_2 in each tank that was continuously aerated with CO_2-free air. A temperature of 26°C was kept constant inside each aquarium using heaters connected to electronic controllers (Biotherm, ± 0.2°C accuracy) and was logged at 10-min intervals using individual temperature recorders (Seamon).Corals were maintained 10 days under these conditions before their nutrient uptake rates were measured.

In experiment ii), aquaria were maintained at the control pH_T (8.1) and at 3 different temperatures (a normal temperature: 26.0 ± 0.2°C, the temperature projected for the end of the century: 29.0 ± 0.2°C; and a very high temperature: 33.0 ± 0.2°C). Temperature, salinity and irradiance were also repeatedly monitored over the course of the experiment, and the maintenance procedure was the same as in experiment i). Corals were also maintained 10 days under these conditions before the nutrient uptake measurements. Before the beginning of the 10-days incubation period, for the two tanks in which temperature was increased to 33°C, corals were first acclimated for 7 days at 29°C then 2 days at 31°C and 2 additional days at 33°C. This gradual temperature increase over 11 days prevented any thermal shock and coral mortality.

Finally, experiment iii) was performed using the same design as in experiment i), except that the temperature was set to 33°C (using the same gradual procedure as in experiment ii) for all the aquaria).

Data of seawater temperature and carbon chemistry were measured as in Houlbrèque et al. [53] and are presented in Table 1. Briefly, three 20 mL samples of seawater were collected daily in each tank, filtered through 0.45 µm GF/F Whatman filters, poisoned with 0.05 ml of 50% $HgCl_2$ to avoid biological alteration, and finally stored in glass bottles in the dark at 4ºC. pH_T was measured using a Metrohm, 826pH meter, equipped with a glass electrode calibrated on the total scale using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffer solutions with a salinity of 38 [54]. Means pH_T were calculated from hydrogen ion concentrations of each measurement and then re-converted back to pH [54]. These measurements were used to adjust every day the pH values of the pH-stat system. Total alkalinity (TA) was calculated from the Gran function. Titrations of TA standards were within 0.7 µmol kg^{-1} of the nominal value. Mean TA of seawater was 2508 ± 16 µmol $kg^{-1}$and remained stable during the whole experiment. pCO_2 was calculated from pH_T, TA, temperature and salinity using the free-access CO_2 Systat package. For each experimental treatment, the parameters of the carbonate system remained constant over the 10-days exposure periods (repeated measures ANOVA, all $p > 0.05$).

Measurements of nutrient uptake rates

After 10 days of incubation, inorganic nutrient uptake was studied by following the

depletion of phosphate, ammonium, or nitrate over time in beakers containing filtered-seawater enriched with the corresponding nutrient. For each nutrient (PO_4, NH_4, or NO_3), six 200-mL beakers were maintained in a water bath at the pH, temperature and irradiance to which the nubbins were previously exposed. Five randomly-selected coral nubbins per experimental condition, each suspended to a nylon wire, were introduced in separate beakers. The last beaker, without coral, served as a control for changes in nutrient concentrations due to adsorption onto beaker surface, to consumption by microbial activity, or to air contamination (particularly for ammonium). After a 10-30 min acclimatization period, beakers were enriched with 300 μL of a 10-mmol L^{-1} buffer solution of KH_2PO_4, NH_4Cl, or KNO_3 to reach an initial concentration of 3 μmol L^{-1}. This concentration was chosen because it corresponded to the plateau in previous concentration-dependent uptake experiments with the same coral species [34,55]. Magnetic stirring bars ensured proper homogenization of nutrient inside the beakers. A 10-mL water sample was taken from each beaker immediately after enrichment and then every 15 min for 60 min. 10-mL samples were also taken in the beakers at the beginning and at the end of the incubation in order to verify that pH had not changed during that period. pH values were measured on total scale (pH_T) with a glass electrode connected to a pH meter (Metrohm, 826 pH mobile) calibrated on the total scale using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffers with a salinity of 38 [54].

Ammonium and phosphate levels were determined manually, according to the spectrofluorimetric method of Holmes et al. [56], and using the ascorbic acid technique of Murphy and Riley [57], respectively. Levels of nitrate were determined using an autoanalyzer (Axflow) according to Aminot and Kérouel [58]. Uptake rates of ammonium, nitrate, and phosphate were calculated as the quantity taken up by each nubbin in 60 min, after correction of concentrations for the diminution of the beakers' volume and after having verified that the uptake rates were linear during the first hour. Uptake rates were normalized to the total chlorophyll content, to the zooxanthellae concentration, or to the surface area of the nubbins (see below).

Measurements of physiological parameters

Photosynthesis and respiration were measured at the end of the experiments, for 3 randomly selected corals per experimental condition, using the same method as described in Godinot et al. [55]. Seawater in the respirometric chambers was at the same pH and temperature as the corresponding experimental tanks. Photosynthesis was measured at a PAR of 110 and 300 μmol m^{-2} s^{-1}. Data were normalized to the surface area of the nubbins and to their chlorophyll content (see below). Additionally, we measured the maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m of PSII) and the electron transport rate of PSII (ETR = dark adapted $F_v/F_m \times 0.5 \times$ PAR) at 9 different light intensities (0 – 3000 μmol m^{-2} s^{-1} PAR) at the end of the two experiments, for 5 randomly selected corals per experimental condition, using pulse-amplitude-modulated chlorophyll fluorometry (diving PAM, Waltz, Germany).

Chlorophyll (chl), protein (prot), and zooxanthellae (zoox) concentrations were

measured at the end of the experiments, on all nubbins used for the uptake rate measurements (15 nubbins per experimental condition). Tissues and zooxanthellae were striped from the skeleton in 10 mL of filtered seawater using an Air-Pik, then homogenized using a Potter grinder, and divided into 3 aliquots for chlorophyll, zooxanthellae, and protein measurements. Chlorophyll *a* and *c2* were extracted in 99% acetone (24 h at 4°C). The extracts were centrifuged at 11,000 x g for 10 min at 4°C, and the absorbances measured at 630, 663, and 750 nm. Concentrations were computed according to the 100% acetone equations of Jeffrey and Humphrey [59]. Zooxanthellae were counted using a counting chamber and an improved version of the Histolab v.5.2.3 image analysis software (Microvision, Every, France). Proteins were extracted in 0.5 mol L^{-1} NaOH (60°C, 5 h) and measured using the commercially available BC Assay Interchim kit, and results analyzed with the GENESIS software (v.3.3). Results were normalized to the surface area of nubbins, measured with the wax technique [60].

Statistical analyses

Equality of variances and normality of residuals were tested using Levene and Shapiro-Wilk tests (Statgraphics Centurion version 15). Data from the tanks replicated between the 3 experiments (26°C or 33°C, and pH_T of 8.1) were compared using unpaired *t*-tests. Since there was no significant difference between replicated tanks, results from those tanks were pooled together for the subsequent statistical analyses. Effects of temperature and pH on nutrient uptake rates, areal chlorophyll, zooxanthellae and protein content, photosynthesis, respiration, F_v/F_m, and ETR_{max} were examined using analyses of variance tests (2-ways ANOVAs, with temperature and pH as fixed factors; StatView version 5.0). When significant differences were found, ANOVAs were followed by protected least significant difference (PLSD) Fisher post hoc tests to attribute differences between specific treatments. The effect of temperature alone on the above-cited parameters was tested using a 1-way ANOVA.

Results

Effect of lowered pH or/and elevated temperature on physiological parameters

After 10 days of incubation, there was no effect of either pH, temperature, or both on the areal content of zooxanthellae (Fig. 1a,d,g), chlorophyll (Fig. 1b,e,h), and protein (Fig. 1c,f,i), nor on the rates of respiration normalized to the chlorophyll content (Fig. 2; 1-way and 2-ways ANOVA, all $p > 0.05$). The rate of photosynthesis normalized to the chlorophyll content was not affected by a change in pH at the control temperature of 26°C (Fig. 2a), but was impacted by a change in temperature alone (Fig. 2b) or combined with a low pH (Fig. 2c). Therefore, at $pH_T = 8.1$, photosynthesis was ca. 2 times lower at 33°C than at 26°C or 29°C (2-ways ANOVA, $p = 0.0004$, $F_2 = 17.51$). At 33°C, photosynthesis was also 1.8 times lower for $pH_T = 7.5$ than for $pH_T = 7.8$ and 8.1 (2-ways ANOVA, $p = 0.038$, $F_2 = 4.48$). There was however no significant interaction of pH and temperature on these rates of photosynthesis (2-ways ANOVA, $p = 0.28$, $F_2 =$

Article 3

Experiment	Temperature (°C)	pH_T	pCO_2 (µatm)	HCO_3^- (µmol kg^{-1})	CO_3^{2-} (µmol kg^{-1})	CO_2 (µmol kg^{-1})	DIC (µmol kg^{-1})
1) Effect of pH	26.0 ± 0.2	8.09 ± 0.04	378 ± 15	1890 ± 4	267.7 ± 2.0	55.2 ± 2.0	2213 ± 2.2
	26.0 ± 0.2	7.78 ± 0.06	903 ± 51	2220 ± 48	150.1 ± 4.7	25.1 ± 1.2	2395 ± 16.7
	26.0 ± 0.2	7.46 ± 0.04	2039 ± 82	2345 ± 6	80.6 ± 2.6	11.8 ± 0.2	2437 ± 5.5
2) Effect of temperature	26.0 ± 0.2	8.08 ± 0.02	375 ± 21	1885 ± 10	268.7 ± 1.6	54.7 ± 2.2	2208 ± 6.0
	29.0 ± 0.2	8.09 ± 0.01	405 ± 17	1891 ± 4	270.2 ± 2.7	59.1 ± 1.8	2220 ± 3.1
	33.0 ± 0.2	8.07 ± 0.04	429 ± 34	1878 ± 8	269.5 ± 1.9	62.6 ± 1.5	2210 ± 4.2
3) Effect of pH x temperature	33.0 ± 0.2	8.08 ± 0.01	434 ± 25	1892 ± 5	269.3 ± 2.1	63.3 ± 1.7	2225 ± 3.9
	33.0 ± 0.2	7.76 ± 0.02	1037 ± 42	2210 ± 34	155.4 ± 5.3	28.9 ± 1.5	2394 ± 14.8
	33.0 ± 0.2	7.45 ± 0.01	2242 ± 75	2337 ± 10	82.8 ± 2.9	12.9 ± 0.1	2433 ± 4.5

Table 1 | Carbonate system parameters during the experiments. Temperature and parameters of the carbonate system in each treatment during a 10-day exposure to lowered pH and/or elevated temperatures. The values reported are averages ± SE of n = 60 measurements performed during the 10-days exposure periods. The total alkalinity was constant and equal to 2508 ± 16 µmol kg^{-1}. pCO_2 was calculated from pH_T, TA, temperature, and salinity using the free-access CO_2 Systat package.

1.37 for an irradiance of 300 μmol m^{-2} s^{-1}). Results were the same when respiration and photosynthetic rates were normalized to the skeletal surface area (cm²). There was no effect of pH on F_v/F_m and ETR, both at 26°C and 33°C (Table 2 for F_v/F_m, and Fig. 3a,c for ETR; 2-way ANOVAs, p = 0.93, F_2 = 0.07 for F_v/F_m; and p = 0.87, F_2 = 0.14 for ETR). Conversely, temperature had an effect at pH_T = 8.1 (Table 2 for F_v/F_m, and Fig. 3b for ETR; 1-way ANOVAs, p = 0.01, F_2 = 7.52 for F_v/F_m; p < 0.0001, F_2 = 24.70 for ETR): F_v/F_m and ETR were significantly higher at 29°C than at 26°C (PLSD Fisher tests, both p < 0.02, df= 9), and they were significantly lower at 33°C than at 26°C (PLSD Fisher tests, both p < 0.001, df= 9). There was however no significant interaction of pH and temperature on these parameters (2-ways ANOVAs, p = 0.67, F_2 = 0.40 for F_v/F_m; p = 0.51, F_2 = 0.69 for ETR).

Effect of lowered pH or/and elevated temperature on nutrient uptake rates

Results of the statistical tests were the same regardless of the normalization used for uptake rates. Uptake data in this paper are presented as normalized to the chl content.

A decrease in pH at 26°C (Fig. 4a,b,c) did not significantly affect ammonium (2-ways ANOVA, p = 0.29, F_2 = 1.35), nitrate (2-ways ANOVA, p = 0.39, F_2 = 1.03), and phosphate (2-ways ANOVA, p = 0.11, F_2 = 2.49) uptake rates.

Article 3

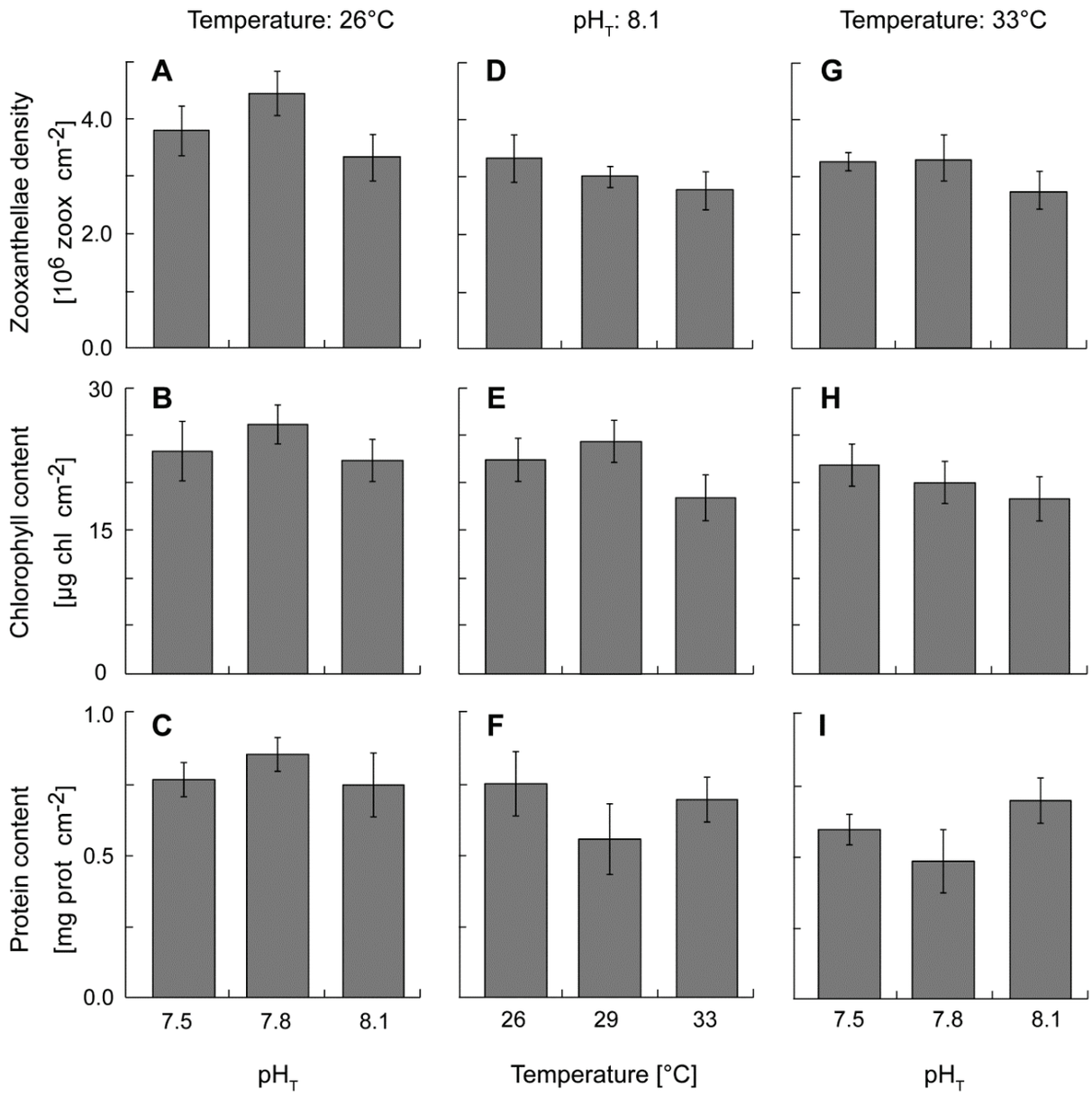


Figure 1 | Effect of pH and/or temperature on coral biomass. Effect of a 10-day exposure to lowered pH and/or elevated temperatures on zooxanthellae (**A**, **D**, **G**), chlorophyll (**B**, **E**, **H**), and protein (**C**, **F**, **I**) content of *Stylophora pistillata* nubbins. Corals were incubated either under 3 different pH_T at 26°C (**A**, **B**, **C**), under 3 different temperatures at pH_T = 8.1 (**D**, **E**, **F**), or under 3 different pH_T at 33°C (**G**, **H**, **I**). Data are presented as mean ± SE of 15 nubbins per treatment.

Article 3

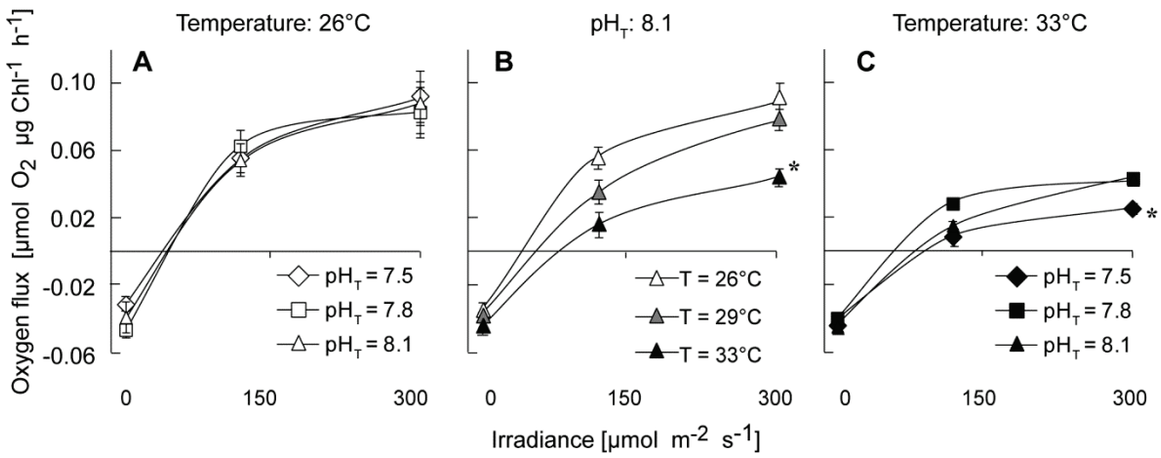


Figure 2 | Effect of pH and/or temperature on coral photosynthesis and respiration. Effect of a 10-day exposure to lowered pH and/or elevated temperatures on oxygen fluxes in *Stylophora pistillata* nubbins. Corals were incubated either under 3 different pH_T at 26°C (**A**), under 3 different temperatures at pH_T = 8.1 (**B**), or under 3 different pH_T at 33°C (**C**). Data are presented as mean ± SE of 3 nubbins per treatment. Lozenges: pH_T = 7.5, squares: pHT = 7.8, triangles: pH_T = 8.1, open symbols: T = 26°C, gray symbols: T = 29°C, dark symbols: T = 33°C. Stars indicate treatments significantly different from the control (pH_T = 8.1 for **A** and **C**; T = 26°C for **B**).

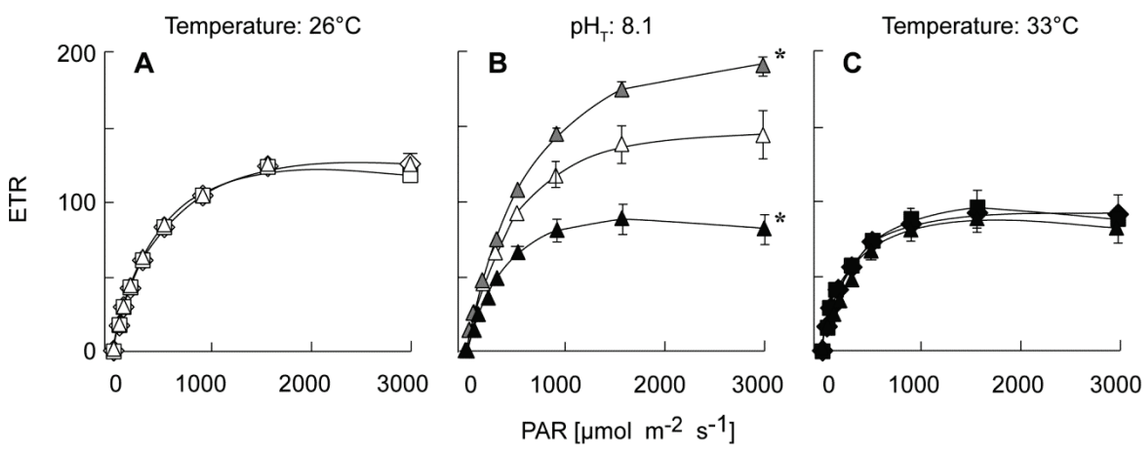


Figure 3 | Effect of pH and/or temperature on coral PSII photosynthetic activity. Effect of a 10-day exposure to lowered pH and/or elevated temperatures on the electron transport rate (ETR) of *Stylophora pistillata* nubbins. Corals were incubated either under 3 different pH_T at 26°C (**A**), under 3 different temperatures at pH_T = 8.1 (**B**), or under 3 different pH_T at 33°C (**C**). Data are presented as mean ± SE of 5 nubbins per treatment. Symbols are the same as on Fig. 2. Stars indicate treatments significantly different from the control (pH_T = 8.1 for **A** and **C**; T = 26°C for **B**).

	Temperature		
pH_T	26°C	29°C	33°C
7.5	0.65 ± 0.002		0.62 ± 0.021
7.8	0.65 ± 0.004		0.63 ± 0.009
8.1	0.66 ± 0.015	0.69 ± 0.002	0.63 ± 0.011

Table 2 | Effect of pH and/or temperature on coral PSII photosynthetic efficiency. Effect of a 10-day exposure to lowered pH and/or elevated temperatures on the maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m of PSII) of *Stylophora pistillata* nubbins. Corals were incubated either under 3 different pHs at 26°C, under 3 different temperatures at pH_T= 8.1, or under 3 different pH_T at 33°C. Data are presented as mean ± SE of 5 to 10 nubbins per condition.

Conversely, elevated temperatures had a significant effect on nutrient uptake. Indeed, under a normal pH_T of 8.1 (Fig. 4d,e,f), ammonium uptake rates first increased by 5 fold at 29°C compared to 26°C (PLSD test, p = 0.004), but then severely decreased to negative values (i.e. release of inorganic nitrogen) at 33°C (1-way ANOVA, p = 0.01, F_2 = 6.39). An equivalent decrease to negative values at 33°C was also observed for nitrate (1-way ANOVA, p = 0.05, F_2 = 3.63), while phosphate uptake rates almost doubled at 33°C (1-way ANOVA, p = 0.003, F_2 = 9.62).

At 33°C and a low pH_T of 7.5 (Fig. 4g,h,i), ammonium uptake rates were the same as at pH_T of 8.1 and temperature of 26°C (Fig. 4a,d), and there was no significant interaction of pH and temperature (2-ways ANOVA, p = 0.10, F_2 = 2.56). On the contrary, corals excreted nitrate at 33°C and a low pH_T of 7.5, and release rates did not vary with pH (2-ways ANOVA, p = 0.88, F_2 = 0.14). Conversely, phosphate uptake rates severely decreased at 33°C and a low pH_T of 7.5, by 4 fold when compared to 33°C and a normal pH_T of 8.1 (2-ways ANOVA, p < 0.0001, F_2 = 27.21), or by 2 fold when compared to control corals (pH_T = 8.1, 26°C; 2-ways ANOVA, p < 0.0001, F_2 = 22.78). There was a significant interaction of pH and temperature (2-ways ANOVA, p < 0.0001, F_2 = 20.56) on phosphate uptake rates.

Discussion

This study presents the changes in the uptake of inorganic phosphorus and nitrogen by a scleractinian coral, *S. pistillata,* under elevated temperature and/or decreased pH, thus bringing new insights into the ability of corals to respond to changes in their environment. To the best of our knowledge, the effects of acidification and/or elevated temperature on nutrient uptake by cnidarians, or even phytoplankton species, have been poorly investigated up to date. We showed that a short-term seawater acidification alone had no impact on the nutrient uptake rates, while elevated temperature (33°C) increased the uptake of phosphate but severely decreased, and even reversed the uptake of nitrogen (nitrogen release). An elevation in both temperature and pCO_2 significantly decreased the uptake of phosphate and nitrate compared to normal conditions (pH_T 8.1 and 26°C), suggesting that overall, climate change will negatively affect nutrient supply in corals.

Effect of lowered pH or/and elevated temperature on physiological parameters

Even though corals did not bleach during the 10-days incubation under high tem-

Article 3

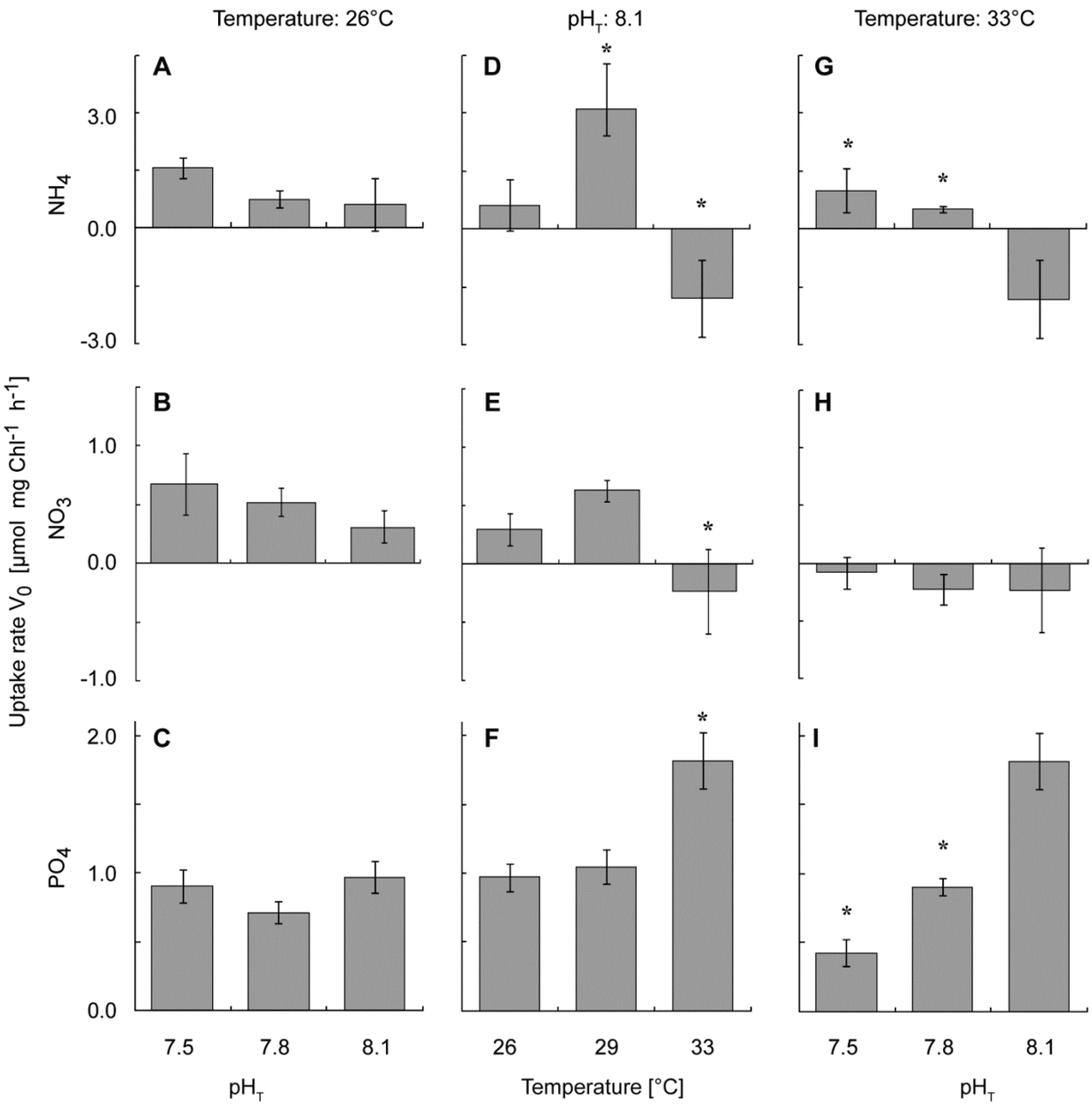


Figure 4 | Effect of pH and/or temperature on coral nutrient uptake rates. Effect of a 10-day exposure to lowered pH and/or elevated temperatures on ammonium (**A**, **D**, **G**), nitrate (**B**, **E**, **H**), and phosphate (**C**, **F**, **I**) uptake rate of *S. pistillata* nubbins. Corals were incubated either under 3 different pH_T at 26°C (**A**, **B**, **C**), under 3 different temperatures at pH_T = 8.1 (**D**, **E**, **F**), or under 3 different pH_T at 33°C (**G**, **H**, **I**). Data are presented as mean ± SE of 5 nubbins per treatment. Stars indicate treatments significantly different from the control (pH_T = 8.1 for **A**, **B**, **C**, **G**, **H**, **I**; T = 26°C for **D**, **E**, **F**).

perature, photosynthesis was impacted, with an increase in the F_v/F_m and ETR at 29°C, and a decrease of the photosynthetic rates, F_v/F_m, and ETR at 33°C, as previously observed [61]. A general decrease in photosynthesis has been observed when temperatures extend above 31°C [41,46,47,62,63], whereas a positive effect was reported when temperatures remained below 31°C [9,41,46,48,62,64]. The decrease in the rates of photosynthesis is often due to damages to the photosystems II (PSII) early during temperature stress [41,46,62,65,66], as observed in this study. Conversely to the temperature effect, there was no effect of pH alone on the photosynthetic rates, which is also in agreement with most of the previous studies [8,9,53,67-69]. This feature is attributed to the fact that corals do not rely solely on dissolved CO_2 for photosynthesis, but also largely depend on HCO_3^- [67,70-73]. Our results are however in disagreement with the study of Anthony et al.[48], who reported a decrease in the net productivity and an increase in the respiration of the corals *Acropora intermedia* and *Porites lobata* with seawater acidification even at normal temperature. However, the latter study used a higher natural irradiance (1000 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and a long-term exposure (8 weeks), which probably brought corals closer to their bleaching threshold. Finally, Hii et al. [74] reported that seawater acidification decreased photosynthesis in the coral *Galaxea fascicularis* and had no impact on that of *Porites cylindrica*, thus showing that the response of corals may be species-dependent.

Effect of lowered pH or/and elevated temperature on nutrient uptake rates

Maximum nutrient uptake rates correspond, as for all enzyme-involving processes, to an optimum in temperature and pH conditions [75,76]. This optimum can be different according to the nutrient or the organism considered. In this study, the optimum uptake rate for ammonium was achieved for the normal pH_T of 8.1 and a temperature of 29°C, while the highest phosphate uptake rate was observed for the normal pH_T of 8.1 and a temperature of 33°C. An increase in nitrate uptake rates was also observed at 29°C, although it was not significant. For both inorganic nitrogen and phosphorus, maximal rates were therefore achieved under elevated temperatures and at the current pH_T of 8.1.

Effect on ammonium uptake rates

The lack of impact of seawater pH alone (in the range studied) on ammonium uptake rates is in agreement with results reported on zooxanthellae freshly isolated from the symbiotic clam *Tridacna crocea*, for which no difference was found across a pH_T range of 7.8 to 8.8 [26]. On the contrary, Fitt et al. [27] observed an inverse relationship between pH and ammonium accumulation in the hemolymph of the symbiotic clam *T. gigas*, over a pH_T range of 7.4 to 7.9. However, in the latter study, changes in pH did not occur in the surrounding seawater but directly inside the tissue, and were related to diel variations in zooxanthellae photosynthesis. In our study, ammonium uptake rates displayed a bell-shaped response to temperature-stress, with a 5-fold increase at 29°C and a net decrease, and even release, at 33°C. Since ammonium uptake is a light-stimulated

process in symbiotic cnidarians [17,77-80] and is linked to zooxanthellae photosynthesis, the observed increase in uptake rates between 26°C and 29°C and the decrease between 29 and 33°C might be linked to the parallel increase and decrease in photosynthesis and photosynthetic efficiency. A similar release of ammonium was indeed observed in a previous study on the same coral species [25], when the photosynthetic chain was blocked by the electron transport inhibitor DCMU. In that latter study, excretion of ammonium was also elicited by the inhibition of the glutamate synthase (GOGAT) [25], which could be an additional explanation for the observed excretion of NH_4^+ at high temperature (33°C). Indeed, although the temperature-sensitivity of this enzyme is not known in corals, heat stress was shown to decrease its activity, as well as that of glutamine synthetase (GS), in higher plants [81]. The release of ammonium at 33°C was however no longer observed under low pH (pH_T = 7.5), and the uptake rate measured under these conditions was comparable to the "control conditions" (pH_T = 8.1, 26°C), therefore suggesting that CO_2 addition may completely offset the negative impact of temperature. One hypothesis to explain this result is that ammonium-assimilating enzymes (GS, GOGAT, and glutamate dehydrogenase GDH) [25,80,82-84] in corals are stimulated by seawater acidification, possibly through the impact of acidification on the intracellular pH [85]. For example, the activity of GS, GOGAT, and GDH are influenced by pH in an actinobacteria [86] and a cyanobacteria [87], with pH_T optima of 7.0 (GS), 7.2-7.6 (GOGAT), and 7.2-7.5 (GDH). In the coral *S. pistillata*, GDH aminating activity is also pH-dependent, as it increased when pH_T was decreased between 8.1 and 7.3 [25]. However, such potential pH effects on the enzymatic activity were only significant at elevated temperature, although a positive but not significant trend was observed at 26°C. It is possible that the enzymatic activity was already optimal at 26°C, as suggested by the concordance of uptake rates measured in this study with those reported in the literature [17,26,34,79,88], and so acidification did not lead to a significant improvement of ammonium uptake at that temperature. On the contrary, when conditions were no longer optimal (i.e. thermal stress), acidification appears to have a significant alleviating effect. It is therefore possible that, as was demonstrated for calcification [9], the effects of high CO_2 do not manifest at low temperatures.

Effect on nitrate uptake rates

Concerning nitrate, the lack of impact of seawater acidification alone is similar to the response reported for freshwater phytoplankton [89], for pH_Ts ranging between 6.6 and 9.2. Conversely, in some marine macroalgae, some authors [90-92] observed an enhancement of nitrate uptake at high CO_2 levels due to an increase in the activity of the nitrate reductase. Such enhancement may not have occurred in the coral *S. pistillata*, possibly because nitrate is not the main source of nitrogen [93,94] and therefore, the nitrate reductase might not be very active. As for ammonium, nitrate uptake rates were severely affected by a thermal stress at 33°C, therefore suggesting that the two nitrogen forms present the same temperature optimum for their uptake (i.e. 29°C), and that climate change in general may negatively impact the absorption of nitrogen by scleractinian corals. When seawater acidification was combined to

elevated temperature, nitrate uptake rates did not decrease any further.

Effect on phosphate uptake rates

The response of phosphate uptake to changes in temperature and pH differed from the nitrogen response. While a thermal stress at 33°C decreased the uptake rates of nitrogen, it increased those of phosphate. The only previous study that examined the impact of seawater temperature on phosphate uptake by the tropical coral *Pocillopora capitata* used a low temperature range of 6 to 22°C [21], and showed that temperatures below 19°C decreased uptake rates. Enhancement of uptake rates by temperature suggests that, although phosphate uptake is light-stimulated [21,55,95,96], it may be less dependent on photosynthesis than ammonium uptake.

As for nitrogen, there was no pH effect alone on phosphate uptake rates. This lack of pH effect (in the same pH range), either on phosphate uptake rates or on the activity of the alkaline phosphatase, has previously been reported for marine phytoplankton [97] and macroalgae [90]. In corals, it is possible that, as for ammonium, the enzymatic activity involved in phosphate uptake and assimilation was optimal at 26°C regarding the metabolic condition of the corals, since the uptake rates were in agreement with rates reported in the literature [21,34,55]. When seawater acidification was combined to elevated temperature, uptake rates severely decreased, by 4 fold when compared to elevated temperature and normal pH, or by 2 fold when compared to control corals (pH_T = 8.1, 26°C).These results therefore suggest that a combined thermal and acidification stress might impact the retrieval of phosphate by corals in the future. The temperature-dependent response of corals to acidification may be due to a higher/lower affinity of the carrier for the different phosphate species available under certain environmental conditions. At 33°C and pH_T 7.5, the decrease in uptake rates may for instance have resulted from a higher affinity of the carrier towards the phosphate form less available due to more acidic conditions, i.e. the less abundant PO_4^{3-}. Indeed, as seawater pH_T decreases from 8.1 to 7.5, the relative abundance of HPO_4^{2-} increases from 82% to 92%, while PO_4^{3-} decreases from 18% to 5% ($H_2PO_4^-$ remains negligible).This 3.6-fold decrease in the relative abundance of PO_4^{3-} corresponds to the observed 4-fold decrease in phosphate uptake rates. From previous work on *S. pistillata*, we showed that a sodium/phosphate symporter is involved in the uptake of phosphate in this coral [34]. Although the same type of symporter has been reported in a marine *Aplysia* [98], no studies to date have examined the stoichiometry of such transporters in invertebrates. On the contrary, in vertebrates, three distinct families have been found, with a remarkable preference (i.e. higher affinity) for divalent HPO_4^{2-} in the type II family and for monovalent H_2PO^{4-} in the type III family [99,100]. The possibility of preferences for specific phosphate forms therefore needs to be considered more extensively for the sodium/phosphate symporter of corals.

Conclusion

In conclusion, this study has shown a strong negative impact of increasing temperature on the ability of corals to take up inorganic nitrogen from the surrounding environment. High temperature indeed completely inhibited the uptake of either

ammonium or nitrate, and even induced a nitrogen release from the corals. Although high temperature enhanced the uptake of inorganic phosphorus, corals cannot use this phosphorus without nitrogen, which is needed in all metabolic functions, such as tissue growth and repair, chlorophyll synthesis, zooxanthellae growth, reproduction, etc…Although nitrogen can also be acquired through particulate feeding when not available in its inorganic forms, not all coral species are able to efficiently graze on zooplankton [101] or increase their grazing rates when they are under thermal stress [23]. Such species will therefore be the first to suffer from thermal stress. A short-term seawater acidification alone does not seem to induce strong changes in the capacity of corals to take up nutrients; however, longer-term experiments are still needed to confirm these first results and the lack of effect. Nevertheless, when combined to high temperatures, a decrease in seawater pH had in turn a negative impact on phosphate uptake. Since phosphorus is needed in several steps of the photosynthetic machinery [102,103] as well as in energy production (ATP for example), this study adds to the growing body of evidence that corals will suffer from global change.

Acknowledgements

We wish to thank Beat Gasser, Khalid Al-Trabeen, François Oberhänsli, and Riccardo Rodolfo-Metalpa for assistance in tank maintenance and uptake rate experiments at the IAEA. We also thank Cécile Rottier and Nicolas Tolstoï for assistance in physiological measurements at the CSM. We are grateful to Patrick Rolland from the Direction de l'Environnement (Monaco) for the use of his autoanalyzer during nitrate determination. We thank two anonymous reviewers for their helpful comments.

References

1. Kleypas JA, Buddemeier RW, Archer D, Gattuso J-P, Langdon C, et al. (1999) Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs. Science 284: 118-120.
2. Solomon S, Qin D, Manning M, Marquis M, Averyt K, et al. (2007) Climate changee 2007: the physical science basis. New York: Cambrige Univ. Press. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. 142 p.
3. Raven J, Caldeira K, Elderfield H, Hoegh-Guldberg O, Liss P, et al. (2005) Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. London: The Royal Socitey.
4. Orr JO, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, et al. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. Nature 437: 681-686.
5. Feely RA, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypas J, et al. (2004) Impact of Anthropogenic CO_2 on the $CaCO_3$ System in the Oceans. Science 305: 362-366.
6. Caldeira K, Wickett ME (2003) Oceanography: Anthropogenic carbon and ocean pH. Nature 425: 365.
7. Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, et al. (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. Science 318: 1737-1742.
8. Langdon C, Atkinson MJ (2005) Effect of elevated pCO_2 on photosynthesis and calcification of corals and interactions with seasonal change in temperature/irradiance and nutrient enrichment. J Geophys Res 110: 1-16.
9. Reynaud S, Leclercq N, Romaine-Lioud S, Ferrier-Pagés C, Jaubert J, et al. (2003)

Interacting effects of CO_2 partial pressure and temperature on photosynthesis and calcification in a scleractinian coral. Glob Change Biol 9: 1660-1668.

10. Guinotte JM, Fabry VJ (2008) Ocean Acidification and Its Potential Effects on Marine Ecosystems. Ann N Y Acad Sci 1134-: 320-342.
11. Beman JM, Chow C-E, King AL, Feng Y, Fuhrman JA, et al. (2011) Global declines in oceanic nitrification rates as a consequence of ocean acidification. Proc Natl Acad Sci 108: 208-213
12. Hutchins DA, Fu F-X (2008) Linking the oceanographic biogeochemistry of iron and phosphorus with the marine nitrogen cycle. In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ, editors. Nitrogen in the marine environment, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Press. pp. 1,627-621,653.
13. Levitan O, Rosenberg G, Setlik I, Setlikova E, Grigel J, et al. (2007) Elevated CO_2 enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. Glob Change Biol 13: 531-538.
14. Hutchins DA, Fu F-X, Zhang Y, Warner ME, Feng Y, et al. (2007) CO_2 control of Trichodesmium N_2 fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. Limnol Oceanogr 52: 1293-1304.
15. Crossland CJ, Barnes DJ (1983) Dissolved nutrients and organic particulates in water flowing over coral reefs at Lizard Island. Aust J Mar Freshw Res 34: 835-844.
16. Muscatine L (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. In: Dubinski Z, editor. Coral Reefs. Amsterdam, Pays-Bas: Elsevier. pp. 75-87.
17. Muscatine L, D'Elia CF (1978) The uptake, retention and release of ammonium by reef corals. Limnol Oceanogr 23: 725-734.
18. Roberts JM, Davies PS, Fixter LM, Preston T (1999) Primary site and initial products of ammonium assimilation in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. Mar Biol 135: 223-236.
19. Bythell JC (1988) A total nitrogen and carbon budget for the elkhorn coral *Acropora palmata* (Lamarck). Proc 6th Int Coral Reef Symp. pp. 535-540.
20. Hoegh-Guldberg O, Williamson J (1999) Availability of two forms of dissolved nitrogen to the coral *Pocillopora damicornis* and its symbiotic zooxanthellae. Mar Biol 133: 561-570.
21. D'Elia CF (1977) The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. Limnol Oceanogr 22: 301-315.
22. Ferrier-Pagès C, Gattuso JP, Dallot S, Jaubert J (2000) Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*. Coral Reefs 19: 103-113.
23. Ferrier-Pagès C, Rottier C, Béraud 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. J Exp Mar Biol Ecol 390: 118-124.
24. Borell EM, Yuliantri AR, Bischof K, Richter C (2008) The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. J Exp Mar Biol Ecol 364: 116-123.
25. Rahav O, Dubinsky Z, Achituv Y, Falkowski PG (1989) Ammonium metabolism in the zooxanthellate coral, *Stylophora pistillata*. P Roy Soc Lond B Bio 236: 325-337.
26. D'Elia CF, Domotor SL, Webb KL (1983) Nutrient uptake kinetics of freshly isolated zooxanthellae. Mar Biol 75: 157-167.
27. Fitt WK, Rees TAV, Yellowlees D (1995) Relationship between pH and the availability of dissolved inorganic nitrogen in the zooxanthella-giant clam symbiosis. Limnol Oceanogr 40: 976-982.
28. Fu F-X, Warner ME, Zhang Y, Feng Y, Hutchins DA (2007) Effects of increased temperature and CO_2 on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). J Phycol 43: 485-496.
29. Conroy JP, Milham PJ, Reed ML, Barlow EW (1990) Increases in phosphorus requirements for CO_2-enriched pine species. Plant Physiology 92: 977-982.
30. Cotrufo MF, Ineson P, Scott A (1998) Elevated CO_2 reduces the nitrogen concentration of plant tissues. Glob Change Biol 4: 43-54.
31. Rogers GS, Payne L, Milham P, Conroy J (1993) Nitrogen and phosphorus requirements of cotton and wheat under changing atmospheric CO_2 concentrations. Plant Soil 155-156: 231-234.

32. Cohen AL, Holcomb M (2009) Why corals care about ocean acidification. Uncovering the mechanism. Oceanography 22: 118-127.
33. Erez J, Reynaud S, Silverman J, Schneider K, Allemand D (2011) Coral calcification under ocean acidification and global change. In: Dubinsky Z, Stambler N, editors. Coral Reefs: An Ecosystem in Transition: Springer Netherlands. pp. 151-176.
34. Godinot C, Grover R, Allemand D, Ferrier-Pagès C (2011) High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral Stylophora pistillata. J Exp Biol 214: 2749-2754.
35. Kleypas JA, Danabasoglu G, Lough JM (2008) Potential role of the ocean thermostat in determining regional differences in coral reef bleaching events. Geophys Res Lett 35: L03613.
36. Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. Mar Freshw Res 50: 839-866.
37. McClanahan TR, Ateweberhan M, Graham NAJ, Wilson SK, Ruiz Sebastian C, et al. (2007) Western Indian Ocean coral communities: bleaching responses and susceptibility to extinction. Mar Ecol Prog Ser 337: 1-13.
38. Kleypas JA, Buddemeier RW, Gattuso JP (2001) The future of coral reefs in an age of global change. Int J Earth Sci 90: 426-437.
39. Guinotte J, Buddemeier R, Kleypas J (2003) Future coral reef habitat marginality: temporal and spatial effects of climate change in the Pacific basin. Coral Reefs 22: 551-558.
40. Coles SL, Brown BE (2003) Coral Bleaching - Capacity for acclimatization and adaptation. Adv Mar Biol 46: 182-223.
41. Hoegh-Guldberg O, Smith GJ (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. J Exp Mar Biol Ecol 129: 279-303.
42. Jokiel PL, Coles SL (1990) Response of hawaiian and other indo-pacific reef corals to elevated temperature. Coral Reefs 8: 155-162.
43. Lesser MP (1997) Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. Coral Reefs 16: 187-192.
44. Cantin NE, Cohen AL, Karnauskas KB, Tarrant AM, McCorkle DC (2010) Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea. Science 329: 322-325.
45. Lough JM, Barnes DJ (2000) Environmental controls on growth of the massive coral *Porites*. J Exp Mar Biol Ecol 245: 225-243.
46. Iglesias-Prieto R, Matta JL, Robins WA, Trench RK (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. Proc Natl Acad Sci USA 89: 10302-10305.
47. Al-Horani F (2005) Effects of changing seawater temperature on photosynthesis and calcification in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*, measured with O_2, Ca^{2+} and pH microsensors. Sci Mar 69: 347-354.
48. Anthony KRN, Kline DI, Diaz-Pulido G, Dove S, Hoegh-Guldberg O (2008) Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. Proc Natl Acad Sci USA 105: 17442-17446.
49. Tambutté É, Allemand D, Jaubert J (1995) The *Stylophora pistillata* microcolony: a model for studying calcium transport process during coral biomineralization. Bull Inst océanogr, Monaco, Proceedings of the 7th international symposium on biomineralization, "Biomineralization 93", D Allemand and J P Cuif [eds], N° spécial 14: 79-87.
50. Williams GJ, Knapp IS, Maragos JE, Davy SK (2010) Modeling patterns of coral bleaching at a remote Central Pacific atoll. Mar Pollut Bull 60: 1467-1476.
51. Lesser MP, Farrell J (2004) Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. Coral Reefs 23: 367-377.
52. Dove S (2004) Scleractinian corals with photoprotective host pigments are hypersensitive to thermal bleaching. Mar Ecol Prog Ser 272: 99.
53. Houlbreque F, Rodolfo-Metalpa R, Jeffree RA, Oberhansli F, Teyssie J-L, et al. (2011) Effetcs of increased pCO_2 on zinc bioaccumulation and calcification in the tropical coral *Stylophora pistillata*. Coral Reefs In press.
54. Dickson AG, Sabine CL, Christian JR (2007) Guide to best practices for ocean

CO_2 measurements.; 8 PspN, editor: North Pacific Marine Science Organization, Sidney, BC. 191 p.

55. Godinot C, Ferrier-Pagès C, Grover R (2009) Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol Oceanogr 54: 1627-1633.
56. Holmes RM, Aminot A, Kérouel R, Hooker BA, Peterson BJ (1999) A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Can J Fish Aquat Sci 56: 1801-1808.
57. Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal Chim Acta 27: 31-36.
58. Aminot A, Kérouel R (2007) Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu: Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin. 188 p.
59. Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. Biochem Physiol Pflanz 167: 191-194.
60. Johannes RE, Weibe WJ (1970) A method for determination of coral tissue biomass and composition. Limnol Oceanogr 15: 822-824.
61. Fitt WK, Warner ME (1995) Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. Biol Bull 189: 298-307.
62. Kajiwara K, Nagai A, Ueno S, Yokochi H (1995) Examination of the effect of temperature, light intensity and zooxanthellae concentration on calcification and photosynthesis of scleractinian coral *Acropora pulchra*. J School Mar Sci Technol 40: 95-103.
63. Jones RJ, Hoegh-Guldberg O, Larkum AWD, Schreiber U (1998) Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO2 fixation mechanism in zooxanthellae. Plant Cell Environ 21: 1219-1230.
64. Coles SL, Jokiel PL (1977) Effects of temperature on photosynthesis and respiration in hermatypic corals. Mar Biol 43: 209-216.
65. Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW (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 Environ 19: 291-299.
66. Iglesias-Prieto R (1995) The effects of elevated temperature on the photosynthetic response of symbiotic dinoflagellates. Photosynthesis: from light to biosphere (eds P Mathis), Vol 4, pp 793-796 Kluwer Academic Publishers, Netherland.
67. Schneider K, Erez J (2006) The effect of carbonate chemistry on calcification and photosynthesis in the hermatypic coral *Acropora eurystoma*. Limnol Oceanogr 51: 1284-1293.
68. Leclercq N, Gattuso J-P, Jaubert J (2002) Primary production, respiration, and calcification of a coral reef mesocosm under increased CO_2 partial pressure. Limnol Oceanogr 47: 558-564.
69. Langdon C, Broecker W, Hammond D, Glenn E, Fitzsimmons K, et al. (2003) Effect of elevated CO_2 on the community metabolism of an experimental coral reef. Global Biogeochem Cy 17: 11.11-11.14.
70. Burris JE, Porter JW, Laing WA (1983) Effects of carbon dioxide concentration on coral photosynthesis. Mar Biol 75: 113-116.
71. Herfort L, Thake B, Taubner I (2008) Bicarbonate stimulation of calcification and photosynthesis in two hermatypic corals. J Phycol 44: 91-98.
72. Al-Moghrabi S, Goiran C, Allemand D, Speziale N, Jaubert J (1996) Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral/ dinoflagellate association. II. Mechanisms for bicarbonate uptake. J Exp Mar Biol Ecol 199: 227-248.
73. Goiran C, Al-Moghrabi S, Allemand D, Jaubert J (1996) Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral/dinoflagellate association.1. Photosynthetic performances of symbionts and dependence on sea water bicarbonate. J Exp Mar Biol Ecol 199: 207-225.
74. Hii Y-S, Bolong AMA, Yang T-T, Liew H-C (2009) Effect of elevated carbon dioxide on two scleractinian corals: *Porites cylindrica* (Dana, 1846) and *Galaxea fascicularis* (Linnaeus, 1767). J Mar Biol 2009: 1-7.
75. Lehninger AL (1985) Enzymes. In: Lehninger AL, Flammarion Medecine Sciences, editor. Principles of biochemistry,

1st Edition. Baltimore: The John Hopkins University. pp. 207-248.
76. Fersht A (1977) Enzyme structure and mechanism. San Francisco: W. H. Freeman.
77. D'Elia CF, Cook CB (1988) Methylamine uptake by zooxanthellae-invertebrate symbioses: insights into host ammonium environment and nutrition. Limnol Oceanogr 33: 1153-1165.
78. Wilkerson FP, Trench RK (1986) Uptake of dissolved inorganic nitrogen by the symbiotic clam *Tridacna gigas* and the coral *Acropora* sp. Mar Biol 93: 237-246.
79. Domotor SL, D'Elia CF (1984) Nutrient uptake kinetics and growth of zooxanthellae maintained in laboratory culture. Mar Biol 80: 93-101.
80. Wilkerson F, Muscatine L (1984) Uptake and assimilation of dissolved inorganic nitrogen by a symbiotic sea anemone. Proc R Soc Lond B Biol Sci B: 71-86.
81. Cui L, Cao R, Li J, Zhang L, Wang J (2006) High temperature effects on ammonium assimilation in leaves of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. Plant Growth Regul 49: 127-136.
82. Yellowlees D, Rees TAV, Fitt WK (1994) Effect of ammonium-supplemented seawater on glutamine synthetase and glutamate deshydrogenase activities in host tissue and zooxanthellae of *Pocillopora damicornis* and on ammonium uptake rates of the zooxanthellae. Pac Sci 48: 291-295.
83. Anderson LA, Burris JE (1987) Role of glutamine synthetase in ammonia assimilation by symbiotic marine dinoflagellates (zooxantellae). Mar Biol 94: 451-458.
84. Catmull J, Yellowlees D, Miller DJ (1987) $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase from *Acropora formosa*: purification and properties. Mar Biol 95: 559-563.
85. Marubini F, Atkinson MJ (1999) Effects of lowered pH and elevated nitrate on coral calcification. Mar Ecol Prog Ser 188: 117-121.
86. Ertan H (1992) Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. Arch Microbiol 158: 35-41.
87. Martinez-Bilbao M, Martinez A, Urkijo I, Llama MJ, Serra JL (1988) Induction, isolation, and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum*. J Bacteriol 170: 4897-4902.
88. Grover R, Maguer J-F, Reynaud-Vaganay S, Ferrier-Pagès C (2002) Uptake of ammonium by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Effect of feeding, light, and ammonium concentrations. Limnol Oceanogr 47: 782-790.
89. Toetz DW (1981) Effects of pH, phosphate and ammonia on the rate of uptake of nitrate and ammonia by freshwater phytoplankton. Hydrobiologia 76: 23-26.
90. Xu Z, Zou D, Gao K (2010) Effects of elevated CO_2 and phosphorus supply on growth, photosynthesis and nutrient uptake in the marine macroalga *Gracilaria lemaniformis* (Rhodophyta). Bot Mar 53: 123-129.
91. Zou D (2005) Effects of elevated atmospheric CO_2 on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta). Aquaculture 250: 726-735.
92. Gordillo FJL, Niell FX, Figueroa FL (2001) Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO_2 level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). Planta 213: 64-70.
93. Grover R, Maguer J-F, Allemand D, Ferrier-Pagès C (2003) Nitrate uptake in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol Oceanogr 48: 2266-2274.
94. Grover R, Maguer JF, Allemand D, Ferrier-Pagès C (2006) Urea uptake by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. J Exp Mar Biol Ecol 332: 216-225.
95. Jackson AE, Yellowlees D (1990) Phosphate uptake by zooxanthellae isolated from corals. Proc R Soc Lond B Biol Sci 242: 201-204.
96. Sorokin YI (1992) Phosphorus metabolism in coral reef communities: exchange between the water column and bottom biotopes. Hydrobiologia 242: 105-114.
97. Tanaka T, Thingstad TF, Lovdal T, Grossart HP, Larsen A, et al. (2008) Availability of phosphate for phytoplankton and bacteria and of glucose for bacteria at different pCO_2 levels in a mesocosm study. Biogeosciences 5: 669-678.

98. Gerencser GA, Levin R, Zhang J (2002) Sodium-phosphate symport by *Aplysia Californica* gut (physiology). Zool Sci (Tokyo) 19: 163-166.
99. Markovich D (2010) Sulfate and phosphate transporters in mammalian renal and gastrointestinal systems. In: Gerencser GA, editor. Epithelial transport physiology. New York: Springer.
100. Virkki LV, Biber J, Murer H, Forster IC (2007) Phosphate transporters: a tale of two solute carriers. Am J Physiol Renal Physiol 293: 643-654.
101. Grottoli AG, Rodrigues LJ, Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. Nature: 1186-1189.
102. Goodman M, Bradley DF, Calvin M (1953) Phosphorus and photosynthesis. I. Differences in the light and dark incorporation of radiophosphate1. J Am Chem Soc 75: 1962-1967.
103. Hall DO, Rao KK (1987) Photosynthesis. Cambridge: Cambridge University Press. 128 p.

Chapter 3

The uptake of dissolved organic phosphorus

Abstract

Despite the fact that DOP levels are usually of the same order of magnitude as DIP levels in reef waters, few studies have addressed its use by corals and their zooxanthellae, and the role of the host in DOP uptake remains particularly unknown. The use of DOP involves a large class of enzymes called phosphatases. They hydrolyze DOP molecules into DIP molecules, which are then taken up by corals. In this work, the activity of phosphatases (abbreviated as APA) was studied in various corals hosts and their symbionts, in order to determine the conditions under which DOP is used, and to which extent this process may compensate for a lack of either DIP or POP, the other two forms of phosphorus available for corals in reef waters. The respective roles of the host and the symbionts in APA were first examined, and the effect of various environmental parameters was then characterized. Results demonstrated that the activity of phosphatases at the host membrane is affected by the photosynthetic activity of the symbionts, as APA increased with irradiance. APA was also affected by the availability of DIP and POP, since host APA increased with symbiont loss (bleaching, i.e. lack of DIP) and with host starvation (lack of POP). Results also suggested for the first time that host and symbiont APA are dependent upon zooxanthellae clade, since clade C displayed lower APA than clades A and B. Finally, at environmental DIP and DOP concentrations of 0.5 µmol L^{-1}, we show that DOP hydrolysis brings up to 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1}, while DIP and POP were reported to bring up to 0.16 and 0.09 µmol P cm^{-2} d^{-1} respectively. This comparison suggests that DOP may represent a highly significant source of phosphorus for corals in oligotrophic reef waters.

Chapitre 3

L'absorption de phosphore organique dissous

Résumé

En dépit du fait que le POD soit présent sur les récifs coralliens à des concentrations similaires à celles du PID, bien peu d'études se sont intéressées à son utilisation par les coraux et leurs zooxanthelles. Le rôle de l'hôte dans cette utilisation reste d'ailleurs totalement méconnu. L'utilisation du POD fait intervenir une classe d'enzymes nommées phosphatases, qui hydrolysent le POD en PID, lequel est ensuite absorbé. Dans ce travail, l'activité des phosphatases (abrégée APA) a été étudiée dans divers hôtes coralliens et leurs symbiotes, afin de déterminer quelles sont les conditions d'absorption du phosphore contenu dans le POD, et dans quelle mesure l'APA peut compenser l'absence des deux autres formes de phosphore, le PID et le POP. Les rôles respectifs de l'hôte et des symbiotes dans l'APA on tout d'abord été examinés, puis l'effet de divers facteurs environnementaux a été caractérisé. Les résultats obtenus ont démontré que l'activité des phosphatases à la membrane de l'hôte est influencée par l'activité photosynthétique des symbiotes. En effet, l'APA a augmenté avec l'éclairement. L'APA est également influencée par la disponibilité du PID et du POD, puisque l'APA de l'hôte a augmenté avec la perte des symbiotes (blanchissement, i.e. réduction des apports de PID) et avec le manque de nourriture (réduction des apports de POP). De plus, cette étude suggère pour la première fois que l'APA de l'hôte et des zooxanthelles dépend du clade des symbiotes, avec une APA *a priori* moins performante chez le clade C que chez les clades A et B. Enfin, à une concentration environnementale de PID et de POD de 0,5 µmol L^{-1}, cette étude démontre que l'hydrolyse du POD apporterait jusqu'à 0,16 µmol P cm^{-2} j^{-1}, tandis qu'il a été rapporté que le POD et le POP apporteraient respectivement jusqu'à 0,16 et 0,09 µmol P cm^{-2} j^{-1}. Cette comparaison suggère que le POD peut représenter une source importante de phosphore sur les récifs oligotrophes.

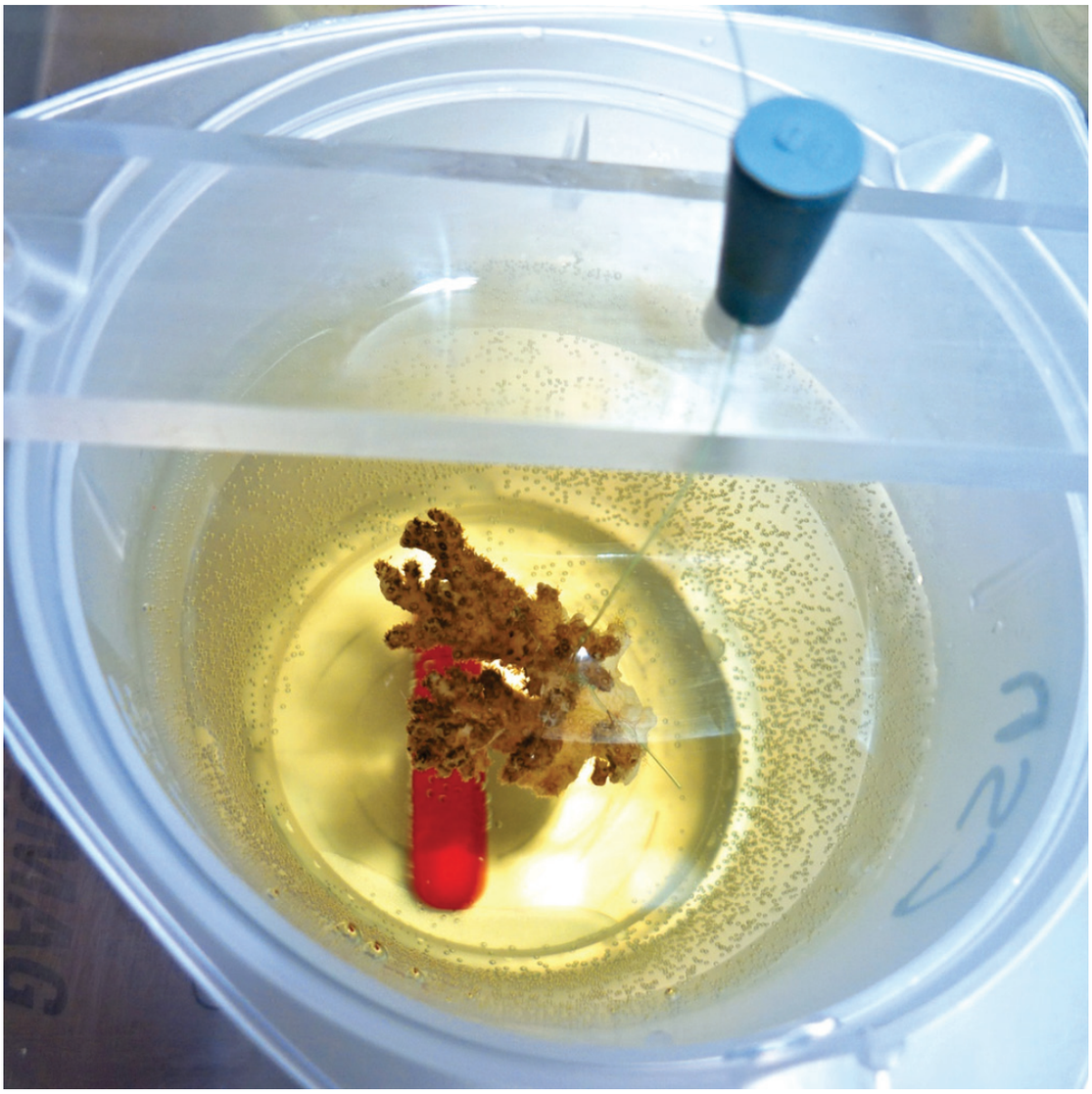


Figure 19 | Bouture de *Pocillopora damicornis* lors d'une mesure d'absorption de POD

La bouture est immergée dans un bécher rempli d'eau de mer enrichie en POD (produit de synthèse pNPP). La coloration jaune de l'eau est due à l'activité des phosphatases alcalines, enzymes responsables de l'absorption du phosphore contenu dans le POD. Ces enzymes hydrolysent le pNPP en PID et en pNP, un produit coloré en jaune que l'on observe facilement à l'œil nu et que l'on dose par spectrophotométrie. Le petit cône de caoutchouc bleu visible en haut de la photographie sert à retenir, sur une barre en plastique transparente, le fil de nylon auquel est suspendue la bouture. Le barreau aimanté rouge permet une homogénéisation des concentrations dans le bécher.

1 Mécanisme d'absorption du phosphore organique dissous

Le POD en milieu récifal

Comme présenté auparavant, le phosphore organique dissous (ou POD) est une des trois sources de phosphore auquel les coraux ont accès dans la colonne d'eau. Dans les récifs, il présente des concentrations qui sont typiquement du même ordre de grandeur que celles du PID (Atkinson, 1987a; Furnas *et al.*, 1988), et qui sont ordinairement inférieures à 1 µmol L^{-1} (Crossland, 1983; Crossland et Barnes, 1983).

Malgré l'importance potentielle de cette source de phosphore pour l'association symbiotique dans son ensemble, et similairement au PID, il apparaît que les deux seules études sur la question se sont concentrées sur le rôle des zooxanthelles dans l'absorption du POD (Jackson *et al.*, 1989; Annis et Cook, 2002), tandis que le rôle de l'hôte reste totalement méconnu.

Une conversion enzymatique est nécessaire à l'absorption du POD

Rôle des phosphatases

L'absorption du phosphore sous forme de POD ne se fait pas directement, ainsi que cela a été évoqué dans la figure 13 du chapitre 1. Le POD est en fait converti en PID par voie enzymatique, avant d'être absorbé sous cette forme[35] (par les transporteurs de phosphate présentés dans le chapitre précédent). Ce recyclage du phosphore constitutif du POD implique des enzymes appelées phosphatases. Ces phosphatases appartiennent à une large famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de molécules organiques phosphorées (esters de phosphate) en un ion phosphate (PID) et une molécule organique portant un groupement hydroxyle (appelée alcool en chimie organique), comme présenté sur la figure 19 et la figure 20. Ces enzymes sont retrouvées dans l'ensemble du vivant, aussi bien dans les bactéries que les plantes et les animaux. Les coraux et leurs zooxanthelles ne font pas exception.

Existence de phosphatases alcalines et acides

Comme toutes les enzymes, les différentes phosphatases présentent un pH optimal, auquel leur activité est maximale. Si ce pH est supérieur à 7, on parle de phosphatases alcalines (PA), sinon de phosphatases acides (PAc). Spécificité de substrat, mécanismes catalytiques et voies d'inhibition diffèrent entre les phosphatases alcalines et acides (Neumann, 1968; Fernley, 1971; Hollander, 1971).

Chez les zooxanthelles, les deux types d'activités enzymatiques sont présentes (respectivement nommées APA et APAc pour l'activité des phosphatases alcalines et acides; Jackson *et al.*, 1989; Annis et Cook, 2002). Chez l'hôte, seule une activité acide a été rapportée (Hayes et Goreau, 1977; Domart-Coulon *et al.*, 2001).

Localisation des phosphatases

Les phosphatases sont généralement associées à la périphérie des cellules (enzymes

[35] Parler "d'**absorption du POD**" est donc un abus de langage, qui sera néanmoins conservé par endroits pour ne pas alourdir inutilement le manuscrit ; le terme exact étant "utilisation ", ou "recyclage" du phosphore contenu dans le POD.

membranaires ou proches de la membrane; Kuenzler et Perras, 1965; Møller *et al.*, 1975; Doonan et Jensen, 1980). Néanmoins, certaines phosphatases sont plutôt intracellulaires ou vésiculaires, et jouent un rôle dans la régénération des ressources internes de DOP de la vacuole ou du dictyosome (Cooper *et al.*, 1974; Swanson et Floyd, 1979; Barlow et Triemer, 1986). De manière générale, et comme c'est le cas pour la majorité des enzymes, le pH optimal des phosphatases reflète le pH du milieu dans lequel elles fonctionnent. Ainsi, l'APAc est plutôt associée aux phosphatases intracellulaires, tandis que l'APA est plutôt associée aux phosphatases extracellulaires en milieu marin.

Chez les zooxanthelles, une activité phosphatase extracellulaire (Annis et Cook, 2002), acide et alcaline, et une activité intracellulaire (Jackson *et al.*, 1989), acide, ont été rapportées et étudiées. Chez l'hôte corallien, une activité phosphatase intracellulaire, acide, a parfois été rapportée, mais elle n'a jamais été caractérisée plus avant (Hayes et Goreau, 1977; Domart-Coulon *et al.*, 2001).

Durant cette thèse, les coraux utilisés lors des expériences étaient entiers et les zooxanthelles intactes. Or, l'activité des phosphatases intracellulaires n'étant observable qu'après lyse des cellules, seule l'ac-

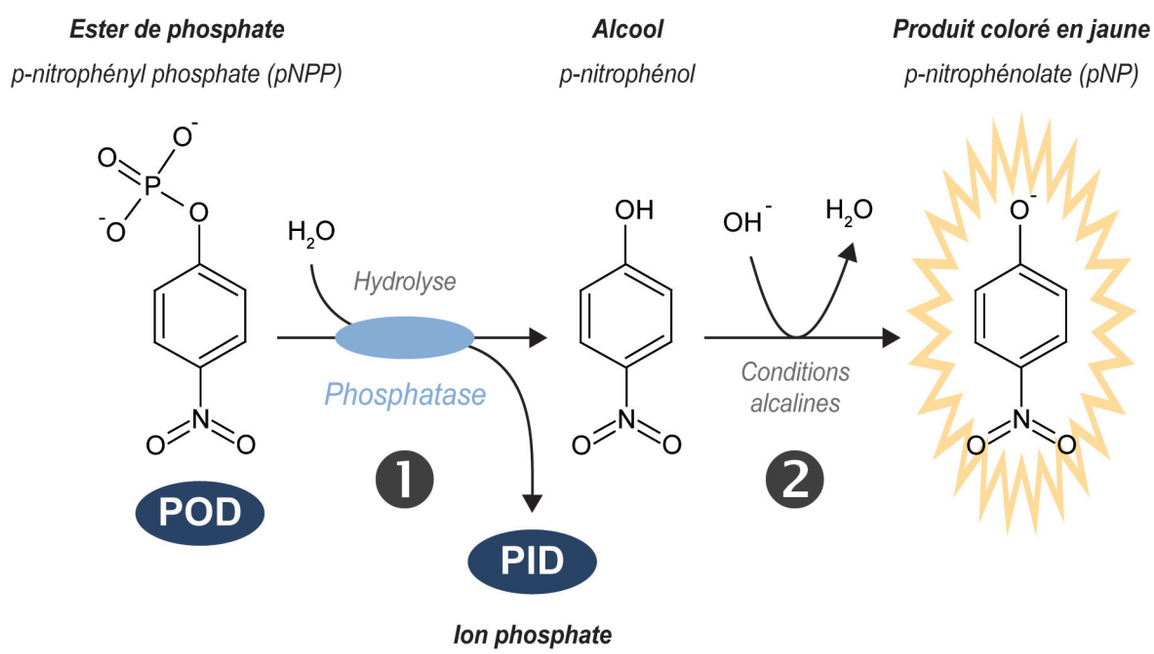


Figure 20 | Activité des phosphatases
Les phosphatases présentent souvent une spécificité de substrat large, c.à.d. qu'elles sont capables d'hydrolyser un grand nombre d'esters de phosphate différents. Cela est dû au fait que la reconnaissance du substrat se fait principalement au niveau du résidu phosphate, et non de l'ester.
L'exemple illustré sur cette figure présente le test colorimétrique permettant de doser l'activité de la phosphatase alcaline (APA). En (**1**), le produit de synthèse pNPP ajouté dans l'eau lors des expériences, est hydrolysé par la phosphatase des coraux ou de leurs zooxanthelles, ce qui libère une molécule de PID et un alcool ; puis, en (**2**), donne un produit coloré en jaune (figure 19), le pNP, après alcalinisation avec de la soude (source des ions OH^-) d'un échantillon d'eau prélevé. La couleur jaune est dosée en spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 400 nm (Kuenzler et Perras, 1965).

tivité des phosphatases extracellulaires a pu être observée et analysée. De plus, les expériences ayant été menées en eau de mer (pH alcalin), c'est donc l'APA et non l'APAc qui a été étudiée.

2 Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude

Dans ce contexte, l'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été de déterminer quelles sont les conditions d'utilisation du POD par les coraux, et dans quelle mesure l'absorption du phosphore contenu dans le POD peut compenser l'absence des deux autres formes de phosphore, le PID et le POP. Les rôles respectifs de l'hôte et des symbiotes dans l'APA ont tout d'abord été examinés, puis l'effet de divers facteurs environnementaux a été caractérisé. Les paramètres suivant ont été testés : lumière, présence/absence de symbiotes, et nutrition hétérotrophe. Enfin, cette étude a été complétée par un bilan chiffré des apports de phosphore pour la symbiose à des concentrations environnementales de PID, de POD et de POP. Ce bilan est présenté dans l'article 4, et sera discuté dans le chapitre 7.

Ces travaux se basent sur les hypothèses suivantes. 1) Les symbiotes et l'hôte présentent probablement des besoins en POD différents, et donc une affinité différente pour ce substrat. De plus, 2) l'hypothèse que l'APA diffère selon le clade des zooxanthelles a été testée. Concernant l'effet des paramètres environnementaux, on s'attend à ce que, 3) l'augmentation de la photosynthèse avec la lumière entraîne une augmentation de l'APA, similairement a ce qui a été observé pour le PID. Il est également attendu que 4) l'absence de zooxanthelles chez des coraux blanchis (également nommés aposymbiotiques, c.à.d. des coraux ayant perdu leurs zooxanthelles symbiotiques), qui présentent par ailleurs une très faible absorption de PID, entraîne une augmentation de l'APA pour compenser le manque de PID. Enfin, 5) l'absence de nutrition hétérotrophe de l'hôte supprimant les apports de POP, l'APA devrait également augmenter en l'absence de nourriture.

Les paragraphes qui suivent résument les principaux résultats issus de la mise en œuvre de ces objectifs et hypothèses. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis pour publication à une revue à comité de lecture international (article 4), au sein duquel ils sont discutés en détail. La technique employée pour doser l'activité de la phosphatase alcaline est illustrée sur la figure 19 et détaillée sur la figure 20.

3 Absorption du phosphore organique dissous

Comparaison des coraux entiers et des zooxanthelles fraîchement isolées

Les résultats obtenus durant cette thèse ont montré que l'APA extracellulaire est détectable même à de très faibles concentrations de pNPP. À 0,05 et 0,50 µmol L^{-1} de pNPP, l'APA mesurée pour l'hôte est de 0,8 ± 0,1 et 4,1 ± 0,4 nmol mg $prot^{-1}$ h^{-1}. L'étude cinétique, réalisée pour des concentrations de pNPP allant de 0,05 à 5000 µmol L^{-1}, a montré que l'APA est dépendante de la concentration en POD dans l'eau pour les zooxanthelles isolées et pour les cellules animales, avec une cinétique de type Michaelis-Menten (article 4, figure 5). Cela n'avait jamais été démontré aupara-

vant, ni pour les zooxanthelles, ni pour l'hôte, bien que le même type de cinétique existe pour les APA et APAc intracellulaires des zooxanthelles (Jackson *et al.*, 1989).

La comparaison des paramètres cinétiques obtenus a démontré que les zooxanthelles présentent une affinité bien plus forte pour le POD que l'hôte, avec une constante[36] K_m 22 fois plus faible que l'hôte (7,6 ± 1,5 µmol L^{-1} contre 170,0 ± 26,2 µmol L^{-1}). De plus, l'APA mesurée pour les zooxanthelles dans l'ensemble des expériences réalisées a généralement été plus élevée que l'APA de l'hôte (article 4, figures 2, 3 et 5). Si l'on suppose que les zooxanthelles fraîchement isolées présentent le même K_m que les zooxanthelles en symbiose, ces résultats montrent que les zooxanthelles semblent relativement bien adaptées pour une absorption efficace du POD issu du métabolisme de l'hôte, et tendraient à indiquer qu'elles sont généralement confrontées à une concentration micromolaire de POD au sein de la vacuole périsymbiotique. Au contraire, le K_m relativement fort de l'hôte indique que les phosphatases alcalines de l'hôte ne sont pas à leur optimum aux faibles concentrations de POD présentes dans l'eau de mer.

Rôles respectifs de l'hôte et des symbiotes, importance du clade

Afin d'examiner les rôles respectifs de l'hôte et des symbiotes dans l'absorption de POD par l'association symbiotique, des coraux sans symbiotes ont tout d'abord été utilisés (hôtes "purs") : le corail asymbiotique *Tubastraea* spp. et des *S. pistillata* aposymbiotiques (blanchis). Dans les deux cas, une APA forte a été mesurée (article 4, figure 4), ce qui démontre que l'expression de phosphatases alcalines à la membrane de l'hôte corallien est indépendante de la présence des symbiotes.

Néanmoins, la comparaison de l'APA mesurée chez les six espèces de coraux symbiotiques présentées dans la figure 11 du chapitre 1 a suggéré que, pour les zooxanthelles comme pour l'hôte, l'APA est dépendante du clade des zooxanthelles (article 4, figure 6). Il semblerait que les zooxanthelles du clade C (hébergé par *P. damicornis*, *P. cactus*, et *G. fascicularis*, et qui est le clade le plus répandu parmi les coraux ; Stat *et al.* 2008) soient moins performants que celles de clade A (hébergé par *S. pistillata* et *C. caespitosa*) ou du clade B (hébergé par *O. patagonica*) pour l'utilisation du POD. Cela pourrait être lié à des différences métaboliques entre clades, telles que des besoins en PID différents par exemple. Néanmoins, le faible niveau de réplication des clades au cours des expériences ne permet pas de conclure de manière ferme à ce sujet.

Ces résultats suggèrent toutefois que, si l'expression des phosphatases alcalines de l'hôte n'est pas dépendante de la présence de zooxanthelles, l'activité de ces phosphatases est tout de même en partie influencée par l'activité métabolique des symbiotes.

[36] On rappelle que K_m est la constante de Michaelis-Menten pour une cinétique enzymatique basée sur l'équation de Michaelis-Menten (équation 1, page 74). Cette constante se note aussi parfois K, $K_{0.5}$ ou autres...

4 Effets de facteurs environnementaux

Effet de la lumière, rôle des symbiotes

La mesure de l'APA de l'hôte à différents éclairements a permis de constater un effet positif de la lumière (article 4, figure 2), un autre argument en faveur du fait que l'activité des phosphatase alcalines de l'hôte est probablement régulée par les symbiotes, et vraisemblablement par leur activité photosynthétique, consommatrice de phosphore.

Pour les zooxanthelles isolées comme pour l'hôte, un effet positif de la lumière a été mis en évidence (article 4, figure 2), renforçant l'hypothèse d'un lien entre l'APA et la photosynthèse.

Effet du blanchissement

Les résultats obtenus sur les boutures de *S. pistillata* aposymbiotiques (blanchies) ont montré que l'APA de l'hôte est 6,4 fois plus élevée en l'absence des symbiotes qu'en leur présence (article 4, figure 4). Ce résultat est probablement lié au fait que les coraux blanchis n'absorbent plus de PID, contrairement à des coraux symbiotiques, mais le relarguent (Muller-Parker *et al.*, 1990). Cela crée un déficit de phosphore dans la symbiose, que l'augmentation de l'APA permet sans doute en partie de compenser.

Effet de la nutrition

Si l'APA a donc augmenté en l'absence de PID, elle a également augmenté en l'absence de POP. En effet, l'utilisation de coraux non nourris durant 3, 6 ou 9 semaines a permis de démontrer que l'APA augmente avec l'absence de nourriture pour l'hôte et pour les zooxanthelles isolées, et donc avec l'absence de POP (article 4, figure 3). Un effet similaire a été rapporté pour des zooxanthelles isolées d'anémones de mer de l'espèce *A. pallida* non nourries durant 5 semaines (Annis et Cook, 2002).

5 Schéma bilan

La figure 21 présente un bilan des résultats obtenus dans ce chapitre.

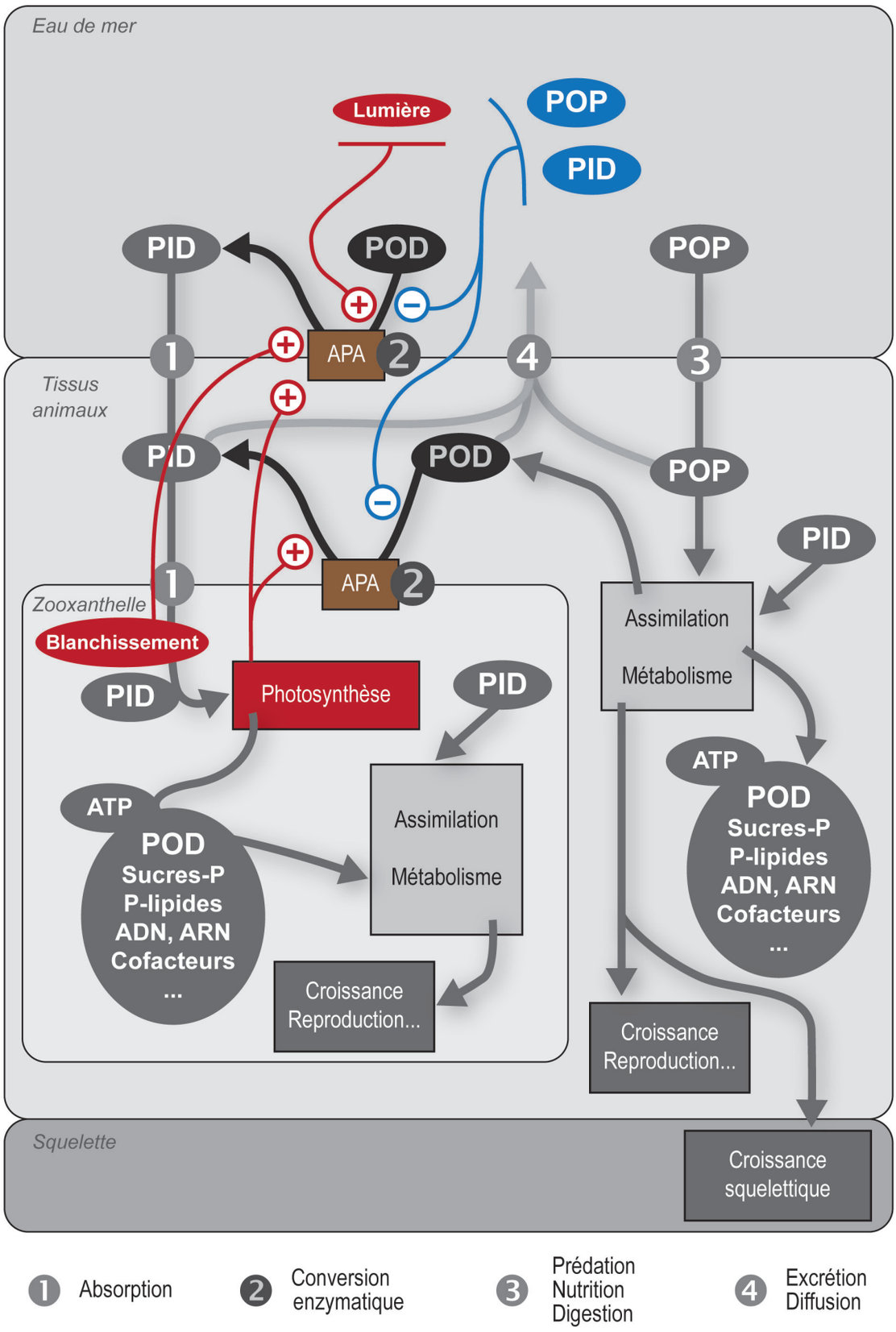


Figure 21 | Bilan de l'absorption du POD dans la symbiose
Les résultats acquis dans le chapitre 3 sont résumés en couleur, sur la base de la Figure 13 (passée en tons de gris pour plus de lisibilité). Vert : paramètre n'ayant pas d'effet. Rouge : paramètre ayant un effet positif. Bleu : paramètre ayant un effet négatif. Noir : voie métabolique considérée.

6

Article 4

Significant use of dissolved organic phosphorus by reef-building corals

Submitted to Limnology and Oceanography | In review

Résumé

Si l'absorption de phosphore organique particulaire (POP) et de phosphore organique dissous (PID) par les coraux et leurs zooxanthelles symbiotiques a été fréquemment étudiée, l'utilisation du phosphore organique dissous (POD) par la symbiose reste relativement méconnu. Pourtant, l'hydrolyse du POD par les phosphatases représente une source de phosphore potentiellement significative dans les récifs coralliens. L'activité des phosphatases alcalines (APA) extracellulaires a été mesurée pour diverses espèces de coraux et leurs zooxanthelles, afin de déterminer l'importance des sources organiques de phosphore pour les besoins métaboliques de différents coraux. Les effets de la lumière, du clade de zooxanthelles, de la nutrition, et du statut symbiotique ont été testés. Les résultats obtenus ont tout d'abord montré que l'APA de l'hôte est affectée par la présence des symbiotes, ainsi que par la disponibilité d'autres sources de phosphore comme la nutrition particulaire (source de POP) et l'absorption de PID due aux symbiotes. En effet, l'APA de l'hôte a augmenté avec l'absence de nourriture, l'éclairement et la perte des symbiotes (blanchissement). L'APA a également varié avec le clade des zooxanthelles et avec la concentration de POD, avec un K 22 fois plus faible pour les zooxanthelles fraîchement isolées (7,6 ± 1,5 µmol L^{-1}) que pour l'hôte (170,0 ± 26,2 µmol L^{-1}). Aux concentrations environnementales, cette étude montre que l'APA fournit jusqu'à 0,16 µmol P cm^{-2} h^{-1}, tandis qu'il a été montré que le PID et le POD fournissent jusqu'à 0,16 µmol P cm^{-2} h^{-1} et jusqu'à 0,09 µmol P cm^{-2} h^{-1}, respectivement. Cette étude illustre ainsi l'importance du POD pour les besoins en phosphore des coraux symbiotiques.

Article 4

Article 4

6

Article 4
Significant use of dissolved organic phosphorus by reef-building corals

C. Godinot[1,2,3], C. Ferrier-Pagès[1,2], S. Sikorski[1], and R. Grover[1,2]

Submitted to Limnology and Oceanography | In review

Abstract

While the acquisition of particulate organic phosphorus (POP) and dissolved inorganic phosphorus (DIP) by corals and their symbionts has been frequently studied, the use of dissolved organic phosphorus (DOP) has been poorly investigated. Yet DOP hydrolysis by phosphatases represents a potentially significant source of phosphorus in reef waters. Extracellular alkaline phosphatase activity (APA) was therefore measured in various coral hosts and zooxanthellae, to assess the importance of dissolved organic phosphorus to the phosphorus needs of corals. The effects of light, symbiont clade, feeding and symbiotic status were tested in *Stylophora pistillata*. Results obtained first showed that host APA was affected by the presence of symbionts, and by the availability of other phosphorus sources, such as particulate feeding (POP source) and DIP uptake through the symbionts' activity. Indeed, host APA increased with long-term starvation, with irradiance, and with the loss of symbionts (bleaching). APA was also dependent upon zooxanthellae clade and upon DOP concentration, with a K_m that was 22 times lower in FIZ (7.6 ± 1.6 µmol L^{-1}) than in the host (170.7 ± 27.3 µmol L^{-1}). At environment conditions, we show that APA brings up to 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1}, whereas DIP and POP have been shown to bring up to 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1} and up to 0.09 µmol P cm^{-2} d^{-1} respectively. This study therefore highlights the importance of DOP for the phosphorus demand of symbiotic corals.

Running head | Reef corals organic phosphorus use

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] LEA CSM-CNRS 647 'Biosensib', Monaco, Principality of Monaco
[3] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc

Introduction

Phosphorus is essential because it enters into the composition of many biological molecules (e.g. deoxyribonucleic acids, ribonucleic acids, phospholipids), and has a role in signaling pathways and metabolic reactions (mostly via the role of adenosine triphosphate, ATP). Corals can fulfill their phosphorus needs by several ways. Particulate organic phosphorus (POP), with a mean concentration of c.a. 0.10 µmol L^{-1} in reef waters (Furnas et al. 1988; Charpy 2001), is acquired via heterotrophy of the coral host, through the capture of planktonic preys caught with their stinging tentacles (Johannes et al. 1970; Wijgerde et al. 2011). Phosphorus is also acquired directly as dissolved inorganic phosphorus (DIP) through an active uptake mediated by the dinoflagellate symbionts (D'Elia 1977; Jackson and Yellowlees 1990; Godinot et al. 2009). This DIP presents concentrations between 0.05 and 0.50 µmol L^{-1} in reef waters (Kinsey and Davies 1979; Atkinson 1987b; Charpy 2001). The last source of phosphorus is represented by dissolved organic phosphorus (DOP), with concentrations generally lower than 0.5 µmol L^{-1} (Crossland and Barnes 1983; Larned 1998). While the acquisition of POP and DIP has been frequently studied, with a global contribution to corals of less than 0.2 µmol P cm^{-2} d^{-1} (Godinot et al. 2009; Wijgerde et al. 2011), the utilization of dissolved organic phosphorus (DOP) has been poorly investigated, and only considered in isolated coral symbionts (Jackson et al. 1989; Annis and Cook 2002). However, since DOP and DIP are usually similarly low in reef waters, DOP may provide a significant alternative source of phosphorus for corals, in replacement or in addition to DIP and POP. In fact, DOP utilization has been shown to be a good indicator of phosphorus deficiency and low environmental DIP in a large number of marine organisms, such as cyanobacteria (Yentsch et al. 1972), diatoms (Møller et al. 1975), dinoflagellates (Dyhrman and Palenik 1999), benthic algae (Lapointe and O'Connell 1989), and freshly isolated zooxanthellae (Annis and Cook 2002), and DOP may therefore compensate the lack of DIP.

In reef waters, DOP is present as phosphomonoesters, phosphodiesters, polyphosphates, and phosphonates (molecules that contain a C-P bond). In this first study, we concentrated on the use of phosphomonoesters. The recycling of phosphorus from phosphomonoesters involves enzymes called phosphatases, which belong to a large class of enzymes that catalyze the hydrolysis of monophosphorylated organic molecules into a phosphate ion molecule (DIP) and an alcohol. These metalloenzymes are classified as acid and alkaline depending on their pH optimum; and each type has different substrate specificities, catalytic mechanisms, and inhibition pathways (Neumann 1968; Fernley 1971; Hollander 1971). Coral hosts and their symbionts (commonly called zooxanthellae), either freshly isolated (FIZ) or cultured (CZ), exhibit phosphatase activity. Only two studies have investigated phosphatases in FIZ and CZ, showing both acid and alkaline phosphatases

activities (AcPA and APA respectively) with intracellular (Jackson et al. 1989) and extracellular (Annis and Cook 2002) activities reported. Some other studies mentioned the presence of intracellular (Goreau 1956) and extracellular (Hayes and Goreau 1977; Domart-Coulon et al. 2001) phosphatase activity in coral hosts, but none of these studies extensively examined it.

This study first aimed at examining the utilization of DOP by the scleractinian coral *Stylophora pistillata* under different environmental conditions. We tested the effect of DOP concentrations, and the effect of light, feeding and symbiotic status at one DOP concentration. We hypothesized that APA would vary depending on the availability or lack of other phosphorus sources. Hence, we hypothesized that APA would increase following an increase in irradiance (at least for the zooxanthellae, whose photosynthetic activity uses phosphorus), or a loss of symbionts, which leads to a decreased DIP uptake, and a release of DIP (D'Elia 1977; Muller-Parker et al. 1990), and that APA would also decrease following feeding of the host, which corresponds to a supply of POP. The second and third aims of this study were to compare the utilization of DOP by isolated symbionts and coral hosts, and by coral species in symbiosis with different symbiont clades. Finally, we estimated the contribution of DOP to the total demand of phosphorus by a scleractinian coral, by comparing the recycling of DOP to the uptakes of POP and DIP. All these questions have never been addressed in corals, but are essential and timely because nutrient availability is one of the key factors which determines reefs expansion and maintenance (Wood 1993; Lapointe 1997; Szmant 2002).

Methods

Organisms

APA was assessed in four tropical symbiotic species (*Stylophora pistillata, Pocillopora damicornis*, *Pavona cactus*, and *Galaxea fascicularis*), two Mediterranean symbiotic species (*Oculina patagonica* and *Cladocora caespitosa*), and one tropical non-symbiotic species (*Tubastraea* sp.). APA was also assessed in bleached *S. pistillata*, prepared by culturing nubbins for 6 weeks in the dark. Microscopy observations confirmed that symbiont density was 3 orders of magnitude lower in bleached nubbins (6.7 10^3 zoox cm^{-2}) than in symbiotic *S. pistillata* (2.5 10^6 zoox cm^{-2}).

All colonies were maintained in aquaria supplied with natural seawater (exchange rate 2% h^{-1}) containing low nutrient concentrations (DOP < 0.1 µmol L^{-1}, DIP < 0.05 µmol L^{-1}, nitrate < 0.4 µmol L^{-1} and ammonium < 0.5 µmol L^{-1}). Seawater salinity was constant at 38.2, pH was 8.1 ± 0.1, and temperature was maintained at 25.0 ± 0.5°C for tropical corals and 18.0 ± 1.0°C for Mediterranean ones. Irradiance was 150 µmol photons m^{-2} s^{-1} for symbiotic corals, with a light:dark cycle of 12h:12h. The non-symbiotic *Tubastraea* sp. and bleached *S. pistillata* were cultured in the dark. All corals were fed twice a week with *Artemia salina* nauplii, but were used for the experiments three days after the feeding (also for the experiments involving FIZ).

Isolation of symbionts

For each experiment with FIZ, symbionts were extracted from 5 coral nubbins using

a commercial-type Water-Pick. They were further purified by three centrifugations (2000 rpm for 5 min at 25°C) followed by re-suspension in seawater (Johannes and Weibe 1970). Aliquots were frozen for subsequent cell counts, chlorophyll and protein determinations. Zooxanthellae phylogeny was determined to the clade level according to Santos et al. (2002), using chloroplastic ribosomal DNA sequences. For each experiment with FIZ, symbionts were extracted from 5 coral nubbins using a commercial-type Water-Pick. They were further purified by three centrifugations (2000 rpm for 5 min at 25°C) followed by re-suspension in seawater (Johannes and Weibe 1970). Aliquots were frozen for subsequent cell counts, chlorophyll and protein determinations. Zooxanthellae phylogeny was determined to the clade level according to Santos et al. (2002), using chloroplastic ribosomal DNA sequences.

APA assays

In this study, all experiments were conducted in seawater (pH = 8.1) and should therefore be considered as assays for APA. APA was measured using a colorimetric assay, which is based on the non-biological substrate p-nitrophenyl phosphate (pNPP) to yield a colored product, *p*-nitrophenolate (pNP), upon hydrolysis under alkaline conditions. Most measurements were performed with the symbiotic coral *S. pistillata* and its FIZ, but APA was also compared between the coral species cited above (see description below). In each case, 5 nubbins or 5 FIZ samples were considered. All APA experiments were performed using six beakers filled with 200-mL of filtered seawater (0.2 µm membrane filters, pH of 8.1), maintained in a water bath at 26 or 18°C (for tropical and Mediterranean species respectively). Light was supplied by 400 W HQI lights and measured using a spherical quantum sensor (LiCor LI-193).

In experiments involving coral nubbins, individual nubbins suspended to a nylon wire were introduced in five beakers. A beaker without coral served as a control for APA activity in the filtered seawater and for any non-enzymatic hydrolysis of the pNPP substrate. Thirty minutes after nubbins were placed in the beakers (acclimatization period), the water was enriched with pNPP. Magnetic stirring bars ensured proper homogenization inside the beakers. A 10-mL water sample was taken from each beaker immediately after enrichment and then every 30 min for 120 min. Samples were immediately alkalinized with 2 mL of 1 mol L^{-1} NaOH to stop the enzymatic reaction and yield the yellow colored *p*-nitrophenolate (pNP). Absorbance was read at 400 nm after 30 minutes against a blank of filtered seawater treated with NaOH. Concentrations of pNP were calculated from a standard curve of pNP absorbance versus concentration established during each experiment using known concentrations of ACS reagent grade pNP in filtered seawater treated with NaOH. At the end of the experiments, corals were frozen for subsequent normalization of the data.

For experiments involving FIZ, a concentrated zooxanthellae solution, obtained after isolation of FIZ, was used to inoculate the five pNPP-enriched beakers, yielding concentrations comprised between 2 10^4 and 10^5 FIZ mL^{-1}. Sampling protocol and sample measurements were the same as above, except that samples were filtered (0.45-µm membrane filters) prior to alkalinization to remove FIZ.

The working parameters for the APA assays were developed in preliminary tests. A first preliminary test was performed to determine the optimal incubation length, using the coral *S. pistillata* and its FIZ at various pNPP concentrations. During each assay, pNP concentration increased linearly over time during c.a. 180 min both for whole coral nubbins and FIZ. Thus, APA was considered linear over these 180 min, and an incubation length of 120 min was chosen for the subsequent experiments. We also examined the impact of pH on phosphatase activity in FIZ, since previous studies suggested that pH optima is different for internal and external phosphatases, and is likely related to the pH experienced by the zooxanthellae (Jackson et al. 1989; Annis and Cook 2002). In the present study, external phosphatase activity of intact FIZ from *S. pistillata* was predominantly alkaline, as phosphatase activity was 2.5 times higher at the pH of seawater (8.1) than at an acidic pH (5.8; Fig. 1). We therefore worked at a pH of 8.1 (in natural seawater, no buffer added) for the FIZ in the following experiments. Other preliminary tests revealed that APA was strongly impacted by pNPP concentration, light level, and coral nutrition. These parameters were therefore tightly controlled in each of the subsequent experiments, to test their individual effect. Therefore, unless otherwise specified, APA was measured at a pNPP concentration of 250 µmol L^{-1} (i.e. near the saturating concentration for both corals and FIZ), light level was maintained at 150 ± 10 µmol photons m^{-2} s^{-1}, and corals were fed three days before only. The set of experimental conditions tested is summarized in Table 1. Moreover, for experiment 1 (Table 1), the dark incubation was conducted at the end of the 12-hour dark period. For experiment 3 (Table 1), APA measurements were also performed in the dark, at the end of the night, to prevent metabolic changes associated with photosynthesis in the symbiotic nubbins. For experiment 4 (Table 1), kinetics parameters of the alkaline phosphatase (APA_{max} and K_m) in *S. pistillata* corals and FIZ were fitted using the Michaelis–Menten equation (Eqn. 1).

$$APA = \frac{APA_{max}\,[pNPP]}{[pNPP] + K_m} \qquad \text{(Eqn. 1)}$$

where [pNPP] is the initial concentration of *p*-nitrophenyl phosphate introduced in the beaker; K_m is the pNPP concentration at which activity is half-optimal, and corresponds to the inverse of the affinity of the alkaline phosphatase towards the pNPP substrate; and APA_{max} is the activity when the saturation concentration of pNPP has been reached.

Data normalization and statistical analyses

APA was expressed as units of pNPP hydrolyzed per hour. It was normalized for the coral host either to the protein content (after extraction in 1 mol L^{-1} NaOH for 30 min at 90°C, measured using the commercially available BC Assay Interchim kit) (according to Hoogenboom et al. 2010), to the chlorophyll and zooxanthellae content (using the same methods as in Godinot et al. 2009), or to the surface area of the nubbins (using the wax-dipping method described in Stimson and Kinzie 1991). Data for the FIZ were normalized to protein content, and to cell density and chlorophyll content. Except for the clade experiment, all data are presented with the nor-

Experiment	Species (clade)	Symbiotic status	Coral nubbin or FIZ	Light (µmol photons m^{-2} s^{-1})	Host feeding (measure 3 days after feeding)	[pNPP] (µmol L^{-1})
1 - Effect of light	*S. pistillata* (A)	Symbiotic	Coral FIZ	0 150 250 350	Control	250
	Tubastraea sp.	Asymbiotic	Coral	0 150	Control	250
2 - Effect of host feeding	*S. pistillata* (A)	Symbiotic	Coral FIZ	150	Control Starved 3 wks Starved 6 wks Starved 9 wks	250
3 - Effect of symbiotic status	*S. pistillata* (A) *S. pistillata* (A) *Tubastraea* sp.	Symbiotic Bleached Asymbiotic	Coral Coral Coral	0	Control	250
4 - Effect of DOP concentration	*S. pistillata* (A)	Symbiotic	Coral	150	Control	0.05 - 0.5 - 1.0 - 5 - 25 - 50 - 250 - 500 - 1000 - 2500 - 5000
	S. pistillata (A)	Symbiotic	FIZ	150	Control	0.05 - 5 - 25 - 50 - 250 - 1000 - 2500
5 - Effect of symbiont clade	*S. pistillata* (A) *P. damicornis* (C) *P. cactus* (C) *G. fascicularis* (C) *C. caespitosa* (A) *O. patagonica* (B)	Symbiotic	Coral FIZ	150	Control	250

Table 1 | Working parameters of the five experiments performed to measure APA in various scleractinian corals

malization per protein content, and expressed as the mean ± standard error of 5 replicates. Normalization to the protein content was considered as the most appropriate to compensate for the difference in biomass per skeletal surface area between the various coral species used, and between coral hosts and FIZ. In the clade experiment, results are also presented with the normalization per chlorophyll content.

Linear regressions were performed with GraphPad Prism to examine the effect of light. Concentration-dependent APA was studied using GraphPad Prism (version 5.0; San Diego, CA, USA). For the other experiments, StatView (version 5.0; Cary, NC, USA) was used to perform *t*-tests, and one-way and two-ways ANOVAs on the data, followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) tests.

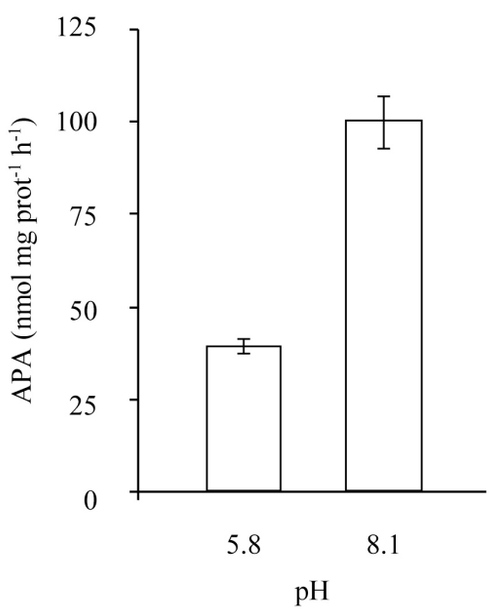


Figure 1 | Effect of pH on APA of FIZ from *S. pistillata* incubated with 250 µmol L^{-1} pNPP. Data are presented as the mean ± standard error of 5 measurements.

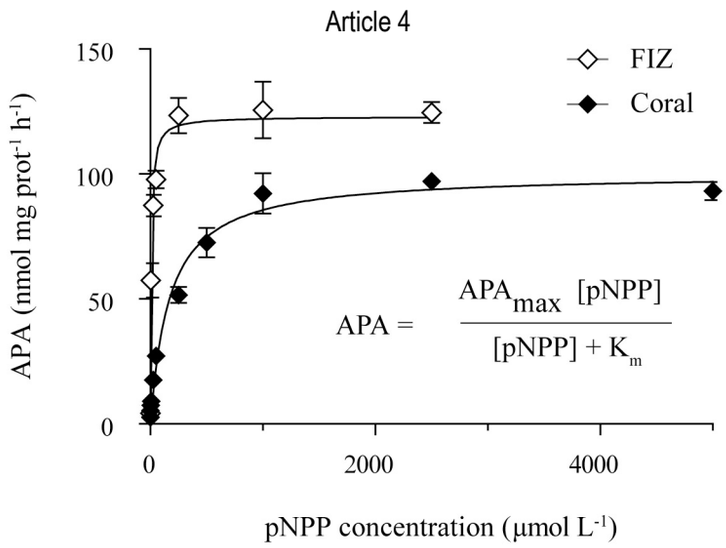
Results

Since we used nubbins entirely covered with tissue and intact symbiont cells, phosphatase activities should have been from external phosphatases only. In the following results, we will refer to "FIZ APA" for the activity related to the symbionts only, and to "host APA" for the activity related to the entire symbiotic association, but mainly coming from the host because only the host tissue was exposed to the medium.

Effect of environmental parameters on the APA of *S. pistillata*

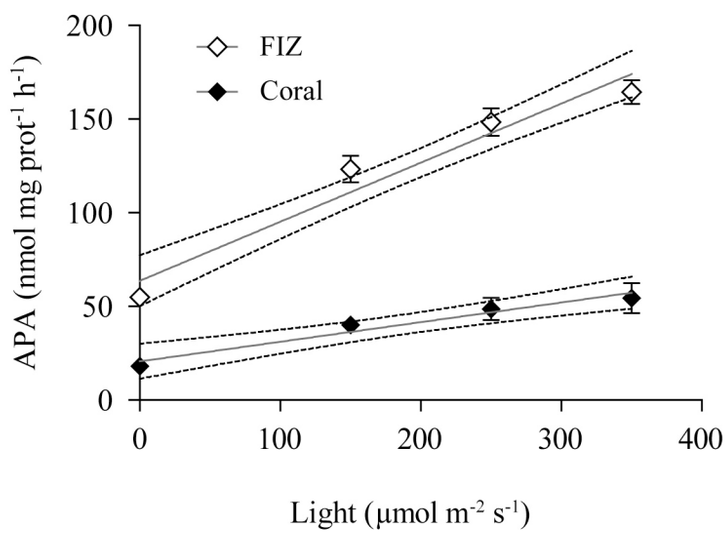
These experiments showed that APA was detectable at pNPP concentrations as low as 0.05, 0.5, and 1.0 µmol L^{-1} and were equal to 0.8 ± 0.1, 4.1 ± 0.4, and 5.5 ± 0.7 nmol mg $prot^{-1}$ h^{-1} respectively. Concerning the kinetic characteristics of APA versus initial pNPP concentration, for both host and FIZ, curves fitted with the Michaelis–Menten equation (Fig. 2; Eqn. 1). The obtained fits showed that alkaline phosphatases of the FIZ presented a much higher affinity towards pNPP than alkaline phosphatases of the host, as the affinity constant of FIZ (K_m = 7.6 ± 1.5 µmol L^{-1}) was 22 times lower than that of the host (K_m = 170.0 ± 26.2 µmol L^{-1}) (*F*-test, $p < 0.01$; Fig. 2). In each case, APA saturated for pNPP concentrations between 250 and 500 µmol L^{-1}.

APA increased linearly with light in both host ($r^2 = 0.61$, $F = 29$, $p < 0.0001$) and FIZ ($r^2 = 0.87$, $F = 120$, $p < 0.0001$; Fig. 3), being c.a. 3.0 times higher at 350 µmol photons m^{-2} s^{-1} than in the dark. For each light level, however, FIZ APA was c.a. 2.5-3.0 times higher than that of the host.



Coral:	FIZ:
$R^2 = 0.94$	$R^2 = 0.75$
$APA_{max} = 100.1 \pm 3.3$	$APA_{max} = 123.1 \pm 3.8$
$K_m = 170.0 \pm 26.2$	$K_m = 7.6 \pm 1.5$

Figure 2 | Concentration-dependent APA in host and FIZ from *S. pistillata*. Data are mean ± standard error of 5 replicates.



Coral:	FIZ:
$r^2 = 0.61$	$r^2 = 0.87$
$F = 29$	$F = 120$
$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
Slope = 0.10 ± 0.02	Slope = 0.32 ± 0.03
y-intercept = 21 ± 4.5	y-intercept = 64 ± 6.5

Figure 3 | Light-dependent APA in *S. pistillata* nubbins and FIZ incubated with 250 µmol L^{-1} pNPP. Data are mean ± standard error of 5 replicates. Light was measured using a LiCor instrument and is expressed as µmol m^{-2} s^{-1} PAR.

Article 4

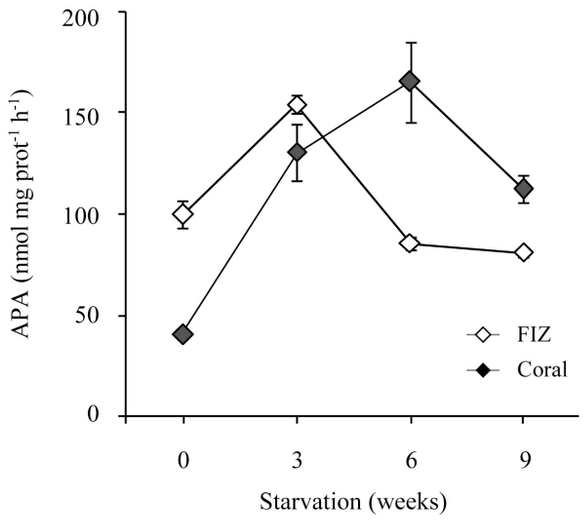


Figure 4 | Effect of starvation on APA in host and FIZ from the coral *S. pistillata* incubated with 250 µmol L^{-1} pNPP. Data are mean ± standard error of 5 replicates.

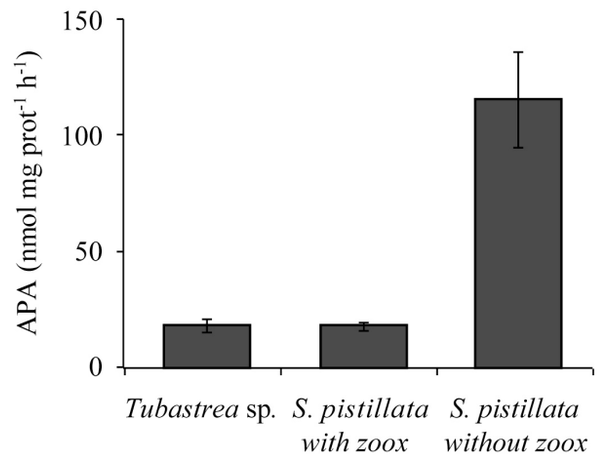
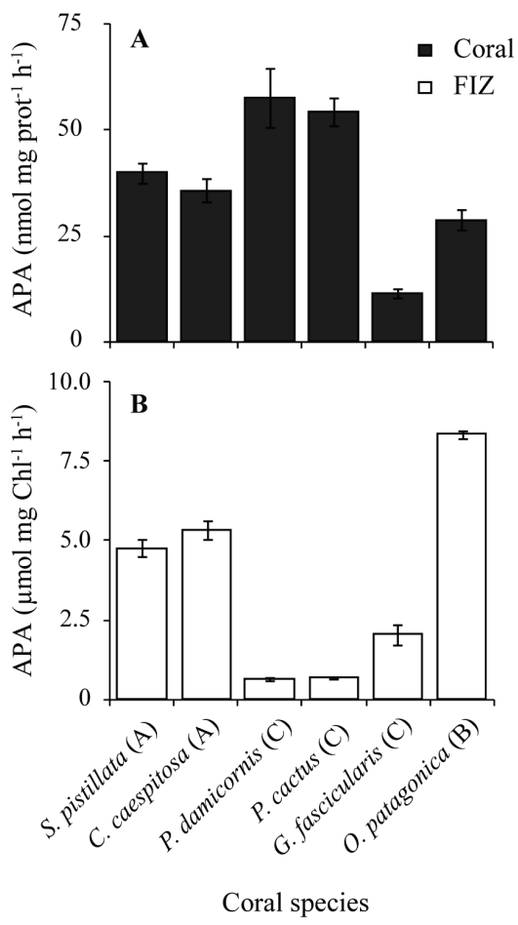


Figure 5 | Dark APA in the non-symbiotic tropical coral *Tubastraea* sp., and in symbiotic and in bleached *S. pistillata* incubated with 250 µmol L^{-1} pNPP. Data are presented as the mean ± standard error of 5 measurements.



◄ **Figure 5 |** Comparison of APA in different coral hosts (**A**) harboring FIZ from different clades (**B**). Data are presented as the mean ± standard error of 5 measurements, normalized per protein content (**A**) or per chlorophyll content (**B**).

APA also significantly increased over time in both host and FIZ when corals were starved (1-way ANOVA, both $p < 0.0001$, $F = 16.9$ for host, and $F = 57.4$ for FIZ; Fig. 4). Host APA was the highest after 6 weeks of starvation (165.5 ± 20.3 nmol mg prot^{-1} h^{-1}). At this moment, activity was 4 times higher than in fed corals (40.0 ± 2.4 nmol mg prot^{-1} h^{-1}), and remained 2.8 times higher until 9 weeks of starvation. FIZ APA was the highest after 3 weeks of starvation (154.6 ± 4.3 nmol mg prot^{-1} h^{-1}), being 1.5 times higher than in FIZ from fed corals (100.0 ± 7.0 nmol mg prot^{-1} h^{-1}). After this point, APA decreased back to the level of FIZ from fed corals.

Effect of the symbiotic status

In the non-symbiotic *Tubastraea* sp., light had no impact on APA, as APA was not significantly different in the dark (18.5 ± 2.9 nmol mg prot^{-1} h^{-1}) and in the light (19.3 ± 2.2 nmol mg prot^{-1} h^{-1}; *t*-test, p = 0.76, $t = 0.27$). Host APA in the dark was not significantly different between *Tubastraea* sp. and symbiotic *S. pistillata* (mean of 18.3 ± 1.6 nmol mg prot^{-1} h^{-1}; 1-way ANOVA, $p = 0.89$, $F = 0.21$; Fig. 5), but increased by 6.4 fold in bleached *S. pistillata* (115.1 ± 20.4 nmol mg prot^{-1} h^{-1}; 1-way ANOVA, $p = 0.0001$, $F = 21.85$).

Comparison of APA in different coral hosts and zooxanthellae clades

When results obtained for the FIZ were normalized to the protein content, there was no significant difference in APA between the clades (1-way ANOVA, $p = 0.18$, $F = 4.81$; data not shown). Conversely, a significant difference in host APA was observed between species (1-way ANOVA, $p < 0.0001$, $F = 21.7$; Fig. 6A). Differences were only related to differences in the chlorophyll content normalized per protein content between coral species, and were unrelated to the tropical or temperate status of the host, to the symbiont density, to the chlorophyll content per surface area, or to the zooxanthellae clade (1-way ANOVAs, all $p > 0.4$). For FIZ, results were also normalized to the chlorophyll content. With this normalization, there was a significant difference in APA between species (1-way ANOVA, $p < 0.0001$, 192.6; Fig. 6B), which was related to the zooxanthellae clade (1-way ANOVA, $p < 0.0001$, 232.7 respectively).

Discussion

This study reports on the alkaline phosphatase activity in coral hosts and their isolated symbionts under various environmental conditions. It is the first to assess the importance of DOP recycling for corals, and to examine APA in coral hosts. It highlights the importance of host metabolism, and phosphorus limitation/repletion, on this activity. It also emphasizes for the first time the effects of light and zooxanthellae clade on APA, and confirms that host feeding has a negative effect on this activity.

Kinetics of phosphatase activity

FIZ and host APA were strongly dependent upon DOP concentration. This dependence was already reported for the intracellular phosphatases of FIZ (Jackson et al. 1989), but is new for the extracellular APA of coral host and FIZ. APA measured at the DOP concentration of 0.5 µmol L^{-1}, which corresponds to one of the highest

occurring *in situ* (Crossland and Barnes 1983; Larned 1998), was 4.1 ± 0.4 10^{-9} mol mg prot^{-1} h^{-1} in the light, and 1.9 10^{-9} mol mg prot^{-1} h^{-1} in the dark (2.2 times lower compared to the light value). Taking into account a mean protein content of 2.2 mg prot cm^{-2}, and 12 h of day and night, this gives a daily DOP input of up to 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1} for the coral *Stylophora pistillata* at this environmental DOP concentration. This amount will be compared to other sources in the conclusion below.

The kinetics of APA at increasing DOP concentrations show that affinity was 22 times higher in FIZ than in the host (Fig. 2), and that FIZ APA was generally higher than host APA (Figs. 2, 3, and 4). If we draw an analogy with most transporter systems, which usually have K_m values close to substrate concentrations in their environments (Wright 1982), the low K_m of FIZ (7.6 ± 1.5 µmol L^{-1}) may indicate that they are exposed to micromolar concentrations of DOP within the animal tissue, and are adapted to an efficient use of the host metabolic waste products, such as planktonic preys digested into phosphomonoesters. On the contrary, the relatively high K_m of the host (170.0 ± 26.2 µmol L^{-1}) suggests that host alkaline phosphatases are not at their optimum at low environmental conditions.

Effects of metabolic activity on APA

In symbiotic corals, APA was dependent upon symbiont activity, and likely upon zooxanthellae photosynthetic activity, since APA was 3.0 times lower in the dark than at 350 µmol photons m^{-2} s^{-1} in a symbiotic coral (Fig. 3) while it did not increase with light in a non-symbiotic one. APA was also 6.4 times higher in bleached than in symbiotic colonies (Fig. 5), suggesting a phosphorus limitation in bleached corals, as previously demonstrated (Annis and Cook 2002). In symbiotic corals, most of the phosphorus requirements are supplied by the activity of the symbionts, which continuously take up DIP from the surrounding seawater (D'Elia 1977; Godinot et al. 2009). The loss of symbionts in bleached colonies corresponds to a loss of phosphorus uptake in the form of DIP, and to a release of DIP (Muller-Parker et al. 1990), which may both lead to a deficit of phosphorus in the symbiotic association. Therefore, the host has to rely on organic phosphorus (and increased APA) to fulfill the high phosphorus metabolic demand (Godinot et al. 2011). Conversely, in the non-symbiotic *Tubastraea* sp., APA was 6.2 times lower than in bleached *S. pistillata* (Fig. 5), suggesting that despite the fact that *Tubastraea* also looses DIP (D'Elia 1977), its total phosphorus demand may be lower. Alternatively, although non-symbiotic, bleached, and symbiotic corals, were supplied the same zooplankton regime before the experiments, their feeding rates remain to be examined in order to determine if their POP inputs were different.

In symbiotic *S. pistillata*, host APA was also impacted by heterotrophy/starvation. The observed increase in APA with long-term starvation of the host (Fig. 4) can also be related to a lack of phosphorus availability in the symbiosis. In fact, feeding provides the host with a source of POP (Johannes et al. 1970; Wijgerde et al. 2011), and this phosphorus source disappears with starvation, which therefore triggered the increase of host APA. The same feeding effect was observed in FIZ (Fig. 4). It was previously reported in FIZ

from the sea anemone *Aiptasia pallida*, which increased their APA after 5 weeks of host starvation (Annis and Cook 2002), or in cultured zooxanthellae under P-limitation (Jackson et al. 1989; Annis and Cook 2002). After a prolonged starvation (more than 3 weeks in FIZ and more than 6 weeks in the host), APA decreased again, probably due to a reorganization and/or reduction of the coral metabolic activity, including the possible shut-down of metabolic machinery and the recycling of macromolecules. It is in fact well established that starvation lowers protein and chlorophyll concentrations, symbionts density, (Titlyanov et al. 2001; Ferrier-Pagès et al. 2003; Houlbrèque et al. 2003), and rates of respiration and photosynthesis (Fitt and Pardy 1981; Szmant-Froelich and Pilson 1984; Davy et al. 2006). Such reduction of the metabolism may have led to a lower phosphorus demand and may explain the APA decrease. Else, the APA decrease may be due to the catabolism of alkaline phosphatases.

Results obtained finally showed that light increased host APA (Fig. 3). Such an increase may be linked to the higher metabolic activity of corals in terms of respiration rates in the light (Porter et al. 1984), or to the possibly faster depletion of DIP stocks of the host by the photosynthesis of symbionts in the light, as phosphorus is needed in photophosphorylation as a component of ATP and enters into the composition of other compounds of the Calvin cycle (Goodman et al. 1953; Hall and Rao 1987). Indeed in FIZ, photosynthetic activity, following increased light levels, also increased the DOP demand, as had been reported for DIP (Jackson and Yellowlees 1990; Godinot et al. 2009).

Inter-species comparison and effect of zooxanthellae clade

Results obtained in this experiment suggest for the first time a possible dependency of APA upon zooxanthellae clade, with the cosmopolitan clade C (Stat et al. 2008) being apparently less efficient than clades A and B (Fig. 6). Specific metabolic characteristics of the different clades may influence APA, possibly through differences in the phosphorus demand and/or DIP supply. This theory remains however to be further investigated, because only one study has examined up to date the relationship between eutrophication and zooxanthellae clades (Lampert-Karako et al. 2008), and has found no differences. Since only one clade B coral was available for the present study, the preliminary results from this experiment need to be completed by expanding the number of samples within the same clade, as well as the number of clades investigated.

Contribution of DOP to the phosphorus demand of corals

Taking into account data obtained in this study on DOP recycling, as well as data from the literature on DIP and POP uptake, the contribution of DOP to the phosphorus demand of corals can be assessed. We calculated above, that, under environmental concentrations of DOP (0.5 µmol L^{-1}), this source may bring up to 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1} to *S. pistillata*. For the same coral species, it was estimated also that at the same environmental concentrations, DIP uptake contributed for 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1} (calculated from rates measured in the light: 0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1} = (0.6 µmol P mg Chl^{-1} h^{-1} in the light + a 2 fold decrease in the dark, i.e. 0.3 µmol P mg Chl^{-1} h^{-1}) × 12

h light or dark d^{-1} × 0.015 mg Chl cm^{-2}) (Godinot et al. 2009). Finally, a recent study, however performed with the species *Galaxea fascicularis* (Wijgerde et al. 2011), estimated that POP inputs from extracoelenteric zooplankton feeding provides up to 0.09 ± 0.03 µmol P cm^{-2} d^{-1}, which was however obtained with a relatively high prey density (4100 nauplii L^{-1}). This POP is then digested into dissolved inorganic and organic forms of phosphorus (respectively termed DIP and DOP) by the host. From these first calculations, DOP appears to be a significant source of phosphorus for corals, even at low environmental concentrations in seawater. DOP may have an even more significant contribution if sources like phosphodiesters, polyphosphates and phosphonates are taken into consideration. Coral species can profit from these sources using other phosphatases and phosphonatases. A more comprehensive budget should also take into account other sources of POP, such as intracoelenteric zooplankton feeding, bacterial digestion, waste released by fish schooling over coral colonies, and particulate suspended matter. For example, POP released from haemulid fish schooling over coral colonies was estimated to contribute 0.02 µmol P cm^{-2} d^{-1} to *Porites furcata* colonies, and 0.06 µmol P cm^{-2} d^{-1} to *Acropora palmata* colonies (Meyer et al. 1983). Unfortunately, the different sources listed above have not been more examined to date in terms of contribution to the phosphorus demand of corals.

In conclusion, this study showed that host and symbionts alkaline phosphatase activities are dependent upon various environmental factors (light, heterotrophy, DOP concentrations), and upon the metabolic activity of the host and the symbionts (clade effect). We showed that DOP may represent a significant source of phosphorus for corals in oligotrophic reefs, since this source may bring as much phosphorus as DIP (0.16 µmol P cm^{-2} d^{-1}), at similarly low environmental concentrations (less than 0.5 µmol L^{-1}). As DIP uptake has been estimated to contribute 0.2 to 1.1 mmol P m^{-2} d^{-1} for reef benthos (Steven and Atkinson 2003; Cuet and Atkinson 2011), DOP may thus contribute a similar amount of phosphorus for reef benthos, although it has also been estimated that DOP recycling by APA may bring higher concentrations of phosphorus, up to 10–100 mmol P m^{-2} d^{-1} (Atkinson 1987a).

Acknowledgements

We thank Cécile Rottier for assistance in coral maintenance and physiological measurements. We are grateful to Didier Zoccola and Anthony Bertucci for assistance in zooxanthellae clade determination. We thank Michael Holcomb for use of his bleached *S. pistillata*. This research was supported by the government of the Principality of Monaco. Financial support to C.G. was provided by the École Normale Supérieure and the Centre Scientifique de Monaco.

References

Annis, E.R., and C.B. Cook. 2002. Alkaline phosphatase activity in symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) as a biological indicator of environmental phosphate exposure. Mar. Ecol. Prog. Ser. **245:** 11-20.

Atkinson, M.J. 1987a. Alkaline phosphatase activity of coral reef benthos. Coral Reefs **6:** 59-62.

---. 1987b. Rates of phosphate uptake by coral reef flat communities. Limnol. Oceanogr. **32:** 426-435.

Charpy, L. 2001. Phosphorus supply for atoll biological productivity. Coral Reefs **20:** 357-360.

Crossland, C.J., and D.J. Barnes. 1983. Dissolved nutrients and organic particulates in water flowing over coral reefs at Lizard Island. Aust. J. Mar. Freshw. Res. **34:** 835-844.

Cuet, P., and A. Atkinson. 2011. Water velocity dependence of phosphate uptake on a coral-dominated fringing reef flat, La Réunion Island, Indian Ocean. Coral Reefs.

D'Elia, C.F. 1977. The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. Limnol. Oceanogr. **22:** 301-315.

Davy, S.K., K.J.T. Withers, and R. Hinde. 2006. Effects of host nutritional status and seasonality on the nitrogen status of zooxanthellae in the temperate coral *Plesiastrea versipora* (Lamarck). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **335:** 256-265.

Domart-Coulon, I.J., D.C. Elbert, E.P. Scully, P.S. Calimlim, and G.K. Ostrander. 2001. Aragonite crystallization in primary cell culture of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*. PNAS **98:** 11885-11890.

Dyhrman, S.T., and B. Palenik. 1999. Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. Appl. Environ. Microbiol. **65:** 3205-3212.

Fernley, H.N. 1971. Mammalian alkaline phosphatases, p. 417-447. *In* P.D. Boyer [ed.], The enzymes. Academic Press.

Ferrier-Pagès, C., J. Witting, E. Tambutté, and K.P. Sebens. 2003. Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Coral Reefs**:** 229-240.

Fitt, W.K., and R.L. Pardy. 1981. Effect of starvation, and light and dark on the energy metabolism of symbiotic and aposymbiotic sea anemons, *Anthopleura elegantissima*. Mar. Biol. **61:** 199-205.

Furnas, M., A.W. Mitchell, J. Wellington, and B. Brady. 1988. Dissolved and particulate nutrients in waters of the Whitsunday Island Group. *In* G.B.R.M.P. Authority [ed.]. Australian Institute of Marine Science.

Godinot, C., C. Ferrier-Pagès, and R. Grover. 2009. Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol. Oceanogr. **54:** 1627-1633.

Godinot, C., R. Grover, D. Allemand, and C. Ferrier-Pagès. 2011. High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral Stylophora pistillata. The Journal of Experimental Biology **214:** 2749-2754.

Goodman, M., D.F. Bradley, and M. Calvin. 1953. Phosphorus and photosynthesis. I. Differences in the light and dark incorporation of radiophosphate1. J. Am. Chem. Soc. **75:** 1962-1967.

Goreau, T. 1956. Histochemistry of Mucopolysaccharide-Like Substances and Alkaline Phosphatase in *Madreporaria*. Nature **177:** 1029-1030.

Hall, D.O., and K.K. Rao. 1987. Photosynthesis. Cambridge University Press.

Hayes, R.L., and N.I. Goreau. 1977. Cytodynamics of coral calcification, p. 433-438. Proceedings, Third Int. Coral reef Symp. Rosenthial School of Marine and atmospheric Science.

Hollander, V.P. 1971. Acid phosphatases, p. 449-498. *In* P.D. Boyer [ed.], The enzymes. Academic Press.

Hoogenboom, M., R. Rodolfo-Metalpa, and C. Ferrier-Pagès. 2010. Co-variation between autotrophy and heterotrophy in the Mediterranean coral Cladocora caespitosa. J. Exp. Biol. **213:** 2399-2409.

Houlbrèque, F., E. Tambutté, and C. Ferrier-Pagès. 2003. Effect of zooplankton availability on the rates of photosynthesis, tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **296:** 145-166.

Jackson, A.E., and D. Yellowlees. 1990. Phosphate uptake by zooxanthellae isolated from corals. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **242:** 201-204.

Jackson, A.E., D.J. Miller, and D. Yellowlees. 1989. Phosphorus metabolism in the coral-zooxanthellae symbiosis: characterization and possible roles of two acid phosphatases in the algal symbiont *Symbiodinium* sp. Proceedings of the Royal Society of London. Series B **238:** 193-202.

Johannes, R.E., and W.J. Weibe. 1970. A method for determination of coral tissue biomass and composition. Limnol. Oceanogr. **15:** 822-824.

Johannes, R.E., S.L. Coles, and N.T. Kuenzel. 1970. The role of zooplankton in the nutrition of some scleractinian corals. Limnol. Oceanogr. **15:** 579-586.

Kinsey, D.W., and P.J. Davies. 1979. Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth. Limnol. Oceanogr. **24:** 935-940.

Lampert-Karako, S., N. Stambler, D.J. Katcoff, Y. Achituv, Z. Dubinsky, and N. Simon-Blecher. 2008. Effects of depth and eutrophication on the zooxanthella clades of *Stylophora pistillata* from the Gulf of Eilat (Red Sea). Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems **18:** 1039-1045.

Lapointe, B. 1997. Nutrient thresholds for bottom-up control of macroalgal blooms on coral reefs in Jamaica and Southeast Florida. Limnol. Oceanogr. **42:** 1119-1131.

Lapointe, B.E., and J. O'Connell. 1989. Nutrient-enhanced growth of *Cladophora prolifera* in harrington sound, bermuda: eutrophication of a confined, phosphorus-limited marine ecosystem. Estuarine, Coastal and Shelf Science **28:** 347-360.

Larned, S.T. 1998. Nitrogen- versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae. Mar. Biol. **132:** 409-421.

Meyer, J.L., E.T. Schultz, and G.S. Helfman. 1983. Fish Schools: An Asset to Corals. Science **220:** 1047-1049.

Møller, M., S. Myklestad, and A. Haug. 1975. Alkaline and acid phosphatases of the marine diatoms Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt and Skeletonema costatum (Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **19:** 217-226.

Muller-Parker, G., C.B. Cook, and C.F. D'Elia. 1990. Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **60:** 283-290.

Neumann, H. 1968. Substrate Selectivity in the Action of Alkaline and Acid Phosphatases. J. Biol. Chem. **243:** 4671-4676.

Porter, J.W., L. Muscatine, Z. Dubinsky, and P.G. Falkowski. 1984. Primary production and photoadaptation in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral, *Stylophora pistillata*. Proc. R. Soc. Lond. **222:** 161-180.

Santos, S.R., D.J. Taylor, R.A. Kinzie, M. Hidaka, K. Sakai, and M.A. Coffroth. 2002. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. **23:** 97-111.

Stat, M., E. Morris, and R.D. Gates. 2008. Functional diversity in coral– dinoflagellate symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. **105:** 9256-9261.

Steven, A.D.L., and M.J. Atkinson. 2003. Nutrient uptake by coral-reef microatolls. Coral Reefs **22:** 197-204.

Stimson, J., and R.A. Kinzie. 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.

Szmant-Froelich, A., and M.E. Pilson. 1984. Effect of feeding frequency and symbiosis with zooxanthellae on nitrogen metabolism and respiration of the coral *Astrangia danae*. Mar. Biol. **81:** 153-162.

Szmant, A.M. 2002. Nutrient enrichment on coral reefs: Is it a major cause of coral reef decline? Estuaries **25:** 743-766.

Titlyanov, E.A., T.V. Titlyanova, K. Yamazato, and R. van Woesik. 2001. Photo-acclimation of the hermatypic coral Stylophora pistillata while subjected to either starvation or food provisioning. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **257:** 163-181.

Wijgerde, T., R. Diantari, M.W. Lewaru, J.A.J. Verreth, and R. Osinga. 2011. Extracoelenteric zooplankton feeding is a key mechanism of nutrient acquisition for the scleractinian coral Galaxea fascicularis. The Journal of Experimental Biology **214:** 3351-3357.

Wood, R. 1993. Nutrients, predation and the history of reef-building. Palaios **8:** 526-543.

Wright, S.H. 1982. A nutritional role for amino acid transport in filter-feeding marine invertebrates. Am. Zool. **22:** 621-634.

Yentsch, C.M., C.S. Yentsch, and J.P. Perras. 1972. Alkaline phosphatase activity in the tropical marine blue-green alga, *Oscillatoria erythraea* ("Trichodesmium"). Limnol. Oceanogr. **17:** 772-774.

Chapter 4

^{31}P-NMR study of the phosphorus composition of the symbiosis

Abstract

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is an analytical chemistry technique that allows, notably, for the determination of the chemical composition of biological samples. This technique relies on the magnetic properties of some chemical elements, such as phosphorus, which possess an odd number of protons and/or of neutrons, giving rise to nonzero nuclear spin. This spin allows them to become oriented in the presence of external magnetic fields. Fourier transform NMR creates a signal by combining a magnetic field with radiofrequency electromagnetic pulses. This allows for the differentiation of observed nuclei according to their electronic environment, and thus for the identification of chemical functions inside studied molecules. In the present study, ^{31}P-NMR was used to characterize classes of phosphorus compounds in coral host tissues and cultured zooxanthellae. Phosphorus compounds observed in the host were mainly phosphate, a high abundance and diversity of phosphonates, as well as phosphate mono- and diesters in lesser quantities. In cultured zooxanthellae on the contrary, the importance of phosphonates was negligible, and the observed compounds mostly consisted in phosphate, phosphate mono- and diesters, as well as some polyphosphates. DIP and DOP enrichments were performed for cultured zooxanthellae, and POP enrichment (nutrition) was tested in the host, to assess the impact of environmental phosphorus availability on the phosphorus composition of corals. DIP and POP enrichments led to an increase in intracellular phosphate content, while DOP enrichment led to a decrease of phosphorus content. Finally, bleaching did not modify the phosphorus composition of the host.

Chapitre 4

Étude par RMN du ^{31}P de la composition en phosphore de la symbiose

Résumé

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de chimie analytique qui permet, notamment, de spécifier la composition chimique des échantillons biologiques. Cette technique repose sur les propriétés magnétiques de certains éléments chimiques, comme le phosphore, qui possèdent un nombre impair de protons et/ou de neutrons, ce qui leur confère un spin nucléaire non nul leur permettant de s'orienter sous l'effet d'un champ magnétique externe. La RMN par transformée de Fourier crée un signal en combinant l'application d'un champ magnétique à des impulsions électromagnétiques de type radiofréquence. Cela permet de différencier les noyaux observés en fonction de leur environnement électronique, et ainsi d'identifier les fonctions chimiques présentes au sein des molécules étudiées. Dans cette étude, la RMN du ^{31}P a été utilisée pour caractériser les classes de molécules phosphorées dans les tissus du corail hôte ainsi que dans les zooxanthelles en culture. Les composés phosphorés observés chez l'hôte sont principalement du phosphate, et une forte quantité et diversité de phosphonates, ainsi que des mono- et diesters de phosphate en quantités moindres. Chez les zooxanthelles au contraire, l'importance des phosphonates est négligeable, et on observe surtout du phosphate, des mono- et des diesters de phosphate, ainsi que parfois des polyphosphates. Des ajouts de PID et de POD ont été réalisés sur les zooxanthelles, et des ajouts de POP (nutrition) sur l'hôte, afin d'évaluer l'effet de la disponibilité en phosphore dans le milieu sur le contenu en phosphore intracellulaire des coraux. L'ajout de PID et le POP a entraîné un enrichissement en phosphate intracellulaire, tandis que l'ajout de POD s'est traduit par une diminution du contenu en phosphore. Enfin, le blanchissement n'a pas entraîné de modification dans la composition en phosphore de l'hôte.

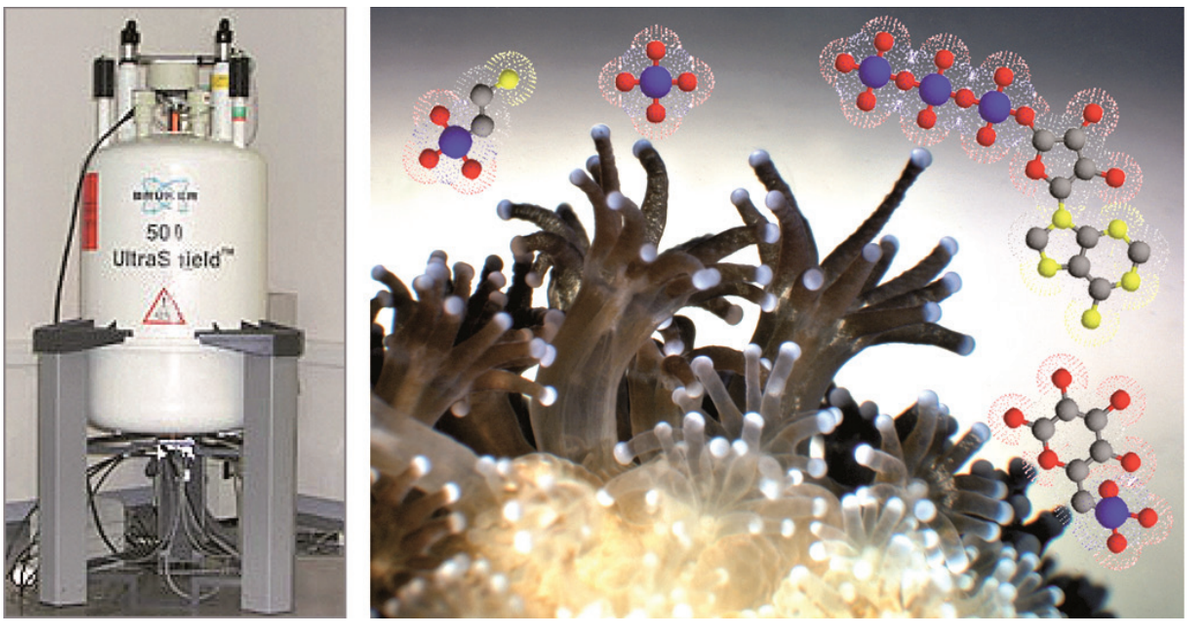


Figure 22 | Les coraux et la RMN du ^{31}P

La photographie de gauche représente un spectromètre RMN, et celle de droite des polypes du corail *S. pistillata*. Les molécules figurées sur cette photographie sont (de gauche à droite et de haut en bas) le glucose-6-phosphate, le phosphate, l'acide (aminoéthyl)phosphonique (AEP), et l'adénosine triphosphate (ATP), que l'on s'attend à trouver dans les tissus coralliens. Les atomes représentés sont le carbone (gris), l'oxygène (rouge), le phosphore (bleu) et l'azote (jaune). Photographies : Bruker et É. Tambutté.

1 La spectroscopie RMN du ^{31}P chez les coraux

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de chimie analytique assez récente au regard des spectroscopies classiques. Elle a été mise au point dans les années 1940 à 1950, par les physiciens américains et suisse Isidor Isaac Rabi, Félix Bloch, et Edward Mills Purcell, auxquels elle valut le prix Nobel de physique en 1944 (Rabi) et 1952 (Bloch et Purcell). La RMN[37] étant surtout un outil expérimental (figure 22) et non l'objet propre de cette thèse, sa théorie, fort complexe, ne sera que relativement peu abordée ici. Le paragraphe qui suit explique, de manière aussi abordable que possible, son principe général, sans rentrer dans le détail des nombreuses équations de physique quantique et statistique qui y sont associées. Toutefois, la compréhension de ce paragraphe, moins "biologique" et "corallien" que le reste de cette thèse, n'est pas indispensable à la lecture du chapitre...

Principe de la spectroscopie RMN

Une technique basée sur l'existence d'un moment magnétique des noyaux...

La RMN repose sur les propriétés magnétiques de certains éléments chimiques ayant un nombre impair de particules dans leur noyau atomique (correspondant à la somme proton(s) + neutron(s)) tels que ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, et ^{31}P. Les noyaux de ces éléments possèdent une propriété, dénommée le spin[38] S, qui peut être assimilée à la capacité du noyau à tourner sur lui-même.

Un noyau chargé en rotation engendre un champ magnétique, il en résulte un moment magnétique [39] nucléaire, noté μ, orienté selon l'axe de rotation et proportionnel à la quantité de mouvement angulaire. Ce moment magnétique nucléaire peut entrer en interaction avec un champ magnétique externe. Ce phénomène d'interaction est à la base de l'analyse par RMN.

... et sur son interaction avec les champs magnétiques externes

En l'absence de champ magnétique externe, tous les μ sont orientés de manière aléatoire et les noyaux ont le même niveau d'énergie. En présence d'un champ magnétique (noté B_0), le μ des noyaux aimantés s'oriente peu à peu dans la direction de B_0, dans le même sens ou dans le sens opposé. Selon que leur μ est orienté dans un sens ou dans l'autre, les noyaux acquièrent un niveau d'énergie différent : un niveau dit

[37] Le terme exact est "spectroscopie de résonance magnétique nucléaire", ou "spectroscopie RMN", ou "spectrométrie RMN", mais le terme **RMN** seul est également employé pour désigner cette technique dans la littérature. Ce raccourci linguistique a été conservé dans cette thèse.

[38] En physique quantique, **le spin** S est défini comme le moment cinétique intrinsèque d'une particule. Il s'agit d'une notion complexe, que l'on peut, de manière simplifiée, assimiler à la capacité d'une particule à tourner sur elle-même, comme dans le cas d'une planète ou d'une balle de tennis. Le spin désigne l'amplitude de cette rotation. Il ne peut prendre que des valeurs entières ou demi-entières (0, 1/2, 1, 3/2...). Seuls les éléments chimiques ayant un nombre impair de protons et/ou de neutrons, tournent sur eux-mêmes, et sont observables en RMN. De manière générale, la RMN s'attache surtout à l'observation de ceux ayant un spin de 1/2.

[39] Le **moment magnétique** est une grandeur qui permet de caractériser l'intensité d'une source magnétique (un aimant par exemple, ou bien une bobine de courant).

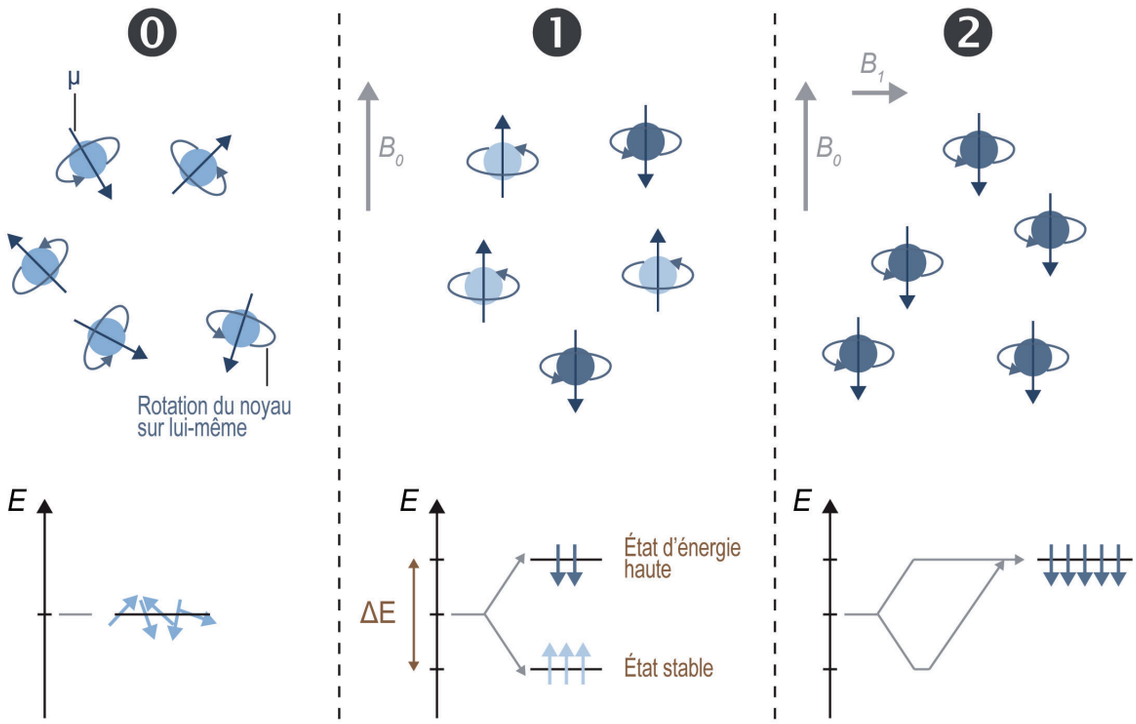


Figure 23 | Principe de la résonance magnétique nucléaire

En haut : représentation de 5 noyaux (spin ½) en l'absence de champ magnétique (**0**), puis soumis à un champ magnétique B_0 (**1**), et enfin soumis à un champ magnétique supplémentaire B_1, perpendiculaire à B_0 (**2**) | En bas : représentation des niveaux d'énergie correspondants. L'intensité de la couleur des noyaux correspond à leur niveau d'énergie. La direction des champs magnétiques appliqués est représentée en gris.

(**0**) En l'absence de champ magnétique externe, il existe une multitude de possibilités pour l'orientation du moment magnétique nucléaire intrinsèque des noyaux, μ. Noter que la représentation du niveau d'énergie de ces noyaux est incorrecte, mais imagée pour aider à la compréhension. (**1**) Lorsqu'un champ magnétique B_0 est appliqué, il n'existe alors plus que deux possibilités d'orientation de μ : dans le sens du champ, et dans le sens contraire. (**2**) Si l'intensité du champ magnétique B_1 est égale à la différence d'énergie entre les deux états (ΔE), alors les noyaux entrent en résonance, un phénomène qui correspond à un retournement du spin nucléaire de l'état de basse énergie (état stable) vers l'état de haute énergie.

de basse énergie (état stable), et un niveau dit de haute énergie (état énergétiquement moins favorable). Ce phénomène est nommé la levée de dégénérescence du niveau d'énergie[40], et est représenté sur la figure 23.

Une technique qui repose sur l'entrée en résonance des différents noyaux

Le but de la RMN est d'observer la transition entre les niveaux d'énergie qui se produit en présence d'un champ magnétique externe B_0 permettant de lever la dégénérescence. À partir d'une situation où tous

[40] On parle de **dégénérescence** lorsque tous les noyaux ont le même niveau d'énergie. La **levée de dégénérescence** correspond à une séparation en plusieurs niveaux d'énergie. La différence d'énergie entre les deux niveaux d'énergie est généralement très faible. Comme elle est proportionnelle au champ magnétique appliqué et inversement proportionnelle à la température, la RMN repose sur l'utilisation de champs magnétiques très élevés (de l'ordre de la centaine de mégahertz) et de températures basses pour obtenir de bonnes observations.

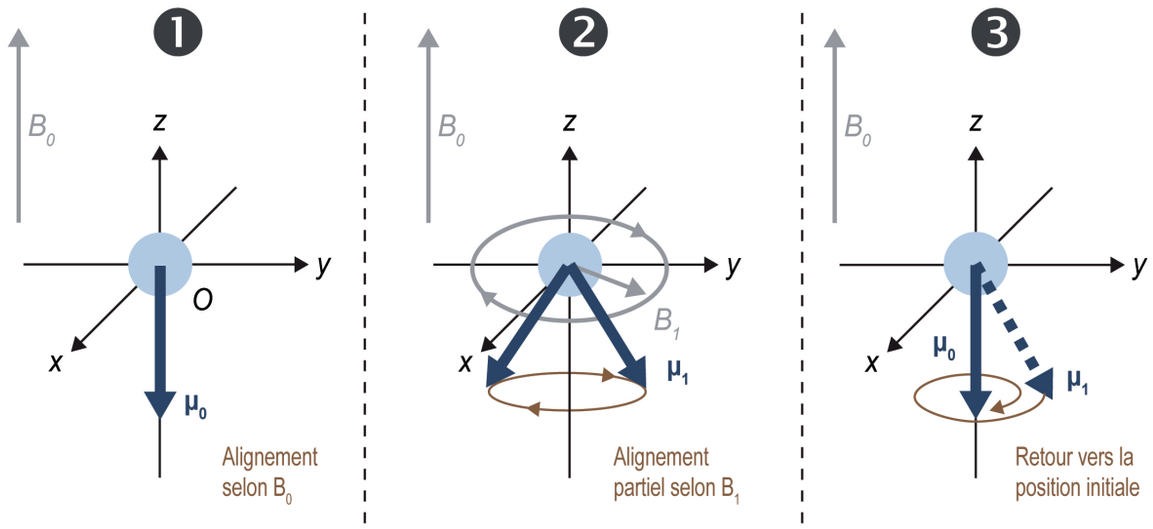


Figure 24 | Étapes de la résonance magnétique nucléaire

Le moment magnétique μ d'un noyau (en bleu pâle) est représenté au cours des différentes étapes de la RMN, dans un repère (x, y, z). Les étapes 1 et 2 correspondent aux mêmes étapes que sur la figure précédente. (**1**) μ est aligné avec le champ magnétique B_0. (**2**) En plus de B_0, un champ magnétique B_1 oscillant est appliqué dans le plan (x, O, y) durant un bref instant (quelques microsecondes généralement). Lors de l'entrée en résonance, μ s'incline vers le plan (x, O, y). (**3**) Lorsque l'impulsion B_1 cesse, μ retourne peu à peu vers sa position initiale en oscillant. C'est la relaxation, qui est observée par le spectromètre RMN. La différence avec la figure 23 est que le champ B_1 est oscillatoire et appliqué sous forme de brèves impulsions, et non de manière continue. L'alignement des μ n'est donc que partiellement réalisé selon l'axe de B_1.

les noyaux sont orientés sous l'effet de B_0, on applique un autre champ magnétique oscillatoire extérieur, noté B_1, perpendiculaire à B_0. B_1 est ajusté afin d'apporter exactement l'énergie (Δ E) nécessaire pour induire la transition de tous les noyaux vers le niveau d'énergie le plus élevé. Cette transition est nommée résonance[41] magnétique nucléaire (figure 23).

Toutefois, au sein des molécules, la perception par les noyaux du champ magnétique appliqué est perturbée par le mouvement des électrons autours des noyaux. Ces électrons génèrent des champs magnétiques faibles, qui font écran aux champs magnétiques externes. Ce phénomène d'écran, nommé blindage en RMN, modifie légèrement la fréquence de résonance d'un noyau selon son environnement électronique. Il existe alors plusieurs fréquences de résonance, que l'on caractérise par convention par une grandeur empirique, le déplacement chimique[42], noté δ. Il exprime la différence relative entre la fréquence de résonance de chaque atome étudié et celle d'un noyau étalon, et est caractéristique de l'ensemble constitué par le noyau et son

[41] Le champ magnétique B_1 appliqué correspond à une onde électromagnétique de fréquence bien précise, nommée la fréquence de Larmor, qui permet aux noyaux d'entrer en **résonance**, c'est à dire de tous se retrouver dans le niveau de haute énergie.

[42] Le **déplacement chimique** est un moyen de repérer les fréquences de résonance d'un échantillon par rapport à la fréquence de résonance d'une substance de référence, l'acide phosphorique H_3PO_4 dans le cas du phosphore. C'est une grandeur sans unité, que l'on exprime généralement en parties par million (ppm).

environnement électronique. Ainsi, loin d'être un inconvénient, la présence de multiples fréquences de résonance est même un outil qui permet à la RMN de détecter simultanément les différents groupes fonctionnels présents dans les molécules constitutives de l'échantillon analysé.

Étapes de la spectroscopie RMN par transformée de Fourier

Dans la pratique, le champ magnétique statique (ou fixe) B_0 est généré par de puissants cryo-aimants au sein du spectromètre RMN, et B_1 est généré par un émetteur d'ondes électromagnétiques qui entoure l'échantillon. B_1 est appliqué sous forme d'impulsions oscillatoires (B_1 tourne) très brèves qui balayent une large gamme de radiofréquences (pour permettre à tous les noyaux étudiés d'entrer en résonance). L'interaction des moments magnétiques μ des noyaux avec l'onde B_1 à la fréquence de résonance se traduit par une forte absorption d'énergie durant l'impulsion, et une déviation des μ depuis leur position initiale (alignée sur B_0) vers le plan contenant B_1 (l'alignement n'est que partiel si le champ B_1 est appliqué de manière brève). Lorsque l'impulsion cesse, l'aimantation μ se met à osciller pour retourner vers sa position initiale, alignée sur B_0 (figure 24). Ce phénomène, nommé relaxation en RMN, est mesuré par une bobine détectrice au sein de l'appareil de RMN. L'oscillation de l'aimantation entraîne une induction[43] dans la bobine, et c'est la décroissance libre de cette induction au fur et à mesure de la relaxation qui est observée en RMN. La décroissance libre de l'induction dans la bobine est nommée FID (pour Free Induction Decay en anglais).

Du fait du blindage au sein des différentes molécules chimiques de l'échantillon, la bobine reçoit en fait en même temps autant de signaux FID de fréquences différentes qu'il y a de noyaux présentant un environnement différent. Ces signaux superposés sont décomposés mathématiquement grâce à la transformée de Fourier[44], qui permet d'obtenir des spectres RMN sous formes de pics (figure 25), alignés sur l'axe des x en fonction de leur déplacement chimique δ, et dont l'aire dépend globalement de la concentration molaire du noyau concerné.

De la RMN du phosphore aux coraux...

Avantages de la spectroscopie RMN du phosphore

Le phosphore fait partie des éléments aisément détectables par spectroscopie RMN car il possède un spin $S = 1/2$. C'est d'ailleurs un élément de choix pour cette technique, car il ne possède qu'un seul isotope naturel[45]. La RMN du ^{31}P permet donc d'identifier les groupes fonctionnels phosphorés présents dans les molécules constitutives de l'échantillon analysé. Ces groupes fonctionnels phosphorés, présentés dans le tableau 4 du chapitre 1 (phos-

[43] L'**induction électromagnétique** est un phénomène physique qui se manifeste par la production d'un courant électrique au sein d'un conducteur, tel qu'une bobine.

[44] L'**analyse de Fourier** est la branche des mathématiques qui étudie la représentation des signaux comme des superposition d'ondes de base.

[45] Dans la majorité des cas, parmi les **isotopes** naturels d'un élément, seuls certains sont observables en RMN. La qualité des résultats obtenus dépend alors de l'abondance de l'isotope ad-hoc. Dans le cas du carbone par exemple, seul le ^{13}C peut être détecté, et sa faible abondance naturelle, proche de 1,1%, limite fortement les mesures. Dans le cas du phosphore, la présence d'un seul isotope, le phosphore ^{31}P (abondance naturelle de 100%), facilite les analyses.

phates, polyphosphates, phosphonates, et divers esters de phosphates), sont répartis sur une large gamme de déplacements chimiques, ce qui facilite leur caractérisation (figure 25).

La RMN du ^{31}P peut être utilisée sur des extraits cellulaires, des cellules entières fixées (c.à.d. mortes) en solution, ou bien sur des cellules ou petits organismes vivants (on parle dans ce cas de RMN *in vivo*). Cependant, la majorité des observations en RMN du ^{31}P se fait sur les deux premiers types d'échantillons, la RMN *in vivo* restant destinée à des applications bien spécifiques.

Inconvénients de la spectroscopie RMN du phosphore

Avant de présenter la méthodologie utilisée pour observer la composition en phosphore des coraux en RMN du ^{31}P, il reste à présenter quelques unes des difficultés liées à la technique de RMN. Tout d'abord, seules les molécules de phosphore relativement mobiles et solubles sont observables en RMN, tandis que celles qui sont immobilisées au sein de structures complexes ou insolubles, telles que les membranes phospholipidiques ou l'ADN, sont relativement indétectables. En second lieu, l'aire des pics observés dépend de la quantité de matière disponible pour la résonance, la con-

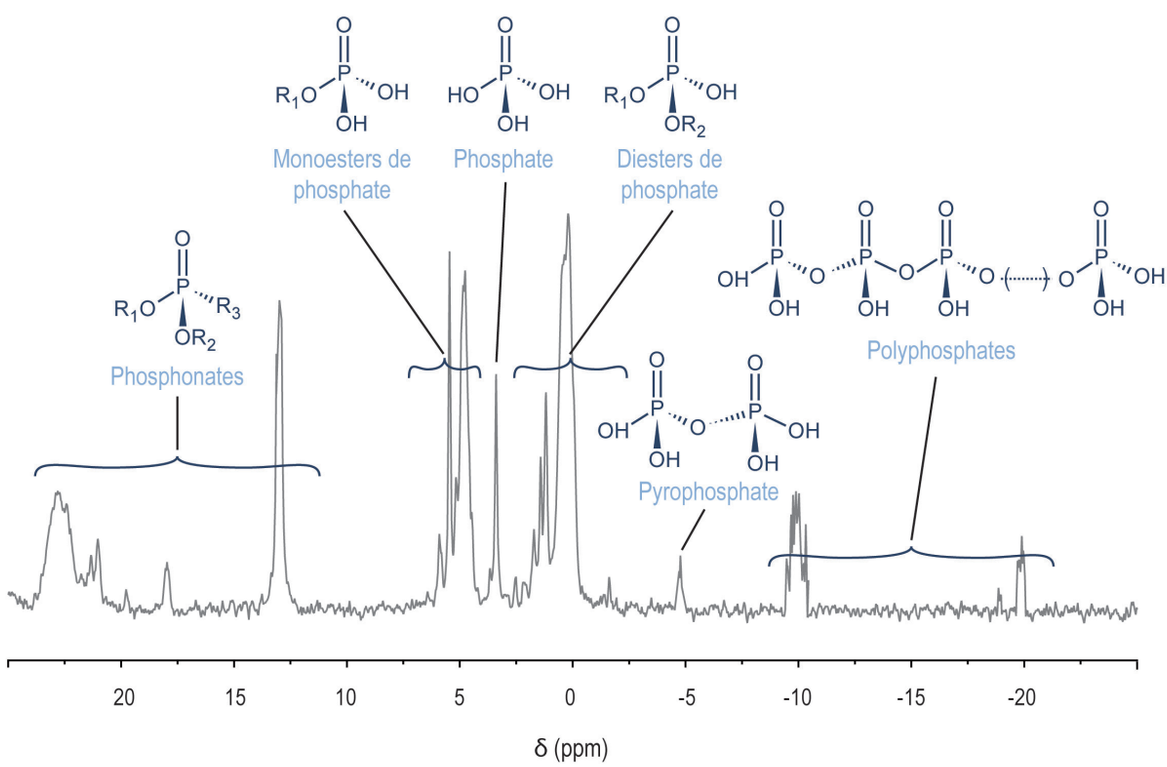


Figure 25 | Exemple de spectre de RMN du ^{31}P

Ce spectre présente les plages de déplacement chimique (δ) des pics typiquement observées en RMN-^{31}P pour des échantillons biologiques. Le nom et la structure des molécules sont indiqués en bleu pour chaque plage ou pic. Toutes ces molécules ne sont pas forcément observées dans tous les échantillons. L'axe horizontal sépare les molécules selon leur déplacement chimique δ, et l'axe vertical est en unités arbitraires. En première approximation, la hauteur d'un pic est proportionnelle à la concentration de la molécule concernée dans l'échantillon (en seconde approximation, il faut considérer l'aire sous le pic).

centration molaire. Plus l'échantillon est petit ou dilué, plus le signal est faible, d'où l'importance de travailler sur de grandes quantités de matériel (pour obtenir des concentrations de l'ordre de la millimole par litre pour les composés d'intérêt, avec des quantités de matériel de l'ordre de 10^8 cellules par millilitre, ce qui n'est d'ailleurs pas toujours compatible avec l'observation d'échantillons biologiques...). Ensuite, le déplacement chimique de la plupart des pics observés en RMN du ^{31}P dépend plus ou moins fortement du pH. Une calibration fine de la technique et un contrôle du pH de l'échantillon sont donc nécessaires pour des observations reproductibles et des identifications fiables. Enfin, la présence de certains sels dans les échantillons, surtout les échantillons marins, est problématique, (sels de calcium et de magnésium notamment[46]) (Boyd *et al.*, 1987; Kugel *et al.*, 1987; Pick et Weiss, 1991). C'est d'ailleurs l'une des raisons pour laquelle la RMN *in vivo* n'est que peu utilisée pour les organismes marins, car la suppression des sels de calcium et de magnésium n'est pas compatible avec le maintien des organismes ou des cellules en vie.

Cependant, des avancées technologiques et méthodologiques récentes ont permis de surmonter la plupart de ces difficultés techniques, et font de la RMN du ^{31}P un excellent outil pour étudier le métabolisme du phosphore chez les organismes marins (Feuillade *et al.*, 1995; Quin et Quin, 2001; Viant *et al.*, 2002; Tjeerdema, 2008).

Utilisations antérieures de la RMN sur des organismes comparables aux coraux

Deux études ont utilisé la spectroscopie RMN du phosphore chez des Cnidaires symbiotiques (Henderson et al., 1972; Steen, 1986). La première s'est penchée sur le contenu en phosphate et en phosphonates d'extraits de l'anémone de mer *Bunadosoma* sp. (Henderson *et al.*, 1972), dans le but d'améliorer les techniques d'extraction de phosphonates plutôt que d'observer le métabolisme du phosphore de l'anémone. La seconde s'est ensuite penchée sur l'observation *in vivo* du métabolisme du phosphore chez l'anémone de mer *Aiptasia pulchella* (Steen, 1986), et plus précisément sur la quantification de l'ATP et de l'ADP dans les cellules hôtes, la quantification de ces molécules chez des zooxanthelles fraîchement isolées n'ayant pas abouti.

Ainsi, malgré les avantages que pourrait présenter la RMN du ^{31}P pour l'étude du métabolisme du phosphore dans la symbiose entre coraux et zooxanthelles, très peu d'études se sont donc penchées sur le sujet.

2 Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre a été de mettre au point une méthode d'isolation et d'extraction de tissus biologiques permettant d'utiliser l'outil de spectroscopie

[46] Le calcium Ca^{2+} et le magnésium Mg^{2+}, comme la plupart des ions divalents (ion^{2+}), sont des ions dits **paramagnétiques**. Ils ont tendance à s'associer avec les résidus phosphate, chargés négativement, et à élargir les pics de certains composés phosphorés (ce qui brouille les spectres en diminuant la hauteur des pics et en entraînant des chevauchements de pics), voire à les rendre invisibles en RMN. Ces ions paramagnétiques peuvent être chélatés par ajout d'EDTA, qui possède une forte affinité pour les ions métalliques en solution, les empêchant ainsi de se lier aux ions phosphates.

RMN du phosphore sur les coraux, afin d'identifier les composés phosphorés présents dans la symbiose, voire de quantifier certains d'entre eux. Une fois la méthode mise au point, l'effet de divers paramètres environnementaux a été testé, afin de voir dans quelle mesure le métabolisme du phosphore est observable grâce à la RMN du ^{31}P dans la symbiose. Des zooxanthelles en culture, des zooxanthelles fraîchement isolées, et des tissus hôtes, ont été examinés séparément. Les paramètres suivants ont été testés : effet de l'âge des cultures de zooxanthelles, effet de la source de phosphore dans leur milieu de culture, effet de la présence ou de l'absence de nourriture pour l'hôte et les zooxanthelles fraîchement isolées, et effet du blanchissement sur la composition en phosphore de l'hôte.

Ces travaux se fondent sur les hypothèses suivantes. 1) Les récentes avancées technologiques en RMN du ^{31}P devraient permettre d'utiliser cette technique sur les coraux, au minimum pour la quantification des molécules hautement solubles comme le phosphate. Pour les zooxanthelles en culture, on s'attend à ce que leur composition en phosphore soit modifiée avec 2) l'âge, conformément au fait que, chez certaines algues marines, chaque stade de croissance présente une variation dans la composition en phosphate et en polyphosphates intracellulaires (Sianoudis *et al.*, 1984) ; et avec 3) un enrichissement en phosphore du milieu de culture, étant donné que les zooxanthelles présentent de forts taux d'absorption de PID et de POD (comme démontré dans les chapitres 2 et 3). Pour l'hôte, on s'attend à ce que sa composition en phosphore soit modifiée par 4) la nutrition, qui constitue un apport de POP et possède déjà un impact sur l'absorption de PID et de POD ; et par 5) la perte des symbiotes lors du blanchissement, qui modifie également les apports de PID et de POD pour l'hôte.

Les paragraphes qui suivent expliquent dans un premier temps la méthodologie employée pour la mise en œuvre de la RMN du ^{31}P chez les coraux, puis résument les principaux résultats obtenus grâce à cette technique. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis pour publication à une revue à comité de lecture international (article 5), au sein duquel ils sont discutés en détail.

3 Mise au point du protocole de RMN du ^{31}P

Protocole mis au point

Isolation des cellules

Les tissus coralliens de grosses colonies de *S. pistillata* (environ 100 g de corail par expérience) ont dans un premier temps été séparés du squelette à l'aide d'une technique abrasive : avec une brosse à dents, un jet d'eau sous pression, ou l'agitation de fragments de corail dans un récipient hermétique.

Ensuite, afin d'examiner indépendamment la composition en phosphore des cellules animales et des zooxanthelles fraîchement isolées, il a été nécessaire d'isoler les symbiotes des tissus de l'hôte. Une technique classique par centrifugations[47] successives

[47] La **centrifugation** a également été utilisée pour les expériences des autres chapitres ayant nécessité des zooxanthelles fraîchement isolées, pour les normalisations par comptage de zooxanthelles... Lorsque l'on centrifuge un échantillon de tissus coralliens broyés dans de l'eau de mer, les zooxanthelles sédimentent et forment un culot au fond du

a été choisie. Afin de ne pas modifier la composition chimique en phosphore des tissus lors de l'isolation, les tissus n'ont pas été isolés dans de l'eau de mer mais dans une solution tampon particulière, nommée solution d'isolation, développée d'après une préparation utilisée au CSM pour observer les cellules coralliennes en microscopie confocale (Venn *et al.*, 2009). Elle est composée, notamment, des trois ions majeurs des cellules hôte aux concentrations cytosoliques (60 mmol L^{-1} de sodium, 200 mmol L^{-1} de potassium et 190 mmol L^{-1} d'ions chlorure), et elle possède un pH de 7,45 (25 mmol L^{-1} de PIPES) et une osmolarité[48] de 1100 mosm L^{-1} (ajustée avec du mannitol) (Herrera *et al.*, 1989; Goiran *et al.*, 1997; Hagedorn *et al.*, 2009). Des inhibiteurs de phosphatases y ont été ajoutés pour éviter l'hydrolyse enzymatique des composés phosphorés (50 mmol L^{-1} de fluorure de sodium et 1 mmol L^{-1} d'orthovanadate de sodium). Cette solution tampon, fraîchement préparée avant chaque expérience de RMN, a permis l'isolation des zooxanthelles et des cellules animales, et leur rinçage lors des diverses étapes de centrifugation successives. Les zooxanthelles en culture ont également été récupérées de leur milieu de culture par centrifugation et rincées dans cette solution d'isolation.

Extraction des cellules

Après l'isolation et le rinçage dans la solution d'isolation, les cellules animales ont été lysées tandis que les zooxanthelles, plus solides, sont restées intactes. La solution de tissus animaux contenue dans le tampon a donc pu être observée directement en RMN. Pour les zooxanthelles, en culture ou fraîchement isolées, une étape supplémentaire d'extraction de leurs composés phosphorés solubles a été nécessaire. Les zooxanthelles ont été plongées dans une solution d'EDTA bouillante contenant du fluorure de sodium (7 minutes à 100°C ; Belda *et al.*, 1993). Le surnageant, contenant la fraction soluble, a ensuite été observé en RMN.

Observation en spectroscopie RMN

Après ces étapes, les extraits des cellules animales, ou de zooxanthelles, ont été lyophilisés afin de pouvoir les conserver avant la mesure en spectroscopie RMN. La lyophilisation a, de plus, permis de resolubiliser les extraits dans une solution tampon, nommée tampon de RMN, de pH fixé (pH = 7,45 ± 0,05 fixé grâce à 50 mmol L^{-1} de TES) et adaptée à la RMN (contenant 10% d'oxyde de deutérium[49]). Cette dernière étape a, à chaque fois, été réalisée le jour même de la mesure en RMN. Les paramètres de mesure sont donnés dans l'article 5, et tous les déplacements chimiques

tube car elles sont plus denses que l'eau de mer, tandis que les tissus de l'hôte, plus légers ou de même densité que l'eau de mer, restent dans le surnageant. La répétition des centrifugations (au moins trois fois) permet de bien nettoyer le culot de zooxanthelles. Les surnageants sont rassemblés à la fin : ils contiennent les tissus animaux.

[48] L'**osmolarité** est la concentration de molécules osmotiquement actives (molécules ou ions) dans une solution, c.à.d. la concentration des solutés qui sont capables d'attirer l'eau.

[49] L'**oxyde de deutérium**, D_2O, aussi appelé eau lourde, est chimiquement identique à l'eau normale (H_2O) à ceci près que les atomes d'hydrogène dont il est composé sont des isotopes lourds, du deutérium. Leur noyau contient un neutron en plus du proton présent dans chaque atome d'hydrogène. Le nom d'eau lourde vient de la densité plus importante de D_2O que celle de l'eau normale. En RMN, la présence d'eau lourde sert à améliorer la qualité des spectres obtenus et à calibrer le spectromètre.

sont exprimés en référence à l'acide phosphorique (voir note 42).

Dans chaque échantillon, un standard interne de calibration a été ajouté en quantité connue (0,5 ou 5,0 µmoles) afin de faciliter l'analyse des spectres. Le standard choisi est l'acide phénylphosphonique (APP, ou PPA en anglais, pour phenylphosphonic acid), qui présente l'avantage d'avoir un déplacement chimique δ bien isolé de ceux des constituants cellulaires, et donc facilement identifiable (c'est le pic le plus à droite des phosphonates sur la figure 25, avec un δ de 13 ppm environ). L'intégration de ce pic, correspondant à une quantité connue de phosphore (0,5 ou 5,0 µmoles), permet d'obtenir la quantité de phosphore correspondant aux autres pics d'un spectre (par un produit en croix)[50].

Tests de l'efficacité du protocole

Paramétrage des analyses

Afin de vérifier que le protocole choisi permettait de réaliser des mesures en RMN du ^{31}P dans des conditions optimales, deux tests préliminaires ont été réalisés.

Le premier test a visé à déterminer le δ de divers composés phosphorés purs dans les conditions d'analyse des tissus coralliens. Six composés purs ont été dissous dans la solution tampon d'isolation, lyophilisés puis redissous dans le tampon de RMN (tout comme n'importe quel échantillon de corail) avant mesure par RMN. Le résultat est présenté sur la figure 2 de l'article 5. Les δ obtenus correspondent bien à ceux de la littérature (figure 25), et il a par la suite été considéré que les solutions tampons choisies sont compatibles avec la mesure en spectroscopie RMN.

Le second test a visé à déterminer l'influence du pH sur les mesures. En effet, lors de la préparation des échantillons de tissus coralliens, il a été constaté que le pH des extraits était variable d'une expérience à l'autre (entre pH = 6,5 et pH = 8), quoique généralement proche de 7,45 (le pH fixé par les solutions tampon). Bien qu'un grand soin ait été apporté au contrôle du pH dans les échantillons à la suite des ces observations, il a été jugé préférable de quantifier l'influence du pH sur le déplacement chimique du phosphate (le composé dont le déplacement chimique est le plus susceptible de varier avec le pH, et le composé auquel on s'est le plus intéressé durant cette thèse). Ainsi, les δ du phosphate et de l'APP ont été déterminés pour des solutions de pH compris entre 4,25 et 8,0. Les résultats sont présentés sur la figure 3 de l'article 5. Ces résultats ont permis de déterminer une équation empirique reliant le δ observé pour l'APP sur un échantillon quelconque au δ théoriquement attendu pour le phosphate (article 5, équation 1). Par la suite, l'identification exacte du pic du phosphate, qui présentait parfois quelque ambigüité, a été aisément possible sur tous les spectres de tissus coralliens, simplement en calculant le δ du phosphate et en examinant la zone correspondante du spectre. Cette précaution a permis de s'affranchir des problèmes liés au contrôle fin du pH dans les extraits.

[50] En toute rigueur, l'**intégration d'un pic** ne permet de calculer la quantité de phosphore à laquelle ce pic correspond que sous certaines conditions expérimentales (il faut que la relaxation soit maximale entre deux impulsions du spectromètre pour éviter un phénomène de saturation des pics). L'approximation a ici été faite en connaissance de cause.

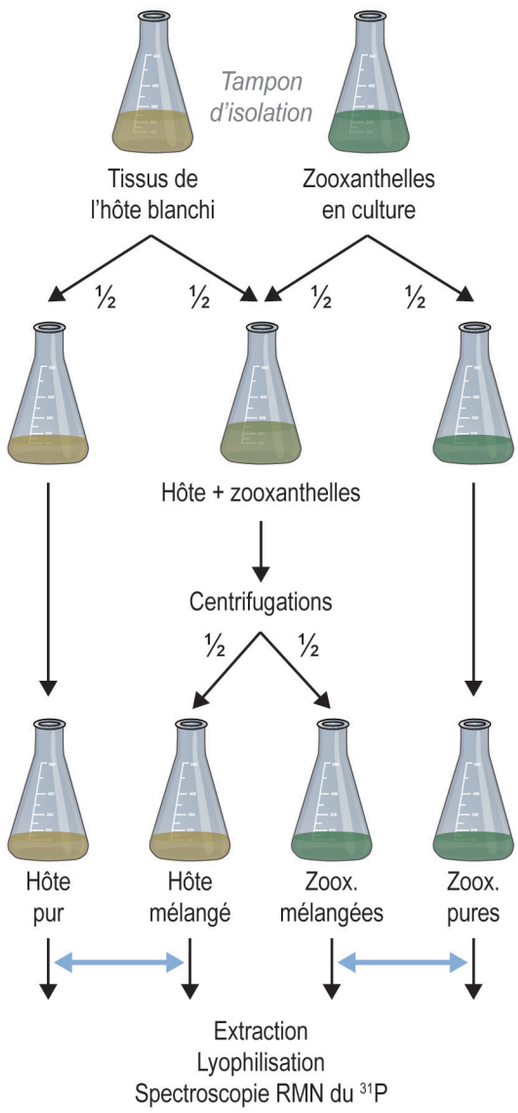


Figure 26 | Principe de l'expérience de contamination croisée

Le protocole figuré sur ce schéma a été utilisé pour tester la qualité de l'isolation des tissus hôtes et des symbiotes par centrifugations successives pour les observations en RMN. Pour ce test, des tissus de corail blanchi (donc naturellement exempt de symbiotes) ont été mélangés à des zooxanthelles en culture (naturellement exemptes de contaminants animaux), puis centrifugés ensembles plusieurs fois afin de re-séparer ces deux fractions. Les flèches bleues représentent les échantillons dont les spectres ont été comparés deux à deux.

Test de la qualité de l'isolation : une technique non optimale...

La qualité de la technique d'isolation des zooxanthelles et des cellules animales a été vérifiée à l'aide d'une expérience dite de contamination croisée, selon le principe présenté sur la figure 26.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 5 de l'article 5. Globalement, ils ont démontré que la technique par centrifugation entraîne une forte contamination des zooxanthelles (+ 39% de phosphate et + 590% de phosphonates !), tandis que la contamination des tissus de l'hôte reste quant à elle négligeable (+4% et +9%). La contamination des zooxanthelles vient sans doute d'une sédimentation de certains composés denses de l'hôte lors des centrifugations, tels que des membranes ou des organites.

Cette constatation a mené à la conclusion que seuls les tissus animaux et les zooxanthelles en culture sont à ce jour observables en RMN, et qu'un nouveau protocole reste à mettre au point pour les zooxanthelles fraîchement isolées[51]. Parmi les pistes envisageables pour améliorer l'isolation de ces zooxanthelles, peu sont néanmoins valables. En effet, la centrifugation sur gradient de Percoll, l'un des outils qui permettrait une meilleure séparation par densité, entraîne des pertes importantes de matériel dans le gradient, ce qui n'est pas compatible avec la forte quantité de cellules né-

[51] Si l'isolation par centrifugation n'est ainsi pas adaptée à la RMN, pour autant, cela ne remet pas en question cette technique dans le cadre du reste de cette thèse. En effet, c'est la grande biomasse et la très forte sensibilité nécessaires à l'analyse par RMN qui mettent ici à mal cette technique. Pour des comptages de zooxanthelles et des expériences d'absorption de nutriments, l'effet de la contamination reste sans doute bel et bien négligeable.

cessaires à la RMN. Une technique de filtration serait peut-être plus adaptée, mais n'a pas pu être testée durant cette thèse, faute de temps.

Tests de la qualité de l'extraction : du triomphe de la simplicité

Pour l'étape d'extraction des molécules phosphorées des zooxanthelles en culture, divers protocoles de la littérature ont été testés : extraction à l'EDTA bouillant, à l'acide perchlorique 30% à froid avec ou sans EDTA, et à l'acide sulfurique (Watanabe *et al.*, 1987; Belda *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1999). En définitive, les spectres les plus propres ont été obtenus pour l'extraction à l'EDTA bouillant, et c'est donc cette technique, la plus simple, qui a été conservée.

Mesure de la composition en phosphore

Pour chaque échantillon de zooxanthelles en culture et de tissus hôtes, le contenu en phosphate a été déterminé à l'aide de l'intégration du pic d'APP (note 50).

Pour les zooxanthelles, dont le dénombrement est possible, cette quantité a été ensuite normalisée par le nombre de cellules et par leur volume.

Pour les tissus animaux, dont les cellules ne sont pas dénombrables, le contenu en phosphate a été normalisé selon une procédure permettant de s'affranchir de la quantité de tissus utilisée pour la mesure. Il a été constaté, sur tous les spectres de l'hôte, qu'un pic permanent existe dans la zone des phosphonates (pic de $\delta = 21{,}2 \pm 0{,}01$ ppm). L'étude de Steen (1986) sur l'anémone de mer a considéré que ce pic de phosphonate était constant, c.à.d. que la quantité de ce phosphonate particulier est indépendante des conditions environnementales[52]. Cette observation a servi de postulat pour calculer le pourcentage de phosphate par rapport à ce phosphonate à 21,2 ppm (en utilisant la technique décrite dans la note 50). Cette technique, bien que critiquable, présente, par rapport à la normalisation par l'APP, l'intérêt de quantifier le phosphate par rapport à une molécule interne aux tissus hôtes (phosphonate) et non par rapport à un standard de calibration rajouté dans l'échantillon (APP).

4 Composition en phosphore de la symbiose

Une fois les conditions d'analyse en spectroscopie RMN adaptées au modèle corallien, l'effet de divers paramètres environnementaux a été testé sur les deux types d'échantillons observables : les zooxanthelles en culture et les tissus de l'hôte.

Composition des tissus hôtes et des zooxanthelles en culture

De fortes différences ont été observées entre la composition en phosphore des tissus hôtes et des zooxanthelles en culture. En particulier, les zooxanthelles en culture présentent des polyphosphates alors que les tissus de l'hôte n'en contiennent pas. De plus, l'hôte est très riche en phosphonates, tant en terme de diversité que d'abondance (article 5, figure 7), tandis que les zooxan-

[52] L'argumentation développée dans l'article de Steen invoque la persistance d'un pic important pour ce phosphonate chez les anémones, même après 4 années dans le noir ! ou 10 jours sans nourriture (Steen, 1986).

thelles en culture n'en contiennent que très peu.

Parmi les phosphonates de l'hôte, l'hypothèse de la présence d'un composé particulier, l'acide (aminoéthyl)phosphonique (AEP), a été testée. En effet, de précédentes études ont rapporté son abondance dans les tissus d'autres cnidaires (Kittredge *et al.*, 1962; Quin, 1964; Henderson *et al.*, 1972; Steen, 1986). Les résultats obtenus avec les tissus de *S. pistillata* ont, par contre, montré que l'AEP ne fait pas partie des phosphonates de ce corail (article 5, figure 8).

Effets de facteurs environnementaux...

... sur la composition des zooxanthelles en culture

Les résultats obtenus durant cette thèse ont montré que le contenu en phosphate des zooxanthelles en culture est multiplié par 2,6 entre une culture âgée de 15 jours et une culture âgée de 38 jours, et que le contenu en phosphore total a également augmenté (article 5, tableau 1 et figure 4), similairement à ce qui a été observé chez l'algue verte *Chlorella fusca* à divers stades de différenciation (Sianoudis *et al.*, 1984).

Un enrichissement du milieu de culture d'algues âgées de 22 jours avec du PID a entraîné une augmentation par 3,1 de leur contenu en phosphate. A l'inverse, un enrichissement avec du POD a entraîné une diminution par 2,5 de ce contenu (article 5, tableau 1 et figure 4). Ce dernier résultat suggère que l'APA des zooxanthelles en culture était faible, ainsi que cela a été observé auparavant (Annis et Cook, 2002).

... sur la composition de l'hôte corallien

Afin de déterminer l'influence du régime nutritif du corail (apports de POP) sur la composition en phosphore de l'hôte, des coraux fortement nourris, "normalement" nourris (selon le régime habituel au CSM, page 64), ou non nourris, ont été comparés. Les résultats ont montré que, par rapport à des coraux nourris "normalement", une forte nutrition de l'hôte augmente son contenu en phosphate (exprimé comme la proportion de phosphate par rapport au pic de phosphonate de $\delta = 21{,}2$ ppm), tandis que la privation de nourriture entraîne une diminution de ce contenu (article 5, tableau 2 et figure 7). Ces résultats sont cohérents avec le fait que la nutrition fournit du POP, ensuite transformé en POD et en PID par le métabolisme de l'hôte (Wijgerde *et al.*, 2011).

Afin de déterminer l'importance de la présence des zooxanthelles pour la composition en phosphore de l'hôte, des coraux blanchis ont été utilisés. Les résultats obtenus ont montré que leur contenu en phosphate n'était pas influencé par la perte des symbiotes (49,3% de phosphate pour les coraux blanchis, contre 48,7% pour des coraux symbiotiques ; article 5, figure 7).

5 Schéma bilan

La figure 27 présente un bilan des résultats obtenus dans ce chapitre.

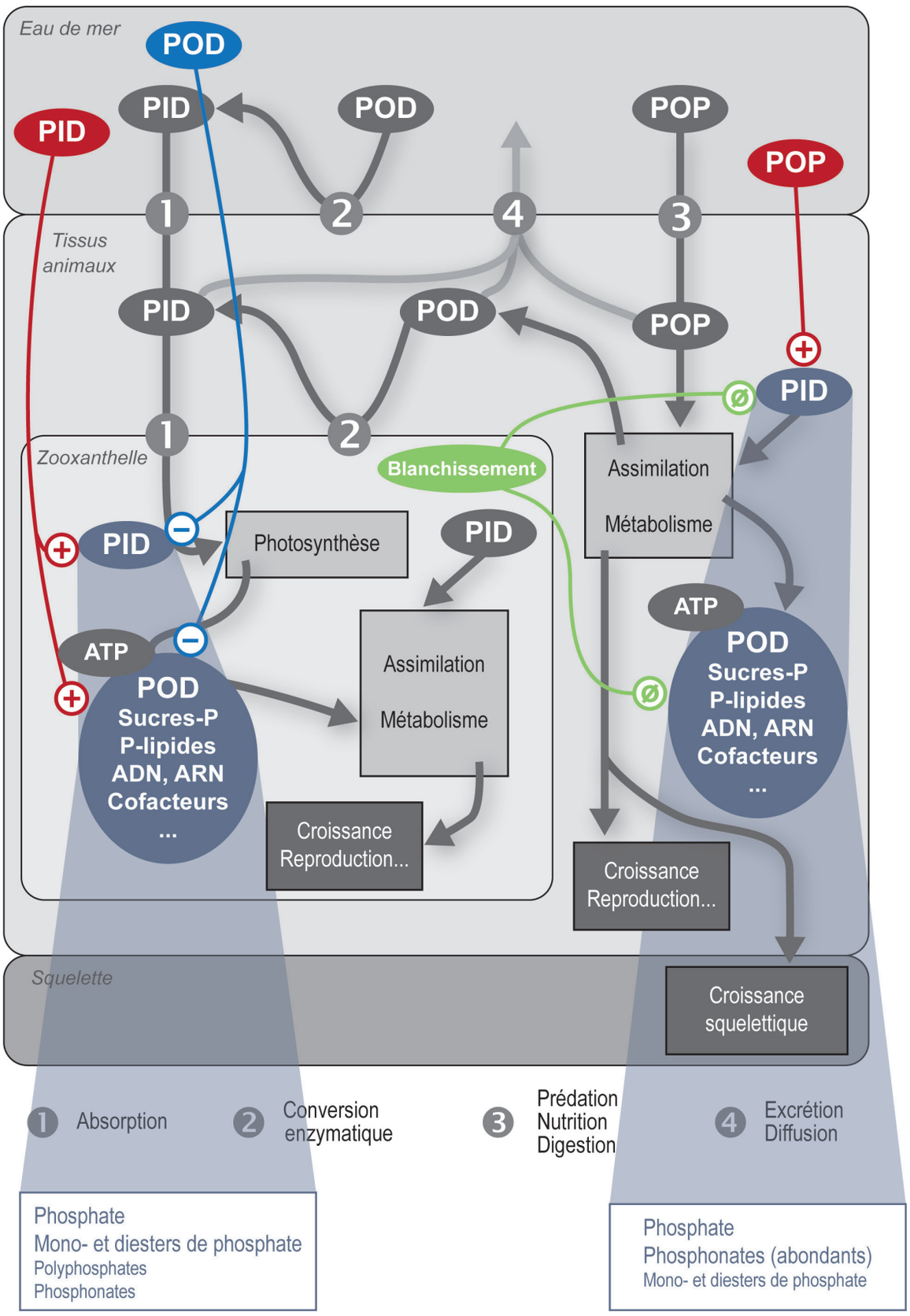


Figure 27 | Bilan de la composition en phosphore de la symbiose
Les résultats acquis dans le chapitre 4 sont résumés en couleur, sur la base de la Figure 13 (passée en tons de gris pour plus de lisibilité). Vert : paramètre n'ayant pas d'effet. Rouge : paramètre ayant un effet positif. Bleu : paramètre ayant un effet négatif. Bleu-gris : stocks de phosphore observés, et dont la composition est donnée dans les encadrés en bas de la figure.

6

Article 5
Phosphorus composition of coral host tissues and cultured zooxanthellae revealed by ^{31}P-NMR

Submitted to Coral Reefs | In review

Résumé

Malgré l'importance du phosphore pour les coraux symbiotiques, le métabolisme de ce nutriment est encore relativement peu connu. À notre connaissance, cette étude est la première à observer, grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore ^{31}P, la composition du corail scléractiniaire *Stylophora pistillata* et de ses zooxanthelles fraîchement isolées ou en culture. Nous avons testé à la fois la faisabilité de cet outil spectroscopique chez les coraux, et son utilité pour déterminer l'effet de facteurs environnementaux sur la composition en phosphore des coraux. Des expériences préliminaires ont montré que la technique conventionnelle de centrifugation utilisée pour séparer les tissus de l'hôte corallien des zooxanthelles symbiotiques entraîne une contamination importante des zooxanthelles, ce qui rend les symbiotes fraîchement isolés impropres aux études en RMN. Les résultats ont montré que les composés phosphorés observés dans les zooxanthelles en culture sont surtout du phosphate, des mono- et des diesters de phosphate, et, en quantité moins importante, des phosphonates et des polyphosphates. Un ajout de phosphore inorganique (KH_2PO_4) dans le milieu de culture a entraîné un enrichissement des zooxanthelles en phosphate, en monoesters de phosphate et en polyphosphates, avec une augmentation par 3,1 de la concentration en phosphate intracellulaire. Un ajout de phosphore organique (beta-glycérophosphate) a entraîné une diminution de la concentration en composés phosphorés dans les zooxanthelles, avec une réduction par 2,5 de la concentration en phosphate intracellulaire. Les composés phosphorés observés dans les tissus de l'hôte sont principalement du phosphate, et une forte quantité et diversité de phosphonates, ainsi que des mono- et diesters de phosphate en quantités moindres. La nutrition de l'hôte a augmenté le contenu en phosphate, avec 20,2% de phosphate intracellulaire pour des coraux non nourris depuis 2 mois contre 48,7% pour des coraux bien nourris. Le blanchissement n'a pas entraîné de modification du contenu en phosphate (49,3%). Cette étude met en évidence l'importance des phosphonates dans la composition en phosphore de l'hôte corallien, et illustre l'effet de la disponibilité du phosphore dans le milieu sur la composition en phosphore de l'hôte et des zooxanthelles en culture, au travers de la nutrition et d'un enrichissement en nutriments dissous dans l'eau.

Article 5

Article 5

6

Article 5
Phosphorus composition of coral host tissues and cultured zooxanthellae revealed by ^{31}P-NMR

C. Godinot[1,2,3], M. Gaysinski[4], O. Thomas[5], C. Ferrier-Pagès[1,2], and R. Grover[1,2]

Submitted to Coral Reefs | In review

Abstract

Despite the importance of phosphorus for symbiotic corals, the metabolism of this nutrient is still poorly known. To our knowledge, this is the first study based on 31P-nuclear magnetic resonance (NMR) investigating the phosphorus composition of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* and its associated zooxanthellae freshly isolated (FIZ) or cultured (CZ). We tested both the feasibility of this spectroscopic tool on corals and its usefulness for determining the impact of environmental factors on corals phosphorus composition. Preliminary experiments showed that conventional centrifugation techniques used to separate coral host tissues from symbiotic zooxanthellae led to high contamination of FIZ, which makes FIZ unsuitable for this study. Results showed that phosphorus compounds observed in CZ were mainly phosphate, phosphate mono- and diesters, and to a much lesser extent, phosphonates and polyphosphates. Adding dissolved inorganic phosphorus (KH_2PO_4) to the culture medium led to enrichment in phosphate, phosphate monoesters and polyphosphates in CZ, with a 3.1 fold intracellular phosphate increase. Adding dissolved organic phosphorus (beta-glycerophosphate) led to a reduction of the concentration of phosphorus compounds, including a 2.5 fold intracellular phosphate decrease. The phosphorus compounds observed in host tissues were mainly phosphate and a large quantity and diversity of phosphonates, and to a lesser extent phosphate mono- and diesters. Host feeding increased the phosphate content, with 20.2% of phosphate in 2-months starved corals compared to 48.7% in well fed corals. Bleaching did not modify the phosphate content (49.3%). This study highlights the importance of phosphonates in the composition of coral host tissues, and illustrates the impact of phosphorus availability on the phosphorus composition of host tissues and CZ, both through feeding of the host and inorganic phosphorus enrichment of the CZ.

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] LEA CSM-CNRS 647 'Biosensib', Monaco, Principality of Monaco
[3] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc
[4] Plateforme technologique de Chimie, University of Nice Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06000 Nice, France
[5] University of Nice-Sophia Antipolis, Nice Institute of Chemistry UMR 7272 CNRS – PCRE, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06008 Nice, France

Introduction

Scleractinian corals form reefs in shallow, oligotrophic waters, where nutrient, and especially phosphorus levels, are among the lowest in the world (Bythell 1990; Furnas 1991; Szmant 2002). Phosphorus has however a central role in life processes, because this element enters into the composition of many biological molecules. Indeed, phosphorus occurs in deoxyribonucleic and ribonucleic acids (DNA and RNA), it is involved in membranes and fat metabolism through phospholipids, and it enters into the composition of many enzymatic cofactors. Phosphorus also plays a major role in the conservation and transfer of energy *via* adenosine triphosphate (ATP), and it is involved in many phosphorylation and transphosphorylation reactions of sugars, proteins and other biomolecules. Hence, for most reef corals, the low availability of phosphorus may limit their calcification and photosynthesis (D'Elia 1977; Jackson and Yellowlees 1990; Annis and Cook 2002). Corals have therefore developed efficient pathways to metabolize environmental phosphorus nutrients at relatively fast rates. They indeed take up dissolved inorganic phosphorus compounds, i.e. phosphate (D'Elia 1977; Sorokin 1992; Godinot et al. 2009), through a sodium/phosphate symporter (Godinot et al. 2011a). They also make use of particulate phosphorus sources when feeding on zooplankton (Johannes et al. 1970; Wijgerde et al. 2011), and take advantage of dissolved organic phosphorus *via* their alkaline phosphatase activity (Jackson et al. 1989; Annis and Cook 2002; Godinot et al. submitted). Once taken up, phosphorus compounds are efficiently retained by corals owing to their association with symbiotic dinoflagellates, called zooxanthellae, which are harbored in coral endodermal cells. Zooxanthellae concentrate nutrients, including phosphorus compounds, and integrate them into organic molecules *via* their photosynthetic activity (Muscatine and D'Elia 1978; D'Elia et al. 1983; Domotor and D'Elia 1984; D'Elia and Cook 1988; Bythell 1990; Badgley et al. 2006; Godinot et al. 2009), and then partly transfer those molecules back to the coral host for its metabolism (Muscatine and Porter 1977). This particular nutrient recycling within the symbiosis is one of the reasons why corals can flourish in nutrient-poor waters.

Despite the central role of the phosphorus element for corals, its metabolism and its distribution into the diverse phosphorus compounds within the coral-zooxanthellae symbiosis are poorly understood to date. Conventional studies have examined phosphorus metabolism in corals using enrichment (Stambler et al. 1991; Snidvongs and Kinzie 1994; Steven and Broadbent 1997; Ferrier-Pagès et al. 2000; Koop et al. 2001; Godinot et al. 2011b) and limitation experiments (Muscatine et al. 1989; Falkowski et al. 1993; Godinot et al. 2011a), measurements of ratios of phosphorus to carbon and nitrogen (Stambler et al. 1991; Snidvongs and Kinzie 1994; Godinot et al. 2011b), or measurements of phosphorus incorporated into the skeleton (Montagna et al. 2007; Godinot et al. 2011b; Mallela et al. 2011; Mason et al. 2011). Other stud-

ies have examined the cellular content of specific phosphorus-containing molecules such as ATP, phospholipids, and phosphonates in other cnidarians (Kittredge et al. 1962; Patton et al. 1977; Steen 1986b; Fang et al. 1987; Fang et al. 1991; Rands et al. 1992) and in symbiotic clams (Belda et al. 1993).

The simultaneous detection of various types of phosphorus-containing molecules can be achieved by the use of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. This analytical technique is based on the magnetic properties of atom nuclei that possess a nuclear spin and it has already been described as an appropriate for the study of the phosphorus metabolism in marine organisms (Feuillade et al. 1995; Quin and Quin 2001; Viant et al. 2002; Tjeerdema 2008). The chemical shift of a phosphorus atom is strongly dependent on the nature of the bounded atoms. The resulting spectra will then allow the identification of compounds classes or functional groups of the phosphorus-containing molecules present in the coral extracts. Phosphorus compounds typically distinguished by NMR spectroscopy include phosphates, polyphosphates, phosphonates, and various phosphates esters (Fig. 1).

Despite the key information that can be gained by using ^{31}P-NMR spectroscopy on coral samples, there are only few previous studies in the literature that reported the use of this technique on cnidarians (Henderson et al. 1972; Steen 1986b; Rands et al. 1992). Two of them used *in vivo* ^{31}P-NMR on live polyps of the sea anemones *Aiptasia pulchella* and *Anemonia viridis* to investigate phosphorus metabolism (Steen 1986b; Rands et al. 1992). These two studies reported on the host adenylate ratio (ATP/(ADP+ATP)), but failed to observe any phosphorus signal when trying to examine freshly isolated zooxanthellae (FIZ). Henderson et al.

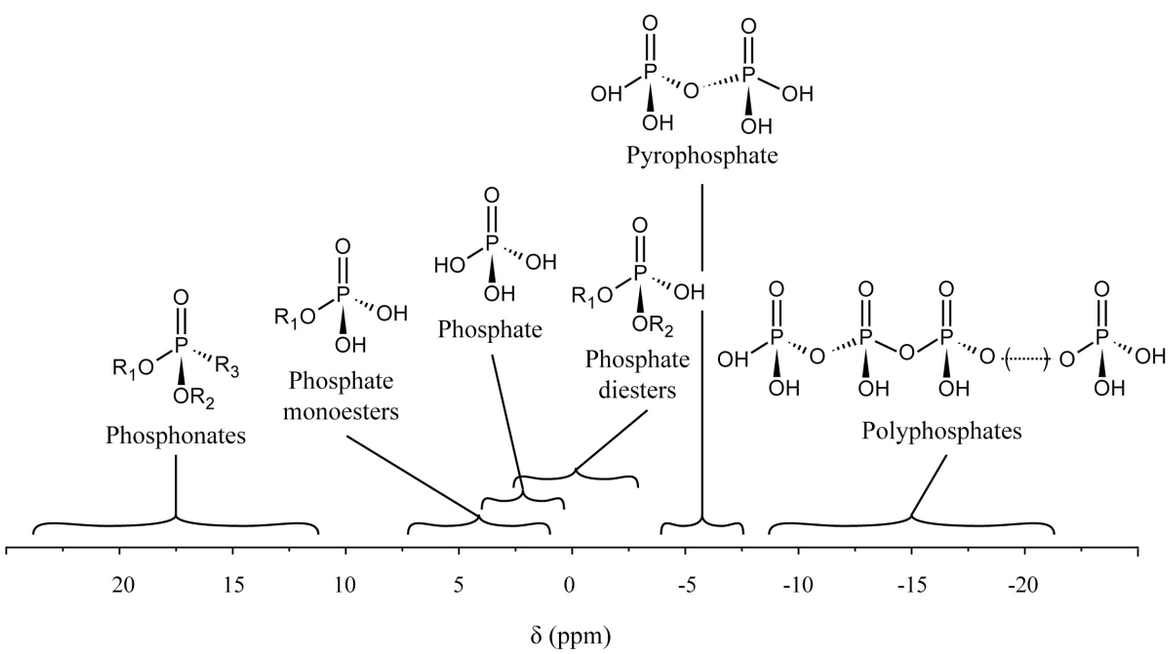


Figure 1 | Chemical shifts (δ) of biological phosphorus compound classes expected to occur in coral cells at physiological pH. Chemical shifts are a synthesis of published values from the literature and from values obtained during this study.

(1972) examined the phosphate and phosphonates composition of extracts from the sea anemone *Bunadosoma* sp., but more with the aim of refining existing hydrolytic procedures of phosphonates in marine samples than with the aim of examining the phosphorus metabolism of this species.

Therefore, the aim of the present study was to use ^{31}P-NMR spectroscopy for the determination of the chemical species in which phosphorus is present in the two partners of the coral symbiosis, in order to give a better knowledge on the phosphorus metabolism in corals. For this purpose, the ^{31}P-NMR spectroscopy tool was first examined in the host and freshly isolated zooxanthellae (FIZ) of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*; maintained under controlled conditions. The usefulness of this tool was then examined during a series of experiments, which aimed at determining the impact of several environmental conditions on the phosphorus composition of cultured (CZ) and freshly isolated zooxanthellae, as well as on coral host tissues. For CZ, we assessed the impact of phosphorus enrichment and culture age, considering that different growth stages are known to affect the phosphorus composition in other algae (Sianoudis et al. 1984). For host tissues and FIZ, we wanted to examine the impact of nutritional status. Indeed, host feeding constitutes an organic phosphorus source, which is known to affect coral uptake of phosphorus (Muller-Parker et al. 1990; Annis and Cook 2002; Godinot et al. 2009; Godinot et al. *submitted*), and may therefore modify the content of different phosphorus species within the symbiosis. Finally, we assessed the impact of bleaching on the phosphorus composition of host tissues, as symbiont loss may affect the phosphorus provisions of the host (Godinot et al. *submitted*). This study thus broadens the array of tools enabling the assessment of coral nutrient metabolism, with the potential to finely determine the impact of various environmental stressors on the phosphorus metabolism of corals.

In reef waters, DOP is present as phosphomonoesters, phosphodiesters, polyphosphates, and phosphonates (molecules that contain a C-P bond). In this first study, we concentrated on the use of phosphomonoesters. The recycling of phosphorus from phosphomonoesters involves enzymes called phosphatases, which belong to a large class of enzymes that catalyze the hydrolysis of monophosphorylated organic molecules into a phosphate ion molecule (DIP) and an alcohol. These metalloenzymes are classified as acid and alkaline depending on their pH optimum; and each type has different substrate specificities, catalytic mechanisms, and inhibition pathways (Neumann 1968; Fernley 1971; Hollander 1971). Coral hosts and their symbionts (commonly called zooxanthellae), either freshly isolated (FIZ) or cultured (CZ), exhibit phosphatase activity. Only two studies have investigated phosphatases in FIZ and CZ, showing both acid and alkaline phosphatases activities (AcPA and APA respectively) with intracellular (Jackson et al. 1989) and extracellular (Annis and Cook 2002) activities reported. Some other studies mentioned the presence of intracellular (Goreau 1956) and extracellular (Hayes and Goreau 1977; Domart-Coulon et al. 2001) phosphatase activity in coral hosts, but none of these studies extensively examined it.

This study first aimed at examining the utilization of DOP by the scleractinian coral

Stylophora pistillata under different environmental conditions. We tested the effect of DOP concentrations, and the effect of light, feeding and symbiotic status at one DOP concentration. We hypothesized that APA would vary depending on the availability or lack of other phosphorus sources. Hence, we hypothesized that APA would increase following an increase in irradiance (at least for the zooxanthellae, whose photosynthetic activity uses phosphorus), or a loss of symbionts, which leads to a decreased DIP uptake, and a release of DIP (D'Elia 1977; Muller-Parker et al. 1990), and that APA would also decrease following feeding of the host, which corresponds to a supply of POP. The second and third aims of this study were to compare the utilization of DOP by isolated symbionts and coral hosts, and by coral species in symbiosis with different symbiont clades. Finally, we estimated the contribution of DOP to the total demand of phosphorus by a scleractinian coral, by comparing the recycling of DOP to the uptakes of POP and DIP. All these questions have never been addressed in corals, but are essential and timely because nutrient availability is one of the key factors which determines reefs expansion and maintenance (Wood 1993; Lapointe 1997; Szmant 2002).

Materials and methods

^{31}P-NMR measurements

^{31}P-NMR has the unique advantage of relying on only one naturally occurring isotope of phosphorus (^{31}P has a 100% natural abundance), associated to a wide range of chemical shifts and to relatively simple spectra. All soluble phosphorus species within a sample can potentially be detected by NMR spectroscopy, while phosphorus nuclei involved in insoluble or immobilized compounds are usually invisible by NMR, as is the case for membrane phospholipids for example. To observe most of the phosphorus compounds present in corals, NMR experiments were performed as follows.

Preparation of the samples for NMR measurements differed between CZ, FIZ and host samples, and is explained in the corresponding paragraphs. All samples were freeze-dried immediately after preparation, and, just before analysis by NMR, the freeze-dried samples were re-dissolved in 4 mL buffer. This buffer (thereafter referred to as the “NMR buffer") contained 50 mM TES, 10% D_2O in DIW, and had a pH of 7.4. (Gupta et al. 1983; Watanabe et al. 1987). For all measurements, PPA (phenylphosphonic acid) was chosen as the internal quantification standard, and 0.5 to 5.0 µmol were added to each sample before freeze-drying.

All 1D NMR spectra were recorded at 298 ± 0.1°K (temperature control BCU 6.0, BVT 3000), on a BRUKER AVANCE DRX 500 spectrometer (500.13 MHz proton frequency and 202.45 MHz phosphorus frequency) equipped with a direct probe head (10 mm PH BBO H-D). D_2O was used for internal lock purposes. H_3PO_4 was used as an external reference for spectrum calibration to express the chemical shift (δ, expressed in parts per million, ppm) of phosphorus compounds. All NMR experiments were carried out using pulse sequences supplied by the spectrometer manufacturer (BRUKER – TOPSPIN 2.1). Each ^{31}P-NMR spectrum was acquired using 20.3 kHz Spectral Width (SW), 64 K complex data point, an acquisition time

(aq) of 1.6 s, a relaxation delay (D1) of 1.2 s, a number of scan (ns) between 19000 and 200000, a number of dummy scan (ds) of 32, and a 45° flip angle pulse width. Prior to Fourier transformation, FIDs were multiplied by an exponential line broadening function of 10 Hz. The resulting spectra were manually phased and baseline corrected.

^{31}P-NMR calibration

Preliminary tests were performed to ensure that NMR experiments were run under optimal conditions with coral samples.

We first measured the chemical shift of two solutions containing in total six identified phosphorus-containing molecules. These molecules were chosen because they cover the range of chemical shifts for molecules expected to occur in coral samples. The molecules and their chemical shifts are presented on Fig. 1. The first solution was made of 5.0 µmol of both PPA and aminoethylphosphonic acid (AEP) in the "NMR buffer". The second solution was made of 5.0 µmol of PPA, of KH_2PO_4, of beta-glycerophosphate, of adenosine triphosphate (ATP), and of polyphosphates in the "NMR buffer". Polyphosphates were used in the form of sodium hexametaphosphate 70 FG (thermPhos, Germany), which has a specified average chain length of 30. Observed resonances were compared to published values from the literature.

We then determined the influence of pH on the NMR observations, since it was observed that pH may slightly vary between experiences despite the use of the "NMR buffer". The second preliminary test therefore consisted in the determination of the chemical shift of both P atoms from phosphate ions (δ PO_4) and P atom from PPA (δ PPA) as a function of pH using various buffers containing 5 mM KH_2PO_4 and 5 mM PPA in 50 mM TES, 10% D_2O, with pH values of 4.25, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0. Chemical shifts were referenced to 85% phosphoric acid. In order to be able to calculate the δ PO_4 from the observed δ PPA at any pH comprised in the 4.5 - 8.0 range, we empirically calculated the mathematical equation of the titration curves of phosphate and PPA. This greatly helped to identify the phosphate peak in the generally dense region of the spectra. The phosphate peak was further confirmed in some cases by spiking the samples with 5.0 µmol of KH_2PO_4 after the first spectra acquisition. Spiking of one of the host samples with 5.0 µmol of AEP was also performed to confirm the putative identification of this compound in coral spectra, as AEP has been reported to be often abundantly present in other cnidarians (Kittredge et al. 1962; Quin 1964; Henderson et al. 1972; Steen 1986b).

Experiments with cultured zooxanthellae

Zooxanthellae from the species *Symbiodinium microadriaticum*, initially isolated from the scleractinian coral *Stylophora pistillata*, were maintained in 100 ml batch cultures contained in 125 ml Erlenmeyer flasks. The clonal cultures were maintained in autoclaved ASP-8A medium at pH 8.2 (modified after Blank 1987) in an incubator (Sanyo, UK). The ASP-8A medium contained 0.02 µM of phosphate, ammonium, and nitrate. Growth temperature was 25.0 ± 0.5°C, and light was provided by daylight fluorescent tubes (15000K) at 80 µmol photons m^{-2} s^{-1} on a 14h:10h light:dark cycle.

In a first experiment, the impact of a dissolved phosphorus enrichment was tested on the CZ phosphorus composition. Logarithmically growing CZ (aged 19 days; Steen 1987) were enriched with either: i) 1 mL of ASP-8A medium (control), ii) 1 mL of a stock solution of KH_2PO_4 (for a final concentration of 5 mM phosphate), iii) 1 mL of a stock solution of beta-glycerophosphate (for a final concentration of 5 mM organic phosphorus). The CZ from the 3 treatments were collected 3 days after the enrichments for ^{31}P-NMR measurements, and were thus 22-days old at the time of NMR measurements.

In a second experiment, we tested if the phosphorus composition changed with the growth phase. Logarithmically growing CZ (aged 15 days; Steen 1987) were therefore compared to stationary-phase CZ (aged 38 days; Steen 1987).

All CZ used for the NMR measurements were collected at the same day time (between 9 and 10 am), and were washed 3 times (centrifugation at 2000 *g*, for 5 min, at 4 °C) in a buffer (called the "cytoplasmic buffer") designed after Venn et al. (2009). This buffer contained approximate cytosolic concentrations of major ions in cnidarian cells (Herrera et al. 1989; Goiran et al. 1997). Phosphatase inhibitors were added to prevent the hydrolysis of organic phosphorus compounds (50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4). Mannitol was added to adjust osmolarity to 1100 mOsm l^{-1} (Hagedorn et al. 2009). pH of the "cytoplasmic buffer" was adjusted to 7.4 with 1M HCl and with 25 mM Pipes. For each NMR measurement, a 1 mL aliquot of the collected zooxanthellae solution was taken for cells counts (a yield of 2.2-5.2 10^8 zooxanthellae was typically harvested). After a final centrifugation (2000 *g*, for 5 min, at 4 °C), 6mL of boiling 50 mM EDTA was added to the CZ pellet and the homogenate was boiled for 7 min at 100°C (Belda et al. 1993). The mixture was then centrifuged at 12000 g for 10 min, and the pellet discarded. 5.0 µmol of PPA were subsequently added to the supernatant, which was then freeze-dried.

Experiments with cultured corals

Colonies of the scleractinian coral *S. pistillata* were maintained in aquaria supplied with natural seawater (exchange rate 2% h^{-1}) containing low phosphate (< 0.05 µmol L^{-1}), nitrate (< 0.4 µmol L^{-1}) and ammonium (< 0.5 µmol L^{-1}) concentrations. Seawater salinity was 38.2, pH was 8.1 ± 0.1, temperature was maintained at 25.0 ± 0.5 °C, and irradiance was 150 µmol photons m^{-2} s^{-1}.

As a preliminary test, we determined the possible contamination of host cells by FIZ, and vice versa, by testing the efficiency of the centrifugation technique (method described below) used to separate the two components. We therefore performed a cross-contamination experiment, using host tissues and CZ. For this purpose, zooxanthellae-depleted host tissues were prepared using bleached *S. pistillata* corals. Bleached corals were prepared by culturing colonies for 6 weeks in the dark. Microscopy observations confirmed that symbiont density was 3 orders of magnitude lower in bleached (6.7 10^3 zoox cm^{-2}) than in normal colonies (2.5 10^6 zoox cm^{-2}). For the cross-contamination experiment, we used two identical aliquots of host tissues from bleached *S. pistillata*, and two identical aliquots of CZ. We mixed one aliquot of each, and then separated them again through centrifugation. The two cross-

contaminated samples were each compared to the second non-contaminated (control) aliquot. Percentage of phosphorus enrichment/loss in the cross-contaminated samples was calculated for two of the main regions of interest presented on Fig. 1, phosphate and total phosphonates. This cross-contamination experiment demonstrated that the centrifugation technique used is not suitable for the observation of zooxanthellae freshly isolated from coral tissues by ^{31}P-NMR (see Results). Therefore, only host tissues were subsequently examined.

In the first experiment with corals, we tested the impact of feeding on the phosphorus composition of coral hosts. Corals were therefore submitted to three different feeding regimes during two months: i) “highly fed” corals, fed 5 times per week with both frozen krill and live *Artemia salina* nauplii, ii) “control” corals, fed 2 times per week with the same food, and iii) “starved” corals, which were not fed for 2 months before the NMR measurements.

In the following experiment, we tested the impact of bleaching (symbiont loss) on the phosphorus composition of the coral host, by comparing symbiotic and highly bleached (aposymbiotic) *S. pistillata* hosts. Bleached colonies were prepared as described above, and fed a regime similar to the control corals from the previous experiment.

All corals used for the NMR measurements were collected at the same time of day (between 9 and 10 am). The isolation of coral tissues from the skeleton and the subsequent separation of host tissues from FIZ were performed in the "cytoplasmic buffer" described above. For each NMR measurement, 20 branch tips (5.0 ± 1.0 cm long, 1.0 ± 0.2 cm wide) of *S. pistillata* colonies were sampled using surgical bone cutters, and crushed with a hammer. The skeletal fragments were covered with the "cytoplasmic buffer", and the tissues were removed by agitation in a flask (Muscatine and Cernichiari 1969). The crude suspension was then filtered by gravity through a 40 µm mesh net to break cell aggregates, homogenized in a Dounce homogenizer, and sonicated for 10 minutes to break the animal cells and separate them from the zooxanthellae. Separation was completed by 3 successive centrifugations at 2000 *g*, for 5 min, at 4 °C. The animal supernatants were pooled, and 5 µmol of PPA were added to act as an internal calibration standard during NMR measurements. Samples were then lyophilized during 48 h.

Data analysis

For the determination of the δ PO_4 and δ PPA as a function of pH, mathematical fitting of the curves was performed with the GraphPad Prism software (version 5.0; San Diego, CA, USA).

Phosphate content was quantified for each CZ and host sample using the ratio of phosphate to PPA peaks integration (values are expressed as µmol of P). For CZ, results were normalized both to cell concentration and cell volume (expressed in fmol of phosphate per zooxanthellae, as well as in mmol phosphate L^{-1}). This latter parameter was calculated using a mean diameter of 8 µm for CZ, which gives a total volume of 2.7 10^{-13} L $zoox^{-1}$, considering zooxanthellae as spherical. The so-called phosphorus concentration obtained by this calculation gives the order of magnitude of the phosphorus concentration in the cytoplasm of the CZ, but one should note that

Article 5

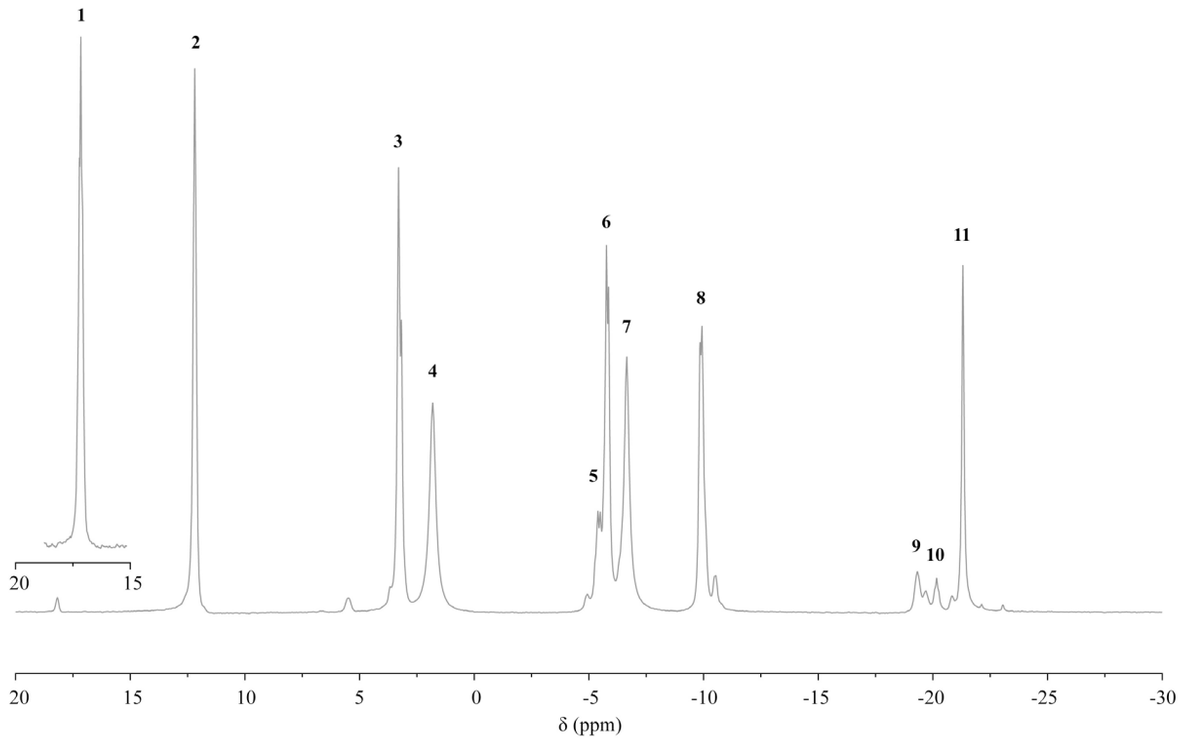


Figure 2 | NMR spectra of 6 known compounds in two solutions, either containing c.a. 5 µmol of aminoethylphosphonic acid (AEP) and phenylphosphonic acid (PPA), or c.a. 5 µmol of PPA, KH_2PO_4, beta-glycerophosphate, adenosine triphosphate (ATP), and polyphosphates. The major peaks were identified from published values and from spectra of each compound alone. The inset on the left shows the AEP peak that was obtained separately, aligned with the rest of the spectra. 1 is the AEP peak, 2 is the PPA peak, 3 is the beta-glycerophosphate peak, 4 is the phosphate peak, 5, 9, and 11 are the polyphosphate peaks, 6 and 7 are the γ-ATP peaks, 8 is the β-ATP peak, and 10 is the α-ATP peak.

the subdivision of zooxanthellae cells by organites was not taken into account in this rough calculation. For animal host tissues on the contrary, normalization by cell numbers was not possible (no counting possible), and phosphate content was quantified using the same method as described by Steen (1986b). According to this method, the highly deshielded signal assigned to one of the phosphonates (21.2 ± 0.01 ppm) was assumed constant (i.e. concentration independent of environmental conditions), and the phosphate content was calculated relative to that phosphonate peak (values are expressed as percentages).

Results

Preliminary tests

The chemical shifts of the six authenticated compounds used for the first preliminary test are presented in Fig. 2. This preliminary test confirmed that no overlapping occurs using PPA as a standard. Spectra obtained with coral cells and CZ also confirmed that PPA was a good internal calibration standard for ^{31}P-NMR experiments involving corals.

Results from the second preliminary test are presented on Fig. 3. The following

Article 5

Treatment	Zooxanthellae content (10^8 zoox.sample^{-1})	Phosphate content (µmol P.sample^{-1})	Phosphate content of CZ (fmol P zoox^{-1})	Phosphate concentration in CZ (mmol P L^{-1})
15-days old CZ	2.19	0.55	2.51	9.37
22-days old CZ	3.05	1.02	3.34	12.4
38-days old CZ	4.07	2.70	6.63	24.75
22-days old CZ + DIP	5.21	5.35	10.3	38.30
22-days old CZ + DOP	3.36	0.45	1.34	5.0

Table 1 | Variation of CZ phosphate content at various growth stages and with various sources of phosphorus in the culture medium. 15 and 22-days old CZ are logarithmically growing, while 38 days old-CZ are in stationary phase (Steen 1987). The culture medium was enriched with either ASP-8A medium (22-days old CZ, control), 5 mM of KH_2PO_4 (22-days old CZ + DIP), or 5 mM of beta-glycerophosphate (2-days old CZ + DOP).

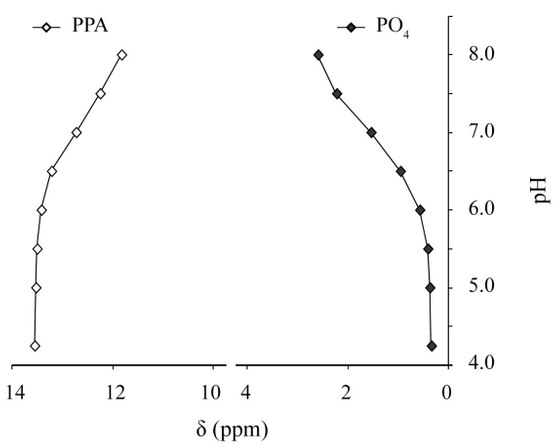


Figure 3 | Variation of δ PPA and δ PO4 with pH.

equation (Eqn. 1) was obtained to calculate the phosphate shift (δ PO_4) relative to the PPA shift (δ PPA).

$$\delta\, PO_4 = a + \frac{b+c \times \delta\, PPA}{d+e \times \delta\, PPA} \qquad \text{(Eqn. 1)}$$

with a = 2.83, b = 2.97 10^8, c = - 2.56 10^7, d = 8.24 10^7, and e = - 4.59 10^6.

Cultured zooxanthellae

The phosphorus compounds observed in CZ were mainly phosphate, phosphate mono- and diesters, and to a much lesser extent, phosphonates and polyphosphates (Fig. 4). Overall, dissolved inorganic phosphorus (DIP) enrichment led to an increase in the concentrations of phosphate, phosphate monoesters and polyphosphates. On the contrary, dissolved organic phosphorus (DOP) enrichment led to a reduction in the content of all the phosphorus compounds observed on the spectra. For example, a 3.1 fold increase in phosphate content was observed in the presence of DIP, while a 2.5 fold decrease was obtained with DOP enrichment (Table 1).

Ageing of CZ cultures impacted the phosphate content of CZ, which increased by 2.6 fold between day 15 and 38 (Table 1). All other peaks increased as well, but the number of compounds present was not modified (data not shown).

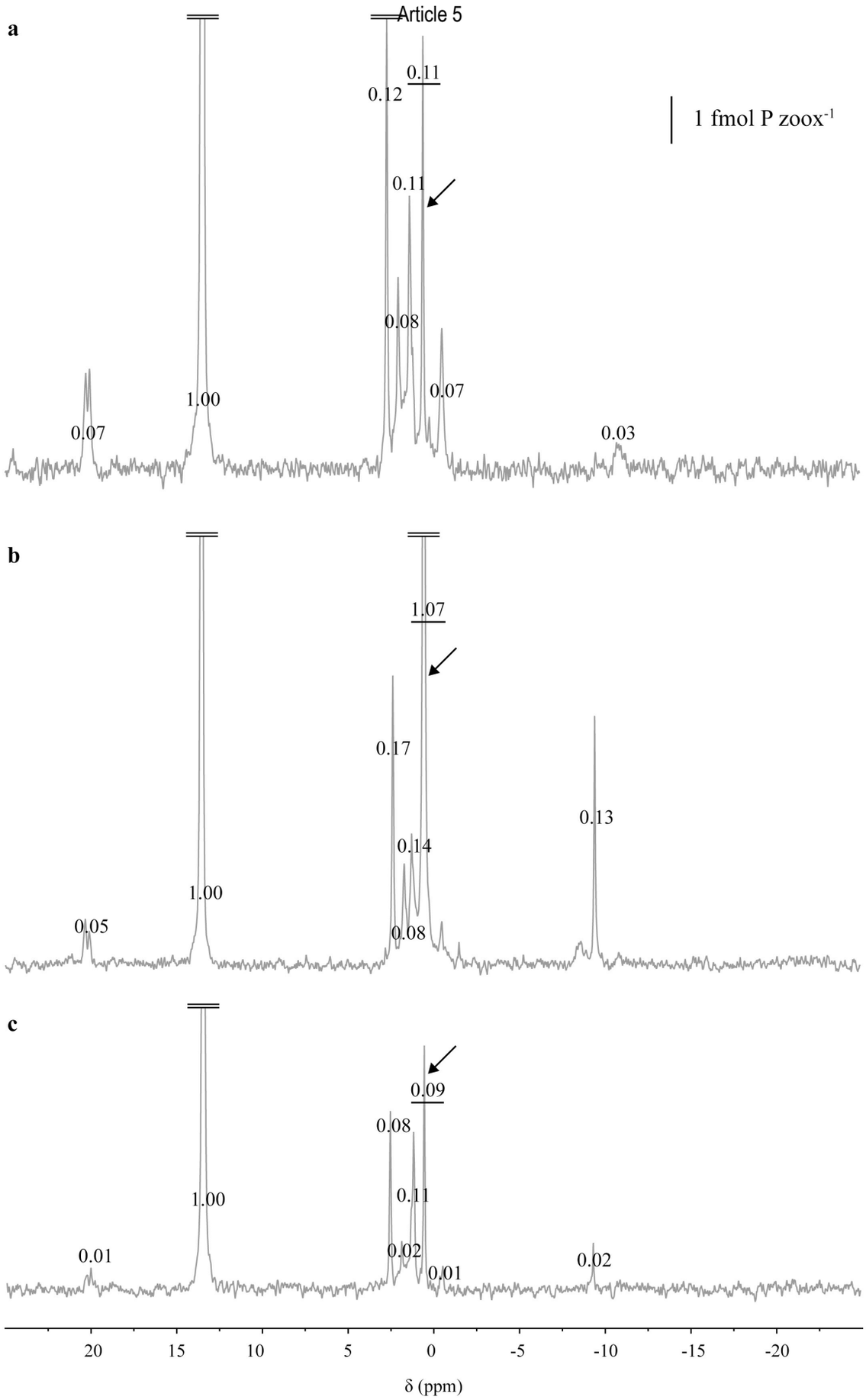


Figure 4 | (*Legend on the following page***)**

Figure 4 | (*legend of the figure on the previous page*) Impact of the phosphorus enrichment in the culture medium on the phosphorus composition of CZ. **a**: control CZ enriched with ASP-8A medium. **b**: CZ enriched with 5mM phosphate (DIP). **c**: CZ enriched with 5mM of beta-glycerophosphate (DOP). The three spectra were vertically scaled to the scale given in the upper-right corner. Values on the spectra represent the integration (relative to a PPA integration of 1.00 for 5 µmol of PPA). The underlined value and the arrow indicate the phosphate peak.

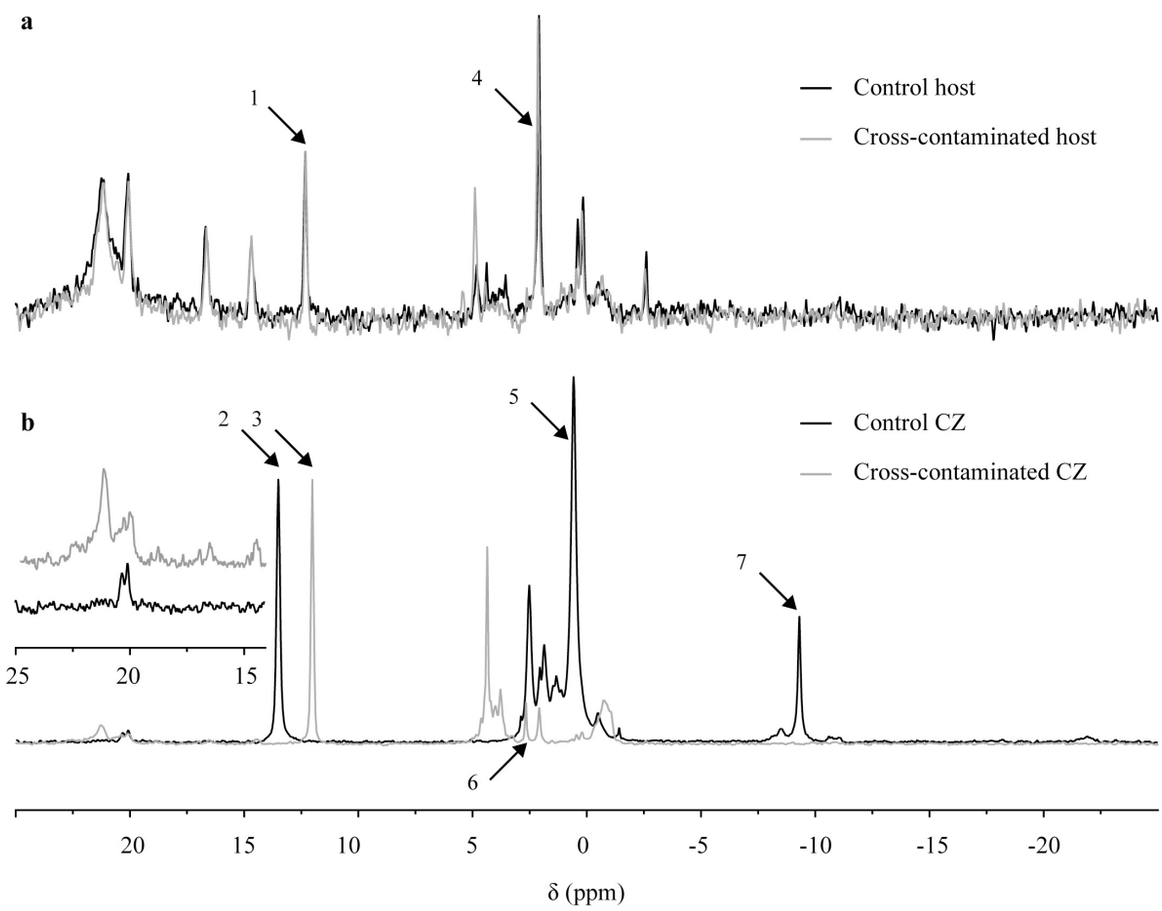


Figure 5 | Impact of the centrifugation technique used for the separation of the two components of coral tissues (**a**: host cells, **b**: FIZ) on the ^{31}P-NMR spectra seen via a cross contamination experiment. Extracted aposymbiotic (bleached) *S. pistillata* host tissues were mixed with cultured zooxanthellae (CZ), and then separated through centrifugation. The two cross-contaminated host and CZ samples (in grey) are each compared to equal quantities of control bleached host tissues and CZ that have not been cross-contaminated (in black). Arrows 1-3: PPA peak (5,0 µmol for CZ, 0,5 µmol for host tissues), arrows 4-6: phosphate peak. The insert on the left-hand side of panel b is a close-up of the phosphonate zone of the CZ spectra.

Article 5

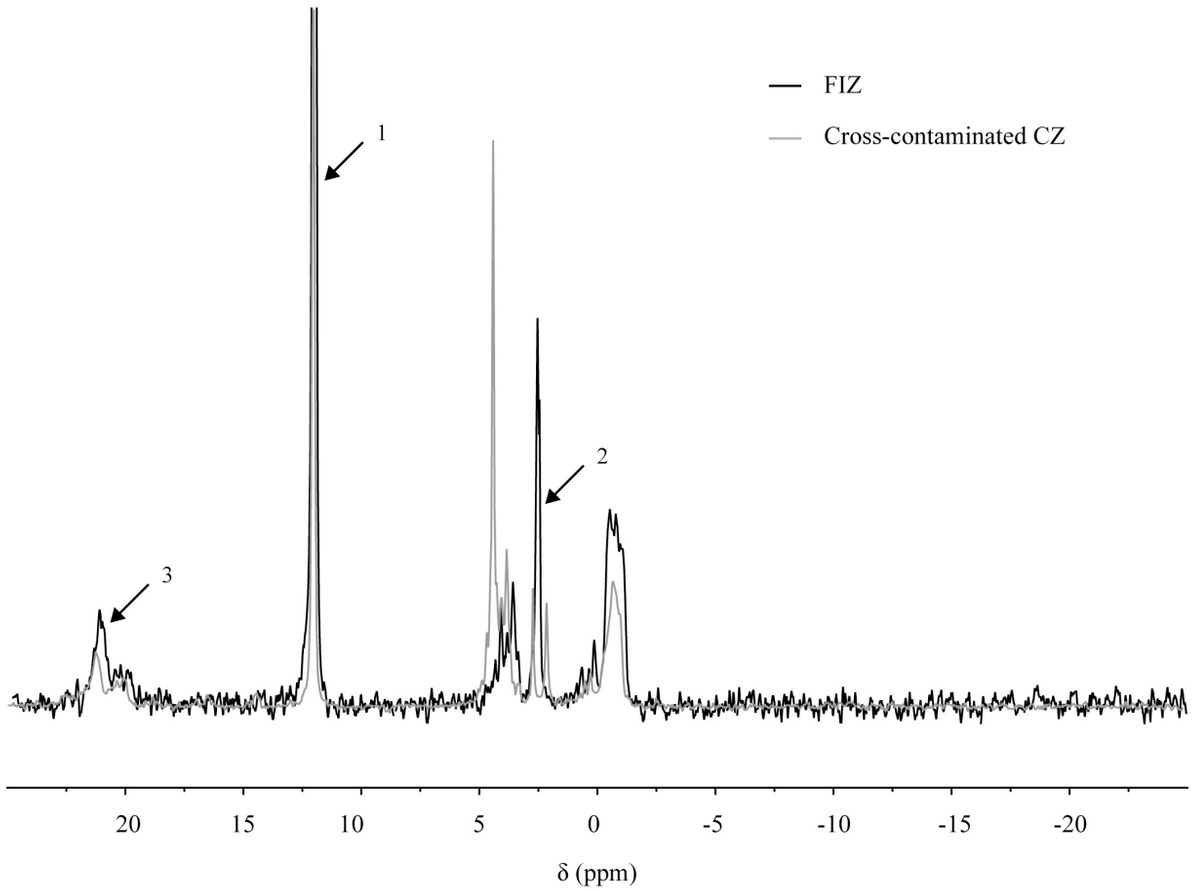


Figure 6 | Comparison between NMR spectra of cross-contaminated CZ (in grey) and FIZ (in black). Arrow 1 indicates the PPA standard (5.0 µmol), arrow 2 the phosphate peak, and arrow 3 the 21.2 ppm phosphonate peak.

Host tissues

Results from the cross-contamination experiment showed that, during centrifugation, zooxanthellae contamination by the host tissue was high, while the host tissues were only slightly contaminated by the zooxanthellae (Fig. 5). Indeed, the two spectra (control and cross-contaminated) were very similar for the host (Fig. 5A), and phosphate and phosphonate contents only increased by 9 and 4%, respectively, due to the cross-contamination. On the contrary, the two spectra of the CZ greatly differed (Fig. 5B), the peaks were shifted, due to a shift in pH (visible on peaks 2 and 3 of PPA on Fig. 5B), and the phosphate content decreased by 39% (from peak 5 to peak 6 on Fig. 5B) while phosphonate content increased by 590%, from 0.07 µmol to 0.48 µmol (insert on Fig. 5B). Also, the peak at -10 ppm, observed for the control CZ, disappeared after cross-contamination (peak 7 on Fig. 5B). We therefore concluded that the separation technique by centrifugation was not suitable for FIZ observations by ^{31}P-NMR, and we then decided to discard the subsequent FIZ spectra. Further confirmation came from the high degree of similarity between the spectra obtained for cross-contaminated CZ and FIZ (Fig. 6).

Article 5

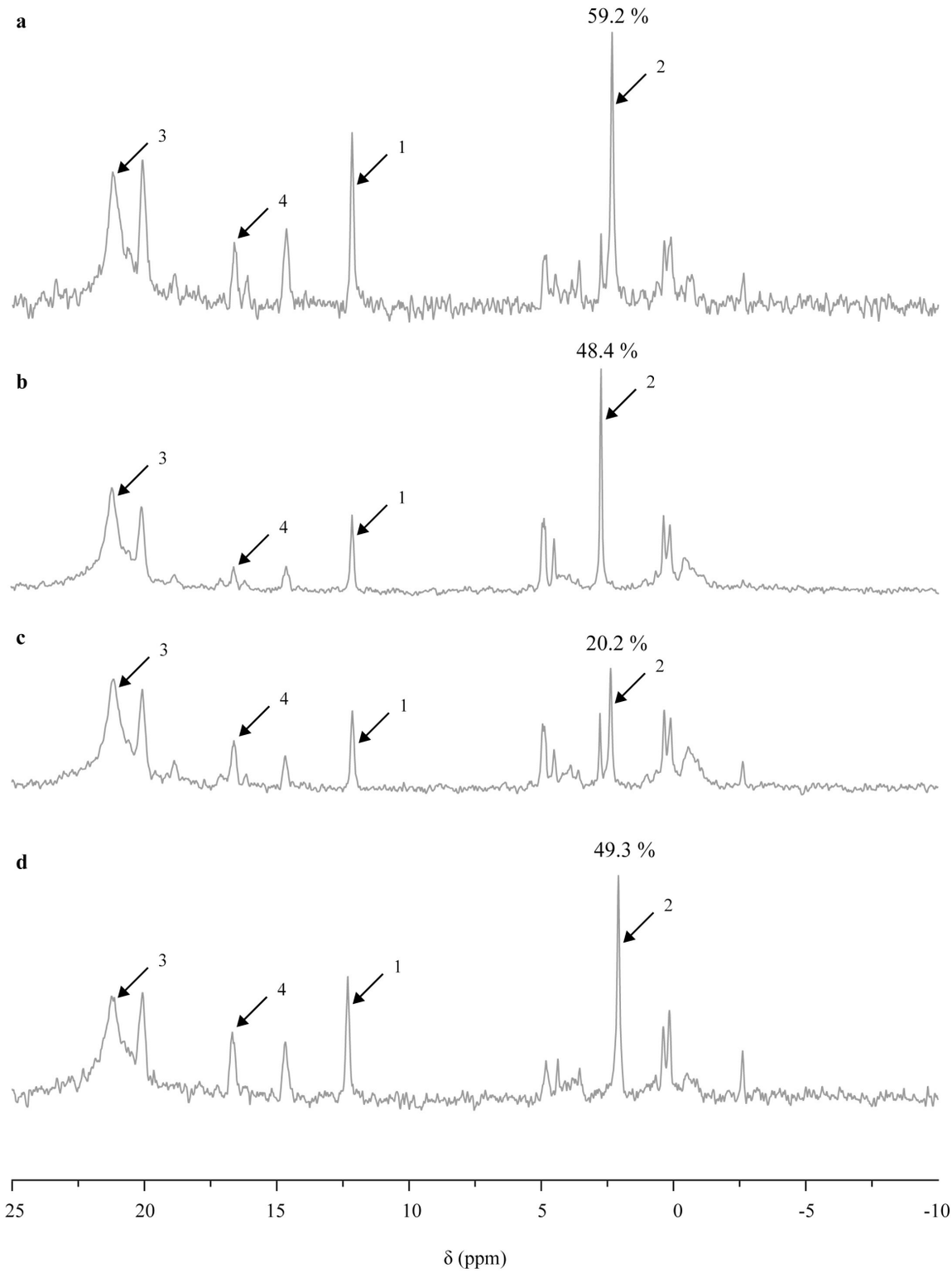


Figure 7 | Impact of host feeding (**a**, **b**, **c**) and symbiotic status (**b**, **d**) on the phosphorus composition of host tissues. **a**: highly fed corals. **b**: control corals. **c**: starved corals. **d**: bleached corals. Arrow 1 indicates the PPA standard (0.5 µmol), arrow 2 the phosphate peak, arrow 3 the 21.2 ppm phosphonate peak, and arrow 4 the peak tentatively identified as AEP. Percentages indicate the proportion of phosphate relative to the 21.2 phosphonate peak.

Article 5

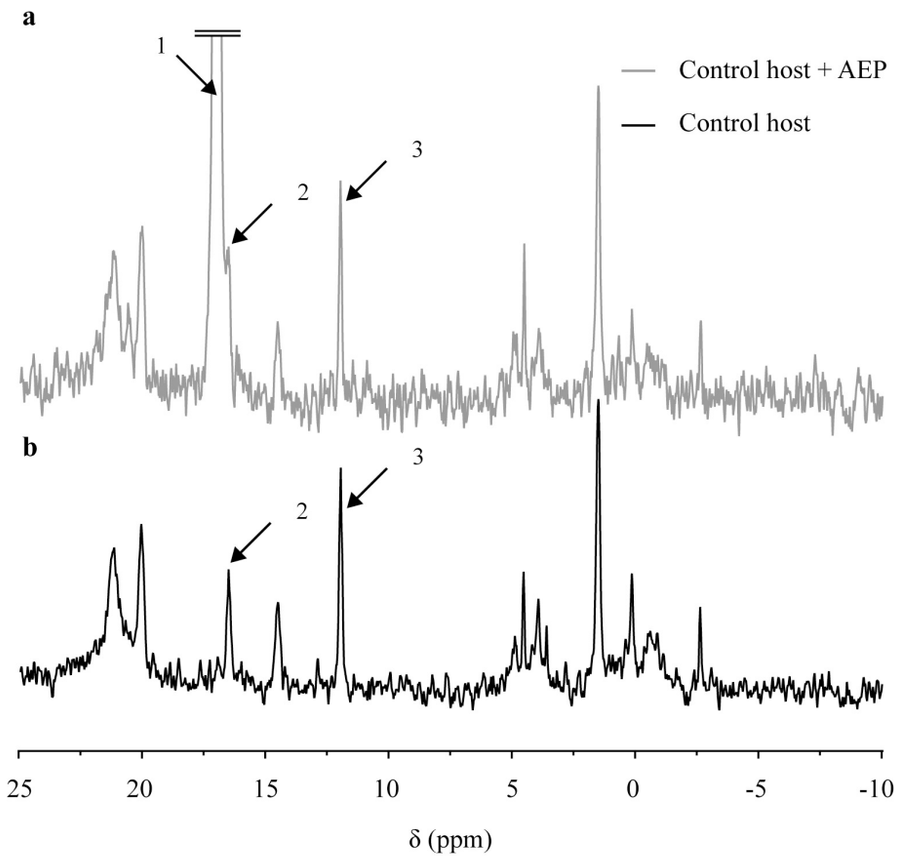


Figure 8 | Spiking of the bleached host sample with 5.0 µmol of AEP (**a**) and comparison with the pure bleached host sample (**b**). Arrow 1: AEP peak, arrow 2: phosphonate peak closest to the AEP peak, and arrow 3: 0,5 µmol PPA.

The phosphorus compounds observed in host tissues were mainly phosphate, a large diversity of phosphonates (Fig. 4), and to a lesser extent, phosphate mono- and diesters (Fig. 7).

Host feeding increased the ratio of phosphate relative to the phosphonate peak at 21.2 ppm, while host starvation induced a decrease of this ratio (Table 2 and Fig. 7). Indeed, control corals had 48.7 ± 0.3% phosphate, a percentage which increased to 61.2 ± 1.2% with a high feeding regime, and which decreased to 20.2% with a 2-months starvation. Symbiont loss (i.e. bleaching) did not modify the phosphate content (49.3%). No other major variations occurred in the rest of the NMR spectra (Fig. 7).

Spiking the bleached host sample with 5.0 µmol of AEP (Fig. 8) showed that peak 4 on Fig. 7 is not AEP, since the shift of that peak (16.55 ppm, peak 2 on Fig. 8) did not match the shift of the AEP peak (17.1 ppm, peak 1 on Fig. 8).

Discussion

This study presents the use of ^{31}P-NMR spectroscopy for the assessment of the phosphorus distribution among coral host

Article 5

Treatment	Phosphate content (µmol P.sample^{-1})	Phosphonate content (µmol P.sample^{-1})	Percentage of phosphate relative to phosphonate (%)
Highly fed	21.0	33.2	63.3
Highly fed	7.9	13.4	59.2
Control	41.0	83.7	49.0
Control	13.6	28.1	48.4
Starved	7.5	37.1	20.2
Bleached	8.8	17.8	49.3

Table 2 | Variation of phosphate relative to the phosphonate peak with a δ of 21.2 ppm in host tissues from corals submitted to three different feeding regimes and from bleached corals. The first two treatments (highly fed and control) were duplicated, each time with a c.a. 3 fold difference in coral biomass used for the extraction, in order to verify that sample biomass did not influence the results in the range tested.

tissues and cultured zooxanthellae, under various environmental conditions.

Development of the NMR protocol

In this study, we developed a ^{31}P-NMR protocol suitable for coral host tissues and cultured zooxanthellae. Duplicated experiments showed that measures were highly repeatable, and the calibration curve performed between pH and the δ PO_4 was useful to examine the phosphate content of all samples.

The protocol developed was not applicable to FIZ. A previous study on the anemone *A. pulchella* also failed to develop a protocol for FIZ examination (Steen 1986b). However, in that latter study, failure may have been due to a lack of material. Indeed, according to Steen (1986a), analyses were made with a c.a. 2.3 10^6 FIZ sample^{-1} (that latter study indeed reports a zooxanthellae content of 0.9 10^6 FIZ mg animal prot^{-1}, and a protein content of 1.0 mg animal prot anemone^{-1}). As NMR suffers from a lack of sensibility especially for ^{31}P with a low gyromagnetic ratio, this probably explains the poor results reported for FIZ (Steen 1986b). In the present study on the contrary, FIZ concentrations were one or two orders of magnitude higher (0.5-3.0 10^8 FIZ sample^{-1}), and lack of applicability of the ^{31}P-NMR protocol was likely not due to a low compound concentration, but rather to contamination by host tissues from the supernatant, and to losses of soluble phosphate from the zooxanthellae pellet, during separation by centrifugation.

Conversely, contamination by the symbionts was negligible for the host tissues. Centrifugation has been used in countless of physiological studies to separate zooxanthellae from host tissues, but its efficiency has been less frequently examined. Muscatine and Cernichiari evaluated that contamination of FIZ by host tissues was of c.a. 6.0%, and that host tissue contamination is of c.a. 1.3%, therefore estimating that the separation of algae and animal tissue by centrifugation is about 95% efficient and that mutual contamination of

fractions does not constitute a significant error (Muscatine and Cernichiari 1969). Latter studies estimated similar separation efficiencies of c.a. 90% (Cook 1972; McAuley 1987), but highlighted that contamination by the remaining 10% may be very high for some applications (McAuley 1987). Alternative separation techniques such as centrifugation through a Percoll gradient or filtration have been successively used to reduce contamination of FIZ by host tissues (Tytler and Spencer Davies 1983; Santos et al. 2001; Treignier et al. 2008), but their rather low yield due to material losses (Grover, pers. comm.) may hamper their applicability to NMR. Additional studies are required to achieve contamination-free isolation of FIZ from host tissues before ^{31}P-NMR can be successfully applied to symbiotic zooxanthellae.

Coral phosphorus composition

Host tissues and cultured zooxanthellae presented different phosphorus composition, with abundant and diverse phosphonates in the host (four peaks) versus scarce phosphonates in CZ (one peak), and polyphosphates only observed in CZ. Additionally, the P-ester regions covered a wider spectral range in host tissues than in CZ, and are therefore presumably representative of differences in the P-esters chemical diversity of coral hosts and CZ. A previous ^{31}P-NMR study on *A. pallida* revealed 8 major signals for the anemone host tissues: two phosphonate peaks (an unidentified one and aminoethyl phosphonate), one peak for sugar monophosphates, one peak for phosphate, and four peaks in the polyphosphate region for ATP, ADP, adenylate and reductants (Steen 1986b). Similar peaks were observed in *Anemonia viridis* (Rands et al. 1992). Polyphosphates were absent for host tissues in the present study, and only one peak was observed in the polyphosphate region for CZ. This result is not surprising, at least for the CZ, as previous studies reported that the presence of NMR-visible polyphosphates is not systematic in algae (Lundberg et al. 1989). For the host tissues, the absence of polyphosphates concurs with results reported for the giant clam *Tridacna gigas* (Belda et al. 1993). Various polyphosphates may have been present in the host and CZ, but at concentrations too low to afford observable NMR signals.

The relative absence of phosphonates in CZ departs from previous reports that phosphonates can occur in a large variety of marine protozoans, including dinoflagellates (Kittredge and Roberts 1969; Kittredge et al. 1969). Conversely, the diversity and abundance of phosphonates in host tissues are in agreement with previous reports which showed that marine metazoans biosynthesize molecules containing C-P bonds (Henderson et al. 1972; Steen 1986b; Nakhel et al. 1988; Matsubara et al. 1990; Quin and Quin 2001). These organophosphorus compounds may represent as much as 30-50% of the total phosphorus content (Kittredge et al. 1962; Quin 1964; Henderson et al. 1972; Steen 1986b). In various sea anemones, it was reported that aminoethyl phosphonate (AEP) is often abundantly present (Kittredge et al. 1962; Quin 1964; Henderson et al. 1972; Steen 1986b). However, in the present study, AEP was not found in the host. The peak observed in the vicinity of the AEP peak (peak 1 on Fig. 8) may have been one of its common derivatives, methylaminoethyl phosphonate, or amino phosphonopropanoate, that

were also frequently observed in anemones (Quin 1964; Quin and Quin 2001). Phosphonates are seldom observed in free form, and are mostly bound to lipid structures (Kittredge et al. 1962) and in complex proteinaceous or glycoprotein structures (Quin 1964). Though their synthesis and degradation have been well studied (Kononova and Nesmeyanova 2002; Quinn et al. 2007), their metabolic importance remains unclear (Hori et al. 1984; Quin and Quin 2001). The presence of resistant C-P bonds in lipids has been suggested to provide increased strength and protection to organisms that lack protective outer coatings of chitin or cellulose (Rosenberg 1973). In *A. pallida*, it was hypothesized that phosphonates were membranar phosphonolipids, because of the typical asymmetric shape of the corresponding peaks on the NMR spectra, which is indicative of membranar compounds in NMR. The same conclusion may also be given in the present study for the phosphonates evidenced in the deshielded part of the host spectra (Fig. 7).

In CZ, the phosphate content measured in the present study (between 1.3 and 10.3 fmol P zoox^{-1}; Table 1), and the calculated phosphate concentration (between 5.0 and 38.3 mmol P L^{-1}; Table 1) are, to the best of our knowledge, the first report of phosphate concentrations in zooxanthellae cells. The order of magnitude of phosphate content is coherent with reports of the one order of magnitude higher total phosphorus content of zooxanthellae from *S. pistillata* (between 40 and 50 fmol P zoox^{-1}) (Godinot et al. 2009; Godinot et al. 2011b). The millimolar concentration calculated in the present study is coherent with concentrations found in other algal cells (between 1 and 15 mmol P L^{-1}) (Eppley 1958; Atkinson et al. 1972; Raven 1974; Reed et al. 1981).

Impact of environmental conditions

The ^{31}P-NMR protocol presented here allowed for the examination of the impact of environmental conditions on the phosphorus composition of CZ and host tissues.

The intracellular phosphorus enrichment of CZ with ageing, and especially their phosphate enrichment, is coherent with previous reports that intracellular phosphate pools increase with the state of differentiation of algal cultures (Sianoudis et al. 1984).

DIP enrichment of the CZ cultures led to an intracellular phosphorus enrichment, with a 3.1 fold increase in phosphate content and phosphate concentration, from 12.4 to 38.3 mmol P L^{-1}. Previous NMR studies had similarly shown that phosphate enrichment, and phosphate depletion, of algal cultures, respectively lead to an increase, and a decrease, of the intracellular phosphate content (Elgavish et al. 1980; Watanabe et al. 1987; Feuillade et al. 1995). Conversely, DOP enrichment led to a 2.5 fold decrease of the phosphate content and concentration of CZ. One hypothesis to explain such poor use of DOP by CZ in the DOP-enriched cultures is that they had a low alkaline phosphatase activity (APA), and therefore could not optimally use DOP. Indeed, very low levels of APA were also observed in CZ in some cultures (Annis and Cook 2002).

In the host, intracellular phosphate increases with feeding, which is in agreement with a recent report that zooplankton feeding provides DIP and DOP to corals (c.a. 3 µg cm^{-2} d^{-1} for DIP + DOP) (Wijgerde et al. 2011). The lack of impact of bleaching

on the phosphate content was probably linked to that strong impact of feeding, as bleached corals were fed the same nutritive regime as control corals. Furthermore, as zooxanthellae photosynthates transferred to the host mostly consist in carbon- and nitrogen-rich compounds such as glycerol and maltose, but not in phosphorus-rich compounds (Muscatine 1967; Battey and Patton 1987; Gattuso and Jaubert 1990; Venn et al. 2008), no major impact of symbiont loss on host phosphorus composition is expected.

By addressing the phosphorus composition of corals, this study brings new information on the nutrient metabolism of corals. The importance of phosphonates in the composition of host compounds was highlighted for the first time, and the response of coral and CZ phosphorus composition to ambient phosphorus pools was established. Therefore, it seems important to follow this study by attempts at 1) identifying the phosphonates present in the host in order to elucidate their biological role, and at 2) improving the isolation of FIZ for ^{31}P-NMR measurements, in order to examine the phosphorus composition of the symbionts as well.

Acknowledgements

We thank Willem Schipper and Andrew McKeon from thermPhos (Germany) for kindly providing the polyphosphate standard used in this study and information on their use. We are grateful to S. Sikorski for assistance in sample preparation. This research was supported by the government of the Principality of Monaco. Financial support to C.G. was provided by the École Normale Supérieure and the Centre Scientifique de Monaco.

References

Annis, E.R., and C.B. Cook. 2002. Alkaline phosphatase activity in symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) as a biological indicator of environmental phosphate exposure. Mar. Ecol. Prog. Ser. 245**:** 11-20.

Atkinson AW, Gunning BES, John PCL, McCullough W (1972) Dual mechanisms of ion absorption. Science 176:694-695

Badgley BD, Lipschultz F, Sebens KP (2006) Nitrate uptake by the reef coral *Diploria strigosa*: effects of concentration, water flow, and irradiance. Mar Biol 149:327-338

Battey JF, Patton JS (1987) Glycerol translocation in *Condylactis gigantea*. Mar Biol 95:37-46

Belda CA, Lucas JS, Yellowlees D (1993) Nutrient limitation in the giant clam-zooxanthellae symbiosis: effects of nutrient supplements on growth of the symbiotic partners. Mar Biol 117:655-664

Blank RJ (1987) Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*. Mar Biol 94:143-155

Bythell JC (1990) Nutrient uptake in the reef-building coral *Acropora palmata* at natural environmental concentrations. Mar Ecol Prog Ser 68:65-69

Cook CB (1972) Benefit to symbiotic zoochlorellae from feeding by green hydra. Biological Bulletin 142:236-242

D'Elia CF (1977) The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. Limnol Oceanogr 22:301-315

D'Elia CF, Cook CB (1988) Methylamine uptake by zooxanthellae-invertebrate symbioses: insights into host ammonium environment and nutrition. Limnol Oceanogr 33:1153-1165.

D'Elia CF, Domotor SL, Webb KL (1983) Nutrient uptake kinetics of freshly isolated zooxanthellae. Mar Biol 75:157-167.

Domotor SL, D'Elia CF (1984) Nutrient uptake kinetics and growth of zooxanthellae

maintained in laboratory culture. Mar Biol 80:93-101

Elgavish A, Elgavish GA, Halmann M, Berman T (1980) Phosphorus utilization and storage in batch cultures of the Dinoflagellate *Peridinium cinctum* F. WestII1. J Phycol 16:626-633

Eppley RW (1958) Sodium exclusion and potassium retention by the red marine alga, *Porphyra perforata*. The Journal of General Physiology 41:901-911

Falkowski PG, Dubinsky Z, Muscatine L, McCloskey L (1993) Population control in symbiotic corals. Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. Bioscience 43:606-611

Fang L-S, Chen Y-W, Chen C-S (1991) Feasibility of using ATP as an index for environmental stress on hermatypic coral. Mar Ecol Prog Ser 70:257-262

Fang LS, Chen YWJ, Soong KY (1987) Methodology and measurement of ATP in corals. Bull Mar Sci 41:605-610

Ferrier-Pagès C, Gattuso JP, Dallot S, Jaubert J (2000) Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*. Coral Reefs 19:103-113

Feuillade J, Bielicki G, Renou J-P (1995) ^{31}P-NMR study of natural phytoplankton samples. Hydrobiologia 300/301:391-398

Furnas MJ (1991) Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. Limnol Oceanogr 36:13-29

Gattuso J-P, Jaubert J (1990) Effect of light on oxygen and carbon dioxide fluxes and on metabolic quotients measured in situ in a zooxanthellate coral. Limnol Oceanogr 35:1796-1804

Godinot C, Ferrier-Pagès C, Grover R (2009) Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol Oceanogr 54:1627-1633

Godinot C, Grover R, Allemand D, Ferrier-Pagès C (2011a) High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral Stylophora pistillata. The Journal of Experimental Biology 214:2749-2754

Godinot C, Ferrier-Pagès C, Montagna P, Grover R (2011b) Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral Stylophora pistillata Esper 1797 under phosphate enrichment. J Exp Mar Biol Ecol 409:200-207

Godinot C, Ferrier-Pagès C, Sikorski S, Grover R (*submitted*) Significant use of dissolved organic phosphorus by reef-building corals. Ecology

Goiran C, Allemand D, Galgani I (1997) Transient Na^+ stress in symbiotic dinoflagellates after isolation from coral-host cells and subsequent immersion in seawater. Mar Biol 129:581-589

Gupta RK, Gupta P, Yushok WD, Rose ZB (1983) Measurement of the dissociation constant of MgATP at physiological nucleotide levels by a combination of ^{31}P NMR and optical absorbance spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun 117:210-216

Hagedorn M, Carter VL, Ly S, Andrell RM, Yancey PH, Leong J-AC, Kleinhans FW (2009) Analysis of internal osmolality in developing coral larvae, *Fungia scutaria*. Physiol Biochem Zool 83:157-166

Henderson TO, Glonek T, Hilderbrand RL, Myers TC (1972) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the phosphonate and phosphate composition of the sea anemone, Bunadosoma, sp. Arch Biochem Biophys 149:484-497

Herrera F, Lopez I, Egea R, Zanders P (1989) Short-term osmotic response of cells and tissues of the sea anemones, *Condylactis gigantea*. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 92:377-384

Hori T, Horiguchi M, Hayashi A (1984) Biochemistry of natural C-P compounds. Maruzen Ltd, Shiga, Japan

Jackson AE, Yellowlees D (1990) Phosphate uptake by zooxanthellae isolated from corals. Proc R Soc Lond B Biol Sci 242:201-204

Jackson AE, Miller DJ, Yellowlees D (1989) Phosphorus metabolism in the coral-zooxanthellae symbiosis: characterization and possible roles of two acid phosphatases in the algal symbiont *Symbiodinium* sp. Proceedings of the Royal Society of London Series B 238:193-202

Johannes RE, Coles SL, Kuenzel NT (1970) The role of zooplankton in the nutrition of some scleractinian corals. Limnol Oceanogr 15:579-586.

Kittredge JS, Roberts E (1969) A carbon-phosphorus bond in nature. Science (New York, NY) 164:37-42

Kittredge JS, Roberts E, Simonsen DG (1962) The occurrence of free 2-aminoethylphosphonic acid in the sea anemone, *Anthopleura elegantissima*. Biochemistry 1:624-628

Kittredge JS, Horiguchi M, Williams PM (1969) Aminophosphonic acids: Biosynthesis by marine phytoplankton. Comp Biochem Physiol 29:859-863

Kononova SV, Nesmeyanova MA (2002) Phosphonates and Their Degradation by Microorganisms. Biochemistry (Mosc) 67:184-195

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 GB, Larkum AWD, 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. Mar Pollut Bull 42:91-120

Lundberg P, Weich RG, Jensén P, Vogel HJ (1989) Phosphorus-31 and nitrogen-14 NMR studies of the uptake of phosphorus and nitrogen compounds in the marine macroalgae *Ulva lactuca*. Plant Physiology 89:1380-1387

Mallela J, Hermann J, Rapp R, Eggins S (2011) Fine-scale phosphorus distribution in coral skeletons: combining X-ray mapping by electronprobe microanalysis and LA-ICP-MS. Coral Reefs 30:813-818

Mason HE, Montagna P, Kubista L, Taviani M, McCulloch M, Phillips BL (2011) Phosphate defects and apatite inclusions in coral skeletal aragonite revealed by solid-state NMR spectroscopy. Geochimica et Cosmochimica Acta 75:7446-7457

Matsubara T, Morita M, Hayashi A (1990) Determination of the presence of ceramide aminoethylphosphonate and ceramide N-methylaminoethylphosphonate in marine animals by fast atom bombardment mass spectrometry. Biochim Biophys Acta 1042:280-286

McAuley PJ (1987) Quantitative estimation of movement of an amino acid from host to Chlorella symbionts in green hydra. The Biological Bulletin 173:504-512

Montagna P, McCulloch M, Mazzoli C, Silenzi S, Odorico R (2007) The non-tropical coral *Cladocora caespitosa* as the new climate archive for the Mediterranean: high-resolution (~ weekly) trace element systematic. Quaternary Science Reviews 26:441-462

Muller-Parker G, Cook CB, D'Elia CF (1990) Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida.* Mar Ecol Prog Ser 60:283-290

Muscatine L (1967) Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and tridacna and its control by the host. Science 156:516-519

Muscatine L, Cernichiari E (1969) Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. Biol Bull 137:506-523

Muscatine L, Porter JW (1977) Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. Bioscience 27:454-460

Muscatine L, D'Elia CF (1978) The uptake, retention and release of ammonium by reef corals. Limnol Oceanogr 23:725-734.

Muscatine L, Falkowski PG, Dubinsky Z, Cook PA, McCloskey LR (1989) The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 236:311-324

Nakhel IC, Mastronicolis SK, Miniadis-Meimaroglou S (1988) Phospho- and phosphonolipids of the aegean pelagic scyphomedusa Pelagia noctiluca. Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and lipid metabolism 958:300-307

Patton JS, Abraham S, Benson AA (1977) Lipogenesis in the intact coral *Pocillopora capitata* and its isolated zooxanthellae: Evidence for a light-driven carbon cycle between symbiont and host. Mar Biol 44:235-247

Quin LD (1964) 2-aminoethylphosphonic acid in insoluble protein of the sea anemone *Metridium dianthus*. Science 144:1133-1134

Quin LD, Quin GS (2001) Screening for carbon-bound phosphorus in marine animals by high-resolution ^{31}P-NMR spectroscopy: coastal and hydrothermal vent invertebrates Comp Biochem Physiol B Comp Biochem 128:173-185

Quinn JP, Kulakova AN, Cooley NA, McGrath JW (2007) New ways to break an old bond: the bacterial carbon–phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling. Environmental Microbiology 9:2392-2400

Rands ML, Douglas AE, Loughman BC, Ratcliffe RG (1992) Avoidance of hypoxia in a Cnidarian symbiosis by algal photosynthetic oxygen. Biol Bull 182:159-162

Raven JA (1974) Phosphate transport in *Hydrodictyon africanum*. New Phytol 73:421-432

Reed RH, Collins JC, Russell G (1981) The effects of salinity upon ion content and ion transport of the marine red alga *Porphyra purpurea* (Roth) C. Ag. J Exp Bot 32:347-367

Rosenberg H (1973) Phosphonolipids. In: Ansell GB, Hawthorne JN, Dawson RMC (eds) Form and function of phospholipids. Elsevier, New York, USA, pp333–344

Santos SR, Taylor DJ, Coffroth MA (2001) Genetic comparisons of freshly isolated versus cultured symbiotic dinoflagellates: Implications for extrapolating to the intact symbiosis. J Phycol 37:900-912

Sianoudis J, Mayer A, Leibfritz D (1984) Investigation of intracellular phosphate pools of the green alga *Chlorella* using ^{31}P nuclear magnetic resonance. Organic Magnetic Resonance 22:364-368

Snidvongs A, Kinzie RA (1994) Effects of nitrogen and phosphorus enrichment on in vivo symbiotic zooxanthellae *Pocillopora damicornis.* Mar Biol 118:705-711

Sorokin YI (1992) Phosphorus metabolism in coral reef communities: exchange between the water column and bottom biotopes. Hydrobiologia 242:105-114

Stambler N, Popper N, Dubinsky Z, Stimson J (1991) Effect of nutrient enrichment and water motion on the coral *Pocillopora damicornis*. Pac Sci 45:299-307

Steen RG (1986a) Evidence for heterothophy by zooxanthellae in symbiosis with *Aiptasia Pulchella*. Biol Bull 170:267-278

Steen RG (1986b) Impact of symbiotic algae on sea anemone metabolism: analysis by in vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. The Journal of Experimental Zoology 240:315-325

Steen RG (1987) Evidence for facultative heterotrophy in cultured zooxanthellae. Mar Biol 95:15-23

Steven ADL, Broadbent AD (1997) Growth and metabolic responses of *Acropora Palifera* to long term nutrient enrichment. Proc 8th Int Coral Reef Sym 1:867-872

Szmant AM (2002) Nutrient enrichment on coral reefs: Is it a major cause of coral reef decline? Estuaries 25:743-766

Tjeerdema RS (2008) Application of NMR-based techniques in aquatic toxicology: Brief examples. Mar Pollut Bull 57:275-279

Treignier C, Grover R, Ferrier-Pagès C (2008) Effect of light and feeding on the fatty acid and sterol composition of zooxanthellae and host tissue isolated from the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*. Limnol Oceanogr 53:2702-2710

Tytler EM, Spencer Davies P (1983) A method of isolating clean and viable zooxanthellae by density gradient centrifugation. Limnol Oceanogr 28:1266-1268

Venn A, Tambutté E, Lotto S, Zoccola D, Allemand D, Tambutté S (2009) Imaging intracellular pH in a reef coral and symbiotic anemone. PNAS 106:16574-16579

Venn AA, Loram JE, Douglas AE (2008) Photosynthetic symbioses in animals. J Exp Bot 59:1069-1080

Viant MR, Pincetich CA, Walton JH, Tjeerdema RS, Hinton DE (2002) Utilizing in vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy to study sublethal stress in aquatic organisms. Mar Environ Res 54:553-557

Watanabe M, Kohata K, Kunugi M (1987) ^{31}P nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Hada) hada (Raphidophyceae). J Phycol 23:54-62

Wijgerde T, Diantari R, Lewaru MW, Verreth JAJ, Osinga R (2011) Extracoelenteric zooplankton feeding is a key mechanism of nutrient acquisition for the scleractinian coral Galaxea fascicularis. The Journal of Experimental Biology 214:3351-3357

Chapter 5

Fate of phosphorus within the symbiosis

Abstract

If the majority of atolls and barrier reefs are thriving in nutrient poor waters (oligotrophic reefs), more and more fringing and barrier reefs, situated in densely populated coastal areas, are confronted to increasing nutrient concentrations (eutrophic reefs). Phosphate concentrations as high as 0.5 µmol L^{-1} were observed in such reefs. Even if phosphorus is often considered as limiting for coral growth, eutrophication does not necessarily have a positive impact on corals at the reef scale. Indeed, pollution generally affects community equilibrium in reefs, usually to the detriment of corals. Yet, at the physiological scale of individual corals, the consequences of phosphorus eutrophication are still debated and rather poorly understood. Therefore, an experiment of long-term phosphate enrichment was performed in this work to complement data on the impacts of phosphorus on coral physiology and stoichiometry, to determine the accumulation sites of phosphorus within the symbiosis, and to assess a possible limitation by phosphorus of coral growth and/or metabolism. Results obtained in the present study showed that DIP enrichment mainly impacted the symbionts. Their C:P and N:P ratios decreased, as well as their chlorophyll content, while their carbon, nitrogen, and particularly phosphorus content increased, as well as their specific growth rate and photosynthetic efficiency. The skeleton was impacted by DIP too, as its specific growth rate and phosphorus content both increased. Conversely, few changes were observed in the animal host. Overall, these results showed that zooxanthellae and the skeleton are the two sites were phosphorus may accumulate within the symbiosis. Additionally, these results suggest that the energetic metabolism of zooxanthellae is phosphorus-limited, while their growth is co-limited by phosphorus and nitrogen.

Chapitre 5

Devenir du phosphore absorbé au sein de la symbiose

Résumé

Si la majorité des atolls et récifs barrières se développent dans des eaux pauvres en nutriments (récifs oligotrophes), certains récifs frangeants et barrières situés dans des zones côtières fortement urbanisées se trouvent quant à eux de plus en plus confrontés à une eutrophisation (fortes concentrations en nutriments dans l'eau, pouvant aller jusqu'à 0,5 µmol L^{-1} pour le PID). Bien que le phosphore soit généralement considéré comme limitant pour la croissance des coraux, l'eutrophisation a quant à elle souvent des conséquences négatives pour les récifs. En effet, la pollution déstabilise généralement l'équilibre entre les diverses communautés du récif, au détriment des coraux. Néanmoins, à l'échelle de la physiologie du seul corail, les conséquences d'une eutrophisation au phosphore sont bien moins connues et plus controversées. Une expérience d'enrichissement en PID sur le long terme a donc été menée afin de compléter les données existantes à propos des effets du phosphore sur la physiologie et la stœchiométrie de la symbiose, de déterminer les sites d'accumulation du PID absorbé dans la symbiose, et d'évaluer la limitation par le phosphore du métabolisme et de la croissance des coraux. Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement en PID a surtout affecté les symbiotes, en entraînant d'une part une diminution de leurs rapports C:P et N:P et de leur contenu en chlorophylles, et d'autre part une augmentation de leur taux de croissance spécifique, de leur efficacité photosynthétique, et de leur contenu en carbone, en azote, et surtout en phosphore. Le squelette a également été affecté par le PID, avec une augmentation du taux de croissance squelettique spécifique et du contenu en phosphore. À l'inverse, peu de changements ont été observés dans les tissus de l'hôte. Ces résultats montrent que les symbiotes et le squelette sont les deux sites où le phosphore peut s'accumuler dans la symbiose. Ils indiquent également que le métabolisme énergétique des zooxanthelles est limité par le phosphore, tandis que leur croissance est limitée à la fois par le phosphore et l'azote.

Figure 28 | Dispositif expérimental d'enrichissement en phosphate

La photographie représente le dispositif expérimental utilisé pour enrichir des boutures du corail *S. pistillata* durant 4 à 15 semaines avec 0, 0,5 ou 2,5 µmol L^{-1} de phosphate. Six aquariums de 30 L sont visibles, avec des boutures de *S. pistillata* suspendues sur fil. Les pompes grises visibles au premier plan dans les aquariums permettent un léger brassage de l'eau, et les boitiers verts pendus au mur permettent de réguler la température de l'eau. Les tuyaux noirs ou jaunes, descendant du plafond ou longeant le haut des aquariums, permettent une alimentation continue en eau de mer (avec ou sans enrichissement en PID). Ils sont reliés à deux pompes péristaltiques (situés à droite de la photographie, mais hors champ). Le grillage gris visible en haut de la photographie, situé sous les lampes HQI, permet d'ajuster l'intensité lumineuse, ici à 150 µmol m^{-2} s^{-1}. Enfin, comme l'indique le panonceau, les coraux n'ont pas été nourris durant la durée de l'expérience, afin de maîtriser l'enrichissement en phosphore réalisé.

1 L'eutrophisation des récifs

Après avoir examiné l'absorption du PID et du POD par les coraux, ainsi que la nature des molécules phosphorées constitutives de la symbiose, ce chapitre aborde la problématique de l'influence des concentrations élevées de phosphore sur la physiologie de la symbiose, un aspect encore relativement méconnu du métabolisme des nutriments chez les coraux. L'hypothèse de la limitation par le phosphore ayant constitué le fil conducteur de l'ensemble des expériences de cette thèse, enrichir des coraux avec des concentrations élevées de phosphore a constitué un moyen privilégié de la valider. De plus, les expériences menées dans ce chapitre ont été une nouvelle occasion d'aborder la problématique du changement global dû aux activités anthropiques sur les coraux, sous l'angle de la pollution des récifs.

Point trop n'en faut

En effet, si la majorité des atolls et des récifs barrière (page 33) se développent dans des eaux relativement pauvres en éléments nutritifs (dites oligotrophes), ce n'est pas le cas de tout les récifs. Certains récifs frangeants et barrières, situés dans des zones côtières fortement urbanisées, se trouvent quant à eux de plus en plus confrontés à des concentrations élevées de nutriments (on parle dans ces cas là de récifs eutrophes). Une forte augmentation des concentrations en sels nutritifs a, par exemple, été observée sur certains récifs australiens, avec des concentrations de phosphate supérieures à 0,5 µmol L^{-1} et d'azote inorganique supérieures à 2 µmol L^{-1} (Johannes et al., 1979; Crossland et Barnes, 1983; Maragos et al., 1985; Tomascik et Sander, 1985)[53].

Si un nutriment tel que le phosphore est parfois considéré comme limitant pour les coraux (D'Elia, 1977; Jackson et al., 1989; Jackson et Yellowlees, 1990; Annis et Cook, 2002), on pourrait alors s'attendre à ce qu'une augmentation des niveaux de PID leur soit favorable ? Pourtant, sur le terrain, une telle eutrophisation d'un récif se traduit généralement par une modification profonde de l'équilibre entre les diverses communautés habitant le récif, bien souvent au détriment des coraux eux-mêmes (Tomascik et Sander, 1985; Bell et Tomascik, 1993; McCook, 1999). La raison de ce paradoxe tient au fait que les coraux ne sont pas les seuls organismes à pouvoir potentiellement profiter de l'augmentation du PID dans les récifs, et que, bien souvent, ils se révèlent ne pas être les plus compétitifs pour son absorption et son utilisation à de fortes concentrations. Ainsi, plusieurs récifs, dominés par les coraux à des niveaux de nutriments faibles, sont passés à une prépondérance des algues benthiques sous l'effet de l'eutrophisation (McCook, 1999; Smith *et al.*, 2001; Bellwood *et al.*, 2004).

Des effets physiologiques méconnus

Malgré cela, l'étude expérimentale de l'impact du phosphore sur la physiologie des coraux seuls, en l'absence d'algues ben-

[53] On rappelle que **les concentrations sur un récif oligotrophe** sont typiquement bien inférieures à 0,50 µmol L^{-1} pour le PID et le nitrate, et à 0,20 µmol L^{-1} pour l'ammonium.

thiques ou d'autres organismes du récif, n'est pour autant pas dénuée d'intérêt. Elle permet en effet d'en apprendre plus sur l'impact direct de ce nutriment sur les coraux, ainsi que sur le devenir du PID absorbé dans la symbiose. D'après le contexte exposé dans les paragraphes précédents, on peut s'attendre à ce qu'un enrichissement en phosphore, qui ne semble pas favoriser la croissance des coraux, en tout cas par rapport à celle des algues benthiques, ait carrément un effet négatif sur la physiologie des coraux. Mais qu'en est-il vraiment ?

Comme présenté dans le chapitre 1 (page 62), il apparaît que la plupart des études sur les effets d'une eutrophisation en milieu contrôlé (uniquement en présence de coraux) se sont concentrées sur l'azote, seul ou combiné au phosphore. Le PID a ainsi rarement été étudié seul, peu de paramètres physiologiques (calcification, photosynthèse, biomasse, respiration,...) ont généralement été examinés, et les études existantes rapportent des résultats contradictoires pour certains de ces paramètres, selon la concentration de PID utilisée, l'espèce de corail étudiée, et les techniques utilisées (article 6, tableau 1). Les données de la littérature ne permettent donc pas de conclure quant à la question des bénéfices ou des effets délétères sur la biologie des coraux d'un point de vue purement physiologique, c.à.d. indépendamment des effets sur les autres organismes.

Dispositif expérimental choisi

Une expérience d'enrichissement en PID sur le long terme (4 à 15 semaines) a donc été mise en place en utilisant une seule et même espèce de corail, cultivée dans des conditions contrôlées, et pour laquelle de nombreux paramètres physiologiques ont été mesurés au cours du temps. Des boutures du corail *S. pistillata* ont ainsi été enrichies de manière continue avec du KH_2PO_4 (PID à 0,5 et 2,5 µmol L^{-1}). Un traitement contrôle sans enrichissement a également été mis en place. Les aquariums ont été alimentés en continu par de l'eau de mer pauvre en nutriments (phosphate < 0,05 µmol l^{-1}, ammonium < 0,5 µmol l^{-1}, et nitrate < 0,4 µmol l^{-1}) ainsi que par du KH_2PO_4 en solution, à l'aide de deux pompes péristaltiques puisant dans des cuves tampons maintenues à l'obscurité (concentration en PID de 0, 2 et 10 µmol L^{-1} respectivement ; figure 28). Afin de bien maîtriser l'enrichissement en phosphate réalisé, les coraux n'étaient pas nourris durant toute la durée de l'expérience. Le reste des conditions (température, salinité, éclairement,... est tel que décrit dans le chapitre 1 (page 64) et l'article 6.

L'enrichissement à 0,5 µmol L^{-1} a été choisi pour s'intéresser aux effets d'une eutrophisation plausible en milieu récifal, tandis que l'enrichissement à 2,5 µmol L^{-1} a permis d'étudier les effets potentiels du PID sur la physiologie des coraux, en dehors de tout contexte environnemental. Les paramètres suivis au cours du temps sont détaillés dans le tableau 5.

2 Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude

Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer la limitation par le phosphore de la croissance, de la productivité primaire et du métabolisme des coraux ; d'enrichir les données existantes concernant les effets du phosphore sur la physiologie de la sym-

biose, notamment au niveau de la photosynthèse, de la calcification et de la composition élémentaire ; et enfin de déterminer les sites d'accumulation du PID absorbé, parmi les différents compartiments de la symbiose (tissus animaux, zooxanthelles et squelette), et d'établir un bilan chiffré du devenir du phosphore dans la symbiose.

Paramètres	Suivi temporel
Paramètres physiologiques	
Chlorophylles Protéines Respiration Photosynthèse	4 et 7 semaines
Efficacité photosynthétique Taux de croissance spécifique des symbiotes	7 semaines
Surface du squelette	0, 4 et 7 semaines
Taux de croissance squelettique spécifique	0, 1, 2, 4, 6 et 8 semaines
Stœchiométrie	
Contenu en carbone, azote, phosphore de l'hôte et des symbiotes Rapport C:N:P	11 semaines
Contenu en ^{26}Mg, ^{31}P, ^{43}Ca et ^{84}Sr du squelette Rapports Mg:Ca, P:Ca et Sr:Ca	11 semaines
Bioérosion	
Distribution des endolithes Abondance des endolithes	15 semaines

Tableau 5 | Suivi des paramètres au cours du temps lors de l'enrichissement en PID

Les techniques employées pour les mesures physiologiques sont référencées et brièvement décrites dans le chapitre 1 et dans l'article 6. Pour les mesures stœchiométriques, les techniques sont décrites en détail dans l'article 6. Enfin, les mesures de bioérosion effectuées après 15 semaines sont entièrement décrites dans l'annexe B et dans l'article 7. Les termes bioérosion et endolithes y sont définis.

Cette expérience a ainsi permis de compléter les données des précédents chapitres quant aux outils utiles pour l'étude de la limitation en phosphore ou en azote.

Ces travaux se basent sur les hypothèses suivantes. 1) Un enrichissement en PID ne devrait pas avoir d'effet positif sur la biomasse et le taux de croissance des zooxanthelles, si elles ne sont pas limitées[54] par le phosphore pour leur croissance. 2) Comme l'on s'attend à ce que le phosphore soit plutôt limitant pour le métabolisme énergétique, un enrichissement en PID devrait augmenter la photosynthèse des zooxanthelles. 3) Si un effet bénéfique substantiel est effectivement observé sur la photosynthèse, cela devrait se traduire par une augmentation de la calcification, en vertu du lien étroit entre calcification et photosynthèse chez les coraux (Goreau, 1959; Barnes et Chalker, 1990; Mass *et al.*, 2007). Cependant, il a également été démontré que le PID peut agir comme un poison lors de la cristallisation de l'aragonite, en remplaçant certaines molécules de carbonate. Ce phénomène déforme le réseau de carbonate de calcium et empêche toute cristallisation ultérieure (Simkiss, 1964; Berner *et al.*, 1978; De Kanel et Morse, 1978; Walter, 1986; Burton et Walter, 1990). Bien que l'occurrence de cet empoissonnement au niveau du site de calcification des coraux reste encore supposée et non formellement démontrée à ce jour (Simkiss, 1964; Montagna *et al.*, 2006; Mallela *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2012), il est possible qu'un tel mécanisme

[54] On rappelle là aussi que la répartition de l'azote et du phosphore au sein des biomolécules semble en faveur d'une **limitation** de la croissance et de la synthèse protéique par l'azote, et d'une limitation du métabolisme énergétique, par le phosphore.

entraîne plutôt une diminution de la calcification. 4) Enfin, sur la base d'études précédentes sur la stœchiométrie des zooxanthelles (Belda *et al.*, 1993) et du squelette (Montagna *et al.*, 2006; Mallela *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2012), une augmentation du contenu en phosphore dans ces compartiments devrait être observée avec l'enrichissement en PID. Concernant les tissus de l'hôte, aucune étude n'a, à ce jour, indiqué comment la stœchiométrie du corail varie avec le PID ambiant.

Les paragraphes qui suivent résument les principaux résultats obtenus lors de cette thèse et découlant des objectifs et hypothèses exposés dans les paragraphes précédents. Ces résultats ont été publiés dans deux revues à comité de lecture international (article 6, et article 7 de l'annexe B), où ils sont discutés de manière approfondie.

3 Effets sur la physiologie de la symbiose

Les résultats obtenus durant cette thèse ont montré que l'enrichissement en PID n'a pas modifié la densité des zooxanthelles et le contenu en protéines de *S. pistillata*, comme précédemment observé chez ce corail et chez *P. damicornis* (Muscatine *et al.*, 1989; Stambler *et al.*, 1991). Le contenu en chlorophylles a quant à lui diminué avec le PID (article 6, figure 1). À l'inverse, le taux de croissance squelettique spécifique[55] et la surface du squelette des coraux ont augmenté en 7 à 8 semaines d'enrichissement. Le taux de croissance spécifique des zooxanthelles[56] a quant à lui suivi l'augmentation des taux de croissance du squelette (article 6, figure 2), mais cette croissance des zooxanthelles s'est faite à densité de symbiotes constante, comme le démontre l'absence d'évolution du contenu en zooxanthelles des coraux (article 6, figure 1).

Étant donné que l'enrichissement en PID a entraîné une diminution du contenu en chlorophylles par zooxanthelle, une augmentation des taux de respiration et de photosynthèse normalisés par chlorophylles a été constatée (article 6, figure 1). Bien que cet effet n'ait pas été observé avec les autres normalisations (par protéines et par surface), l'efficacité photosynthétique du PSII a cependant augmenté (article 6, figure 1). Ces résultats suggèrent que le phosphore est effectivement un facteur limitant pour le métabolisme énergétique (photosynthèse) des symbiotes. Ils pourraient également permettre d'expliquer la diminution du contenu en chlorophylles des zooxanthelles, une diminution n'ayant pas été observée lors de précédentes études sur les coraux (article 6, tableau 1; Muscatine *et al.*, 1989; Stambler *et al.*, 1991; Snidvongs et Kinzie, 1994; Steven et Broadbent, 1997; Koop *et al.*, 2001).

[55] Le **taux de croissance squelettique spécifique** est défini comme la pente décrivant l'évolution au cours du temps du logarithme népérien du poids du squelette. Il s'exprime en j^{-1} (lorsque le temps est exprimé en jours).

[56] Le **taux de croissance spécifique des zooxanthelles** (noté μ) décrit l'évolution du nombre de zooxanthelles (noté Z) au cours du temps (noté t). Il est défini comme : $\mu = \frac{1}{Z}\frac{dZ}{dt}$. Il s'exprime également en j^{-1} (avec le temps exprimé en jours).

4 Effets sur la stœchiométrie de la symbiose

Concernant la stœchiométrie de la symbiose, les résultats obtenus durant cette thèse ont montré que l'enrichissement en PID ne modifie ni le contenu en carbone, en azote et en phosphore de l'hôte ni son rapport C:N:P après 11 semaines (article 6, tableaux 2 et 4). Par contre, l'enrichissement a entraîné une augmentation du contenu en carbone, en azote et en phosphore des zooxanthelles, ainsi qu'une diminution de leurs rapports C:P et N:P (article 6, figure 3 et tableaux 2 et 4). Dans chacun des traitements, des rapports C:P (> 400) et N:P (> 50) bien supérieurs aux rapports de Redfield (106 et 16) ont été mesurés. Ce résultat, semblable a ce qui a été observé chez le bénitier géant (Belda *et al.*, 1993), suggère lui aussi une limitation par le phosphore des zooxanthelles.

Dans le squelette, l'enrichissement en PID a entraîné une accumulation de phosphore, une augmentation du rapport P:Ca et du rapport Mg:Ca, ainsi qu'une diminution du rapport Sr:Ca (article 6, figure 2). Ces résultats confirment que le phosphore peut s'accumuler dans le squelette de coraux tropicaux selon sa concentration dans l'eau de mer (Montagna *et al.*, 2006; LaVigne *et al.*, 2008; Mallela *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2012). L'augmentation concomitante du taux de croissance squelettique spécifique suggère que, aux concentrations utilisées, le PID n'a pas agi en tant que poison pour la calcification chez *S. pistillata*.

L'ensemble des résultats de stœchiométrie obtenus durant cette étude ont été utilisés pour construire un bilan chiffré des sites d'accumulation du PID absorbé dans la symbiose. La composition élémentaire des cellules animales n'a pas été modifiée, tandis que les zooxanthelles et le squelette se sont enrichis en phosphore, respectivement de 82% et de 50% (entre le contrôle et le traitement à 2,5 µmol L^{-1} ; article 6, figure 4). Ces deux compartiments représentent donc les sites d'accumulation de phosphore dans la symbiose.

5 Schéma bilan

La figure 29 présente un bilan des résultats obtenus dans ce chapitre et dans l'annexe B.

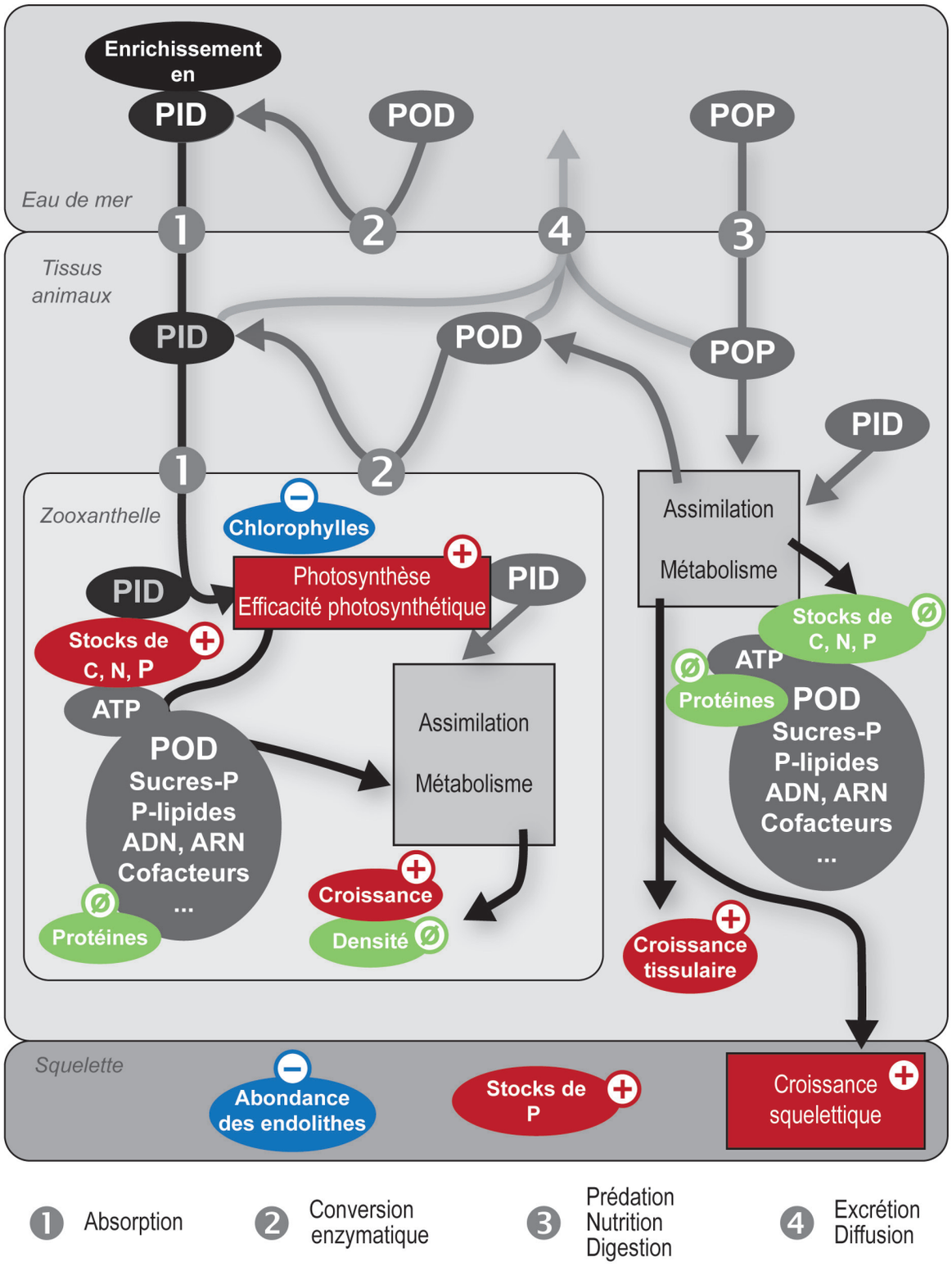


Figure 29 | Bilan de l'effet d'un enrichissement en PID sur la symbiose
Les résultats acquis dans le chapitre 5 sont résumés en couleur, sur la base de la Figure 13 (passée en tons de gris pour plus de lisibilité). Vert : paramètre sur lequel l'enrichissement en PID n'a pas eu d'effet. Rouge : paramètre sur lequel l'enrichissement en PID a eu un effet positif. Bleu : paramètre sur lequel l'enrichissement en PID a eu un effet négatif. Noir : voies métaboliques considérées.

6

Article 6
Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral *Stylophora pistillata* Esper 1797 under phosphate enrichment

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology | 2011

Résumé

Des enrichissements en phosphate à long terme (0, 0,5 et 2,5 µmol L^{-1} ; 4 à 11 semaines) ont permis d'évaluer la limitation en phosphore supposée des zooxanthelles, ainsi que d'accroître les données sur les effets d'un enrichissement en phosphate sur la calcification et la composition élémentaire des tissus du corail scléractiniaire *Stylophora pistillata*. L'ajout de phosphate a principalement affecté les zooxanthelles. En effet, dans l'enrichissement à 2,5 µmol L^{-1} de phosphate, l'efficacité photosynthétique des zooxanthelles a augmenté, leur contenu en carbone et en azote ont augmenté de 70%, leur contenu en phosphore de 190%, et leur taux de croissance spécifique de 18%. Des rapports C:P et N:P largement supérieurs aux rapports de Redfield – rapports supposés comme représentatifs de niveaux optimaux de nutriments – ont été mesurés pour les zooxanthelles, et ont diminué avec l'enrichissement en phosphate. L'ensemble de ces résultats suggère que le phosphore est limitant pour la croissance des zooxanthelles *in hospite*. Cependant, l'augmentation du taux de croissance spécifique des zooxanthelles n'a pas entraîné d'augmentation significative de leur densité, étant donné que la croissance des zooxanthelles a uniquement suivi l'augmentation du taux de croissance squelettique de l'hôte pour les coraux enrichis en phosphate. Les bénéfices obtenus par la présence de phosphate dans le milieu n'ont donc pas suffi pour augmenter la densité des symbiotes et pour permettre leur croissance optimale (i.e. équilibrée en nutriments). Cela suggère que la croissance des zooxanthelles s'est probablement trouvée limitée par un nutriment supplémentaire, probablement l'azote. Concernant les effets du phosphate sur l'hôte, aucune modification de la composition élémentaire ou de la concentration en protéines n'a été observée. Cependant, le taux de croissance squelettique de l'hôte a augmenté de 31% pour les coraux enrichis avec 2,5 µmol L^{-1} de phosphate par rapport aux coraux non enrichis. Les coraux enrichis en phosphate ont également incorporé 1,7 fois plus de phosphore dans leur squelette que les coraux non enrichis. Ces résultats ont mis en évidence le fait que les zooxanthelles et le squelette sont les deux sites d'accumulation du phosphore inorganique dans la symbiose.

Erratum : l'autorité taxonomique ayant décrit l'espèce *S. pistillata* devrait se trouver entre parenthèses dans le titre de l'article.

Article 6

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 409 (2011) 200–207

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jembe

Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral *Stylophora pistillata* Esper 1797 under phosphate enrichment

C. Godinot [a,*], C. Ferrier-Pagès [a], P. Montagna [b,c,d], R. Grover [a]

[a] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000, Monaco
[b] Lamont-Doherty Earth Observatory, 237 Comer, 61 Route 9W – PO Box 1000, Palisades, NY, United States
[c] Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, Av. de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France
[d] Istituto di Scienze Marine (ISMAR), CNR, Via Gobetti 101, 40129 Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 May 2011
Received in revised form 22 August 2011
Accepted 23 August 2011
Available online 16 September 2011

Keywords:
Calcification
Coral
Eutrophication
Limitation
Phosphate
Zooxanthellae

ABSTRACT

Long-term phosphate enrichments (0, 0.5, and 2.5 μmol L^{-1}; 4 to 11 weeks) were used to assess a possible limitation in phosphorus of zooxanthellae and to complement data on the effect of phosphate enrichment on calcification and elemental composition of the tissue in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Phosphate addition mainly affected the coral symbionts. Indeed, at 2.5 μmol L^{-1} P-enriched, zooxanthellae had a greater photosynthetic efficiency, their intracellular carbon and nitrogen contents increased by 70% and their phosphorus content by 190%, while their specific growth rate increased by 18%. C:P and N:P ratios in zooxanthellae were much higher than the Redfield ratios advocated for nutrient-repleted phytoplankton, and decreased with phosphate enrichment. Collectively, these results suggest a phosphorus limitation of the zooxanthellae growth *in hospite*. However, the increase in zooxanthellae specific growth rate did not lead to the building of a higher symbiont density, as zooxanthellae growth just matched the tissue and skeletal growth of the enriched corals. Benefits of phosphate supplementation were thus not substantial enough to lead to the building of higher zooxanthellae density and to their balanced growth, which suggests that symbiont growth was likely limited by another nutrient as well, probably nitrogen. At the host level, there were no changes in the elemental composition or in the protein levels, while skeletal growth rate increased by 31% between unenriched and 2.5 μmol L^{-1} P-enriched corals. Phosphate-enriched corals also incorporated 1.7 times more phosphorus into their skeleton than did unenriched corals. These results evidenced that zooxanthellae and the skeleton are the two accumulation sites of inorganic phosphorus within the symbiotic association.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coral reefs generally develop in clear, oligotrophic waters, where nutrient, and especially phosphorus levels are among the lowest in the world (Furnas, 1991; Szmant, 2002). Phosphorus is however an essential nutrient because it enters into the composition of many biological molecules (deoxyribonucleic and ribonucleic acids, phospholipids), including adenosine triphosphate (ATP), which has a major role as energy supplier. Hence, around most atolls and barrier reefs, its low availability may limit coral calcification and photosynthesis (Annis and Cook, 2002; D'Elia, 1977; Jackson and Yellowlees, 1990), and phosphorus is therefore taken up by corals at a relatively fast rate (D'Elia, 1977; Godinot et al., 2009; Sorokin, 1992). Conversely, many coastal reefs are subject to increased phosphorus levels, due to continuous nutrient release from sewage discharges, rainfall, rivers and ground waters. Seawater eutrophication was shown to strongly affect the community equilibrium, usually to the detriment of corals (Bell and Tomascik, 1993; McCook, 1999; Tomascik and Sander, 1985), which are often replaced by benthic algae (Bellwood et al., 2004; McCook, 1999; Smith et al., 2001).

Due to the important role of phosphorus in reef ecosystems, both under oligotrophic and eutrophic conditions, it is essential to understand the effect of phosphate enrichment on the coral-zooxanthellae symbiosis, as well as the fate of phosphorus in this association. Previous work on the subject has mainly focused on the effect of nitrogen enrichment, alone or in combination with phosphorus, on coral physiology (more than twenty studies, from Kinsey and Davies, 1979; Koop et al., 2001; Kumarsingh et al., 1998; LaVigne et al., 2008, 2010; Mason et al., 2007; McCook, 1999; Miller and Yellowlees, 1989; Murphy and Riley, 1962; Muscatine et al., 1989; Rasmussen, 1988; Rasmussen and Cuff, 1990; Redfield, 1934; Rees, 1991; Renegar and Riegl, 2005; Reynaud et al., 2007; Rodolfo-Metalpa et al., 2010; Smith et al., 2001; Snidvongs and Kinzie, 1994; Sorokin, 1992; Stambler et al., 1991; Steven and Broadbent, 1997; Stimson and Kinzie, 1991; Szmant, 2002; Tambutté et al., 1995; Tanaka et al.,

* Corresponding author. Tel.: +377 92 16 79 82; fax: +377 92 16 79 81.
E-mail addresses: cgodinot@centrescientifique.mc (C. Godinot), ferrier@centrescientifique.mc (C. Ferrier-Pagès), p.montagna@icram.org (P. Montagna), grover@centrescientifique.mc (R. Grover).

0022-0981/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi: 10.1016/j.jembe.2011.08.022

Article 6

6

Article 6
Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral *Stylophora pistillata* Esper 1797 under phosphate enrichment

C. Godinot[1,2], C. Ferrier-Pagès[1], P. Montagna[3,4,5], and R. Grover[1]

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology | 2011

Abstract

Long-term phosphate enrichments (0, 0.5, and 2.5 µmol L^{-1}; 4 to 11 weeks) were used to assess a possible limitation in phosphorus of zooxanthellae and to complement data on the effect of phosphate enrichment on calcification and elemental composition of the tissue in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Phosphate addition mainly affected the coral symbionts. Indeed, at 2.5 µmol L^{-1} P-enriched, zooxanthellae had a greater photosynthetic efficiency, their intracellular carbon and nitrogen contents increased by 70% and their phosphorus content by 190%, while their specific growth rate increased by 18%. C:P and N:P ratios in zooxanthellae were much higher than the Redfield ratios advocated for nutrient-repleted phytoplankton, and decreased with phosphate enrichment. Collectively, these results suggest a phosphorus limitation of the zooxanthellae growth in hospite. However, the increase in zooxanthellae specific growth rate did not lead to the building of a higher symbiont density, as zooxanthellae growth just matched the tissue and skeletal growth of the enriched corals. Benefits of phosphate supplementation were thus not substantial enough to lead to the building of higher zooxanthellae density and to their balanced growth, which suggests that symbiont growth was likely limited by another nutrient as well, probably nitrogen. At the host level, there were no changes in the elemental composition or in the protein levels, while skeletal growth rate increased by 31% between unenriched and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals. Phosphate-enriched corals also incorporated 1.7 times more phosphorus into their skeleton than did unenriched corals. These results evidenced that zooxanthellae and the skeleton are the two accumulation sites of inorganic phosphorus within the symbiotic association.

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc
[3] Lamont-Doherty Earth Observatory, 237 Comer, 61 Route 9W – PO Box 1000, Palisades, NY, United States
[4] Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, Av. de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France
[5] Istituto di Scienze Marine (ISMAR), CNR, Via Gobetti 101, 40129 Bologna, Italy

Introduction

Coral reefs generally develop in clear, oligotrophic waters, where nutrient, and especially phosphorus levels are among the lowest in the world (Furnas, 1991; Szmant, 2002). Phosphorus is however an essential nutrient because it enters into the composition of many biological molecules (deoxyribonucleic and ribonucleic acids, phospholipids), including adenosine triphosphate (ATP), which has a major role as energy supplier. Hence, around most atolls and barrier reefs, its low availability may limit coral calcification and photosynthesis (Annis and Cook, 2002; D'Elia, 1977; Jackson and Yellowlees, 1990), and phosphorus is therefore taken up by corals at a relatively fast rate (D'Elia, 1977; Godinot et al., 2009; Sorokin, 1992). Conversely, many coastal reefs are subject to increased phosphorus levels, due to continuous nutrient release from sewage discharges, rainfall, rivers and ground waters. Seawater eutrophication was shown to strongly affect the community equilibrium, usually to the detriment of corals (Bell and Tomascik, 1993; McCook, 1999; Tomascik and Sander, 1985), which are often replaced by benthic algae (Bellwood et al., 2004; McCook, 1999; Smith et al., 2001).

Due to the important role of phosphorus in reef ecosystems, both under oligotrophic and eutrophic conditions, it is essential to understand the effect of phosphate enrichment on the coral-zooxanthellae symbiosis, as well as the fate of phosphorus in this association. Previous work on the subject has mainly focused on the effect of nitrogen enrichment, alone or in combination with phosphorus, on coral physiology (more than twenty studies, from Kinsey and Davies, 1979; Koop et al., 2001; Kumarsingh et al., 1998; LaVigne et al., 2008, 2010; Mason et al., 2007; McCook, 1999; Miller and Yellowlees, 1989; Murphy and Riley, 1962; Muscatine et al., 1989; Rasmussen, 1988; Rasmussen and Cuff, 1990; Redfield, 1934; Rees, 1991; Renegar and Riegl, 2005; Reynaud et al., 2007; Rodolfo-Metalpa et al., 2010; Smith et al., 2001; Snidvongs and Kinzie, 1994; Sorokin, 1992; Stambler et al., 1991; Steven and Broadbent, 1997; Stimson and Kinzie, 1991; Szmant, 2002; Tambutté et al., 1995; Tanaka et al.,

2007). However, the effect of phosphorus enrichment alone on coral physiology has not been extensively investigated (Table 1), mainly because physiological parameters studied are scattered among different works, coral species and conditions. Moreover, studies have reported conflicting results, difficult to interpret because each parameter has been considered separately from the others. Concerning calcification for example, phosphate enrichment was found to decrease it (Ferrier-Pagès et al., 2000; Koop et al., 2001; Rasmussen and Cuff, 1990; Renegar and Riegl, 2005), increase it (Koop et al., 2001; Rasmussen and Cuff, 1990; Steven and Broadbent, 1997), or have no effect (Koop et al., 2001; Stambler et al., 1991) depending on the enrichment, the species, and the technique used for calcification measurement. The same is true for the C:P ratios of the tissue, although results come from only three studies (Table 2): while Belda et al. (1993)

Article 6

Species	Experimental design		Parameters measured and effect of P								References
	In situ or laboratory	Phosphate enrichment (in μmol L^{-1})	Prot	Zoox	Chl	Growth	Photo-synthesis	Respi-ration	Elemental ratios of tissues	Others	
Acropora longicyathus	ENCORE reef experiment	4			+	+ / 0					Bucher and Harrison (2000)
Stylophora pistillata	Laboratory enrichments	2.8				-	+				Ferrier-Pagès et al. (2000)
Acropora longicyathus, Acropora palifera, Acropora aspera, Pocillopora damicornis, Stylophora pistillata	ENCORE reef experiment	2.5 – 5.1		+ / 0	0	+ / 0 / -	+	+		+ (lipids), + / 0 / - (reproduction), + (NH_4 uptake)	Koop et al. (2001)
Stylophora pistillata	Laboratory enrichments	2	0	0	0				0 (C:N)	- (lipids), 0 (mitotic index)	Muscatine et al. (1989)
Acropora formosa	Laboratory enrichments	1,2 and 4								- (Sr in skeleton, thinning of skeletal walls, void enlargement)	Rasmussen (1988)
Acropora formosa	Laboratory enrichments	2, 4, and 8				+ / -				- (Sr in skeleton)	Rasmussen and Cuff (1990)
Acropora cervicornis	Laboratory enrichments	2 and 4				-					Renegar and Riegl (2005)
Pocillopora damicornis	Laboratory enrichments	1 and 2			0				+ (C:P)		Snidvongs and Kinzie (1994)
Pocillopora damicornis	Laboratory enrichments	0.5 and 2	0	0	0	0			+ (C:P)		Stambler et al. (1991)
Acropora palifera	ENCORE reef experiment	4		+	0	+					Steven and Broadbent (1997)
Stylophora pistillata	Laboratory enrichments	0.5 and 2.5	0	0	-	+	+	+	- (N:P)	+ (P/Ca), + (Mg/Ca), - (Sr/Ca) in skeleton	This study

Table 1 | Summary of coral responses to phosphate in the literature. "+" indicates a positive effect, "–" a negative effect, and "0" an absence of effect.

P enrichment	Whole organism			Animal			Zooxanthellae			Reference / Species
	C:P	N:P	C:N	C:P	N:P	C:N	C:P	N:P	C:N	
Unenriched				433 ± 47	66 ± 6	6.6 ± 0.2	551± 58	87 ± 8	6.3± 1.3	This study
0.5 μmol L^{-1}				417 ± 40	65 ± 6	6.4 ± 0.4	520± 26	73± 17	7.1± 1.7	*Stylophora pistillata*
2.5 μmol L^{-1}				389 ± 73	58± 10	6.8± 0.1	411± 55	56± 7	7.3 ± 1.2	
Unenriched							355			Snidvongs and Kinzie (1994)
1.2 μmol L^{-1}							500			*Pocillopora damicornis*
0.1 μmol L^{-1}	233									Stambler et al. (1991)
0.5 μmol L^{-1}	416									*Pocillopora damicornis*
2.0 μmol L^{-1}	375									
Unenriched				172 ± 35	26.6 ± 4.4	6.4 ± 0.4	365 ± 49	21.4 ± 3.1	19.7 ± 4.0	Muller-Parker et al. (1994) *Pocillopora damicornis*
Unenriched	130	22					279 ± 18	52 ± 1		
2.0 μmol L^{-1}	100	17					256 ± 15	46± 1		Belda et al. (1995)
5.0 μmol L^{-1}	75	13					376± 101	66± 14		*Tridacna gigas*
10.0 μmol L^{-1}	95	16					238± 20	39± 4		

Table 2 | Elemental ratios of C, N, and P in the coral *Stylophora pistillata* exposed to 0, 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} phosphate-enriched seawater for 11 weeks; and summary of data in the literature on C:P and N:P ratios from unenriched and phosphate-enriched corals and clams. Results from the present study are expressed as the mean ± SE of 6 nubbins randomly pooled by groups of two (3 groups per treatment).

reported a decrease in C:P ratios for the giant clam *Tridacna gigas* after a 3-month phosphate enrichment of 2 - 10 µmol L^{-1}, two other studies (Snidvongs and Kinzie, 1994; Stambler et al., 1991) found an increase in C:P ratios in the coral *Pocillopora damicornis* with phosphate enrichments of 0.5 - 2 µmol L^{-1}.

Consequently, the scleractinian coral *Stylophora pistillata* was maintained 4 to 11 weeks under phosphate enrichment to i) assess a possible limitation in phosphorus of zooxanthellae growth and/or coral primary productivity, ii) complement data on the effect of phosphate enrichment on calcification and elemental composition of the tissue; and to iii) determine the accumulation sites of phosphorus within the symbiosis, among animal tissue, zooxanthellae, and skeleton. To our knowledge, the extent of phosphorus accumulation in the skeleton versus external phosphorus enrichment has not yet been experimentally assessed for tropical corals, although they have been reported to concentrate phosphorus relative to calcium in phosphate-rich environments (Dodge et al., 1984; Kumarsingh et al., 1998; LaVigne et al., 2008, 2010). From all the above data, we calculated the percentage of phosphorus accumulation within each compartment (animal, zooxanthellae, skeleton) of phosphate-enriched corals relative to unenriched corals.

Materials and methods

Organisms and culture conditions

Colonies of the zooxanthellate coral *S. pistillata* were obtained from the Red Sea, and maintained in natural seawater under controlled conditions (26°C, salinity of 38) and under an irradiance (photosynthetic active radiation, PAR) of 150 µmol m^{-2} s^{-1},with a 12 h:12 h dark:light cycle. Light was supplied by 400W Hydrargyrum Quartz Iodide lights (HQI), and measured using a spherical quantum sensor (LiCor LI-193). 1.5 months before the experiment, 120 nubbins (i.e. branch tips) were prepared by cutting 12 branches (2.5 ± 1.0 cm long and 0.6 ± 0.3 cm in diameter) of ten parent colonies with pliers (Tambutté et al., 1995). Nubbins were attached to nylon filaments and suspended in aquaria until tissues fully covered the skeleton. They were then randomly assigned to six 30-L aquaria, and allowed to acclimate for a week. Temperature was regulated in each aquarium at 26.0 ± 0.1°C. After the first week of acclimation, two aquaria were randomly assigned to each of the 3 following treatments: 0 (unenriched control), 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} phosphate enriched, considering that P concentration in the natural seawater was almost undetectable during the whole experiment (< 0.05 µmol L^{-1}). The 0.5 µmol L^{-1} enrichment represented a phosphate concentration which has been reported on some reefs under eutrophication (Kinsey and Davies, 1979), whereas the 2.5 µmol L^{-1} enrichment was used to highlight the effect of phosphate on coral physiology. Concentrated stock solutions of phosphate (as KH_2PO_4, 2.0 and 10.0 µmol L^{-1} respectively) were maintained in 2 separate 50-L tanks kept in the dark and were continuously pumped with a peristaltic pump to the enriched tanks. Pre-heated (24 ± 0.2 °C) natural seawater with trace phosphate (< 0.05 µmol L^{-1}), nitrate (< 0.4 µmol L^{-1}), and ammonium (< 0.5 µmol L^{-1}) concentrations was also continuously pumped into the aquaria, in order to obtain

final phosphate concentrations of ca. 0, 0.5, or 2.5 µmol L^{-1}. The seawater flow rate was ca. 1.2 L h^{-1}. Phosphate concentrations were regularly checked in the experimental tanks according to Murphy and Riley

(1962) and did not vary by more than ± 0.05 µmol L^{-1} throughout the experiment. The pH_T was also checked and did not change by more than 0.01. Corals were not fed during the 11 weeks enrichment, in order to control phosphorus levels.

Physiological measurements

Skeletal growth rate was assessed using the buoyant weight technique (Jokiel et al., 1978) on 10 nubbins per treatment (5 nubbins per aquarium) one week prior to the beginning of the experiment, the first day of incubation and after one, two, four, six and eight weeks of incubation. Since nubbins were entirely covered with tissue, no algal growth was possible on the skeleton. Moreover, due to the small tissue thickness and incubation length, increase in tissue weight per cm^2 was negligible, as demonstrated by Davies (1989), so that only skeletal weight was monitored. Specific growth rate (G) was expressed as the slope of the regression line relating the natural logarithm of coral nubbin weight (mg) versus the experimental time (days).

Net photosynthesis (P_n) and respiration (R) were measured after 4 and 7 weeks (T_4 and T_7), on 5 randomly selected nubbins per treatment (modified after Ferrier-Pagès et al., 2000) under dark or light conditions (PAR of 0 and 150 µmol m^{-2} s^{-1}). Data were normalized either to the total chlorophyll content (according to Godinot et al., 2009) or to the surface area of the nubbins (using the wax technique described in Stimson and Kinzie, 1991). Protein content was also determined on the 5 nubbins used for photosynthesis measurements, after extraction in 1 mol L^{-1} NaOH for 30 min at 90 °C (measured using the commercially available BC Assay Interchim kit, according to Hoogenboom et al., 2010). Zooxanthella density was assessed at T_4 and T_7 on 4 additional nubbins for each incubation time and condition as in Godinot et al. (2009). The mean areal zooxanthella density was used to calculate mean photosynthetic and respiration rates per zooxanthella, as well as mean chlorophyll content per zooxanthella. Change in the total number of zooxanthellae between T_4 and T_7 was used to determine the zooxanthellae specific growth rate (µ) in the three P-conditions, using the equation:

$$\mu = \frac{1}{Z}\frac{dZ}{dt}$$

where Z is the number of zooxanthellae cells and t the incubation length (Falkowski et al., 1984, 1993).

In order to examine the photosynthetic efficiency of PSII, the maximum quantum yield of photosystem II (dark F_v/F_m of PSII) was measured at T7 on 5 randomly selected nubbins per treatment using pulse-amplitude-modulated chlorophyll fluorometry (diving PAM, Waltz; method described in Rodolfo-Metalpa et al., 2010).

Changes in tissue and zooxanthellae C:N:P

The total carbon:nitrogen:phosphorus (C:N:P) ratios were also measured, after 11 weeks, in the animal tissue and zooxanthellae of 6 nubbins per treatment.

Coral tissue was separated from the skeleton in 10 mL 2 µm-filtered seawater, using an Air-Pik. Tissues from two coral nubbins were pooled together to improve measurement precision. Therefore, three replicates were obtained by using six nubbins. Tissues were homogenized using a tissue grinder. A 500-µL sample was taken for zooxanthellae counts, and bare skeletons were used for surface area measurements. For each sample, zooxanthellae and animal tissues were separated using three successive centrifugations (1300 g, 25°C, 5 min). The success of the separation was visually checked using an optical microscope. Animal and zooxanthellae samples were each equally divided into two aliquots for the determination of total carbon and nitrogen content on one side and total phosphorus content on the other side. Carbon and nitrogen contents were measured on freeze-dried samples using a CHN elemental analyzer (Flash EA Thermoquest). 4 tubes containing freeze-dried filtered seawater (FSW) served as controls. Aliquots used for phosphorus assays were ashed (2 h, 500°C) in Pyrex containers and subsequently acidified (with hot HCl 0.2 mol L−1; modified after Snidvongs and Kinzie, 1994). Phosphorus was then measured following the technique of Murphy and Riley (1962). Three control bottles containing FSW were also run as a control for seawater phosphorus concentration. Previous testing of this technique yielded a 99.3% recovery rate for both inorganic (KH_2PO_4) and organic (methylumbelliferyl P) phosphorus.

Multiple element/calcium ratios in the skeleton

Analyses of ^{26}Mg, ^{31}P, ^{43}Ca and ^{84}Sr were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using the multicollector Axiom in single collection mode at Lamont-Doherty Earth Observatory, following the standard addition method (Vandecasteele and Block, 1997) to correct for matrix effects. Approximately 50 mg of coral powder was carefully scraped off the outermost portion (2 to 5 mm-thick portion at the tip of apexes) of the coral skeletons from the three 11-week treatments. Three skeletons from each phosphate treatment were pooled together to get one measurable sample. The aragonite powder was soaked in H2O2 (30%, ~8.9 mol L^{-1}) for two days, then placed at 80°C for 30 min, in order to remove any residual organic matter. The samples were subsequently dried in an oven at 50°C for 6 h and dissolved overnight with double distilled 1 mol L^{-1}

HNO_3. Working solutions were further diluted in 0.45 mol L^{-1} HNO_3 (~2%) resulting in a final calcium concentration of ~80 µg mL^{-1}. Procedural blank solutions were made with the same vials and acid used for the treatment of the samples. A multi-elemental stock standard mixture was prepared gravimetrically with 0.45 mol L^{-1} HNO_3 and High-Purity Standards (Charleston, SC), mixed in appropriate concentrations to match the typical composition of coral skeletons. A four point standard curve was prepared by adding increasing volumes of the stock solution to three pre-cleaned vials containing a constant volume of the unknown solution (sample "control") and 0.45 mol L^{-1} HNO_3. A drift correction was performed by analysing an indium-spiked mixed solution every five samples and using a linear interpolation for all the elements. Also all the working solutions were spiked with indium as an internal standard to further correct for the in-

strumental drift. Analytical reproducibility based on the RSD (1σ) of six analyses of the Porites coral standard JCp-1 (Geological Survey of Japan) (run as an unknown) are 0.7% for Mg/Ca, 5% for P/Ca and 0.3% for Sr/Ca ratios, and 6% for P concentration.

Statistical analyses

Differences among replicated tanks were tested using *t* tests on skeletal growth rate measurements. No significant differences were found at any of the sampling dates (*t* tests, all $p > 0.05$), thus corals were pooled together for other statistical analyses.

Using the software GraphPad Prism (version 5.0), we compared the slopes of the regression lines calculated for growth, in order to look for possible statistically significant differences between the three phosphate enrichments. The global effect of time and treatment on photosynthesis, chlorophyll, protein, and zooxanthellae content was examined using repeated measures ANOVAs (StatView version 5.0). For significant effects, one-way ANOVAs and protected least significant difference (PLSD) Fisher post hoc tests were performed at each sampling time. Equality of variances and normality of residuals were tested using Levene and Shapiro-Wilk tests (Statgraphics Centurion version 15). Dark F_v/F_m at T_7 were compared using a one-way ANOVA followed by PLSD Fisher post hoc tests. As the normality assumption was not met for carbon, nitrogen, and phosphorus contents of coral tissues, these data were compared using non parametric Kruskal–Wallis tests, followed by Man-Whitney post hoc tests. All results are presented as mean values ± standard error except for elemental ratios of the skeleton, for which error bars represent the analytical reproducibility (1 σ, RSD).

Results

Repeated measures ANOVAs showed that there was no effect of time or treatment (P enrichment) on the zooxanthellae density ($F = 3.02$, $p = 0.12$ for time; and $F = 0.42$, $p=0.96$ for treatment) and protein content ($F = 0.93$, $p = 0.79$ for time; and $F = 1.15$, $p = 0.35$ for treatment). Mean concentrations were $3.7 \pm 0.1 \times 10^6$ zooxanthellae cm^{-2} and 1.5 ± 0.1 mg protein cm^{-2} in all samples. Conversely, there was an effect of phosphate enrichment on the chlorophyll content, with a 44% and 58% decrease in the 0.5 and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals as compared to the unenriched corals after 7 weeks (one-way ANOVA, PLSD Fisher tests, both $p < 0.001$; Fig. 1A). Chlorophyll content per zooxanthellae therefore decreased from 4.3 ± 0.7 pg Chl $zoox^{-1}$ in unenriched corals to 2.3 ± 0.4 and 1.8 ± 0.2 pg Chl $zoox^{-1}$ in 0.5 and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals. As a consequence of this decrease, rates of respiration (R) and gross photosynthesis (P_g) normalized to chlorophyll content significantly increased for enriched corals (Fig. 1B; PLSD Fisher tests, $p = 0.002$ and 0.007 for differences between unenriched and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals respectively for the respiration or gross photosynthesis rates at T_7). These rates however didn't significantly change with other normalizations (all $p > 0.05$). After 7 weeks, they were equal to a mean value of 1.1 and -1.0 µmol O_2 cm^{-2} h^{-1} or 2.9 and -2.7 µmol O_2 $zoox^{-1}$ h^{-1} for P_n and R respectively. The photosyn-

Article 6

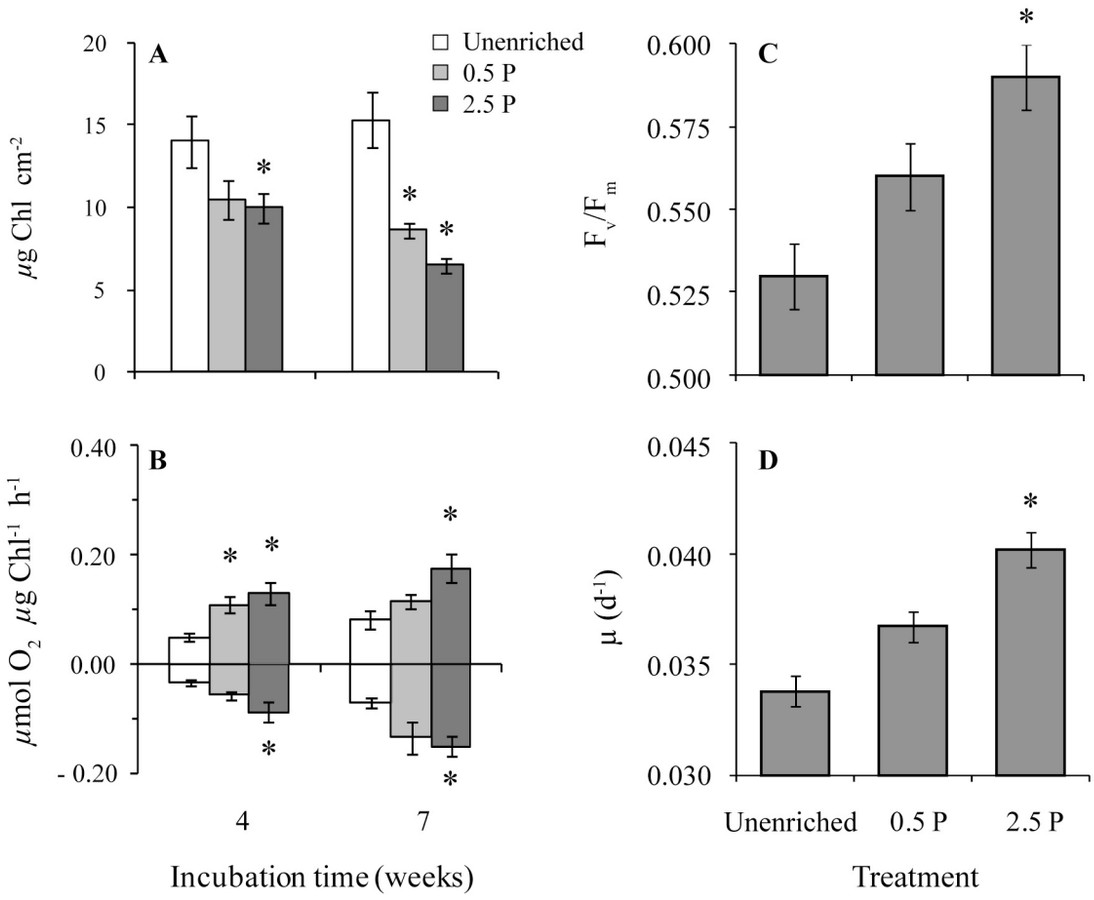


Figure 1 | Zooxanthellae parameters of *Stylophora pistillata* nubbins enriched with 0 (unenriched), 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} phosphate. (**A**) Areal chlorophyll content measured after 4 and 7 weeks of enrichment. (**B**) Respiration (R, below the x-axis) and net photosynthesis (P_n, above the x-axis) after 4 and 7 weeks of enrichment. Data are normalized per chlorophyll content. (**C**) Maximum quantum yield of photosystem II (dark F_v/F_m of PSII) measured after 7 weeks of enrichment. (**D**) Calculated specific growth rate of the zooxanthellae population. Data are presented as the mean ± SE of 5 nubbins per treatment. Data significantly different from the unenriched treatment are indicated by an asterisk for each parameter and sampling date.

		Unenriched	0.5 µmol L^{-1}	2.5 µmol L^{-1}
Mean surface area (cm²)	T_0	2.78 ± 0.32	2.78 ± 0.32	2.78 ± 0.32
	T_4	4.64 ± 0.39	4.82 ± 0.45	5.04 ± 0.42
	T_7	6.10 ± 0.74	6.43 ± 0.79	6.82 ± 0.71
Zooxanthellae formed between T_4 and T_7 (10^6 cells)		8.53 ± 0.09	9.19 ± 0.12	9.97 ± 0.08

Table 3 | Evolution of the average surface area in the coral *Stylophora pistillata* exposed to 0, 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} phosphate-enriched seawater for 7 weeks, and concomitant growth of zooxanthellae over the last three weeks of the enrichment. All data are presented as the mean ± SE of 4 - 10 nubbins per treatment.

Article 6

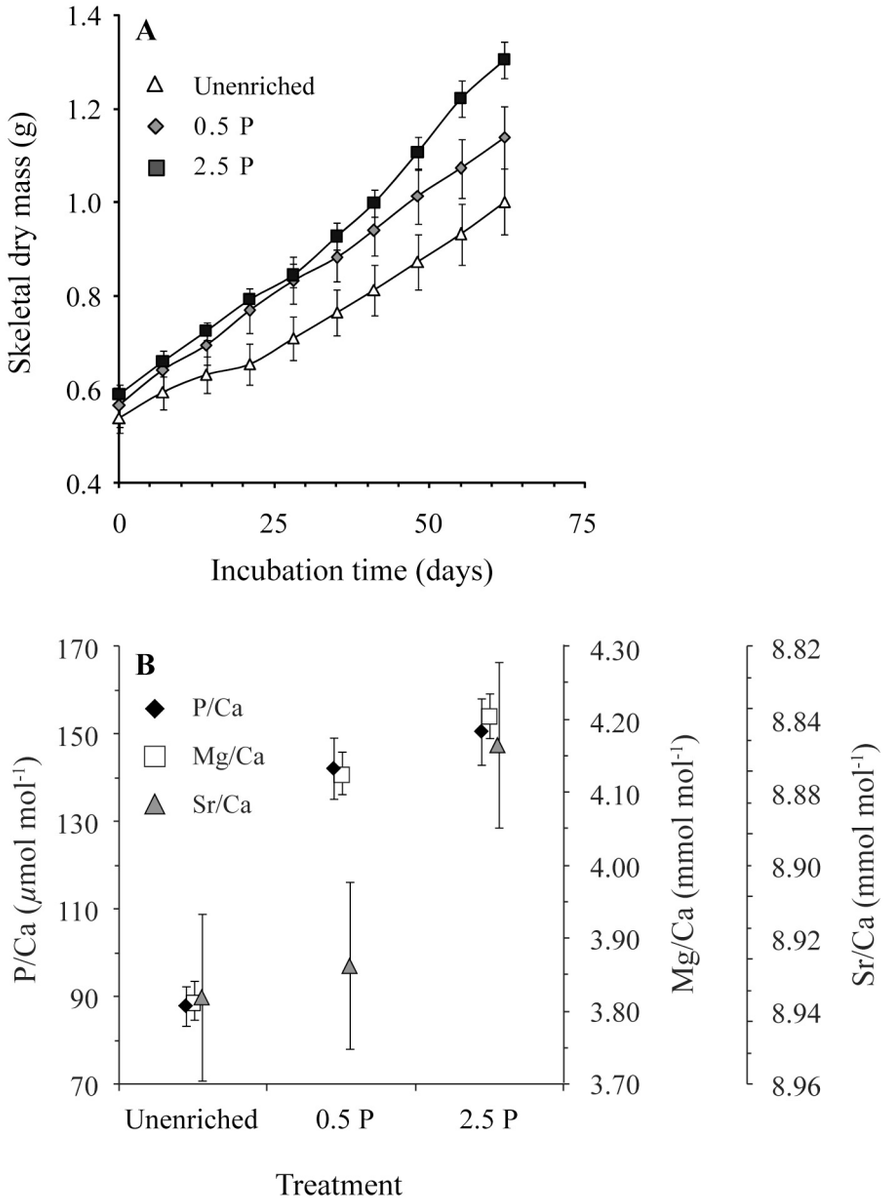


Figure 2 | Skeletal parameters of *Stylophora pistillata* nubbins enriched with 0 (unenriched), 0.5, and 2.5 µmol phosphate L^{-1}. (**A**) Evolution of dry mass over 8 weeks of enrichment under laboratory conditions. Each point represents the mean ± SE of 10 nubbins. (**B**) P/Ca, Mg/Ca and Sr/Ca ratios of nubbins enriched for 11 weeks. Data represent the ratios measured on three skeletons pooled together for each phosphate treatment. Error bars represent the analytical reproducibility based on the RSD (1σ) of six analyses of the Porites coral standard JCp-1 (Geological Survey of Japan). Note that the y-scale is inverted for Sr/Ca ratios.

thetic efficiency of PSII was higher for 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals than for unenriched corals (PLSD Fisher test, p=0.001; Fig. 1C). Specific growth rate, calculated as the slope of the regression line between the natural logarithm of the skeletal weight and the time (Fig. 2A), was 31% higher in the 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals (1.27 ± 0.04% d^{-1}) than in the unenriched ones (0.97 ± 0.11% d^{-1}; $F = 7.77$, $p = 0.006$). Specific growth rate was 1.11 ± 0.09% d^{-1} in the 0.5 µmol L^{-1} P-enriched corals, and was not significantly different than in the unenriched corals ($F = 0.35$, $p = 0.14$).

Surface area of the coral nubbins increased over the course of the experiment, from 2.8 ± 0.3 cm^2 on average at the beginning of the experiment, to 4.8 ± 0.4 and 6.5 ± 0.8 cm^2 on average after 4 and 7 weeks of phosphate enrichment respectively (Table 3). As nubbins grew, the animal tissue and symbiotic cells also grew. Between weeks 4 and 7 of the enrichment, 8.5, 9.2, and 10.0 × 10^6 zooxanthellae were formed in unenriched, 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals respectively, with specific the growth rate of the zooxanthellae population significantly increasing from 0.034 ± 0.001 to 0.040 ± 0.001 d^{-1} between unenriched and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals (PLSD Fisher test, $p = 0.007$; Fig. 1D).

In the animal compartment, there was no change in total areal carbon (65.3 ± 1.8 µmol C cm^{-2}), nitrogen (9.9 ± 0.3 µmol N cm^{-2}), and phosphorus (0.16 ± 0.01 µmol P cm^{-2}) contents, as well as in C:N:P ratios (427:65:1 ± 28:4:1) after 11 weeks of incubation in the different treatments (Tables 2 and 4; Kruskal–Wallis tests, all $p > 0.3$). In zooxanthellae, C, N, and P content increased in phosphate-enriched

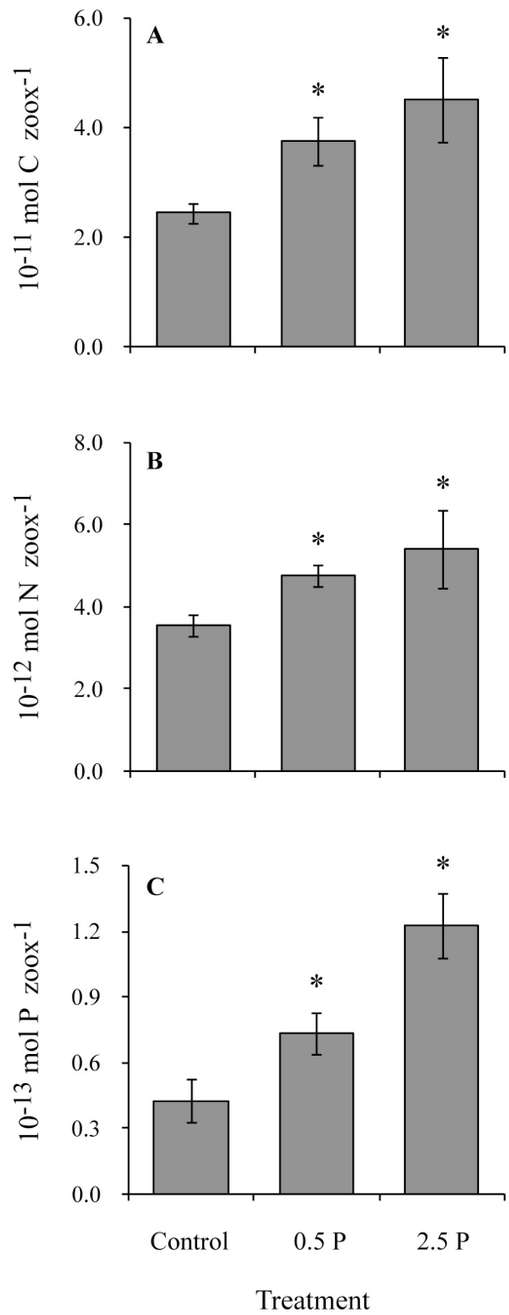


Figure 3 | Total carbon (**A**), nitrogen (**B**), and phosphorus (**C**) content of the zooxanthellae compartment of nubbins after 11 weeks of continuous phosphate enrichments of 0 (unenriched), 0.5, and 2.5 µmol L^{-1}.Each bar represents the mean ± SE of 6 nubbins. Data significantly different from the unenriched treatment are indicated by an asterisk for each element.

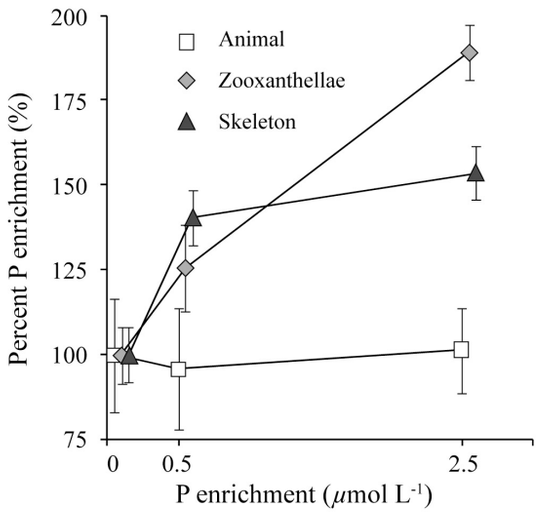


Figure 4 | Percentage of phosphorus accumulation relative to unenriched corals in each compartment (animal, zooxanthellae, skeleton) of 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} phosphate-enriched corals after 11 weeks of continuous enrichment. Error bars represent the standard error of 6 nubbins for the animal and zooxanthellae compartment, and the analytical reproducibility for the skeleton.

corals as compared to unenriched corals, both when normalized to the surface area (Mann-Whitney post hoc tests, all $p < 0.05$; Table 4) and to zooxanthella (Mann-Whitney post hoc tests, all $p < 0.05$; Fig. 3). The increase in P was the highest (increase of 190% when normalized per zooxanthellae, Fig. 3). As a consequence, molar N:P ratios were significantly lower in the 2.5 µmol L^{-1} P-enriched zooxanthellae (Mann-Whitney post hoc test, $p = 0.49$; Table 2).

In the skeletal compartment, total phosphorus content was 0.90, 1.45 and 1.55 µmol P g^{-1} for unenriched, 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals respectively, i.e. 0.10, 0.17 and 0.21 µmol P cm^{-2} respectively. P/Ca ratios were 62% and 71% higher (± 9%) and Mg/Ca ratios were 8% and 10% higher (± 1.6%) in the 0.5 and 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals, respectively. Sr/Ca ratios were 0.90% lower (± 0.28%) in the 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals than in the other corals (Fig. 2B).

The percentage of phosphorus accumulation in each compartment of P-enriched corals relative to unenriched corals after 11 weeks of incubation is presented in Fig. 4. An increase in ambient phosphate concentration resulted in a linear accumulation of phosphorus in the zooxanthellae, while a tendency towards saturation was observed in the skeleton, and no change occurred in the tissue.

Discussion

Overall, results obtained in this study have shown that phosphate enrichment mainly affected the coral symbionts, by decreasing their C:P and N:P ratios, while increasing their carbon, nitrogen, and phosphorus contents, as well as their specific growth rate, maximal photosynthetic efficiency of the PSII, and rate of photosynthesis normalized to chlorophyll content. Phosphate enrichment also affected the skeletal compartment, by increasing the skeletal growth and the P/Ca ratio. Conversely, few changes were observed in the animal host tissue.

Concerning the elemental composition of the symbionts, the C:P and N:P ratios were > 400:1 and 50:1 respectively (Table 2), and were thus much higher than the Redfield ratios advocated for nutrient-repleted phytoplankton of 106:1 and 16:1 (Redfield, 1934), suggesting a nutrient limitation. The decrease in C:P and N:P with P-enrichment, together with the increase in the cellular phosphorus content,

Article 6

P enrichment	Animal			Zooxanthellae		
	Total C (μmol cm^{-2})	Total N (μmol cm^{-2})	Total P (nmol cm^{-2})	Total C (μmol cm^{-2})	Total N (μmol cm^{-2})	Total P (nmol cm^{-2})
Unenriched	68.7 ± 2.9	10.4 ± 0.7	159 ± 21	28.6 ± 1.9	4.5 ± 0.7	52 ± 3
0.5 μmol L^{-1}	62.0 ± 2.6	9.7 ± 0.3	149 ± 12	33.2 ± 2.9	4.7 ± 1.1	64 ± 3
2.5 μmol L^{-1}	65.2 ± 3.5	9.6 ± 0.6	168 ± 27	40.9 ± 6.6	5.6 ± 0.9	100 ± 5

Table 4 | Total carbon (C), nitrogen (N), and phosphorus (P) content in the coral *Stylophora pistillata* exposed to 0, 0.5, and 2.5 µmol L^{-1} phosphate-enriched seawater for 11 weeks. Elemental contents are expressed in µmol cm^{-2} for carbon and nitrogen, and in nmol cm^{-2} for phosphorus. They are all presented as the mean ± SE of 6 nubbins randomly pooled in groups of two (3 groups per treatment).

and in the specific growth rate of the symbiont population, suggest that there was a phosphorus-limitation of zooxanthellae growth in hospite, in agreement with the hypothesis of Belda et al. (1993), who reported a similar decrease in C:P ratios after phosphate enrichment in the giant clam *T. gigas* (Table 2). This limitation was partially alleviated by phosphate supplementation. Phosphorus-limitation of zooxanthellae growth was also hypothesized by Miller and Yellowlees (1989) based on physiological evidence related to cytoplasmic pH, as well as inorganic and organic phosphorus uptake activity of corals and their symbionts. The increase in the rates of photosynthesis per chlorophyll content and in the PSII photosynthetic efficiency after P-enrichment suggest that, in addition to the growth of the symbiont population, phosphorus might also have been a limiting factor for the many steps of the light-dark phases of zooxanthellae photosynthesis. Phosphorus is indeed needed in photophosphorylation as a component of ATP during the conversion of light energy to chemical energy (Goodman et al., 1953; Hall and Rao, 1987), and is involved, during the dark phase, in many components of the Calvin cycle, such as ribulose 1,5-bisphosphate, 3-phosphoglycerate, 1,3-bisphosphoglycerate, glyceraldehydes-3-phosphate and ribulose-5-phosphate (Goodman et al., 1953; Hall and Rao, 1987). Increased photosynthetic efficiency of the zooxanthellae may explain the decrease in chlorophyll content per surface area (Fig. 2C) or per cell. A decrease in chlorophyll content was similarly observed in the giant clam *T. gigas* (Belda et al., 1993) with higher phosphate enrichments (2, 5, and 10 µmol P L^{-1}), but was attributed to an increase in the zooxanthellae density and a possible iron limitation. Underlying mechanisms for this observed decrease in chlorophyll content remain to be further investigated, especially because phosphate enrichment had also no effect on the chlorophyll content of the corals *P. damicornis* (Snidvongs and Kinzie, 1994; Stambler et al., 1991), *Acropora palifera* (Steven and Broadbent, 1997), and *S. pistillata* (Koop et al., 2001; Muscatine et al., 1989), with both similar and higher phosphate enrichments (Table 1).

As a consequence of a higher photosynthetic efficiency in phosphate-enriched zooxanthellae, and a limited enhancement of their growth rates, the cellular carbon

and nitrogen contents of these zooxanthellae were enhanced by 70%. Carbon supply is not limited in symbiotic corals, and nitrogen was certainly obtained and concentrated from the host excretion and the efficient uptake of the low concentrations in seawater. Indeed, a total of 10×10^6 zooxanthellae were produced between weeks 4 and 7 in the 2.5 µmol L^{-1} P-enriched corals (Table 3), with a mean N content of 4.2 10^{-12} mol N $zoox^{-1}$ (Fig. 3). A total of ca. 42 µmol N were therefore needed during this period to afford the zooxanthellae production. If we consider a daily flux of nitrogen from the host to the zooxanthellae of 0.26 µmol N cm^{-2} d^{-1} (Falkowski et al., 1993), ca. 32 µmol N (= 0.26 µmol N cm^{-2} d^{-1} × 21 d × 5.9 cm^2 on average) were available to the corals from host excretion. An additional total amount of 20 µmol N was provided via the uptake of dissolved ammonium in seawater (considering a mean uptake rate of 2.7 µmol N mg Chl^{-1} h^{-1} at an ambient concentration of < 0.5 µmol NH_4^+, 12 h light, and 3×10^{-9} mg Chl $zoox^{-1}$; Godinot et al., 2011). These two nitrogen sources were therefore sufficient to cover the needs of the zooxanthellae production in P-enriched corals.

The increase in zooxanthellae specific growth rate with phosphate supplementation however did not lead to the building of a higher zooxanthellae density, which remained unchanged in P-enriched corals compared to control corals (i.e. zooxanthellae growth just matched the tissue and skeletal growth of the enriched corals). The specific growth rate calculated at T_7 (0.034 - 0.040 ± 0.01 d^{-1}) was also ca.10 times lower than the theoretical maximal exponential growth rate of 0.3 d^{-1} for cultured zooxanthellae (Chang et al., 1983). Benefits of phosphate to the zooxanthellae growth were therefore not substantial enough to reach balanced growth, suggesting that another nutrient was limiting, likely nitrogen. Indeed, the lack of change in zooxanthellae density tends to support the view that nitrogen was also largely limiting zooxanthellae growth, as addition of this nutrient is generally followed by a zooxanthellae burst in the coral tissue (Falkowski et al., 1993; Muscatine et al., 1989; Rees, 1991). Such a nitrogen-phosphorus co-limitation may also explain why phosphate addition alone did not lead to the negative impact on the coral calcification generally observed when phosphate and nitrogen are provided together (Ferrier- Pagès et al., 2000; Kinsey and Davies, 1979; Renegar and Riegl, 2005), in which case the overgrowth of zooxanthellae induces the disruption of the symbiotic association.

At the host level, there was no change in the elemental composition of the cells or in the protein content. This fact was already observed in the scleractinian coral *S. pistillata* and in the clam *T. gigas*, and it was hypothesized that protein synthesis was rather limited by the supply of amino acids and nitrogen (Belda et al., 1993; Muscatine et al., 1989). Nonetheless, the skeletal growth increased with phosphate enrichment, as was observed in some other studies (Table 1), maybe due to the possibility of adding sufficient zooxanthellae biomass in the newly formed tissue and skeleton. The discrepancy observed with other studies that reported a decrease in skeletal growth (Table 1) might be due to different ways in measuring calcification, i.e. total skeletal weight with the buoyant weight technique, versus linear extension rate.

Measurements of the amount of phosphorus and of the P/Ca ratio in the skeleton confirmed an enrichment of this compartment after addition of phosphate, and shows that phosphorus is not a toxic element for calcification, at least at these concentrations. However, the small difference in P/Ca ratio between the two phosphate-enriched treatments clearly demonstrated that there was a maximum limit in the amount of skeletal phosphorus accumulation. The mechanism of this incorporation is still unknown, and two pathways are possible: i) phosphorus can be deposited from the host cytoplasm, or ii) it can directly be acquired from seawater, without entering through the animal compartment (Braun and Erez, 2004; Erez and Braun, 2007). LaVigne et al. (2008, 2010) suggested the existence of two pools of skeletal phosphorus, an organic pool representing the background level, and a skeletal inorganic pool that increases with the increasing seawater phosphorus concentration. In the present study, phosphorus was measured in this latter inorganic pool, since the organic matrix was suppressed by the sample treatment. P/Ca values measured in enriched nubbins were remarkably similar to the first values reported by LaVigne et al. (2008) for *Pavona gigantea* (ca. 118 µmol mol^{-1}) from the Gulf of Panamá, characterized by a seasonal surface water phosphate increase between ca. 0.1 to ca. 0.6 µmol L^{-1}. Concerning the other trace elements analyzed, Mg/Ca and Sr/Ca ratios were respectively positively and negatively correlated with the skeletal growth rate, as previously reported (de Villiers et al., 1994; Gaetani and Cohen, 2006; Inoue et al., 2007; Mason et al., 2007; Rasmussen, 1988; Rasmussen and Cuff, 1990; Reynaud et al., 2007). The exact mechanisms responsible for this calcification-rate related kinetic effect are not entirely understood, although several hypotheses have been proposed, including a Rayleigh fractionation process and cation partitioning during aragonite crystal formation (Gaetani and Cohen, 2006; Inoue et al., 2007). However, the present study does not attempt to examine in detail the reasons behind the correlation between the growth rate and Mg/Ca and Sr/Ca ratios.

Under enrichment conditions, phosphorus concentrations did not change in the animal compartment when compared to unenriched conditions (Fig. 4), confirming that animal cells do not represent an accumulation site of inorganic phosphorus within the symbiosis. Conversely, the importance of phosphorus inside the skeleton and zooxanthellae increased (Fig. 4), confirming that these compartments are the two accumulation sites of inorganic phosphorus within the symbiotic association. In the zooxanthellar compartment, phosphorus accumulation was directly proportional to the ambient phosphate concentration (Fig. 4). Conversely, the skeletal phosphorus accumulation seemed saturable as phosphorus concentration was the same, within analytical error, for skeletons from the 0.5 and 2.5 µmol L^{-1} phosphate enrichments.

By addressing issues of nutrient supply to corals, this study provides a better understanding of the phosphorus metabolism of corals. The present results suggest that a 0.5 µmol L^{-1} P enrichment, which is usually the level encountered in eutrophicated areas, did not significantly change the physiology of the *S. pistillata* host, as measured through protein content and skeletal growth. However, the physiology of the symbionts was affected: although the zooxanthellae density remained

constant, the photosynthetic efficiency increased, and phosphorus accumulated in the zooxanthellae, changing their elemental composition (after 11 weeks of enrichment). Phosphorus also accumulated in the skeleton of those corals.

Acknowledgements

We are grateful to Denis Allemand, and Michael Holcomb for useful comments on this manuscript. We wish to thank Cécile Rottier and Nicolas Tolstoï for assistance in phosphate measurements and aquaria maintenance. We also want to thank Jean-François Maguer from the Institut Universitaire Européen de la Mer in Plouzané (France) for C:N measurements. Financial support was provided by funds from the École Normale Supérieure to C. Godinot. P. Montagna acknowledges financial support from the Marie Curie International Outgoing Fellowship Programme. This research was supported by the Government of the Principality of Monaco.

References

Annis, E.R., Cook, C.B., 2002. Alkaline phosphatase activity in symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) as a biological indicator of environmental phosphate exposure. Mar. Ecol. Prog. Ser. 245, 11–20.

Belda, C.A., Lucas, J.S., Yellowlees, D., 1993. Nutrient limitation in the giant clam-zooxanthellae symbiosis: effects of nutrient supplements on growth of the symbiotic partners. Mar. Biol. 117, 655–664.

Belda, C.A., Yellowlees, D., 1995. Phosphate acquisition in the giant clam-zooxanthellae symbiosis. Mar. Biol. 124, 261–266.

Bell, P.R.F., Tomascik, T., 1993. The demise of fringing coral reefs of Barbados and of regions in the Great Barrier Reef lagoon—impacts of eutrophication. In: Ginsburg, R.N. (Ed.), Proceedings of the Colloquium on Global Aspects of Coral Reefs: Health, Hazards and History.

Bellwood, D.R., Hughes, T.P., Folke, C., Nyström, M., 2004. Confronting the coral reef crisis. Nature 429, 827–833.

Braun, A., Erez, J., 2004. Preliminary observations on sea water utilization during calcification in scleractinian corals. American Geophysical Union Fall Meeting, Dec. 13-17, San Francisco.

Bucher, D.J., Harrison, P.L., 2000. Growth response of the reef coral *Acropora longicyathus* to elevated inorganic nutrients: do responses to nutrients vary among coral taxa?, Proceedings 9th International Coral Reef symposium, Bali, Indonesia, pp. 443–448.

Chang, S.S., Prezelin, B.B., Trench, R.K., 1983. Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate Symbiodinium microadriaticum. Mar. Biol 76, 219–229.

Davies, P.S., 1989. Short-term growth measurements of corals using an accurate buoyant weighing technique. Mar. Biol. 101 (3), 389–395.

de Villiers, S., Shen, G.T., Nelson, B.K., 1994. The Sr/Ca-temperature relationship in coralline aragonite: influence of variability in (Sr/Ca)seawater and skeletal growth parameters. Geochim. Cosmochim. Acta 58, 197–208.

D'Elia, C.F., 1977. The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. Limnol. Oceanogr. 22 (2), 301–315.

Dodge, R.E., Jickells, T.D., Knap, A.H., Boyd, S., Bak, R.P.M., 1984. Reef- building coral skeletons as chemical pollution (phosphorus) indicators. Mar. Pollut. Bull. 15 (5), 178–187.

Erez, J., Braun, A., 2007. Calcification in hermatypic corals is based on direct supply to the biomineralization site. 17th Annual V M Goldschmidt, Cologne, Germany: Geochim. Cosmochim. Acta, 71(15, p. A260-A260.

Falkowski, P.G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., Porter, J.W., 1984. Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. Bioscience 34 (11), 705–709.

Falkowski, P.G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., McCloskey, L., 1993. Population control in symbiotic corals. Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. Bioscience 43 (9), 606–611.

Ferrier-Pagès, C., Gattuso, J.P., Dallot, S., Jaubert, J., 2000. Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*. Coral Reefs 19, 103–113.

Furnas, M.J., 1991. Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. Limnol. Oceanogr. 36 (1), 13–29.

Gaetani, G.A., Cohen, A.L., 2006. Element partitioning during precipitation of aragonite from seawater: a framework for understanding paleoproxies. Geochim. Cosmochim. Acta 70, 4617–4634.

Godinot, C., Ferrier-Pagès, C., Grover, R., 2009. Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. Limnol. Oceanogr. 54 (5), 1627–1633.

Godinot, C., Grover, R., Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., 2011. High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. J. Exp. Biol. 214 (16), 2749–2754.

Goodman, M., Bradley, D.F., Calvin, M., 1953. Phosphorus and photosynthesis. I. Differences in the light and dark incorporation of radiophosphate1. J. Am. Chem. Soc. 75 (8), 1962–1967.

Hall, D.O., Rao, K.K., 1987. Photosynthesis. Cambridge University Press, Cambridge.

Hoogenboom, M., Rodolfo-Metalpa, R., Ferrier-Pagès, C., 2010. Co-variation between autotrophy and heterotrophy in the Mediterranean coral *Cladocora caespitosa*. J. Exp. Biol. 213 (14), 2399–2409.

Inoue, M., Suzuki, A., Nohara, M., Hibino, K., Kawahata, H., 2007. Empirical assessment of coral Sr/Ca and Mg/Ca ratios as climate proxies using colonies grown at different temperatures. Geophys. Res. Lett. 34, L12611. doi:10.1029/2007GL029628.

Jackson, A.E., Yellowlees, D., 1990. Phosphate uptake by zooxanthellae isolated from corals. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 242 (1305), 201–204.

Jokiel, P.L., Maragos, J.E., Franzisket, L., 1978. Coral growth: buoyant weight technique. In: Stoddart, D.R., Johannes, R.E. (Eds.), Coral reef: research methods. Unesco, Paris, pp. 379–396.

Kinsey, D.W., Davies, P.J., 1979. Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth. Limnol. Oceanogr. 24 (5), 935–940.

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. Mar. Pollut. Bull. 42, 91–120.

Kumarsingh, K., Laydoo, R., Chen, J.K., Siung-Chang, A.M., 1998. Historic records of phosphorus levels in the reef-building coral *Montastrea annularis* from Tobago, West Indies. Mar. Pollut. Bull. 36 (12), 1012–1018.

LaVigne, M., Field, M.P., Anagnostou, E., Grottoli, A.G., Wellington, G.M., Sherrell, R.M., 2008. Skeletal P/Ca tracks upwelling in Gulf of Panama coral: evidence for a new seawater phosphate proxy. Geophys. Res. Lett. 35, 1–5.

LaVigne, M., Matthews, K.A., Grottoli, A.G., Cobb, K.M., Anagnostou, E., Cabioch, G., Sherrell, R.M., 2010. Coral skeleton P/Ca proxy for seawater phosphate: multycolony calibration with a contemporaneous seawater phosphate record. Geochim. Cosmochim. Acta 74, 1282–1293.

Mason, H.E., Montagna, P., Phillips, B.L., 2007. Phosphorus speciation in skeletal aragonite of deep sea corals. Eos Trans. 2007 Fall Meeting Suppl., Abstract B31D-0617.

McCook, L.J., 1999. Macroalgae, nutrients and phase shifts on coral reefs: scientific issues and management consequences for the Great Barrier Reef. Coral Reefs 18, 357–367.

Miller, D.J., Yellowlees, D., 1989. Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine cnidarians: a critical review. Proc. R. Soc. Lond. 237B, 109–125.

Muller-Parker, G., Cook, C.B., D'Elia, C.F., 1994. Elemental composition of the coral *Pocillopora damicornis* exposed to elevated

seawater ammonium. Pac. Sci. 48, 234–246.

Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27, 31–36.

Muscatine, L., Falkowski, P.G., Dubinsky, Z., Cook, P.A., McCloskey, L.R., 1989. The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, pp. 311–324.

Rasmussen, C.E., 1988. The use of strontium as an indicator of anthropogenically altered environmental parameters. Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium, Australia, pp. 325–330.

Rasmussen, C.E., Cuff, C., 1990. Enhanced nutrient levels in the marine environment and their effects on coral reefs. Proceeding of the 4th Pacific Congress on Marine Science and Technology, Tokyo, Tokyo, pp. 13–20.

Redfield, A.C., 1934. On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. In: Daniel, R.J. (Ed.), James Johnstone Memorial Volume. University Press of Liverpool, pp. 177–192.

Rees, T.A.V., 1991. Are symbiotic algae nutrient defficient? Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 243, 227–233.

Renegar, D.A., Riegl, B.M., 2005. Effect of nutrient enrichment and elevated CO_2 partial pressure on growth rate of Atlantic scleractinian coral *Acropora cervicornis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 293, 69–76.

Reynaud, S., Ferrier-Pagès, C., Meibom, A., Mostefaoui, S., Mortlock, R.A., Fairbanks, R.G., Allemand, D., 2007. Light and temperature effects on Sr/Ca and Mg/Ca ratios in the scleractinian coral *Acropora* sp. Geochim. Cosmochim. Acta 71, 354–362.

Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ferrier-Pagès, C., Gattuso, J.P., 2010. Response of the temperate coral *Cladocora caespitosa* to mid- and long-term exposure to pCO_2 and temperature levels projected for the year 2100 AD. Biogeosciences 7, 289–300.

Smith, J., Smith, C., Hunter, C., 2001. An experimental analysis of the effects of herbivory and nutrient enrichment on benthic community dynamics on a Hawaiian reef. Coral Reefs 19 (4), 332–342.

Snidvongs, A., Kinzie, R.A., 1994. Effects of nitrogen and phosphorus enrichment on in vivo symbiotic zooxanthellae *Pocillopora damicornis*. Mar. Biol. 118 (4), 705–711.

Sorokin, Y.I., 1992. Phosphorus metabolism in coral reef communities: exchange between the water column and bottom biotopes. Hydrobiologia 242 (2), 105–114.

Stambler, N., Popper, N., Dubinsky, Z., Stimson, J., 1991. Effect of nutrient enrichment and water motion on the coral *Pocillopora damicornis*. Pac. Sci. 45 (3), 299–307.

Steven, A.D.L., Broadbent, A.D., 1997. Growth and metabolic responses of *Acropora palifera* to long term nutrient enrichment. Proc. 8th Int. Coral Reef Sym, pp. 867–872.

Stimson, J., Kinzie, 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. 63–74.

Szmant, A.M., 2002. Nutrient enrichment on coral reefs: is it a major cause of coral reef decline? Estuaries 25 (4b), 743–766.

Tambutté, É., Allemand, D., Jaubert, J., 1995. The *Stylophora pistillata* microcolony: a model for studying calcium transport process during coral biomineralization. In: Allemand, D., Cuif, J.P. (Eds.), Monaco, Proceedings of the 7th international symposium on biomineralization, "Biomineralization 93": Bull. Inst. océanogr., N° spécial 14(2), pp. 79–87.

Tanaka, Y., Miyajima, T., Koike, I., Hayashibara, T., Ogawa, H., 2007. Imbalanced coral growth between organic tissue and carbonate skeleton caused by nutrient enrichment. Limnol. Oceanogr. 52 (3), 1139–1146.

Tomascik, T., Sander, F., 1985. Effects of eutrophication on reef-building corals. I. Growth rate of the reef building coral *Monstrea annularis*. Mar. Biol. 87, 143–155.

Vandecasteele, C., Block, C.B., 1997. Modern Methods for Trace Element Determination. John Wiley & Sons, Ltd.

Chapter 6

Field-work: nutrient limitation in a mesotrophic reef

Abstract

The techniques developed in the laboratory at CSM on *S. pistillata* to study the nutrient limitation of corals were tested in the field, in a mesotrophic reef from the volcanic island of Moorea, French Polynesia. The studied site, named " *la Pépinière*" (17° 29' 23,2"S 149° 53' 34,3"W), is characterized by high phosphorus (0.70 ± 0.03 µmol L^{-1} for DIP, and ?? ± ?? µmol L^{-1} for DOP) and nitrate (0.83 ± 0.07 µmol L^{-1}) concentrations, and a very low ammonium concentration (0.07 ± 0.02 µmol L^{-1}). Nubbins of *P. damicornis* were sampled on the *Pépinière* reef in June 2011, in order to assess their ammonium or phosphate limitation. Michaelis-Menten constants *K* measured for DIP (K = 2.47 ± 0.85 µmol L^{-1}) and DOP (K_m = 74.8 ± 36.5 µmol L^{-1}) were relatively high, and reflected the elevated dissolved phosphorus concentrations of the *Pépinière* reef. Measures performed with the double enrichment technique showed that DIP uptake increased in the presence of ammonium. Also, the C:P ratio of zooxanthellae was lower than for *P. damicornis* corals from an oligotrophic reef. Finally, the intracellular phosphate content observed with NMR in the host tissues was higher than that measured for highly fed corals at CSM. Collectively, these results suggest that *P. damicornis* was more limited by nitrogen than by phosphorus in the mesotrophic *Pépinière* reef. The field validation of techniques developed at CSM suggests that the double enrichment technique and NMR are two promising indicators of coral nutrient limitation for field-based studies.

Chapitre 6

Application sur le terrain : limitation sur un récif mésotrophe

Résumé

Les techniques permettant l'étude de la limitation en nutriments, mises au point en laboratoire sur *S. pistillata*, ont été testées sur un récif mésotrophe de l'île volcanique de Moorea, en Polynésie Française. Le site choisi, nommé "site de la Pépinière" (17° 29' 23,2"S 149° 53' 34,3"O), est caractérisé par des concentrations élevées en phosphore (0,70 ± 0,03 µmol L^{-1} pour le PID, et ?? ± ?? µmol L^{-1} pour le POD) et en nitrate (0,83 ± 0,07 µmol L^{-1}), et très faibles en ammonium (0,07 ± 0,02 µmol L^{-1}). Des boutures du corail *P. damicornis* ont été prélevées sur ce site en juin 2011, afin d'évaluer une éventuelle limitation par l'ammonium ou le phosphore. Les constantes de Michaelis-Menten *K* relativement élevées mesurées pour l'absorption du PID (K = 2,47 ± 0,85 µmol L^{-1}) et du POD (K_m = 74,8 ± 36,5 µmol L^{-1}) reflètent les forts niveaux de phosphore dissous à la Pépinière. Des mesures réalisées avec la technique de double enrichissement ont montré que l'absorption de PID augmente en présence d'ammonium. De plus, le rapport C:P mesuré pour les zooxanthelles est faible comparé à celui de *P. damicornis* provenant d'un site oligotrophe, et la concentration de phosphate intracellulaire observée en RMN dans les tissus de l'hôte est plus élevée que celle des coraux fortement nourris du CSM. Tous ces résultats suggèrent que *P. damicornis* est plus limité par l'azote que par le phosphore sur le site mésotrophe de la Pépinière. La validation sur le terrain des techniques mises au point au CSM suggère que la technique de double enrichissement et la RMN sont deux indicateurs prometteurs pour étudier la limitation en nutriments des coraux sur le terrain.

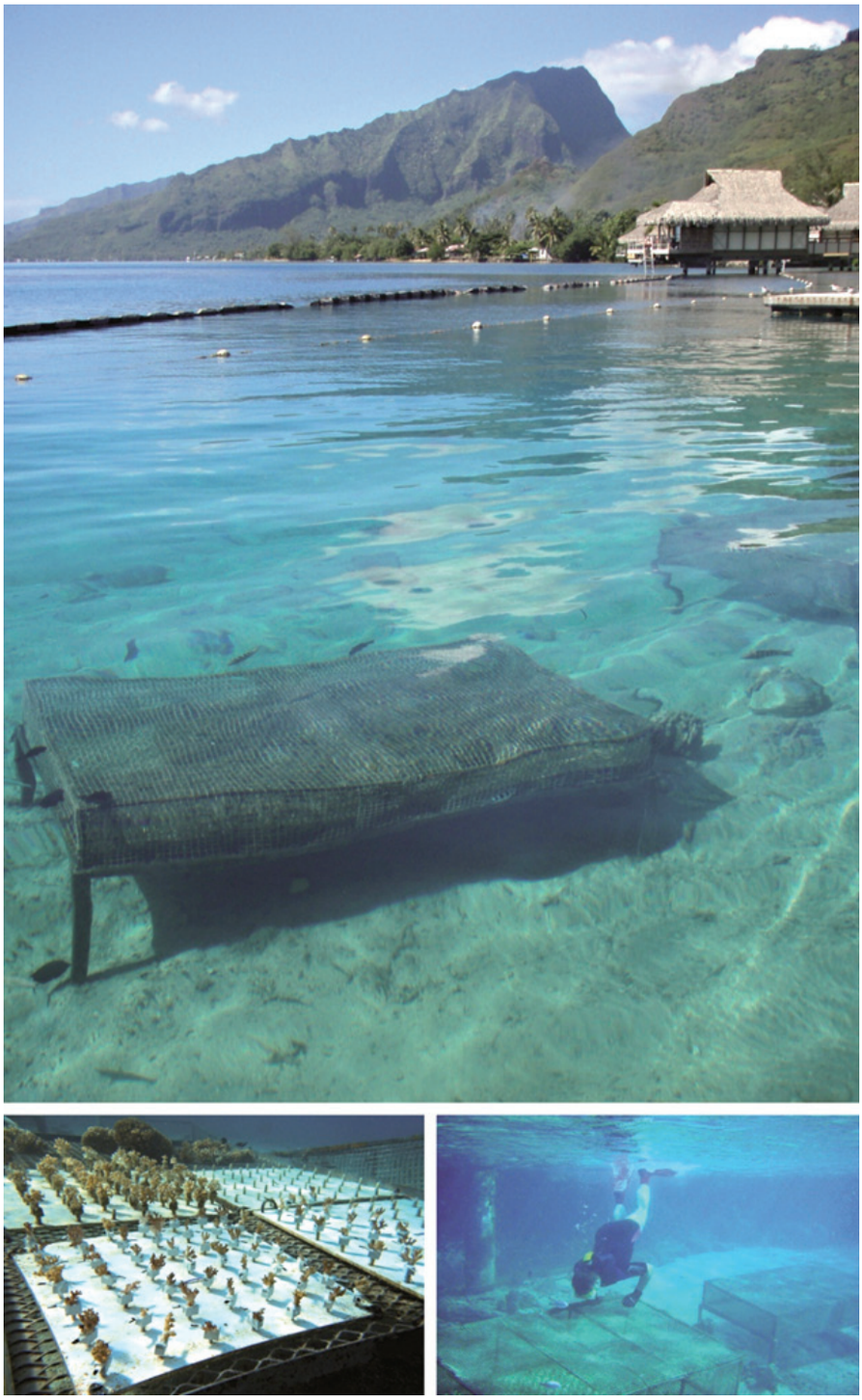


Figure 30 | Site de la Pépinière dans le lagon de Moorea

La photographie du haut présente le site d'étude (nommé site de la Pépinière) dans le lagon de Moorea. Les deux cages, dans lesquelles les boutures du corail *Pocillopora damicornis* ont été cultivées, sont visibles par transparence. La ligne de bouées visible à gauche délimite en surface la partie du lagon appartenant à l'hôtel Intercontinental, qui abrite ce site expérimental du Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE). Le laboratoire du CRIOBE se situe à quelques kilomètres de là, dans la vallée visible à droite de la photographie, à l'arrière plan | La photographie en bas à gauche présente les boutures dans la cage ouverte | La photographie en bas à droite présente le suivi visuel, effectué tous les jours en apnée, pour vérifier l'état de santé des boutures dans les cages.

1 Site d'étude, problématiques scientifiques et objectifs

Après avoir examiné différentes techniques permettant d'évaluer la limitation en phosphore ou en azote des coraux en laboratoire, une mission en Polynésie Française, réalisée en juin 2011, a permis d'aller les tester directement sur le terrain. Un récif de l'île haute volcanique de Moorea, située dans l'archipel de la Société en Polynésie Française, a été choisi pour cette étude (figure 30).

Site d'étude de la Pépinière

Le récif étudié se situe dans le lagon nord de l'île de Moorea, en face de la passe de Taotai (figure 31). Il s'agit d'un site expérimental mis en place par le CRIOBE, nommé site de la Pépinière. Il est maintenu dans une partie du lagon appartenant à l'hôtel Intercontinental. Sur le petit récif expérimental du site de la Pépinière, les coraux sont maintenus au sein de cages métalliques finement grillagées qui les protègent des gros brouteurs (poissons, bivalves) et des apnéistes nageant dans le lagon (figure 30). Ces cages sont situées à 2 mètres de profondeur.

Nutriment	Concentration (µmoles L^{-1})
Phosphore	
PID	0,70 ± 0,03
POD	?? ± ??
POP	?? ± ??
Azote	
Ammonium	0,07 ± 0,02
Nitrate	0,83 ± 0,07
Nitrite	0,04 ± 0,003
Autres	
Silicate	2,61 ± 0,05

Tableau 6 | Concentrations en nutriments du site de la Pépinière

La Pépinière est caractérisée par une salinité de 38 et une température moyenne de 27,5 ± 0,5°C durant la journée. L'éclairement à une profondeur de 2 mètres est de 1700 ± 200 µmol m^{-2} s^{-1} (mesuré à midi). Les concentrations en nutriments de ce site (tableau 6) sont relativement élevées pour le phosphore et le nitrate, et plutôt faibles pour l'ammonium[57] : le site est donc mésotrophe (i.e. intermédiaire entre oligotrophe et eutrophe).

Ce site représente une occasion d'élargir le champ d'application des techniques mises en place au laboratoire pour étudier la limitation des coraux, ce qui fait tout son intérêt. Il est également facile d'accès, ce qui a facilité les échantillonnages sur le terrain, et bien protégé, ce qui a permis de minimiser la mortalité des boutures sur place[58].

Techniques testées sur le terrain

Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer l'éventuelle limitation en ammonium ou en phosphore de coraux cultivés sur le site de la Pépinière, en appliquant les tech-

[57] On rappelle que **les concentrations sur un récif oligotrophe** sont typiquement inférieures à 0,50 µmol L^{-1} pour le PID et le nitrate, et à 0,20 µmol L^{-1} pour l'ammonium. Sur un **récif eutrophe**, les concentrations peuvent atteindre 1 µmol L^{-1} de phosphate et 2 µmol L^{-1} d'ammonium.

[58] Si les **coraux maintenus en aquarium** au CSM sont relativement résistants, ceux **prélevés en milieu naturel** sont plus fragiles, et leur bouturage reste une étape délicate

Figure 31 | Position géographique du site de la Pépinière *(figure en page suivante)*
Les trois cartes du monde, de la Polynésie Française et de Moorea présentent la situation géographique du site d'étude (17° 29' 23,2"S, 149° 53' 34,3"O). Les trois photographies présentent une vue aérienne de Moorea, une vue du site de la Pépinière depuis le large, et une vue satellitaire de la côte nord-ouest de Moorea (rectangle orange sur la carte de Moorea). Le site de la Pépinière est représenté par un diamant jaune, et le laboratoire du CRIOBE par un diamant bleu. Photographies : S. Teva (vue aérienne), C. Godinot (vue du large) et Google Earth (vue satellitaire).

niques de laboratoire mises au point au CSM. Dans ce contexte, la cinétique d'absorption du PID et du POD (chapitres 2 et 3), puis l'absorption de PID en présence d'ammonium (chapitre 2), ont été mesurées pour des coraux entiers. Le rapport C:N:P des coraux et de leurs zooxanthelles a également été mesuré (chapitre 5), et le contenu en phosphore de l'hôte a été déterminé en RMN (chapitre 4).

Ces travaux se basent sur l'hypothèse générale que les coraux du site ne sont pas limités en phosphore (vu les fortes concentrations dans le milieu environnant), mais plus limités en ammonium. Les sous-hypothèses sont donc les suivantes. 1) La constante de Michaelis-Menten, *K*, pour le PID devrait être élevée, étant donné que la concentration en PID est importante sur le site de la Pépinière. 2) De même, au vu des concentrations de POD sur le récif, on s'attend à ce que le *K* soit également élevé pour le POD. 3) L'absorption de PID devrait augmenter en présence d'ammonium, compte tenu des très faibles concentrations d'ammonium sur le récif. On s'attend ainsi à ce que l'ammonium soit plus limitant que le phosphore à la Pépinière. 4) Il est de plus attendu que les zooxanthelles présentent des rapports C:P et N:P relativement élevés, et un rapport C:N relativement faible. En effet, dans l'expérience d'enrichissement en PID du chapitre 5, il a été constaté que les rapports C:P et N:P des zooxanthelles ont augmenté avec l'enrichissement en PID, tandis que le rapport C:N a diminué. Pour l'hôte, on ne s'attend pas à constater un fort impact des concentrations externes de nutriments sur les rapports C:N:P, ainsi que cela a été observé dans le chapitre 5. 5) Enfin, les tissus de l'hôte devraient présenter une forte concentration de phosphate en RMN, au vu des fortes concentrations de POP dans le milieu et d'après les observations du chapitre 4.

Les paragraphes qui suivent exposent l'ensemble des résultats obtenus lors de la mission à Moorea. Ces résultats feront l'objet d'un article soumis pour publication à une revue à comité de lecture international.

2 Matériel et méthodes

Préparation des boutures de corail

L'espèce de corail étudiée sur ce site est *Pocillopora damicornis*, un proche parent de *Stylophora pistillata* (qui n'est pas présent à Moorea). Un mois avant les expériences sur le terrain, de grosses colonies de *P. damicornis* ont été transplantées sur le site de la Pépinière depuis un autre emplacement du lagon. Début juin 2011, les colonies ont été fragmentées en boutures, et réimplantées sur le site pour une à deux semaines de récupération.

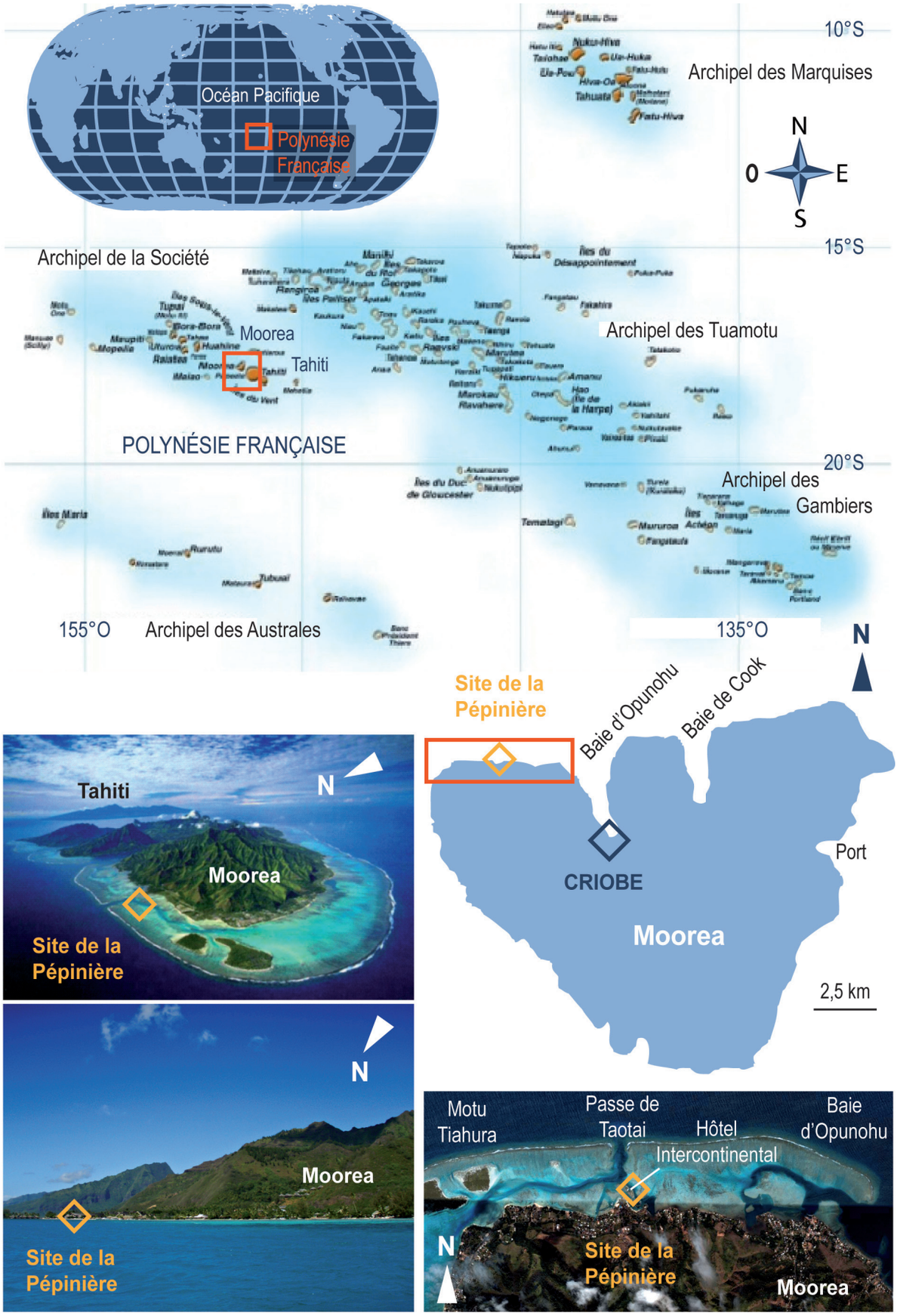


Figure 31 | Position géographique du site de la Pépinière *(légende en page précédente)*

Pour chaque expérience, les boutures ont été prélevées le matin à la Pépinière, et transportées dans les plus brefs délais au CRIOBE, dans des glacières remplies d'eau de mer prélevée à la Pépinière. La température a été maintenue constante durant le transport (variations inférieures à 0,4°C), et les boutures ont été utilisées au plus tard 1h30 après leur prélèvement. À l'arrivée au CRIOBE, soit les boutures ont été directement utilisées (mesure des rapports C:N:P et RMN), soit elles ont été transférées immédiatement dans des aquariums de 12 litres, remplis d'eau de mer filtrée (0,45 µm), récoltée la veille à la Pépinière, et chauffée à 27,5 ± 0,2°C. Les boutures ont été laissées 1 heure dans ces aquariums pour s'y acclimater, avant que les expériences d'absorption de PID et de POD ne commencent.

Mesure de l'absorption de phosphore

Le dispositif utilisé pour mesurer l'absorption de PID et de POD est le même que celui décrit dans le chapitre 1 (pages 65-66). L'éclairement a été fixé à 220 ± 20 μmol m^{-2} s^{-1}, et la température a été régulée à 27,5 ± 0,2°C. Cinq boutures ont été utilisées pour chaque mesure, chacune placée dans un bécher différent, et un bécher sans corail a été utilisé comme contrôle. Des prélèvements ont été effectués dans chaque bécher toutes les 30 minutes durant 120 minutes.

Absorption de PID seul

Le protocole suivi pour mesurer l'absorption de PID est le même que celui décrit dans les articles 1, 2 et 3. Le taux d'absorption de PID a été mesuré en présence de six enrichissements en PID différents : + 0,0 ; + 0,5 ; + 1,0 ; + 2,0 ; + 3,0 et + 4,0 µmol L^{-1} (avec du KH_2PO_4). Il faut rajouter à ces enrichissements la concentration de PID déjà présente dans l'eau de mer filtrée utilisée (0,70 ± 0,03 µmol L^{-1}, tableau 6). Les résultats ont été normalisés par le contenu en zooxanthelles, en chlorophylles et en protéines des coraux, puis modélisés selon l'équation de Michaelis-Menten (équation 1, page 74).

Absorption de PID en présence d'ammonium

De la même façon, le taux d'absorption de PID a également été mesuré en présence d'enrichissements en ammonium : + 0,0 ; + 1,0 et + 4,0 µmol L^{-1} (avec du NH_4Cl). Ces taux d'absorption ont été mesurés avec un enrichissement en PID de + 3,0 µmol L^{-1}. Il faut rajouter à ces enrichissements les concentrations de PID et d'ammonium déjà présentes dans l'eau de mer filtrée utilisée (0,70 ± 0,03 µmol L^{-1} pour le PID, et 0,07 ± 0,02 µmol L^{-1} pour l'ammonium, tableau 6). Les résultats, également normalisés par le contenu en zooxanthelles, en chlorophylles et en protéines des coraux, ont été traités par application d'un modèle de régression linéaire.

Absorption de POD

L'APA a été mesurée selon le protocole décrit dans l'article 4 et le chapitre 3, avec des concentrations en pNPP de 0,5 ; 50 ; 250 ; 500 et 1000 µmol L^{-1}.

Mesure du contenu en phosphore

Rapport C:N:P

Le rapport C:N:P a été mesuré sur cinq grosses boutures, selon le protocole décrit dans l'article 6.

Composition en phosphore en RMN

La composition en phosphore de deux grosses boutures a été observée par RMN,

selon le protocole décrit dans l'article 5 et le chapitre 4. Seuls les tissus de l'hôte ont été observés.

3 Résultats

Absorption de phosphore

Absorption de PID seul

Comme dans les expériences du chapitre 2, les résultats ont montré que l'absorption du PID est dépendante de la concentration du PID dans l'eau (figure 32), avec un modèle mathématique de type cinétique de Monod (page 74). Le *K* obtenu est de 1,77 ± 0,85 µmol L^{-1}, auquel il faut rajouter le niveau de base de PID présent dans l'eau de mer à la Pépinière (0,70 ± 0,03 µmol L^{-1}). Le *K* corrigé est donc de 2,47 ± 0,85 µmol L^{-1}.

Absorption de PID en présence d'ammonium

Les résultats obtenus ont montré que l'absorption de PID est plus rapide en présence d'un enrichissement en ammonium dans l'eau (figure 33).

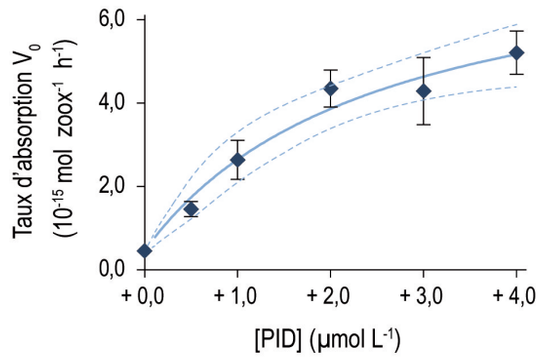
Absorption de POD

De même que dans les expériences du chapitre 3, le recyclage du POD par l'activité phosphatase alcaline de l'hôte a varié avec la concentration de pNPP introduite (figure 34), selon l'équation de Michaelis-Menten. Le K_m obtenu est de 74,8 ± 36,5 µmol L^{-1}.

Contenu en phosphore

Rapports C:N:P

Les rapports C:N:P mesurés pour les coraux de la Pépinière sont présentés dans le tableau 7, où ils sont comparés à ceux de la littérature.



R^2 = 0,64
V_{max} = 7,40 ± 1,49 10^{-15} mol zoox^{-1} h^{-1}
K = 1,77 ± 0,85 µmol L^{-1}
K (corrigé) = 2,47 ± 0,85 µmol L^{-1}

Figure 32 | Absorption de PID seul
Effet de l'enrichissement en PID sur son absorption par *P. damicornis*. Le *K* doit être corrigé avec la concentration initiale de PID présente dans l'eau de mer filtrée (0,70 ± 0,03 µmol L^{-1}). Les pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%.

Composition en phosphore en RMN

Les résultats obtenus en RMN du ^{31}P pour la composition en phosphore des tissus de l'hôte *P. damicornis* sont présentés sur la figure 35. Le contenu en phosphate mesuré[59] est de 75,3 ± 3,1 %, et le spectre est comparé à celui de l'hôte *S. pistillata* fortement nourri (59,2% de phosphate) sur la figure 35. On observe une forte similitude avec les spectres obtenus pour *S. pistillata* au CSM, avec notamment l'absence de polyphosphates (zone sans pics non représentée à droite des spectres de la figure 35). Cependant, une moins grande diversité de phosphonates a été observée chez *P. damicornis*.

[59] On rappelle que, comme expliqué dans le chapitre 4, **le contenu en phosphate** des tissus de l'hôte est exprimé en pourcentage (de phosphate) par rapport au pic de phosphonate à 21,2 ppm, qui a lui aussi été retrouvé dans les *P. damicornis* examinés à la Pépinière.

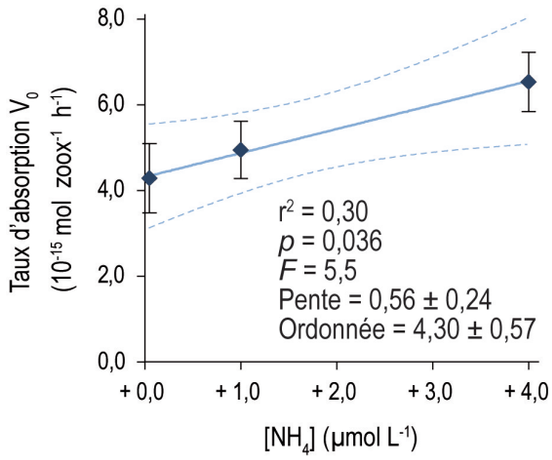


Figure 33 | Absorption de PID en présence d'ammonium

Absorption de PID (enrichissement initial de 3,0 µmol L^{-1}) par *P. damicornis* en présence d'ammonium. Les pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%.

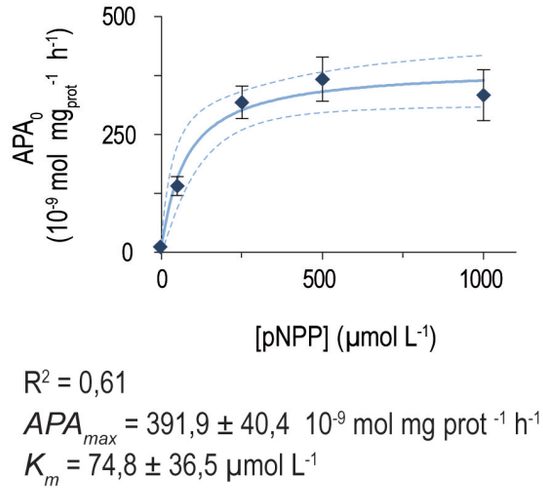


Figure 34 | Absorption de POD

Effet de la concentration en pNPP sur son hydrolyse par l'APA de *P. damicornis*. Les pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%.

Tableau 7 | Rapports C:N:P (*tableau en page suivante*)

Rapports C:N:P de l'hôte et des zooxanthelles des colonies de *P. damicornis* de la Pépinière (ligne 1) comparés aux valeurs de la littérature pour le même corail (ligne 2, Muller-Parker *et al.*, 1994), ou pour des *S. pistillata* (lignes 4 et 5, Godinot *et al.*, 2011). Les *P. damicornis* de l'étude de Muller-Parker *et al.* (1994) proviennent d'un récif Hawaiien présentant des concentrations de nutriments décrites comme inférieures à 1 µmol L^{-1} (site caractérisé d'oligotrophe, sans plus de précisions sur les concentrations de chaque nutriment). Les *S. pistillata* sont ceux présentés dans l'article 6, avec un enrichissement en PID de 0,5 µmol L^{-1} (ligne 4) et le traitement non enrichi (ligne 5). Les lignes 3 et 6 comparent pour chaque espèce les coraux contrôle (lignes 2 et 5) et les coraux des lignes 1 et 4, en prenant les coraux contrôle pour référence de la tendance donnée | ● : pas de différences | ▼ : diminution | ▲ : augmentation.

Figure 35 | Composition en phosphore (*figure en page suivante*)

Observation en RMN du ^{31}P de la composition en phosphore de l'hôte *P. damicornis* du site de la Pépinière (en bas, bleu foncé) comparé à un hôte de *S. pistillata* fortement nourri (en haut, bleu ciel). La flèche 1 représente le standard APP (0,5 µmoles), la flèche 2 le phosphate, et la flèche 3 le pic de phosphonate à 21,2 ppm. Le pourcentage de phosphate par rapport à ce dernier pic est indiqué à droite du pic de phosphate. Le spectre du haut provient de l'article 5, figure 7A.

		Hôte			Zooxanthelles		
	P. damicornis	*C:P*	*N:P*	*C:N*	*C:P*	*N:P*	*C:N*
1	**Cette étude** Site de la Pépinière	136 ± 8	24,0 ± 1,0	5,7 ± 0,1	255 ± 41	27,6 ± 2,8	9,2 ± 1,3
2	**Muller-Parker *et al.* (1994)** Contrôle	172 ± 35	26,6 ± 4,4	6,4 ± 0,4	365 ± 49	21,4 ± 3,1	19,7 ± 4,0
3	**Tendance la Pépinière**	●	●	▼	▼	▲	▼
	S. pistillata	*C:P*	*N:P*	*C:N*	*C:P*	*N:P*	*C:N*
4	**Godinot *et al.* (2011)** Enrichis en PID	389 ± 73	58 ± 10	6,8 ± 0,1	411 ± 55	56 ± 7	7,3 ± 1,2
5	**Godinot *et al.* (2011)** *Contrôle*	433 ± 47	66 ± 6	6,6 ± 0,2	551 ± 58	87 ± 8	6,3 ± 1,3
6	**Tendance enrichis en PID**	●	●	●	▼	▼	●

Tableau 7 | Rapports C:N:P (*légende en page précédente*)

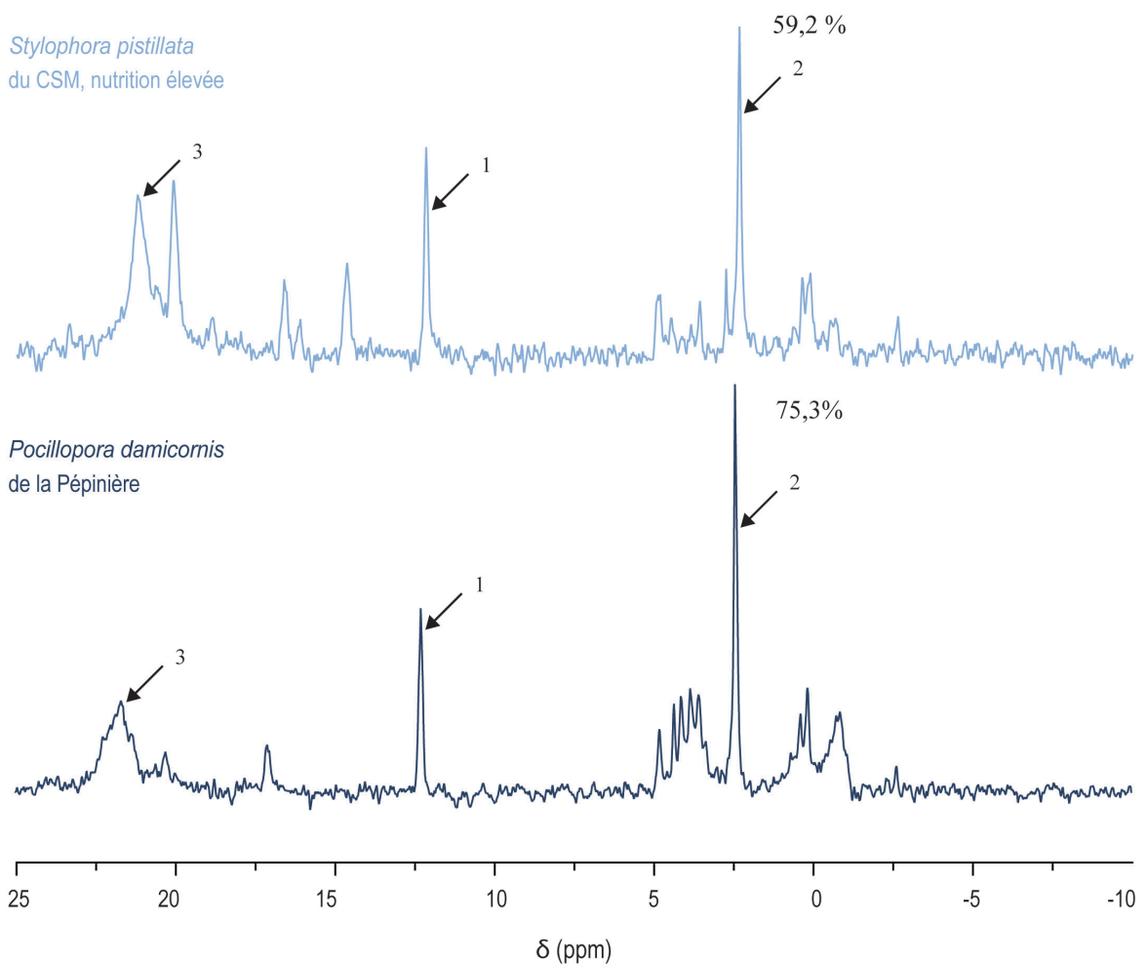


Figure 35 | Composition en phosphore (*légende en page précédente*)

4 Discussion

Limitation par les nutriments

Les résultats obtenus confirment les hypothèses émises au début de ce chapitre, ainsi que l'exposent les paragraphes qui suivent.

Pas ou peu de limitation par le phosphore...

Les *K* relativement élevés mesurés pour le PID (K = 2,47 ± 0,85 µmol L^{-1}) et le POD (K_m = 74,8 ± 36,5 µmol L^{-1}), ainsi que le contenu élevé en phosphate intracellulaire observé en RMN (75,3 ± 3,1 %, i.e. plus que dans des coraux fortement nourris au CSM), sont cohérents avec les concentrations relativement élevées de DIP (0,70 ± 0,03 µmol L^{-1}) et de DOP (?? ± ?? µmol L^{-1}) mesurées sur le récif. Ces résultats suggèrent que les coraux de la Pépinière sont relativement peu limités par le phosphore.

De plus, le rapport C:P mesuré pour les zooxanthelles est relativement faible par rapport à celui rapporté auparavant pour *P. damicornis* (Muller-Parker *et al.*, 1994). Or, dans le chapitre 5, il a été montré qu'un enrichissement en PID de *S. pistillata* entraîne une diminution du rapport C:P des zooxanthelles. Cette comparaison suggère donc également que les coraux ne manquent pas de phosphore à la Pépinière. En outre, le rapport C:N:P des zooxanthelles de La Pépinière est plus proche du rapport 106:16:1 de Redfield que la rapport C:N:P des zooxanthelles de *S. pistillata* du CSM, renforçant l'hypothèse que les coraux de la Pépinière sont plutôt proches de l'équilibre nutritif sur ce site mésotrophe.

... mais une limitation par l'azote...

Le fait que l'absorption de PID ait augmenté en présence d'ammonium indique que les coraux de la Pépinière manquaient probablement d'ammonium pour utiliser au maximum le PID présent dans l'eau. Ce résultat est cohérent avec la très faible concentration d'ammonium dans l'eau à la Pépinière (0,07 ± 0,02 µmol L^{-1}), et suggère que les coraux de la Pépinière sont plus limités par l'azote que par le phosphore.

... malgré une forte concentration de nitrate

La présence d'une forte concentration de nitrate dans l'eau (0,83 ± 0,07 µmol L^{-1}) ne semble pas avoir évité la limitation par l'azote des coraux. Cela suggère que les *P. damicornis* de la Pépinière n'ont pas une forte activité de l'enzyme permettant d'utiliser le nitrate, la nitrate réductase, voire que cette enzyme est inhibée dans leurs zooxanthelles (annexe A). Cela est cohérent avec le fait que le nitrate est considéré comme une source d'azote peu importante pour les coraux (D'Elia *et al.*, 1983; Domotor et D'Elia, 1984; Wilkerson et Trench, 1986; Grover *et al.*, 2003).

Néanmoins, il a également été rapporté que la nitrate réductase est surtout inhibée par des concentrations fortes d'ammonium (Grover *et al.*, 2003), ce qui n'est pourtant pas le cas au site de la Pépinière. Ainsi, l'hypothèse que le nitrate ne représente pas une source d'azote significative, ou suffisante, pour les coraux de la Pépinière, reste à confirmer expérimentalement par des mesures d'absorption de ce nutriment.

Techniques testées sur le terrain

Le but de la mission à Moorea a également été de tester directement sur le terrain cinq des techniques présentées dans les chapitres précédents, et qui permettent d'évaluer la limitation des coraux par le phosphore ou l'azote : la mesure du taux d'absorption de PID, seul et en présence d'ammonium, la mesure du taux d'absorption de POD, la mesure du rapport C:N:P de l'hôte et des zooxanthelles, et l'observation en RMN du ^{31}P. Les résultats présentés dans ce chapitre suggèrent que les techniques d'étude les plus indicatives d'une limitation par les nutriments sont : la mesure des taux d'absorption d'un nutriment en présence d'un autre nutriment (technique de double enrichissement), et l'analyse par RMN. Ces deux techniques sont réalisables sur le terrain, mais présentent des avantages et des inconvénients.

La technique de double enrichissement nécessite d'évaluer au préalable les paramètres cinétiques d'absorption du nutriment étudié, afin de pouvoir ensuite se placer à une concentration saturante de ce nutriment lors des mesures en présence d'un autre nutriment. Ces mesures sont donc relativement longues à effectuer. Ces mesures nécessitent de plus du matériel qu'il n'est pas forcément facile de trouver sur le terrain (agitateurs magnétiques multipostes, système de pompes et de régulation de la température, centrifugeuse, spectrophotomètre et spectrofluorimètre). Cependant, la technique de double enrichissement a donné lieu à des résultats facilement interprétables lors de cette thèse, et elle ne nécessite pas de calibration[60] préalable, ce qui fait tout son avantage.

La préparation d'échantillons à des fins d'analyse par RMN ne nécessite, quant à elle, que peu de matériel sur le terrain (plaque chauffante, centrifugeuse, lyophilisateur) et est relativement rapide à mettre en place (une journée), mais nécessite d'avoir accès à une plateforme de spectrométrie de retour de mission... Elle nécessite, de plus, de pouvoir au préalable calibrer la réponse de l'espèce de corail étudiée à un enrichissement en PID.

Malgré leurs inconvénients, ces deux techniques ont pu être mises en place sur le terrain, et ont donné des résultats cohérents avec le caractère mésotrophe du site choisi pour l'étude. Ces deux techniques constituent donc des indicateurs prometteurs pour étudier la limitation en nutriments, et surtout en phosphore, en milieu récifal.

Toutefois, pour évaluer de manière plus exhaustive la limitation par les nutriments sur le terrain, il aurait été intéressant de pouvoir également mesurer les taux d'absorption d'ammonium et de nitrate, seuls et en présence de PID. Ces mesures de taux d'absorption étant très chronophages, il n'a pas été possible de toutes les réaliser durant les trois semaines de la mission.

[60] On entend par **calibration** la nécessité d'obtenir au préalable des résultats dans diverses des conditions expérimentales, afin de pouvoir ensuite interpréter les résultats obtenus. C'est par exemple le cas pour les mesures des rapports C:N:P (qui ne veulent pas dire grand chose sans point de comparaison) et pour la RMN (il a fallu établir la variabilité du pic intracellulaire de phosphate et le relier aux conditions environnementales pour pouvoir interpréter les résultats obtenus à Moorea.

Comparaison avec les résultats obtenus au CSM

Avant toute chose, il convient de noter que, bien qu'il s'agisse d'espèces apparentées, les coraux utilisés à Moorea sont différents de ceux du CSM, ce qui peut constituer un biais dans les analyses et rend délicate, voire impossible, une stricte comparaison des résultats obtenus à Moorea et au CSM dans des conditions similaires. Toutefois, une comparaison globale de l'ensemble des résultats obtenus reste possible, en tenant compte des différences entre les disponibilités en nutriments dissous du CSM et de la Pépinière.

Ainsi, au CSM, où la concentration en PID est 10 fois plus faible que la concentration en ammonium (0,05 et 0,50 µmol L^{-1} respectivement), les coraux sont plutôt limités par le phosphore pour leur métabolisme. En particulier, l'absorption d'ammonium est limitée par la disponibilité du PID, tandis que l'absorption de PID est indépendante de la concentration en ammonium. Au contraire, à Moorea, où le rapport entre concentration en PID et en ammonium est inversé (0,70 et 0,07 µmol L^{-1} respectivement), les résultats sont eux aussi inversés : les coraux semblent plutôt limités par l'ammonium, et l'absorption de PID est dépendante de la concentration d'ammonium.

5 Schéma bilan

La figure 36 présente un bilan des résultats obtenus dans ce chapitre.

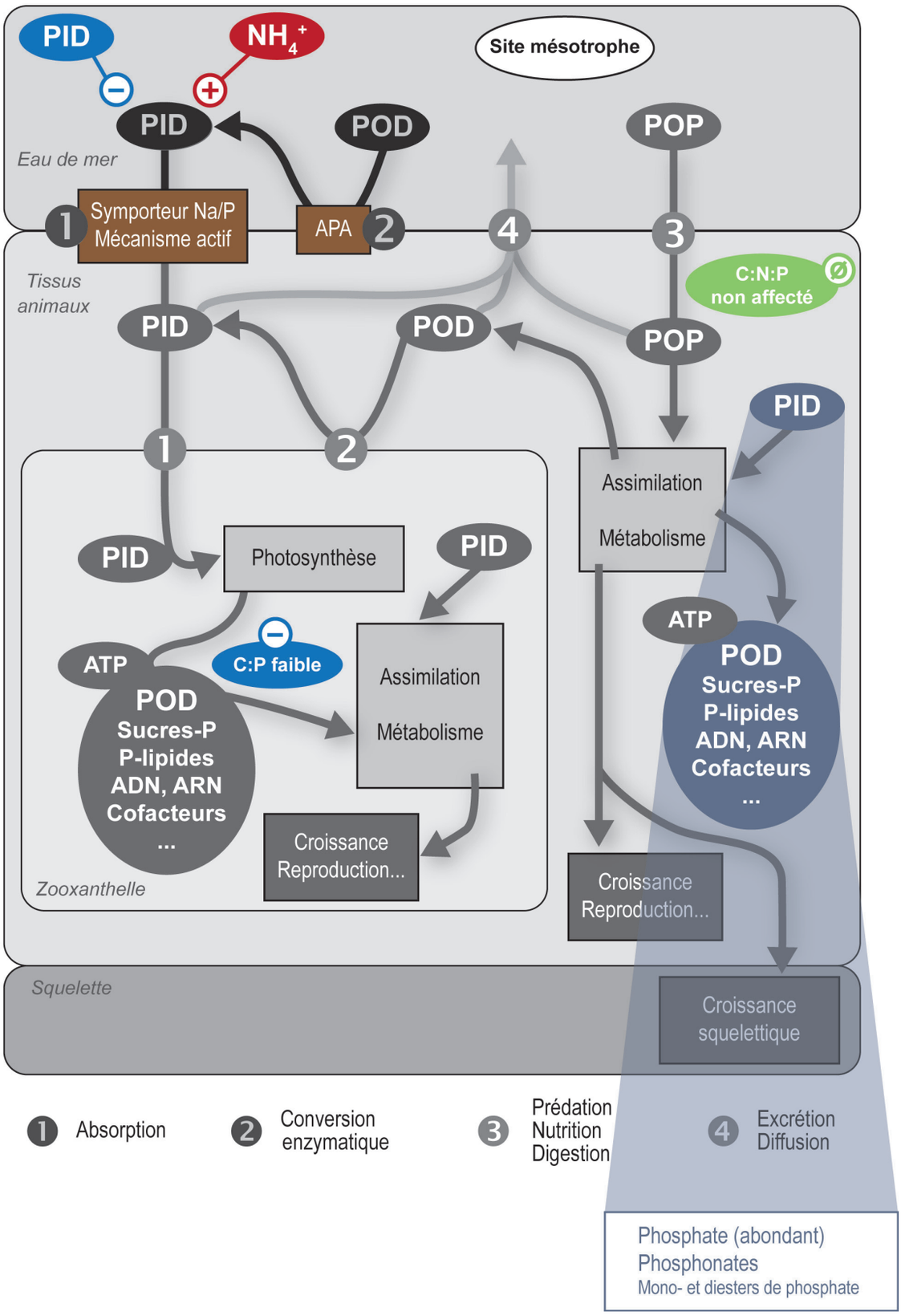


Figure 36 | Bilan de l'absorption et de la composition en phosphore à la Pépinière
Les résultats acquis dans le chapitre 6 sont résumés en couleur, sur la base de la Figure 13 (passée en tons de gris pour plus de lisibilité). Vert : paramètre non affecté par les conditions mésotrophes. Rouge : paramètre positivement affecté par les conditions mésotrophes. Bleu : paramètre négativement affecté par les conditions mésotrophes. Noir : voies métaboliques considérées. Bleu-gris : stocks de phosphore observés, et dont la composition est donnée dans les encadrés en bas de la figure.

Chapter 7

General discussion and perspectives: phosphorus metabolism and limitation within the symbiosis

Abstract

The main aim of this work was to assess the metabolic phosphorus demand of scleractinian corals, and the use of the various dissolved forms of phosphorus. If most previous studies have focused on nitrogen limitation, the results obtained in this work suggest that the symbiotic association can also be limited by phosphorus. Indeed, under oligotrophic conditions, the high uptake rates of DIP and DOP, the adaptation of DIP transporters and of APA to micromolar phosphorus concentrations, as well as the increase in photosynthesis and skeletal growth rate observed with a DIP enrichment, are in favor of a possible phosphorus limitation of the energetic metabolism of corals. Indirect results were also obtained on nitrogen during this work, which suggest that both nutrients are probably co-limiting the symbiosis, with nitrogen mostly limiting biomass and growth, while phosphorus mostly limits metabolism. Results also demonstrated that DIP and DOP uptake are highly regulated processes, influenced by the availability of the various phosphorus sources, in and out of the symbiosis, and by environmental parameters (light, pH, temperature, presence/absence of nitrogen). Finally, this work highlighted the fate of phosphorus within the symbiotic association, by determining the compounds in which phosphorus occurs in host tissues and zooxanthellae cells, and by assessing the physiological parameters impacted by DIP enrichment. Additionally, two innovative indicators were developed during this work to assess the nutrient limitation of corals in the field: double nutrient enrichments and ^{31}P-NMR. To summarize the results obtained, a balance of the contribution of DIP, DOP, and POP, to the uptake of phosphorus of the symbiosis, was calculated. It showed that these three sources each contribute c.a. 100 nmol of P cm^{-2} d^{-1}, but that POP is likely the predominant form of phosphorus used among the three. It also highlights the variability of this budget with environmental conditions, and the main perspective of this work is to complete this phosphorus budget in the context of global change.

Chapitre 7

Discussion générale et perspectives : métabolisme du phosphore et limitation de la symbiose

Résumé

L'enjeu principal de cette thèse a été d'évaluer les besoins métaboliques en phosphore des coraux scléractiniaires, et l'utilisation des différentes formes dissoutes du phosphore. Si la plupart des études se sont auparavant focalisées sur la limitation en azote, les résultats obtenus durant cette thèse suggèrent qu'il existe également une limitation des coraux par le phosphore. En effet, en conditions oligotrophes, les taux d'absorption de PID et de POD élevés, l'adaptation des transporteurs de PID et de l'APA à des concentrations micromolaires de phosphore, ainsi que l'augmentation de la photosynthèse et de la croissance squelettique des coraux en présence d'un enrichissement en PID, sont des indices en faveur d'une possible limitation par le phosphore du métabolisme énergétique de la symbiose. Des résultats indirects ont également été obtenus sur l'azote, et suggèrent que les deux nutriments limitent conjointement la symbiose, avec surtout une limitation de la biomasse et de la croissance par l'azote, et une limitation du métabolisme par le phosphore. Les résultats obtenus ont également démontré que l'absorption du PID et du POD sont des processus extrêmement régulés, aussi bien par la disponibilité des diverses sources de phosphore au sein et hors de la symbiose, que par les paramètres environnementaux (lumière, pH, température, présence/absence d'azote). Enfin, cette thèse a mis en évidence le devenir du phosphore absorbé dans la symbiose, en déterminant les molécules au sein desquelles se trouve le phosphore dans la symbiose, et en évaluant les paramètres physiologiques modifiés par un enrichissement en PID. De plus, deux indicateurs innovants ont été mis en place durant cette thèse pour évaluer la limitation des coraux par les nutriments sur le terrain : la technique de double enrichissement et la RMN du ^{31}P. A l'issue de ces travaux, il a été possible de réaliser un bilan de la contribution du PID, du POD et du POP, à l'absorption de phosphore par la symbiose. Ce bilan montre que ces trois sources apportent chacune environ une centaine de nmol de P cm^{-2} j^{-1}, mais que la contribution du POP est sans doute majoritaire par rapport à celles du POD et du PID. Ce bilan met aussi en évidence la variabilité des contributions en fonction des conditions environnementales, et la perspective majeure de cette thèse est de le compléter dans le contexte du changement global.

Figure 37 | Coucher de soleil concluant la mission de terrain en Polynésie Française

1 Rappel des enjeux et objectifs de cette thèse

L'enjeu principal de cette thèse a été d'évaluer les besoins en phosphore des coraux scléractiniaires, et l'utilisation des différentes formes dissoutes du phosphore. Les trois objectifs développés tout au long des chapitres de cette thèse ont été les suivants :

- 1. examiner l'absorption de phosphore dissous par les coraux sous diverses conditions environnementales (approche 1, physiologique et biochimique | chapitres 2, 3 et 6) ;
- 2. déterminer la composition en phosphore des symbiotes et de l'hôte (approche 2, stœchiométrique | chapitres 4, 5 et 6) ;
- 3. évaluer les paramètres physiologiques intervenant dans le devenir du phosphore absorbé par la symbiose (approche 3, expérimentale | chapitres 4 et 5).

De plus, un examen critique des outils permettant de déterminer les processus métaboliques limités par le phosphore a été réalisé.

Les résultats de ce travail de thèse ont permis d'apporter de nouvelles informations sur i) la limitation en phosphore des coraux, ii) la régulation de l'absorption du phosphore dissous par les conditions environnementales (résumées sur la figure 38), et iii) le devenir du phosphore absorbé dans la symbiose. Ces trois aspects sont discutés dans les paragraphes qui suivent. Ce chapitre se termine par un bilan chiffré de l'importance relative des diverses sources de phosphore (PID, POD et POP) pour les coraux (approche 4, mathématique).

2 Limitation par le phosphore dans la symbiose

Alors que la plupart des études sur la limitation des coraux par les nutriments se sont concentrées sur l'azote et ont conclu à une limitation par ce nutriment (Muscatine *et al.*, 1989; Rees, 1991; Falkowski *et al.*, 1993), cette thèse s'est au contraire attachée à évaluer la possible limitation en phosphore des coraux. Les résultats obtenus démontrent que la symbiose corallienne peut effectivement être limitée par le phosphore.

Limitation en phosphore

Les taux d'absorption de PID et de POD relativement élevés, et l'adaptation des transporteurs de PID et des phosphatases alcalines à des concentrations micromolaires de phosphore (chapitres 2 et 3), sont des indices en faveur de forts besoins métaboliques en phosphore, et d'une limitation possible de la symbiose par ce nutriment. C'est particulièrement le cas pour les symbiotes, qui présentent de faibles K à la fois pour le PID ($K = 0{,}57 \pm 0{,}18$ µmol L^{-1}) et le POD ($K = 7{,}6 \pm 1{,}6$ µmol L^{-1}). Concernant le POD, le fait que l'expression des phosphatases alcalines de l'hôte soit indépendante de la présence des symbiotes est un indice supplémentaire de limitation en phosphore.

Enfin, l'augmentation de la photosynthèse et de l'efficacité photosynthétique avec le PID (chapitre 5), démontrent que le phos-

phore est un élément limitant pour le métabolisme énergétique des symbiotes, en accord avec l'abondance de cet élément dans des molécules telles que l'ATP et l'ARN. De plus, la diminution des rapports C:P et N:P des zooxanthelles avec l'enrichissement, ainsi que l'augmentation du contenu en phosphore et du taux de croissance spécifique des zooxanthelles, suggèrent que les symbiotes sont également limités par le phosphore pour leur croissance. Cette limitation a été partiellement atténuée par l'enrichissement en PID.

La conclusion d'une limitation du métabolisme énergétique des coraux par le phosphore est en accord avec les conclusions d'études précédentes (Miller et Yellowlees, 1989; Belda *et al.*, 1993), et cohérente avec la distribution du phosphore au sein des molécules du vivant (ATP, ARN).

Limitation conjointe en phosphore et en azote

Les résultats obtenus au cours de cette thèse permettent également d'obtenir des informations, directes et indirectes, sur une éventuelle limitation en azote de la symbiose, qu'elle soit concomitante ou alternative à la limitation en phosphore.

Ainsi, dans le chapitre 2 et l'annexe A, l'absence d'augmentation de l'absorption de PID en présence d'azote, et l'augmentation de l'absorption d'azote en présence de PID, sont des indices directs en faveur d'une plus forte limitation par le phosphore que par l'azote, en accord avec les hypothèses de Jackson *et al.* (1989) et de Miller et Yellowlees (1989). Pour autant, ces résultats n'excluent pas une limitation possible de certaines voies métaboliques par l'azote, dont les taux d'absorption sont également relativement élevés, notamment sous forme d'ammonium (annexe A).

Un autre indice, indirect, sur la limitation en azote, provient des résultats de l'expérience d'enrichissement en PID du chapitre 5. Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation du taux de croissance spécifique des zooxanthelles n'a pas été suffisante pour entraîner une augmentation de leur densité dans les tissus de l'hôte. En effet, la croissance des zooxanthelles a simplement suivi la croissance squelettique de l'hôte, sans la dépasser. De plus, le taux de croissance spécifique des zooxanthelles est resté compris entre 0,03 et 0,04 j^{-1} malgré l'enrichissement en PID, soit environ 10 fois plus faible que le taux de croissance spécifique maximal obtenu en culture, qui est de 0,30 j^{-1} (Chang *et al.*, 1983). Les nutriments disponibles n'ont donc pas suffi pour permettre une croissance équilibrée et optimale des zooxanthelles. Ces résultats indiquent donc que le phosphore n'a pas été le seul élément limitant pour la croissance des zooxanthelles. On peut alors supposer que l'azote a également manqué, d'autant plus qu'un enrichissement en ammonium entraîne généralement une augmentation de la densité des zooxanthelles dans les tissus de l'hôte (Muscatine *et al.*, 1989; Rees, 1991; Falkowski *et al.*, 1993).

Les résultats de cette thèse vont donc dans le sens d'une limitation conjointe par le phosphore et l'azote de la croissance des coraux et de leurs zooxanthelles, avec surtout une limitation de la biomasse et de la croissance par l'azote, et une limitation du métabolisme énergétique par le phosphore.

Variabilité de la limitation en phosphore

Cette limitation du métabolisme par le phosphore semble, par contre, dépendante de la disponibilité des sources de phosphore dans le milieu : ainsi, au CSM, où la concentration en PID est 10 fois plus faible que la concentration en ammonium, les coraux sont plutôt limités par le phosphore pour leur métabolisme. Au contraire, à Moorea, où le rapport entre concentration en PID et en ammonium est inversé, les résultats ont montré que l'ensemble des paramètres mesurés reflète la forte teneur en phosphore du site de la Pépinière, et suggère une plus forte limitation par l'azote que par le phosphore sur ce récif mésotrophe. Ces résultats s'opposent donc à l'hypothèse de Belda selon laquelle la limitation en phosphore est constitutive et relativement indépendante de la présence de phosphate dans l'eau, tandis que seule la limitation en azote est fonction de sa disponibilité dans le milieu (Belda *et al.*, 1993).

Techniques d'étude de la limitation

Cette thèse a également permis de développer les outils permettant d'évaluer les déficiences en nutriments de la symbiose. Ainsi, la limitation a été étudiée par la mesure des taux d'absorption de nutriments, seuls ou lors d'un double enrichissement, par la mesure de la composition élémentaire (C:N:P), par l'observation de la répartition du phosphore dans les molécules de la symbiose en RMN du ^{31}P, et par la mesure de divers paramètres physiologiques en présence et en l'absence de phosphore.

Deux indicateurs efficaces

Il ressort des expériences effectuées sur le terrain à Moorea que la mesure des taux d'absorption de nutriments avec la technique de double enrichissement (mesure du taux d'absorption d'un nutriments en présence/absence d'un autre nutriment) est un indicateur prometteur, relativement facile à mettre en place, quoique chronophage, pour étudier la limitation en nutriments en milieu récifal.

La mesure du contenu en phosphate des tissus hôtes par RMN du ^{31}P représente un indicateur supplémentaire, rapide, mais demandant plus d'investissement technique, pour évaluer la disponibilité du phosphore pour les coraux (même si ce n'est pas là le seul avantage de cet outil spectroscopique de pointe, comme rappelé par la suite en pages 261-262). Les résultats du chapitre 4 ont en effet montré que le contenu en phosphore de la symbiose, et notamment en phosphate intracellulaire, est dépendent des conditions environnementales, en particulier de la disponibilité en phosphore, que ce soit sous forme de PID, de POD ou de POP. Ce résultat, confirmé lors de la mission à Moorea du chapitre 6, fait de l'observation en RMN du ^{31}P de la concentration de phosphate intracellulaire un indicateur de choix pour évaluer les déficiences en nutriments de la symbiose. Mais ce n'est pas là

Un indicateur remis en question

Au contraire, la mesure de l'APA, auparavant présentée comme un bon indicateur de limitation en phosphore (Annis et Cook, 2002), apparaît à l'issue de cette thèse comme un indicateur peu fiable. En effet, s'il est généralement admis que l'APA augmente en cas de limitation en phosphore, le contraire a été observé durant cette thèse. Ainsi, pour une même espèce de corail, *P. damicornis*, l'APA mesurée en conditions oligotrophes au CSM (57,6 ±

7,0 10^{-9} mol P mg $prot^{-1}$ h^{-1} à une concentration de pNPP de 250 µmol L^{-1}) est environ 5,5 fois plus faible que celle mesurée sur le récif mésotrophe de la Pépinière (318 ± 34 10^{-9} mol P mg $prot^{-1}$ h^{-1} à la même concentration de pNPP).

Les résultats de cette thèse apportent ainsi un éclairage nouveau sur la limitation par les nutriments dans la symbiose corallienne. Les deux indicateurs innovants, mis en place pour évaluer la limitation des coraux par les nutriments, devraient permettre de mieux déterminer l'état nutritif des récifs sur le terrain.

3 Régulation de l'absorption de phosphore

Contrairement aux précédentes études qui s'étaient surtout concentrées sur les symbiotes, l'absorption de phosphore, au cours des travaux réalisés durant cette thèse, a été envisagée aussi bien sous l'angle des symbiotes que de l'hôte corallien, en démontrant notamment la présence d'un symporteur sodium/phosphate candidat pour le transport de PID chez l'hôte. L'effet de divers facteurs environnementaux a également été précisé, renforçant ainsi les connaissances scientifiques sur la capacité d'adaptation des coraux aux changements ambiants. Enfin, l'absorption a été caractérisée aux faibles concentrations environnementales, ce qui va permettre d'établir un bilan détaillé des apports de PID et de POD dans la symbiose (à la fin de ce chapitre).

Les résultats obtenus ont démontré que l'absorption du PID et du POD sont des processus extrêmement régulés (figure 38), aussi bien par la disponibilité des diverses sources de phosphore à l'extérieur et à l'intérieur de la symbiose, que par les paramètres environnementaux (lumière, pH, température...).

Cette régulation fine est cohérente avec le fait que le phosphore soit limitant pour le métabolisme énergétique de la symbiose : l'absorption de phosphore dissous est donc sans doute proportionnée aux besoins en phosphore de la symbiose et à l'état de réplétion des stocks internes de phosphore, eux même dépendants des performances métaboliques et physiologiques des coraux dans des conditions environnementales données.

Régulation par la disponibilité des diverses sources de phosphore

Régulation de l'absorption de PID et de POD par la présence de PID

Tout d'abord, pour le PID, son taux d'absorption diminue avec la présence de fortes concentrations de PID dans le milieu. En effet, dans le chapitre 2, le PID a été absorbé respectivement 5,3 et 4,9 fois plus rapidement par des coraux cultivés sans ajout de PID que par des coraux cultivés avec 0,5 et 2,5 µmol L^{-1} de PID durant 8 semaines. En outre, dans le chapitre 6, le K mesuré pour les coraux du récif mésotrophe de la Pépinière (K = 2,47 ± 0,85 µmol L^{-1}) est environ 2,5 fois plus élevé que le K mesuré en conditions oligotrophes au CSM (K = 1,0 ± 0,37 µmol L^{-1}), ce qui indique que l'affinité des coraux pour le PID est plus faible en présence d'une forte concentration de phosphore.

Concernant le POD, des indices sur le lien entre absorption de PID et de POD ont été obtenus par l'utilisation de coraux blanchis. En effet, une APA 6,4 fois plus forte a été mesurée pour des *S. pistillata* blanchis que

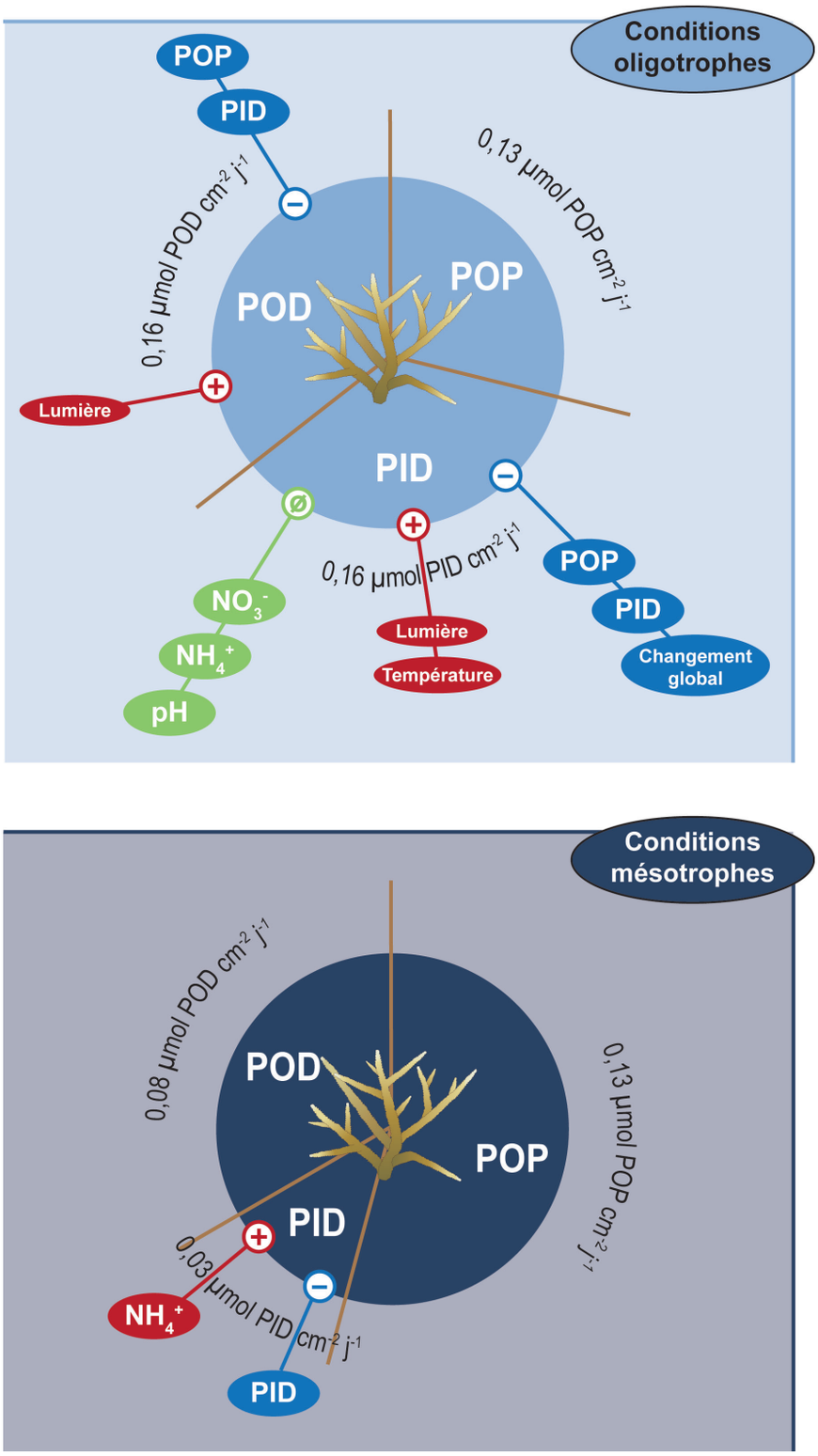


Figure 38 | Bilan des apports de phosphore en conditions oligotrophes et mésotrophes
Les secteurs sur les disques représentent la proportion de phosphore apportée par chacune des trois sources de phosphore, en conditions oligotrophes (haut) et mésotrophes (bas). Les apports de PID, de POD et de POP proviennent du tableau 8. Les facteurs inscrits autour du cercle des apports représentent les paramètres environnementaux testés durant la thèse. Vert : paramètre n'ayant pas d'effet. Rouge : paramètre ayant un effet positif. Bleu : paramètre ayant un effet négatif.

pour des *S. pistillata* symbiotiques. L'hypothèse émise est que les apports continus de PID, dus à la présence des zooxanthelles, ont réduit l'APA chez les coraux symbiotiques, tandis que les carences en PID provoquées par la perte des symbiotes, a été compensée, au moins en partie, par une augmentation de l'utilisation du POD par l'APA. Ceci peut paraître contradictoire avec les résultats discutés en pages 257 - 258. Cependant, l'APA plus forte mesurée à la Pépinière en conditions mésotrophes par rapport aux conditions oligotrophes du CSM représente probablement une adaptation à des concentrations élevées de phosphore sur le long terme au site de la Pépinière, tandis que l'augmentation de l'APA dans les coraux blanchis pourrait être liée à une réponse transitoire des coraux à la perte des symbiotes et à des carences internes en phosphore. Quoiqu'il en soit, la relation entre utilisation du POD et concentrations environnementales de POD et de PID reste à approfondir.

Régulation de l'absorption de PID et de POD par la présence de POP

Dans le chapitre 2, l'utilisation de coraux non nourris durant 1, 3 ou 21 jours a permis de démontrer que le taux d'absorption du PID diminue avec la proximité dans le temps des repas de l'hôte. Pour le POD étudié dans le chapitre 3, la même tendance a été observée, avec une diminution de l'APA chez les coraux nourris par rapport à des coraux non nourris. Il est probable que l'enrichissement régulier en POP apporté par la nutrition soit directement à l'origine de la diminution de l'absorption du PID et du POD chez les coraux nourris. Il a de plus été constaté que, pour le PID, cet effet de la nutrition s'atténue dès 3 jours sans nourriture, ce qui implique que la vidange des stocks de phosphore apportés par la nutrition hétérotrophe se produit relativement rapidement.

Régulation par les autres conditions environnementales

Effet de la lumière

Les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 ont montré que l'absorption de PID et de POD se font à la fois à l'obscurité et à la lumière, avec un effet positif de l'éclairement, autant pour les zooxanthelles que pour l'hôte. Ces résultats ont permis de mettre en avant un lien probable avec la photosynthèse des symbiotes, qui est un processus consommant du phosphate pour générer de l'ATP (Goodman *et al.*, 1953; Hall et Rao, 1987).

Effet du changement global

Les résultats du chapitre 2 ont démontré que le taux d'absorption du PID n'est pas affecté par un changement du pH seul. À l'inverse, une augmentation de température seule (33°C) a entraîné un accroissement de l'absorption de PID. La combinaison d'une température élevée (33°C) et d'un pH faible (7,5) a entraîné une diminution significative de l'absorption de PID en comparaison avec les taux mesurés dans les conditions contrôle (26°C, pH = 8,1).

Ces résultats permettent d'améliorer la compréhension du devenir des récifs coralliens dans le contexte du changement global, et indiquent que les effets cumulatifs du réchauffement des océans et de leur acidification pourraient avoir des conséquences négatives pour le métabolisme du phosphore inorganique chez les coraux.

4 Devenir du phosphore absorbé au sein de la symbiose

Effets physiologiques d'un enrichissement en PID et sites d'accumulation de phosphore dans la symbiose

Les résultats obtenus lors de l'expérience d'enrichissement en PID sur le long terme du chapitre 5 ont permis de compléter les données existantes à propos des effets du phosphore sur la physiologie et la stœchiométrie de la symbiose, de déterminer les sites d'accumulation du PID absorbé dans la symbiose, et d'évaluer les effets du PID sur la croissance, la productivité primaire et le métabolisme des coraux (figure 29).

L'enrichissement en PID a surtout affecté les symbiotes, en entraînant une diminution de leurs rapports C:P et N:P, et de leur contenu en chlorophylles, ainsi qu'une augmentation de leur contenu en carbone, en azote, et surtout en phosphore, de leur taux de croissance spécifique, et de leur efficacité photosynthétique. Le squelette a également été affecté par la présence de concentrations élevées de PID, avec une augmentation du taux de croissance squelettique spécifique et du contenu en phosphore. À l'inverse, peu de changements ont été observés dans les tissus de l'hôte.

Les résultats ont démontré que les zooxanthelles et le squelette sont les deux sites d'accumulation du phosphore inorganique dissous dans la symbiose, avec un enrichissement relativement linéaire dans les symbiotes en fonction de la concentration en PID, tandis que l'incorporation de phosphore dans le squelette semble déjà saturée à une concentration de 0,5 µmol L^{-1} de PID (article 6, figure 4).

Enfin, si la plupart des résultats discutés précédemment ont été bien visibles pour l'enrichissement à 2,5 µmol L^{-1} de PID, cela n'a pas été toujours le cas pour l'enrichissement à 0,5 µmol L^{-1} de PID, initialement choisi pour s'intéresser aux effets d'une eutrophisation plausible en milieu récifal (comme c'est le cas à Moorea par exemple). Les résultats ont montré qu'une telle eutrophisation n'a pas d'impact significatif sur la physiologie de l'hôte (contenu en protéines, stœchiométrie, croissance squelettique). Par contre, un effet se manifeste sur certains aspects du métabolisme des symbiotes (efficacité photosynthétique, stœchiométrie), ainsi que sur la composition élémentaire du squelette (contenu en phosphore). Les résultats obtenus en conditions naturelles à Moorea ont de plus montré qu'une forte concentration de phosphore entraîne une adaptation des taux d'absorption de nutriments et de la composition en phosphore de la symbiose, conformément à ce qui a été observé au CSM dans le chapitre 2.

Répartition du phosphore dans les biomolécules

Si les résultats du chapitre 5 ont permis d'évaluer les sites d'accumulation du phosphore en cas d'enrichissement en PID et le contenu global en phosphore de la symbiose, les résultats obtenus par RMN du ^{31}P dans le chapitre 4 ont, quant à eux, permis de déterminer, dans diverses conditions expérimentales, les détails de la composition en phosphore de la symbiose (figure 27). Il a ainsi été possible de quantifier certains des composés phosphorés des tissus hôtes et des zooxanthelles en culture, notamment le phosphate, et de mettre en évidence l'abondance et la diversité des

phosphonates dans les tissus de l'hôte corallien.

Pour les zooxanthelles en culture, l'enrichissement général en phosphore avec l'âge, auparavant observé chez d'autres algues marines (Sianoudis *et al.*, 1984), a été confirmé, avec notamment une forte augmentation du contenu en phosphate intracellulaire. L'enrichissement en PID du milieu de culture a également entraîné une augmentation du contenu en phosphore, et notamment en phosphate et en polyphosphates. Ce résultat est cohérent avec les forts taux d'absorption de PID des zooxanthelles (chapitre 1). Par contre, l'enrichissement en POD a entraîné une diminution du contenu en phosphore, mais est probablement lié au fait que, contrairement aux zooxanthelles en symbiose, les zooxanthelles en culture présentent une faible APA (Annis et Cook, 2002).

Pour les tissus hôtes, les apports de POP dus à la nutrition ont entraîné une augmentation du contenu en phosphore, et notamment en phosphate intracellulaire. Ce résultat est cohérent avec le fort effet de la nutrition sur l'absorption de PID et de POD observé dans les chapitres 2 et 3. Par contre, la perte des apports autotrophes de PID et de POD, nécessairement entraînée par la perte des symbiotes chez des coraux blanchis, n'a pas donné lieu à une réduction du contenu en phosphore intracellulaire. Les coraux blanchis étant nourris dans l'expérience réalisée, ce résultat traduit la compensation possible entre les apports de POP, de POD et de PID. De plus, comme indiqué dans le chapitre 1, les photosynthétats transférés à l'hôte par les zooxanthelles sont surtout riches en carbone et en azote, et pauvres en phosphore. Il n'est donc pas surprenant de n'avoir observé qu'un très faible impact de la perte des symbiotes sur la composition en phosphore des tissus de l'hôte.

5 Conclusion générale : sources de phosphore et limitation par les nutriments

Les taux d'absorption de PID et de POD obtenus aux concentrations environnementales (chapitres 2, 3 et 6), permettent de calculer et de comparer la quantité de phosphore obtenue à partir de ces deux sources dans des conditions oligotrophes et mésotrophes. Les apports de phosphore dus à l'absorption de POP seront quand à eux estimés à partir de la littérature.

Contributions du PID et du POD aux besoins en phosphore

En conditions oligotrophes

Le fait que l'APA de l'hôte soit fortement diminuée lorsque les apports en PID et en POP sont importants (chapitre 3) pourrait indiquer que le POD n'est pas la source privilégiée de phosphore dans la symbiose. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que l'absorption de POD, qui implique sa conversion enzymatique en PID, est nécessairement plus coûteuse que l'absorption directe de PID. Pour tester formellement cette hypothèse, il aurait fallu réaliser des expériences d'absorption simultanée de PID et de POD en présence d'un double enrichissement en PID et en POD, selon la technique développée dans le chapitre 2. Le bilan établi ci-dessous montre cependant que, en conditions oligotrophes, le PID et le POD semblent contribuer à parts égales aux besoins en phosphore de la symbiose.

En effet, dans les conditions oligotrophes du CSM, le taux d'absorption de PID mesuré à une concentration de 0,50 µmol L^{-1} est de 0,6 10^{-6} mol P mg Chl^{-1} h^{-1} à la lumière, et est 2 fois inférieur à l'obscurité, soit 0,3 10^{-6} mol P mg Chl^{-1} h^{-1} à l'obscurité. Ceci permet de calculer une contribution totale journalière de 0,16 ± 0,01 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le PID[61].

Le taux d'absorption de POD mesuré au CSM à une concentration de 0,50 µmol L^{-1} est de 4,1 ± 0,4 10^{-9} mol P mg $prot^{-1}$ h^{-1} à la lumière, et est 2,2 fois inférieur à l'obscurité, soit 1,9 10^{-9} mol P mg $prot^{-1}$ h^{-1} à l'obscurité. Ceci permet de calculer une contribution totale journalière de 0,16 ± 0,02 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le POD.

En conditions mésotrophes

Dans les conditions mésotrophes de la Pépinière à Moorea, le taux d'absorption de PID mesuré à une concentration de 0,70 µmol L^{-1} est de 0,50 ± 0,11 10^{-15} mol P $zoox^{-1}$ h^{-1}, soit une contribution totale journalière de 0,03 ± 0,01 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le PID[62].

De la même façon pour le POD, le taux d'absorption de POD mesuré à une concentration de 0,50 µmol L^{-1} est de 10 ± 1,4 10^{-9} mol P mg $prot^{-1}$ h^{-1}, soit une contribution totale journalière de 0,08 ± 0,01 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le POD.

Contribution du POP aux besoins en phosphore

Si aucun bilan complet des apports de phosphore dus à la nutrition n'existe à ce jour, quelques études de la littérature permettent d'estimer en partie la contribution des apports de POP. Une étude récente réalisée sur le corail *Galaxea fascicularis* (Wijgerde *et al.*, 2011) a estimé que la digestion extracœlentérique du zooplancton par l'hôte, en présence d'une une forte concentration de proies (4100 proies L^{-1}), apporte une contribution totale journalière de 0,09 ± 0,03 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le POP. Une autre étude a estimé que le POP relargué par les bancs de poissons de la famille des Hæmulidae apporte une contribution totale journalière supplémentaire en POP de 0,02 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le corail *Porites furcata*, et de 0,06 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le corail *Acropora palmata* (Meyer *et al.*, 1983).

Bilan de la contribution des diverses sources de phosphore

Les valeurs citées dans les paragraphes précédents sont résumées dans le tableau 8 et la figure 38. Les valeurs exactes de ce bilan n'ont que peu de sens dans l'absolu, car elles ne sont probablement valables que dans des conditions données et pour une espèce de corail donnée, mais elles donnent un ordre de grandeur des besoins totaux en phosphore de la symbiose en conditions oligotrophes et mésotrophes.

Ainsi, il est intéressant de constater sur le bilan actuel (tableau 8) que les apports des trois sources de phosphore sont globale-

[61] La valeur de **0,16 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le PID** est obtenue en multipliant le taux d'absorption mesuré par la quantité de zooxanthelles par cm^2. La valeur de **0,16 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le POD** est obtenue en multipliant le taux d'absorption mesuré par la quantité de protéines par cm^2. On multiplie ensuite les deux chiffres par 12 heures de jour, et 12 heures de nuit.

[62] De même, la valeur de **0,03 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le PID** et de **0,08 µmol P cm^{-2} j^{-1} pour le POD** sont obtenues en multipliant le taux d'absorption mesuré par la quantité de zooxanthelles par cm^2 ou par la quantité de protéines par cm^2. On multiplie ensuite par 12 heures de jour, et 12 heures de nuit (en considérant que, comme dans les chapitres 2 et 3, le taux d'absorption du phosphore dissous est réduit de moitié durant la nuit).

Source de phosphore	Apports (µmol P cm^{-2} j^{-1})	Référence
PID	***Total : 0,03 à 0,16***	
CSM (*conditions oligotrophes*)	0,16 ± 0,01	Article 1 | Godinot *et al.* (2009)
Pépinière (*conditions mésotrophes*)	0,03 ± 0,01	Chapitre 6
POD	***Total : 0,08 à 0,16***	
CSM (*conditions oligotrophes*)	0,16 ± 0,02	Article 4
Pépinière (*conditions mésotrophes*)	0,08 ± 0,01	Chapitre 6
POP	***Total : 0,11 à 0,15***	
Digestion extracœlentérique	0,09 ± 0,03	Wijgerde *et al.* (2011)
Excrétion des poissons	0,02 à 0,06	Meyer *et al.* (1983)

Tableau 8 | Bilan des apports de phosphore pour la symbiose
Les apports de PID et de POD ont été calculés avec les résultats acquis dans les chapitres 2, 3 et 6. Les apports de POP ne sont listés que pour les deux sources dont la contribution a été rapportée dans la littérature.

ment du même ordre de grandeur (de l'ordre de 0,1 µmol P cm^{-2} j^{-1} chacune). On constate néanmoins que le POP semble être la source majoritaire de phosphore pour la symbiose (0,11 à 0,15 µmol P cm^{-2} j^{-1} estimés dans le tableau 8, mais cette valeur est sans doute sous-estimée). Pour le PID et le POD, leurs importances respectives semblent varier en fonction des conditions environnementales. Ainsi, le POD semble être une source de phosphore plus importante que le PID sur le récif mésotrophe riche en phosphore de la Pépinière, tandis que dans les conditions oligotrophes du CSM, les contributions du PID et du POD sont égales.

6 Perspectives

Le bilan des apports de phosphore dans la symbiose reste à compléter...

... dans le contexte du changement global...

Une des perspectives majeures de cette thèse est de compléter le bilan des sources de phosphore de la symbiose dans le contexte du changement global (augmentation de la température, de la pCO_2 et des concentrations de nutriments), l'un des enjeux cruciaux pour le devenir des coraux à l'issue du 21ème siècle. Ainsi, il reste à caractériser l'effet des facteurs environnemen-

taux sur l'absorption de POP. De plus, pour le PID et le POD, si le bilan établi en figure 38 est relativement complet en conditions oligotrophes, il faut le compléter en conditions mésotrophes, voire eutrophes, car l'élévation des concentrations de nutriments est un problème auquel de plus en plus de récifs frangeants ont, et auront, à faire face. Trois directions principales seraient ensuite à envisager, afin de déterminer si des différences dans la capacité à acquérir des sels nutritifs peuvent expliquer les performances inégales des coraux face au changement global.

Il serait dans un premier temps intéressant d'établir le bilan des sources de phosphore pour plusieurs espèces de coraux tropicaux emblématiques. En effet, il a été démontré que toutes les espèces de corail ne réagissent pas de la même façon aux stress environnementaux. Par exemple, les coraux branchus semblent globalement plus susceptibles au blanchissement que les coraux massifs (Loya *et al.*, 2001). Il est ainsi possible que les performances de ces coraux soient différentes en terme d'acquisition des nutriments, ce qui pourrait être l'une des raisons de la meilleure résistance de certaines espèces. Or cet aspect n'a, à ce jour, jamais été étudié. L'une des perspectives de ce travail sur la limitation en phosphore des coraux est donc d'estimer les besoins en nutriments de coraux dits "résistants" et de coraux dits "susceptibles" au changement global.

Au sein d'une même espèce de corail, il existe également des individus plus résistants que d'autres aux perturbations environnementales. Ainsi, l'espèce de corail massif cosmopolite *Porites lobata* présente des capacités de résistance tout à fait singulières sur certains récifs. Dans le Golfe Persique, où les températures journalières peuvent fluctuer jusqu'à 9°C et où les températures peuvent varier de plus de 25°C sur l'année (avec des minima hivernaux de 11°C et des maxima estivaux de 36°C; Coles, 1997), les *P. lobata* sont adaptés à un environnement thermique hautement variable, semblable à celui qui pourrait prévaloir d'ici la fin du siècle sur la majorité des récifs mondiaux. À l'inverse, sur des récifs où l'amplitude thermique journalière et annuelle est plus faible, comme aux îles Fidji par exemple, il est probable que les *P. lobata* ne survivent pas à des variations semblables à celles ayant lieu à l'heure actuelle dans le Golfe Persique. Ainsi, les coraux de ces deux régions constitueraient des modèles tout à fait adaptés pour poursuivre les travaux entrepris dans cette thèse.

La résistance aux fluctuations thermiques au sein d'une même espèce de corail étant généralement attribuée à la possession de clades de zooxanthelles dits "résistants", cet angle reste également à aborder pour compléter ce travail. En effet, il a été montré que la présence de symbiotes du clade D, considéré comme le clade le plus thermorésistant, permet au corail *Acropora millepora* de gagner 1,5°C de thermorésistance en plus par rapport à des colonies abritant le clade C (Berkelmans et van Oppen, 2006). Dans le cadre du travail ébauché dans cette thèse sur l'importance du clade de zooxanthelles pour l'absorption de POD, les performances du clade D pour l'acquisition de phosphore restent donc à mesurer, afin de déterminer si une absorption de nutriments plus efficaces est l'une des bases de la meilleure thermorésistance des coraux abritant le clade D. Le nombre de clades testés, et de représentants de chaque clade, reste lui aussi à augmenter,

pour obtenir un bilan exhaustif des performances des différents clades.

... et en tenant compte d'autres sources de phosphore

Une autre des perspectives majeures de cette thèse est d'obtenir un bilan chiffré plus exhaustif dans le tableau 8. Il faudra pour ce faire tenir compte des apports issus de sources supplémentaires de POD et de POP, dans diverses conditions environnementales, et notamment en fonction de la concentration en phosphore total dans le milieu.

Pour le POD, il est en effet probable qu'il soit également utilisé sous forme de phosphodiesters, de polyphosphates et de phosphonates, grâce à d'autres phosphatases que celles étudiées dans le chapitre 3 et grâce à des phosphonatases. Ces phosphatases et phosphonatases pourront être étudiées en reprenant la technique utilisée dans le chapitre 3, mais en utilisant d'autres types de substrats que le pNPP.

Pour le POP, il faudra également tenir compte de la digestion intracœlentérique du zooplancton, de la digestion des bactéries contenues dans le mucus et de l'absorption de matière particulaire en suspension. Ces sources pourront être étudiées par des marquages au ^{33}P radioactif de proies et de bactéries.

Les indicateurs et la répartition du phosphore dans les biomolécules du corail

Outre la perspective majeure de l'acquisition de nutriments dans le contexte du changement global, d'autres perspectives se dégagent de cette thèse pour compléter les travaux entrepris sur les indicateurs de limitation et sur la composition en phosphore de la symbiose.

Des indicateurs à améliorer

Premièrement, comme discuté en pages 257 et 260, des mesures supplémentaires d'APA doivent être réalisées pour évaluer l'utilité de cet indicateur sur le terrain, en mesurant l'APA de coraux soumis à des concentrations différentes de phosphore. Il serait par exemple intéressant de compléter les mesures effectuées à la Pépinière par des mesures sur d'autres sites plus ou moins riches en phosphore et en azote de Moorea.

Deuxièmement, la technique de RMN du ^{31}P reste à améliorer pour pouvoir observer non seulement les tissus hôtes, mais aussi les symbiotes fraîchement isolés. Comme discuté en page 176, la technique de filtration, voire de centrifugation sur gradient de Percoll, doivent être testées.

Une catégorie de molécules à examiner de plus près

Il reste enfin à étudier de plus près le rôle des phosphonates dans les tissus hôtes. En effet, les phosphonates forment une catégorie très particulière de biomolécules, et leur diversité et leur abondance dans les tissus de l'hôte suggèrent un rôle particulier pour la biologie du corail. Les phosphonates sont généralement conjugués à des protéines et des lipides (Rosenberg, 1973; Hilderbrand, 1983), et ils pourraient avoir notamment un rôle dans la régulation des propriétés des membranes biologiques (Deslauriers *et al.*, 1982).

Si l'étude de leurs rôles dans les coraux est difficilement réalisable sans connaître les gènes et les étapes impliquées dans leur synthèse, il serait dans un premier temps possible de déterminer précisément la

composition chimique des phosphonates qui ont été observés dans le chapitre 4. Ainsi, si l'AEP n'a pas été retrouvé dans les tissus hôtes de *S. pistillata*, la présence de ses dérivés (méthylaminoéthyl phosphonate, et amino phosphonopropanoate) a été supposée, et reste à vérifier par un ajout dosé de ces composés dans les échantillons de RMN. Des extractions lipidiques pourraient également compléter ces expériences pour vérifier la localisation membranaire de tout ou partie des phosphonates de l'hôte.

Annex A

The uptake of dissolved inorganic nitrogen

Abstract

Dissolved inorganic nitrogen is available in two main forms in coral reefs, ammonium and nitrate, which are typically present at levels below 0.20 and 0.50 µmol L^{-1}, respectively. Their uptake is mainly an active process, and their assimilation involves enzymes expressed in both the host and symbionts (GDH and GS for ammonium), or only in the zooxanthellae (GOGAT for ammonium, NAR, and NIR for nitrate). The objectives of the work presented in this annex were to examine the eventual limitation of nitrogen uptake by the presence of phosphate, and to examine the impacts of global change on this uptake. Results obtained showed that ammonium uptake is enhanced in the presence of DIP in *S. pistillata*, while nitrate uptake was not modified. These results suggest a greater limitation by phosphorus than by nitrogen in the symbiosis. It was also evidenced that the cumulative effects of ocean warming and acidification had no impact on ammonium uptake, while they led to nitrate excretion. Together with the negative impact on phosphate uptake measured in chapter 2, these results highlight the fact that nutrient metabolism within the symbiosis will likely suffer from global change.

Annexe A

L'absorption d'azote inorganique dissous

Résumé

L'azote inorganique dissous est disponible sous deux formes principales au sein des récifs coralliens, l'ammonium et le nitrate, qui présentent respectivement des concentrations typiquement inférieures à 0,20 et 0,50 µmol L^{-1}. Leur absorption est un processus actif, et leur assimilation fait intervenir des enzymes présentes chez l'hôte et les symbiotes (GDH et GS pour l'ammonium), ou chez les symbiotes seulement (GOGAT pour l'ammonium, NAR et NIR pour le nitrate). L'objectif des travaux présentés dans cette annexe a été d'examiner la limitation éventuelle de l'absorption d'azote par le phosphore, et d'examiner les effets du changement global sur cette absorption. Les résultats obtenus ont montré que l'absorption d'ammonium augmente en présence de PID chez *S. pistillata*, tandis que l'absorption de nitrate n'est globalement pas modifiée. Ce résultat est en faveur d'une plus forte limitation de la symbiose par le phosphore que par l'azote. Il a également été mis en évidence que les impacts cumulés du réchauffement et de l'acidification des océans n'ont eu aucun effet sur l'absorption d'ammonium, tandis qu'une excrétion de nitrate a été observée dans ces conditions. En parallèle avec l'effet négatif mesuré pour l'absorption de phosphate dans le chapitre 2, ces résultats impliquent que le métabolisme des nutriments au sein de la symbiose risque certainement d'être remis en question par le changement global.

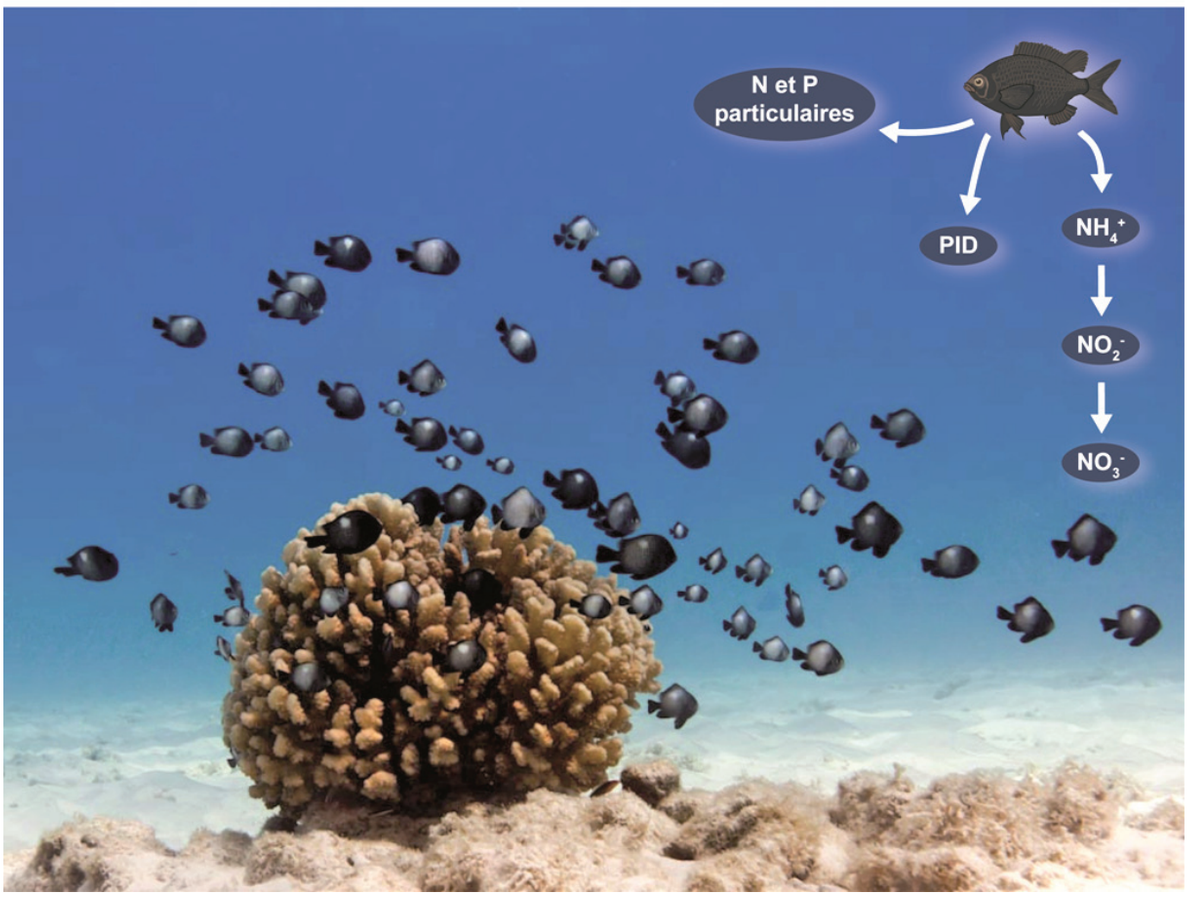


Figure 39 | Colonie de *Pocillopora meandrina* abritant des poissons domino

Colonie de *Pocillopora meandrina* située dans le lagon de Shark Island, au sein de la réserve de Papahanaumokuakea Marine National Monument, Hawaii. Cette colonie abrite des dizaines de poissons domino, *Dascyllus albisella*, qui excrètent des quantités importantes d'azote et de phosphore, qui peuvent être métabolisés par les bactéries (conversion de l'ammonium NH_4^+ en nitrate NO_3^-) et absorbés par les coraux. Photographie : L. Kramer.

1 L'azote inorganique dissous en milieu récifal

Présentation de l'azote en milieu récifal

L'azote a pour symbole chimique N. Son nom latin *nitrogenium* provient du grec *nitron gennan* et signifie "formateur de salpêtre"[63]. C'est le 34ème élément le plus abondant de la croûte terrestre, et le 7ème élément de la classification périodique. Tout comme le phosphore, il s'agit de l'un des blocs de construction indispensable des molécules du vivant. Par contre, contrairement à celui du phosphore, le cycle de l'azote présente une composante atmosphérique importante, notamment avec le diazote, N_2, qui représente 78% des gaz atmosphériques en volume. Ce diazote atmosphérique peut être fixé par certains organismes, dits diazotrophes, qui le convertissent en matière organique. Il s'agit principalement de Cyanobactéries. De plus, contrairement au cycle du phosphore qui est sous l'influence de sa composante abiotique à l'échelle globale et de sa composante biotique à l'échelle des récifs, le cycle de l'azote est principalement déterminé par sa composante biotique (figure 39), tant à l'échelle des récifs coralliens qu'à l'échelle globale (Webb, 1981).

Les coraux trouvent l'azote dans les récifs coralliens sous forme dissoute et particulaire, organique et inorganique. Durant cette thèse, seule les formes inorganiques dissoutes ont été abordées, en lien avec les travaux réalisés sur le PID. L'azote inorganique dissous se présente principalement sous forme d'ammonium[64], NH_4^+, et de nitrate, NO_3^-, avec des concentrations typiquement inférieures à 0,20 µmol L^{-1} pour le NH_4^+, et inférieures à 0,50 µmol L^{-1} pour le NO_3^- (Furnas *et al.*, 1988). Néanmoins, sur certains récifs, les concentrations de NO_3^- peuvent être bien plus élevées, atteignant par exemple 4 µmol L^{-1} à Canton Island (Smith et Jokiel, 1978), et 8 µmol L^{-1} à Guam (Marsh, 1977), deux îles de l'océan Pacifique.

Voies d'absorption et d'assimilation

L'absorption est active

Ammonium et nitrate sont absorbés par des voies actives, et retenus dans la symbiose du fait de la présence des zooxanthelles chez les coraux symbiotiques (Wilkerson et Trench, 1986; Miller et Yellowlees, 1989; Falkowski *et al.*, 1993; Marubini et Davies, 1996; Grover *et al.*, 2002; Grover *et al.*, 2003). Toutefois, pour l'ammonium, l'absorption peut également se faire par diffusion simple, sous la forme d'ammoniac, NH_3, dissous dans l'eau de mer (Miller et Yellowlees, 1989).

[63] Le **salpêtre**, ou nitrate de potassium, de formule chimique KNO_3, se présente sous forme de fibres blanches. C'est l'un des résidus du développement des bactéries dans les endroits humides tels que les caves ou les grottes. Dès le 13ème siècle, il a été utilisé pour fabriquer la poudre à canon. Il fut ensuite utilisé comme remède de la pharmacopée maritime occidentale au 18ème siècle, puis dans les munitions et les engrais par la suite.

[64] En réalité, le taux d'**ammonium** dépend du pH. Au pH actuel de l'eau de mer de 8,1, on trouve 95% d'ammonium NH_4^+ et 5% d'ammoniac NH_3, la base faible conjuguée de l'ammonium.

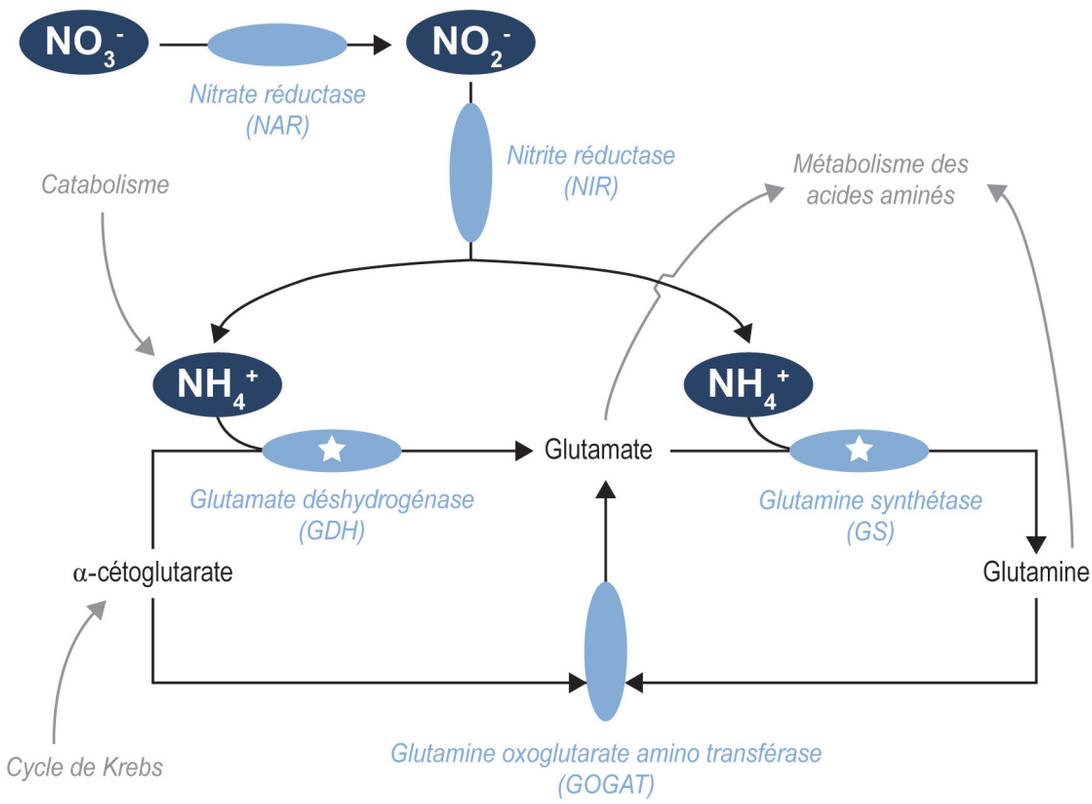


Figure 40 | Voies d'assimilation de l'azote inorganique dissous
Les enzymes intervenant dans l'assimilation de l'ammonium et du nitrate sont indiquées en bleu clair. L'enzyme GOGAT est mentionnée pour son importance indirecte dans l'assimilation de l'ammonium : c'est elle qui permet la régénération du glutamate utilisé par la GS, à partir de glutamine et d'α-cétoglutarate (également nommé oxoglutarate). Les deux enzymes sont d'ailleurs couplées (on parle souvent de GS-GOGAT). De même que les nitrate (NAR) et nitrite (NIR) réductases, la GOGAT n'est présente que chez les zooxanthelles (Falkowski, 1983). Les enzymes présentes à la fois chez l'hôte et les symbiotes, la GS et la GDH, sont marquées d'une ★ blanche sur le schéma. Pour plus de lisibilité, les cofacteurs ne sont pas mentionnés, et les réactions ne sont pas équilibrées. Les liens au reste du métabolisme sont mentionnés en gris.

L'assimilation d'ammonium dépend à la fois de l'hôte et des symbiotes

Une fois absorbé, l'ammonium est assimilé sous forme d'acides aminés selon deux voies : celle de la glutamate déshydrogénase (GDH), et celle de la glutamine synthétase (GS), présentées sur la figure 40. Les deux voies sont présentes à la fois chez l'hôte et chez les zooxanthelles, mais semblent néanmoins plus actives chez l'hôte (Catmull *et al.*, 1987; Miller et Yellowlees, 1989; Yellowlees *et al.*, 1994).

L'assimilation de nitrate reste un phénomène controversé

Le nitrate absorbé est converti en nitrite puis en ammonium avant d'être assimilé

par les voies présentées ci-dessus (figure 40). Cette conversion ne se fait *a priori* que dans les zooxanthelles, et fait intervenir des nitrate et nitrite réductases (Crossland et Barnes, 1977; Miller et Yellowlees, 1989). Néanmoins, l'absorption et l'assimilation de nitrate par les coraux reste controversée (Muscatine *et al.*, 1984; Grover *et al.*, 2003). En effet, malgré des concentrations généralement plus fortes que l'ammonium dans les récifs (D'Elia *et al.*, 1981; Lapointe et Clark, 1992), le nitrate est considéré comme une source moins importante d'azote pour les coraux (D'Elia *et al.*, 1983; Domotor et D'Elia, 1984; Wilkerson et Trench, 1986; Grover *et al.*, 2003). Il semblerait en fait que les enzymes de l'assimilation du nitrate soient inhibées par de fortes concentrations d'ammonium (Grover *et al.*, 2003), ce qui rend l'absorption du nitrate dépendante des niveaux d'azote dans l'eau.

2 Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude

Dans le contexte de la limitation de la symbiose par l'un ou l'autre des nutriments, entre le phosphore et l'azote, l'objectif des travaux présentés dans cette annexe a été d'examiner la limitation éventuelle de l'absorption d'azote par le phosphore, et d'examiner les effets du changement global sur cette absorption.

Ces travaux se basent sur les hypothèses suivantes. 1) L'absorption d'ammonium peut être augmentée en présence de PID, si le métabolisme des coraux est effectivement limité par le phosphore. 2) L'absorption de nitrate, *a priori* fortement dépendante de concentrations en ammonium, est peut-être également limitée par la présence de phosphore, ce qui pourrait expliquer que certains coraux ne semblent pas capables d'absorber le nitrate. On s'attend de plus à ce que 3) le stress associé à une augmentation de la température et de la pCO_2 ait un effet relativement négatif sur l'absorption d'ammonium et de nitrate, comme pour les autres paramètres métaboliques majeurs.

Les paragraphes qui suivent résument les principaux résultats obtenus lors de cette thèse et découlant de ces objectifs et hypothèses. Ces résultats sont inclus dans les articles 2 et 3, au sein desquels ils sont discutés en détail.

3 Effets du phosphate et du changement global sur l'absorption d'azote

Effet de la concentration en phosphate

Cette expérience a visé à aborder de manière directe la question de la limitation par le phosphore ou l'azote dans la symbiose, en complétant les résultats obtenus sur l'absorption de phosphate en présence d'azote. Pour ce faire, l'absorption d'ammonium et de nitrate a été mesurée en présence de phosphate. On rappelle que l'absorption de phosphate n'a pas été modifiée par la présence d'ammonium ou de nitrate (article 2).

Les résultats obtenus ont montré que l'absorption d'ammonium est augmentée en présence de 3,0 µmol L^{-1} de PID, tandis que l'absorption de nitrate n'est globalement pas augmentée dans les mêmes conditions (article 2, figure 5). Ce résultat permet d'affirmer que, dans les conditions de culture testées, la présence de phosphate

permet d'améliorer l'utilisation de l'ammonium dans le milieu, mais *a priori* uniquement sous forme d'ammonium. Ainsi, le phosphore semble plus limitant que l'azote pour la symbiose.

Concernant l'absorption de nitrate, les taux d'absorption relativement forts qui ont été mesurés dans cette étude (article 2, figure 1) permettent de confirmer que le corail *S. pistillata* semble capable d'utiliser cette forme d'azote inorganique dissous, ainsi que l'a montré une précédente étude sur cette espèce (Grover *et al.*, 2003). Ces résultats contredisent donc les conclusions d'une étude antérieure (Muscatine *et al.*, 1984). Outre des niveaux d'ammonium différents entre ces trois études, des différences de disponibilité en PID pourraient également expliquer ces résultats. En effet, les résultats de la présente thèse ont montré que l'absorption de nitrate augmente en présence de faibles niveaux de PID (0,5 µmol L^{-1}, article 2, figure 5).

Effet des changements globaux

Si la chimie du nitrate et de l'ammonium n'est pas (pour NO_3^-), ou très peu (pour NH_4^+) affectée par des variations du pH de l'eau de mer, ni par des variations de la température, les voies d'assimilation de l'azote sont par contre a priori dépendantes de ces deux phénomènes. Même si très peu d'études ont a ce jour été réalisées sur les coraux, il a été montré que l'activité de la GDH de *S. pistillata* est plus élevée à pH 7,3 qu'à pH 8,1 (Rahav *et al.*, 1989). De même, l'activité de la GS, de la GOGAT et de la GDH sont dépendantes du pH chez certaines bactéries marines (Martinez-Bilbao *et al.*, 1988; Ertan, 1992). Pour ce qui est des effets de la température, outre le fait que la plupart des voies enzymatiques des cellules sont fortement dépendantes de la température en général, il a été montré que la GS et la GOGAT présentent une activité moindre en cas de stress de température chez les végétaux supérieurs (Cui *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, afin de tester les effets du changement global sur l'absorption d'azote inorganique dissous par la symbiose corallienne, des boutures ont été cultivées durant 10 jours sous les neuf conditions présentées dans le chapitre 2, puis leurs taux d'absorption d'ammonium et de nitrate ont été mesurés.

Les résultats obtenus ont révélé que les taux d'absorption d'ammonium et de nitrate ne sont pas affectés par un changement du pH seul (article 3, figure 4). À l'inverse, une forte augmentation de température (33°C) a entraîné une diminution importante de l'absorption d'ammonium et de nitrate, allant même jusqu'à une excrétion nette de ces deux nutriments. La combinaison d'une température élevée (33°C) et d'un pH faible (7,5) n'a entraîné aucun effet pour l'ammonium, tandis qu'une excrétion de nitrate a été observée dans ces conditions, en comparaison avec les taux mesurés dans les conditions contrôle (26°C, pH = 8,1).

L'absence d'effet du pH seul sur l'absorption d'ammonium est en accord avec l'absence de variation de cette absorption chez les zooxanthelles du bénitier symbiotique *Tridacna crocea* pour une gamme de pH diminuant de 8,8 à 7,8 (D'Elia *et al.*, 1983). Concernant l'effet négatif de la température sur l'absorption d'ammonium, ce résultat peut être relié à la diminution concomitante de l'activité photosynthétique des coraux lors du stress de température (ar-

ticle 3, figures 2 et 3). En effet, il a été démontré qu'en présence d'un inhibiteur de la chaîne photosynthétique, le DCMU, l'ammonium est excrété et non absorbé par les coraux (Rahav *et al.*, 1989). La diminution de l'activité photosynthétique à 33°C pourrait donc expliquer l'excrétion d'ammonium observée à cette température. Enfin, en présence d'un pH faible et d'une température élevée (pH = 7,5 et 33°C), le retour à un taux d'absorption similaire à celui du contrôle (pH = 8,1 et 26°C) suggère que les effets de l'acidification pourraient compenser les effets négatifs de la température pour l'absorption d'ammonium. Les mécanismes rentrant en jeu sont discutés dans l'article 3.

Bien que les effets cumulés de l'acidification et du réchauffement des océans n'aient pas révélé d'effet négatif sur l'absorption d'ammonium, et aient révélé un effet négatif uniquement sur l'absorption de nitrate – qui reste toutefois une forme d'azote relativement moins importante que l'ammonium pour les coraux –, l'effet négatif mesuré en parallèle sur l'absorption de phosphate dans le chapitre 2 implique que le métabolisme des nutriments au sein de la symbiose risque certainement d'être remis en question par le changement global.

Annex B

Impact of phosphorus on bioerosion

Abstract

Coral reefs are fragile ecosystems. Their persistence depends upon the delicate balance between two antinomic forces: constructive forces on the one hand (with coral growth as the main driver), and destructive forces on the other hand (erosion). A significant part of reef erosion is due to the biological activity of bioeroders. Among those organisms, the smallest (< 20 µm) are named microbioeroders, or endoliths. They are made of green algae, cyanobacteria, and fungi, which bore vast networks of tunnels within the skeletons of dead and live corals. The impact of various environmental factors, especially eutrophication, on endolith activity in live corals remains particularly unknown. Using the DIP enrichment experiment presented in chapter 5, the aim of the present study was to assess the impact of DIP on the abundance and distribution of endoliths in the skeleton of live *S. pistillata* nubbins. Results showed that only two types of endoliths colonized the nubbins: the green chlorophyte *Ostreobium* sp. and fungi. Those endoliths mainly bored the central part of the nubbins, and were less abundant in the apexes. Unlike previous studies from the literature, DIP enrichment led to a 1.7 fold reduction in endoliths abundance in the apexes, suggesting that the enhanced skeletal growth of enriched nubbins was too fast for endoliths to keep up: they became diluted in the newly calcified apexes of DIP-enriched corals. Two conclusions arise from this work. On the one hand, the endoliths decrease may be considered as favorable because it reduces erosion and thus fragility of coral skeletons. On the other hand, since endoliths can partly compensate for the loss of zooxanthellae from the host tissue in case of bleaching by providing nutrients to the coral host, their reduction thus also represents the loss of a potential compensating source of nutrient in case of environmental disturbances.

Annexe B

Influence du phosphore sur la bioérosion

Résumé

Les récifs coralliens sont des écosystèmes fragiles, dont le maintien résulte du délicat équilibre entre deux forces antinomiques : les forces constructrices d'une part (dont la croissance des coraux est le principal moteur) et les forces destructrices d'autre part (l'érosion). Une partie importante de l'érosion des récifs est due à l'activité biologique de divers organismes dits bioérodeurs. Parmi eux, les plus petits (< 20 µm) sont nommés microbioérodeurs, ou endolithes. Ce sont des algues vertes, des cyanobactéries et des champignons, qui creusent de véritables réseaux de galeries à l'intérieur des squelettes de coraux morts et vivants. L'effet de divers facteurs environnementaux sur l'activité des endolithes dans les coraux vivants reste peu connue à ce jour, notamment en ce qui concerne l'effet de l'eutrophisation. Sur la base de l'enrichissement en phosphate du chapitre 5, cette étude a eu pour objectif d'évaluer l'effet du PID sur l'abondance et la distribution des endolithes dans le squelette du corail *S. pistillata* vivant. Les résultats obtenus ont montré que seuls deux types d'endolithes ont colonisé le squelette de *S. pistillata* : l'algue verte *Ostreobium* sp. et des champignons. Ces endolithes se sont surtout développés au cœur des boutures de corail, avec une distribution peu abondante à leurs extrémités. Contrairement à ce qui était attendu sur la base d'études de la littérature, l'enrichissement en PID a entraîné une diminution par 1,7 de l'abondance des endolithes dans les extrémités des squelettes. Ce résultat permet de supposer que la croissance squelettique plus importante en présence de PID a été trop rapide pour que les endolithes suivent : ils se sont retrouvés dilués dans le squelette nouvellement formé. Deux conclusions découlent de ces résultats. Certes, la diminution des endolithes peut être considérée comme favorable aux coraux, puisque cela réduit l'érosion, et donc la fragilité, de leur squelette. Cependant, étant donné que les endolithes peuvent en partie compenser la perte des zooxanthelles des tissus de l'hôte lors d'épisodes de blanchissement, en fournissant à l'hôte des nutriments dissous, la diminution des endolithes représente donc également la disparition d'une source de nourriture en cas de perturbations environnementales.

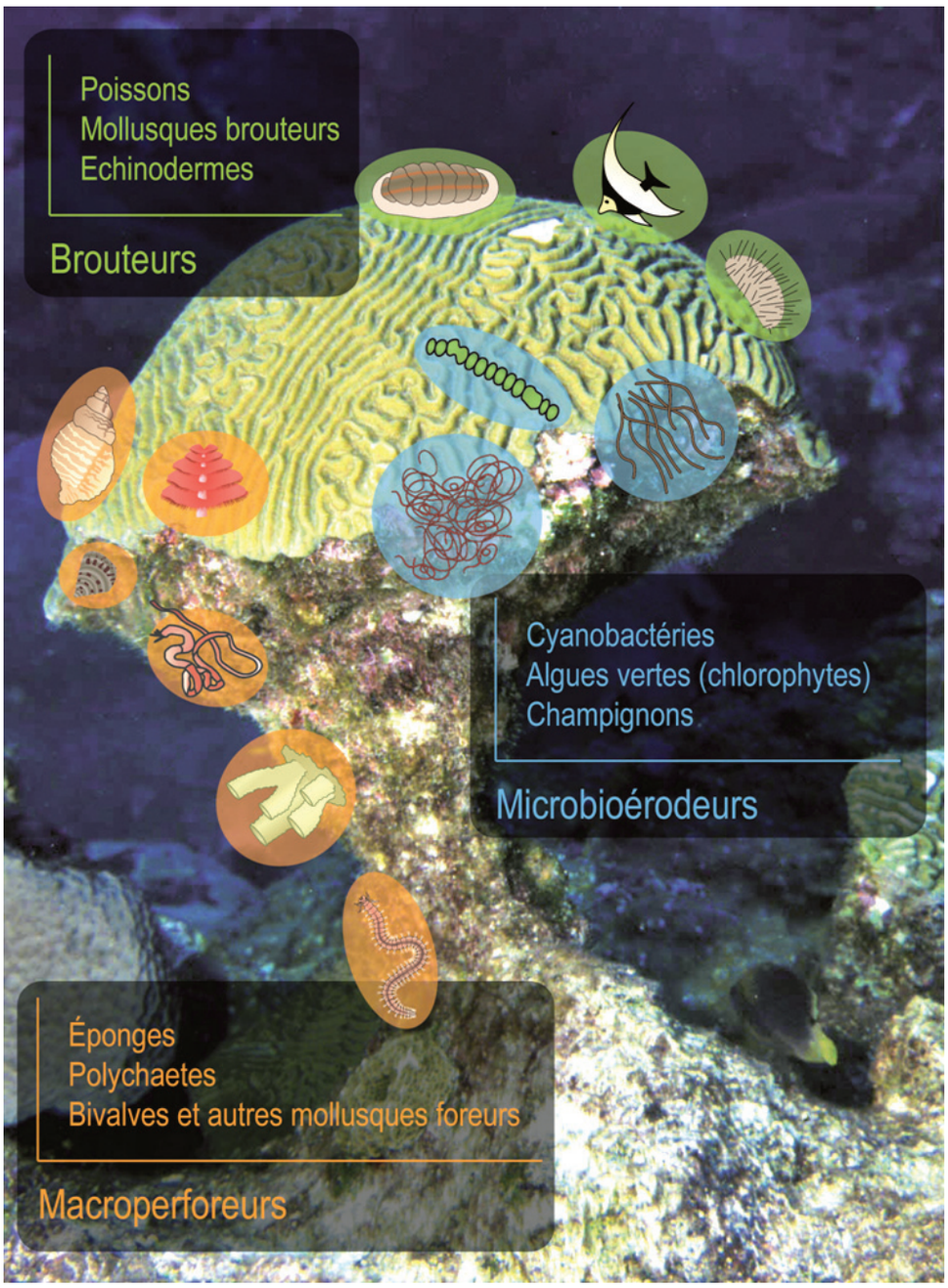


Figure 41 | Destruction des récifs coralliens par les organismes bioérodeurs

Le schéma présente les divers types d'organismes responsables de la bioérosion des récifs coralliens. L'amincissement de la base de cette tête de *Diploria strigosa*, qui lui donne cette forme en champignon, résulte de l'activité érosive de ces divers organismes. Photographie : F. et J. Burek.

1 La bioérosion récifale

Comme évoqué dans le tableau 5 du chapitre 5, l'expérience d'enrichissement en PID réalisée durant cette thèse a également été l'occasion d'examiner l'influence de l'eutrophisation sur la bioérosion des coraux. Les premiers paragraphes de cette annexe expliquent ce qu'est la bioérosion et quels en sont les agents principaux (figure 41). L'annexe se poursuit par une présentation des résultats obtenus.

La bioérosion, une force majeure de destruction des récifs coralliens

Le maintien des écosystèmes coralliens est fragile et résulte du délicat équilibre entre deux types de forces : les forces constructrices d'une part, nommés accrétion, principalement issues de la calcification des coraux, et les forces destructrices d'autre part, nommées érosion (figure 42). L'érosion des récifs coralliens est due à deux catégories de facteurs. Il y a d'une part les facteurs extérieurs au récif (ceux présentés dans le chapitre 1 : anthropisation, acidification des océans, accroissement de la fréquence des tsunamis, variations de la composition chimique de l'eau, ...), qui entraînent une érosion physique (destruction mécanique) ou chimique (dissolution) des coraux; et d'autre part une érosion biologique[65] des récifs par des agents internes aux coraux, nommés bioérodeurs.

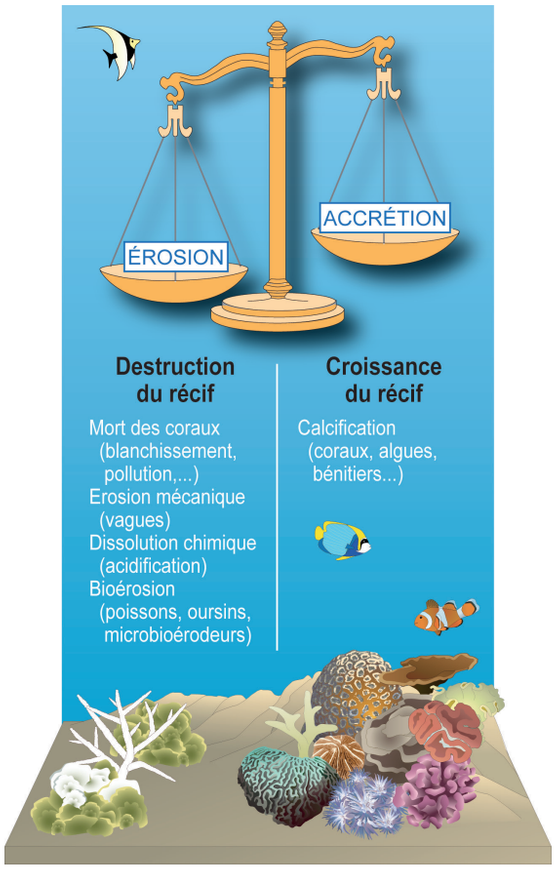


Figure 42 | Le délicat équilibre entre croissance et destruction des récifs coralliens
Les principaux processus à l'origine de la croissance et de la destruction des récifs coralliens sont indiqués de part et d'autre du schéma. Toute perturbation de l'écosystème, tel que le changement climatique ou l'anthropisation, peut faire pencher la balance d'un côté ou de l'autre... même si c'est malheureusement plus souvent du côté de l'érosion.

La bioérosion est le processus majeur de la destruction des récifs coralliens (Scoffin *et al.*, 1980; Tribollet et Golubic, 2011). En effet, il a été montré que lorsque la bioérosion dépasse la capacité d'accrétion des coraux, les récifs se trouvent dégradés, voire disparaissent (Reaka-Kudla *et al.*, 1996; Glynn, 1997). La bioérosion (figure 43) résulte de l'activité biologique d'organismes bioérodeurs plus ou moins

[65] Le terme **érosion biologique**, ou **bioérosion**, vient du fait que ce type d'érosion est du à l'activité d'organismes vivants.

gros (figure 41), tels que des champignons, bactéries, algues, éponges, oursins, et poissons, sur les substrats carbonatés récifaux vivants et morts, dont les coraux (Tribollet et Golubic, 2011). Ces organismes détruisent les substrats calcaires des récifs coralliens par une action mécanique, telle que le broutage des poissons ou des oursins, et par une action chimique comme la dissolution des minéraux calcaires effectuée par les bactéries, les champignons, les algues et les éponges.

Importance des microbioérodeurs

Bien que les traces laissées par les plus gros organismes (de taille supérieure à 20 µm) soient les plus facilement observables (figure 43), les plus petits organismes bioérodeurs (de taille inférieure à 20 µm), nommés microbioérodeurs (ou également micro-organismes bioérodeurs, microflores perforantes, ou endolithes[66]), ne sont cependant pas en reste en terme de contribution à la bioérosion des récifs coralliens. Ils creusent en effet de véritables labyrinthes de galeries micrométriques à l'intérieur des substrats carbonatés (figure 44), et l'on peut par exemple trouver jusqu'à 250 000 galeries d'endolithes par cm² dans certains squelettes de corail mort (Schneider et Le Campion-Alsumard, 1999).

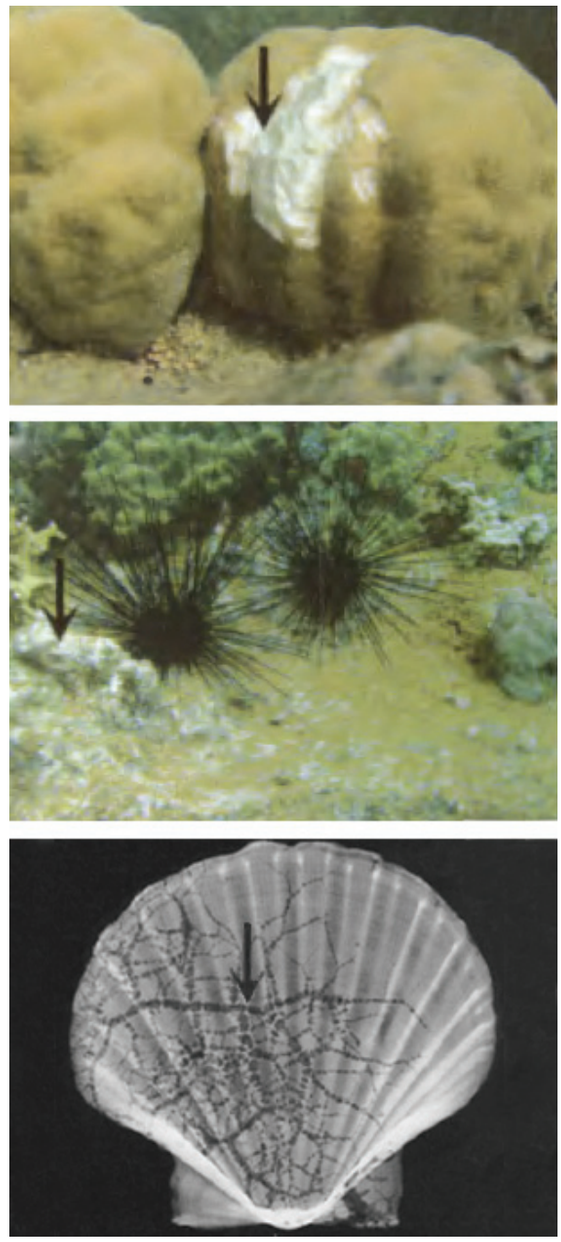


Figure 43 | Traces de bioérosion
Les photographies représentent de haut en bas : traces de broutage de poisson perroquet sur le corail massif *Porites*, traces de broutage d'oursin sur du calcaire récifal, et traces de bioérosion dues à l'éponge perforante *Cliona* sp. sur une coquille de bivalve (il s'agit ici d'une coquille de bivalve tempéré, la coquille Saint Jacques, mais le même type de traces se retrouve sur les coquilles de bivalves tropicaux). Photographies : A. Tribollet.

[66] Le terme **endolithe** vient des termes grecs *endon* et *lithos*, et signifie "qui se développe dans la pierre". Les endolithes sont subdivisés en trois catégories selon leur site de développement au sein des substrats carbonatés : les chasmo- et crypto-endolithes se développent dans les fissures et les cavités des substrats abimés ou poreux, tandis que les **euendolithes** se développent au sein même des substrats en les dissolvant activement. Ce sont ces derniers organismes, les euendolithes, qui ont été étudiés durant cette thèse. Le terme endolithes a été conservé pour plus de simplicité, mais ne fait référence qu'aux seuls euendolithes dans le reste de cette annexe.

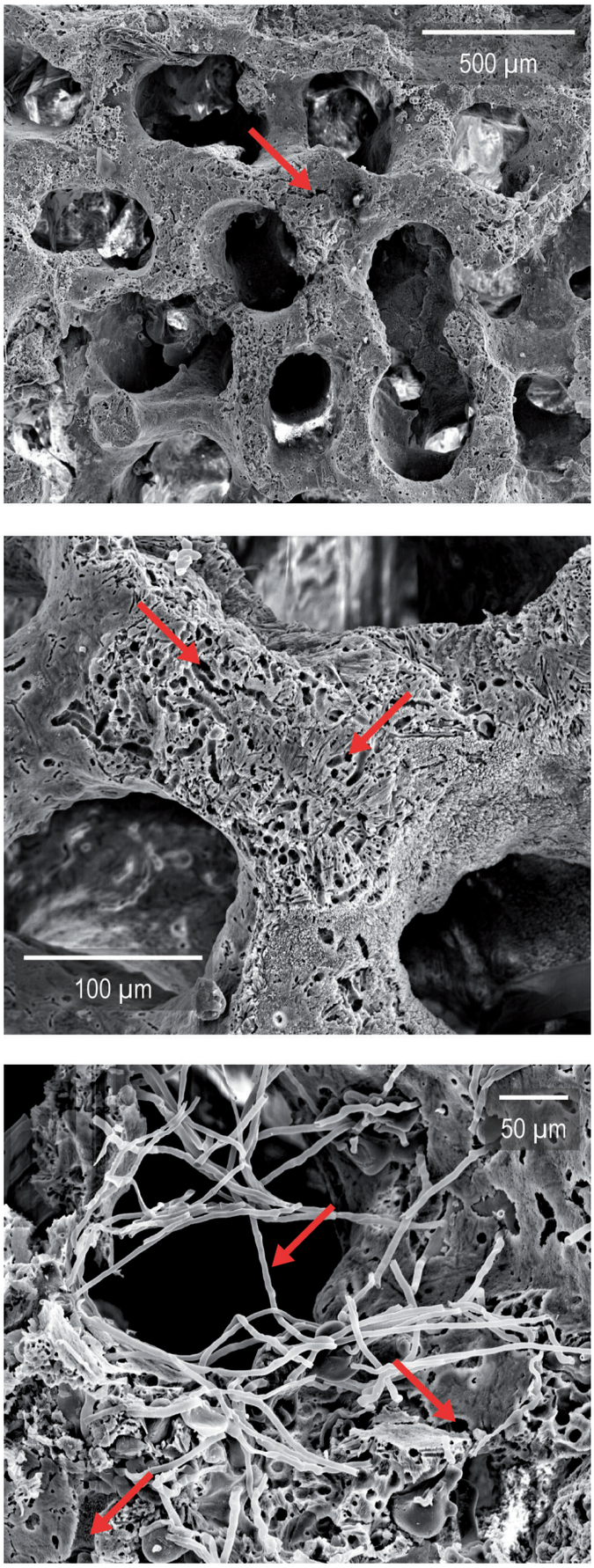


Figure 44 | Squelette perforé par des endolithes ◄

Les photographies présentent trois vues au microscope électronique à balayage (MEB) d'un squelette de corail (*Porites lobata*) perforé par des endolithes. De haut en bas : Vue d'ensemble sur laquelle les gros trous représentent les pores du squelette | Détail d'une crête située entre trois pores et portant de nombreuses traces de bioérosion | Détails de filaments traversant un pore et perforant les crêtes environnantes. Les flèches rouges indiquent divers filaments d'endolithes ou traces qu'ils ont laissées dans le squelette. Le même type de traces peut être observé chez *Stylophora pistillata*, même si la structure du squelette n'est pas la même.

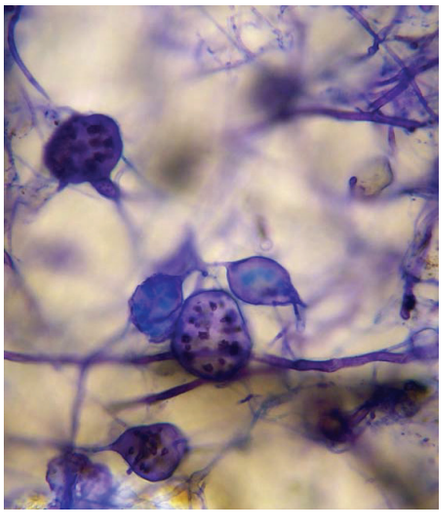


Figure 45 | Exemple d'endolithes

La photographie présente une vue de l'un des agents majeurs de la microbioérosion, l'algue verte *Ostreobium* sp. (diamètre moyen de 5 µm). Cette espèce forme des filaments avec des organes reproducteurs (sacs bleus) au sein de squelettes coralliens. Certains des très fins filaments sont formés par des champignons. L'observation est faite en microscopie optique sur des lames minces, après coloration au bleu de Toluidine. Photographie : A. Tribollet.

Ces endolithes regroupent des cyanobactéries, des microalgues et des champignons (figure 45), qui colonisent de manière intensive touts types de substrats carbonatés récifaux (squelettes des coraux, coquilles de bivalves, calcaires récifaux, etc ; Tribollet, 2008a; Garcia-Pichel *et al.*, 2010). La contribution majeure des microbioérodeurs à la dissolution récifale est due à leur activité métabolique très intense (respiration et photosynthèse notamment) malgré leur petite taille (Tribollet et al., 2006; Tribollet et al., 2009).

Si leur activité est plus importante dans les substrats morts (qui sont donc exempts de tissus et généralement nus), ils colonisent également activement les substrats vivants tels que les squelettes de coraux vivants. Dans les coraux morts, qui n'ont plus de tissus, ils pénètrent depuis l'extérieur et se fraient un chemin jusqu'au cœur du squelette (Tribollet, 2008b) Dans les coraux vivants, dont le squelette est protégé par une couche de tissus vivants qui empêche la colonisation par les endolithes, le mode de pénétration des endolithes diffère : ils se développent depuis un point d'infection initial (zone lésée sans tissus, base du corail en contact avec un substrat rocheux...) et poussent vers l'extérieur en accompagnant la croissance du corail.

Dans les squelettes de coraux vivants, outre leur rôle en tant que perforateurs du squelette, les endolithes remplissent également d'autres fonctions. Les champignons peuvent ainsi léser les tissus de l'hôte (Bentis *et al.*, 2000; Alker *et al.*, 2001; Domart-Coulon *et al.*, 2004), tandis que les cyanobactéries et les algues vertes pourraient quant à elles avoir un rôle bénéfique pour l'hôte en relarguant des nutriments et des composés organiques, notamment en cas de blanchissement (Odum et Odum, 1955; Ferrer et Szmant, 1988; Schlichter *et al.*, 1995; Fine et Loya, 2002).

Effets de l'eutrophisation

Malgré leur importance, la contribution, positive ou négative, des endolithes au devenir des récifs coralliens reste cependant largement sous-estimée à l'heure actuelle, et la balance entre leurs rôles destructeur et bénéfique reste relativement peu connue. Cette balance est probablement dépendante des conditions environnementales, comme l'apport en éléments nutritifs par exemple. Or, si cet aspect a déjà été plusieurs fois étudié pour les squelettes de coraux morts (Zubia et Peyrot-Clausade, 2001; Chazottes *et al.*, 2002; Carreiro-Silva *et al.*, 2005, 2009; Carreiro-Silva *et al.*, 2012), l'impact de l'eutrophisation sur la bioérosion et le métabolisme des endolithes dans les squelettes de coraux vivants n'a jamais été examiné.

2 Problématiques scientifiques et objectifs de l'étude

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude, réalisée sur la base de l'expérience d'enrichissement en PID présentée dans le chapitre 5, a été d'évaluer l'effet d'une concentration élevée de PID dans l'eau sur l'abondance et la distribution des endolithes dans le squelette du corail *S. pistillata* vivant.

Cette étude se base sur les deux hypothèses suivantes. 1) Étant donné qu'une eutrophisation au PID favorise l'activité et le développement des endolithes dans les coraux morts (Zubia et Peyrot-Clausade, 2001;

Chazottes *et al.*, 2002; Carreiro-Silva *et al.*, 2005, 2009; Carreiro-Silva *et al.*, 2012), il est attendu que l'enrichissement en PID stimule également le développement des endolithes dans les coraux vivants. Cette hypothèse est renforcée par les résultats d'une étude précédente, qui a montré que le PID entraîne une diminution de la densité du squelette dans les coraux vivants (Dunn *et al.*, 2012). On s'attend donc bien à ce que les endolithes colonisent plus facilement le squelette plus fragile des coraux vivants enrichis en PID[67]. Cependant, dans les coraux vivants, qui sont recouverts de tissus, cette hypothèse n'est valable que si l'hypothèse suivante est vérifiée : 2) le PID a pu atteindre le squelette de ces coraux au travers des tissus vivants. Étant donné que l'enrichissement en PID a entraîné une augmentation du contenu en phosphore du squelette dans l'expérience du chapitre 5 après 11 semaines, le PID a donc bien atteint le squelette. L'hypothèse 2 étant ainsi d'ores et déjà vérifiée, l'hypothèse 1 a été testée lors de cette étude.

Cette étude a aussi été l'occasion d'examiner la limitation en nutriments des coraux sous un nouvel angle. Si le PID favorise bien la bioérosion par les endolithes, alors il est probable que ces endolithes soient eux aussi limités par le phosphore au sein du squelette des coraux vivants. Si la bioérosion vient à augmenter en présence de ce nutriment limitant, alors les effets majoritairement bénéfiques rapportés pour la physiologie et le métabolisme corallien dans le chapitre 5 pourraient se trouver contrebalancés sur le long terme par une fragilisation du squelette.

Les paragraphes qui suivent résument les principaux résultats obtenus lors de cette étude sur la bioérosion et découlant des objectifs et hypothèses exposés dans les paragraphes précédents. Ces résultats ont fait l'objet d'un article dans une revue à comité de lecture international (article 7), au sein duquel ils sont discutés en détail. Les techniques utilisées pour cette étude y sont également décrites.

3 Effets du PID sur la bioérosion par les endolithes

Les résultats obtenus durant cette étude ont tout d'abord montré que seuls deux types d'endolithes ont colonisé le squelette de *S. pistillata* : l'algue verte *Ostreobium* sp. et des champignons. Ce résultat est conforme à ce qui a été observé dans d'autres coraux vivants (Le Campion-Alsumard *et al.*, 1995), et confirme que peu d'espèces d'endolithes sont capables de pénétrer les squelettes des coraux vivants.

L'observation de lames minces de corail a montré que les endolithes se sont surtout développés au cœur des boutures, avec une distribution moins abondante aux extrémités (nommées apex) (article 7, figure 2).

De manière plutôt inattendue, l'enrichissement en PID a entraîné une diminution de l'abondance des endolithes dans ces extrémités (article 7, figure 2). La quantification des endolithes sur des lames minces de squelette, observées au microscope électronique à balayage et au microscope optique, a confirmé ce résultat et révélé une diminution par 1,7 de la surface bioérodée

[67] On considère que plus un matériau est **dense**, plus les endolithes le colonisent lentement.

avec l'enrichissement en PID (article 7, figure 3). Cette diminution infirme les hypothèses émises précédemment. S'il reste possible que la densité des squelettes ait diminué avec le PID, comme dans l'étude de Dunn *et al*. sur le corail *A. muricata* (Dunn *et al.*, 2012), cette diminution éventuelle de la densité dans les zones fraîchement calcifiées des apex n'a pour autant pas permis une colonisation plus rapide par les endolithes.

Une relation inversement proportionnelle (article 7, figure 4) a été trouvée entre la surface bioérodée et le taux de croissance squelettique rapporté précédemment (article 6). La nouvelle hypothèse formulée au vu de ce résultat est que la croissance squelettique plus importante en présence de PID a été trop rapide pour que les endolithes suivent. Les endolithes se sont ainsi retrouvés dilués dans le squelette nouvellement formé des boutures enrichies en PID.

Les résultats de cette étude tendent à indiquer que le squelette du corail *S. pistillata* ne se trouvera pas fragilisé davantage par les endolithes lors d'épisodes d'eutrophisation au PID. Cependant, dans le contexte du changement global, si un stress entraînant le blanchissement des coraux venait s'ajouter à l'eutrophisation, les endolithes, plus dilués dans le squelette du fait de l'eutrophisation, pourraient alors ne plus être à même de relarguer efficacement les nutriments et les composés organiques d'habitude en partie disponibles pour l'hôte corallien (Odum et Odum, 1955; Ferrer et Szmant, 1988; Schlichter *et al.*, 1995; Fine et Loya, 2002). L'hôte pourrait ainsi pâtir de la diminution des endolithes en cas de double stress environnemental (eutrophisation plus blanchissement). La délicate balance entre avantages et inconvénients liés à la bioérosion, évoquée au début de cette annexe, reste donc bien réelle dans le cas d'une eutrophisation au PID.

De plus, le PID n'est généralement pas le seul nutriment dont la concentration augmente en cas d'eutrophisation. L'effet de l'azote, seul et combiné au phosphore, doit également être déterminé avant de conclure sur les effets de l'eutrophisation sur la bioérosion des coraux vivants.

4

Article 7
Bioerosion by euendoliths decreases in phosphate-enriched skeletons of living corals

Submitted to Biogeosciences | In press

Résumé

Si le rôle des organismes microbioérodeurs, ou euendolithes, est relativement bien connu dans les squelettes de coraux morts, leurs fonctions dans les coraux vivants restent à ce jour peu comprises. Il a été suggéré que les euendolithes puissent avoir un effet sur la santé de leur hôte corallien en se comportant soit comme des ecto-symbiotes soit comme des parasites. Cependant, la composition spécifique des communautés de microbioérodeurs, leur abondance et leur dynamique dans les coraux vivants, reste peu étudiée, notamment sous diverses conditions environnementales. Dans cette étude, l'effet d'un enrichissement en phosphate sur les microorganismes perforants a été testé pour la première fois. Des boutures du corail *S. pistillata* ont été soumises à 3 enrichissements en phosphate différents durant 15 semaines (0, 0,5 et 2,5 µmol L^{-1}). Après 15 semaines d'enrichissement, des lames minces pétrographiques des squelettes de ces coraux ont été observées en microscopie optique et en microscopie à balayage électronique (MEB). Ce sont principalement des filaments de l'espèce phototrophe *Ostreobium* sp. qui ont colonisé les coraux. Quelques filaments de champignons ont également été observés. Tous les filaments se sont surtout développés dans la partie centrale des boutures, avec une abondance moindre au niveau des apex. De façon inattendue, une réduction de l'abondance des filaments a été observée dans les apex récemment calcifiés des boutures enrichies en phosphate. L'abondance globale des filaments d'euendolithes a significativement diminué dans les coraux enrichis en phosphate, passant de 9,12 ± 1,09% de la surface des squelettes bioérodée dans les coraux non enrichis à 5,81 ± 0,77% et 5,27 ± 0,34% dans les coraux enrichis à 0,5 et 2,5 µmol L^{-1} de phosphate, respectivement. Les observations au MEB ont confirmé cette diminution. Des études récentes ont montré qu'un enrichissement en phosphate augmente la croissance squelettique des coraux et leur métabolisme, tout en réduisant la densité de leur squelette et leur résistance face aux contraintes mécaniques. L'hypothèse émise à la suite de la présente étude est donc que l'augmentation de la croissance squelettique en présence d'un enrichissement au phosphate a été trop rapide pour que les euendolithes s'accroissent. Les euendolithes se sont retrouvés dilués dans les apex durant la croissance des coraux en présence de phosphate. Les résultats indiquent que le squelette de *S. pistillata* pourrait ne pas être fragilisé d'avantage par les endolithes en cas d'eutrophisation au phosphate.

Biogeosciences Discuss., 9, 2425–2444, 2012
www.biogeosciences-discuss.net/9/2425/2012/
doi:10.5194/bgd-9-2425-2012
© Author(s) 2012. CC Attribution 3.0 License.

Biogeosciences Discussions

This discussion paper is/has been under review for the journal Biogeosciences (BG).
Please refer to the corresponding final paper in BG if available.

Bioerosion by euendoliths decreases in phosphate-enriched skeletons of living corals

C. Godinot[1], A. Tribollet[2], R. Grover[1,*], and C. Ferrier-Pagès[1,*]

[1]Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Monaco
[2]Institut de Recherche pour le Développement, UMR IPSL-LOCEAN (IRD/CNRS/UPMC/MNHN), 32 Avenue Henri Varagnat, 93143 Bondy Cedex, France
[*]These authors contributed equally to this work.

Received: 17 January 2012 – Accepted: 28 February 2012 – Published: 5 March 2012

Correspondence to: C. Godinot (cgodinot@centrescientifique.mc)

Published by Copernicus Publications on behalf of the European Geosciences Union.

Article 7

4

Article 7
Bioerosion by euendoliths decreases in phosphate-enriched skeletons of living corals

C. Godinot[1,2], A. Tribollet[3], R. Grover[1], and C. Ferrier-Pagès[1]

Submitted to Biogeosciences | In press

Abstract

While the role of microboring organisms, or euendoliths, is relatively well known in dead coral skeletons, their function in live corals remains poorly understood. They are suggested to behave like ectosymbionts or parasites, impacting their host health. However, the species composition of microboring communities, their abundance and dynamic in live corals under various environmental conditions have never been explored. Here, the effect of phosphate enrichment on boring microorganisms in live corals was tested for the first time. *Stylophora pistillata* nubbins were exposed to 3 different treatments (phosphate concentrations of 0, 0.5 and 2.5 µmol L^{-1}) during 15 weeks. After 15 weeks of phosphate enrichment, petrographic thin sections were prepared for observation with light microscopy, and additional samples were examined with scanning electron microscopy (SEM). Euendoliths comprised mainly phototrophic Ostreobium sp. filaments. Rare filaments of heterotrophic fungi were also observed. Filaments were densely distributed in the central part of nubbins, and less abundant towards the apex. Unexpectedly, there was a visible reduction of filaments abundance in the most recently-calcified apical part of phosphate-enriched nubbins. The overall abundance of euendoliths significantly decreased, from 9.12 ± 1.09 % of the skeletal surface area in unenriched corals, to 5.81 ± 0.77 % and 5.27 ± 0.34 % in 0.5 and 2.5 µmol L^{-1}-phosphate enriched corals respectively. SEM observations confirmed this decrease. Recent studies have shown that phosphate enrichment increases coral skeletal growth and metabolic rates, while it decreases skeletal density and resilience to mechanical stress. We thus hypothesize that increased skeletal growth in the presence of phosphate enrichment occurred too fast for an effective expansion of euendolith growth. They could not keep up with coral growth, so they became diluted in the apex areas as nubbins grew with phosphate enrichment. Results from the present study suggest that coral skeletons of *S. pistillata* will not be further weakened by euendoliths under phosphate enrichment.

Running head | Phosphate-enriched skeletons of living corals

[1] Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, Principality of Monaco
[2] Corresponding author: C. Godinot, Centre Scientifique de Monaco, CSM, Avenue Saint-Martin, 98000 Monaco, MONACO, Tel. 377 921 679 82, cgodinot@centrescientifique.mc
[3] Institut de Recherche pour le Développement, UMR IPSL-LOCEAN (IRD/CNRS/UPMC/MNHN)

Introduction

Euendoliths are boring phototrophic and organotrophic microorganisms that include cyanobacteria, chlorophytes, rhodophytes, and fungi (Tribollet, 2008a). They develop in a large variety of carbonate substrates, including crustose coralline algal thalli and coral skeletons (Tribollet and Payri, 2001; Tribollet and Golubic, 2005), in which they actively penetrate through active processes of dissolution (Golubic et al., 1981; Garcia-Pichel et al., 2010). They colonize live and dead substrates, although colonization has been shown to be more intense in dead ones (Le Campion-Alsumard et al., 1995a; Tribollet and Payri, 2001). In live coral skeletons, euendoliths grow from the inside of the skeleton towards the surface, trying to keep up with coral growth (Le Campion-Alsumard et al., 1995a). In dead skeletons on the contrary, they penetrate from the outside and bore towards the inside of the substratum (Tribollet, 2008b).

In dead corals, euendoliths have been shown to be important primary producers, and major agents of reef bioerosion and sediment production (Schneider and Torunski, 1983; Chazottes et al., 1995; Perry, 2000; Tribollet et al., 2002; Tribollet and Golubic, 2005; Tribollet et al., 2006). Various environmental factors have been reported to affect rates of dissolution by euendoliths in dead substrates. Zubia et al. (2001), Chazottes et al. (2002), and Carreiro-Silva et al. (2005, 2009; 2012) reported enhanced rates of dissolution under eutrophied conditions, while Tribollet and Golubic (2005) and Tribollet (Tribollet, 2008b) showed that terrigenous inputs can mitigate the effects of eutrophication by limiting settlement and penetration of euendoliths. Moreover, it was shown recently that rates of bioerosion by euendolithic communities are positively affected by elevated pCO_2 (Tribollet et al., 2009).

In live corals, besides their role as skeleton bioeroders, euendoliths are known to have different activities. Boring heterotrophic fungi appear to inflict damages to their live hosts (Bentis et al., 2000; Alker et al., 2001; Domart-Coulon et al., 2004) while autotrophic euendoliths may provide benefits, especially in cases of bleaching events, through the release of nutrients and organic compounds (Odum and Odum, 1955; Ferrer and Szmant, 1988; Schlichter et al., 1995; Fine and Loya, 2002). The metabolism of euendoliths and the balance between damages and benefits in live corals remain however poorly known (Ferrer and Szmant, 1988; Tribollet, 2008a). In particular, the role of environmental factors on bioerosion of live coral skeletons has been seldom addressed. It was shown that elevated light leads to a photoacclimation of phototrophic euendoliths when increased progressively, and makes them more susceptible to thermal photoinihibition and photodamages when increased rapidly, while concomitant increases in light and temperature lead to a decrease of their photosynthetic efficiency (Fine and Loya, 2002; Fine et al., 2004; Fine et al., 2005). But the roles of other factors such as nutrient concentrations have never been formally examined. Since corals are becoming increasingly impacted

by eutrophication due to continuous nutrient release from sewage discharges, rainfall, rivers and ground waters (Tomascik and Sander, 1985; Bell and Tomascik, 1993; McCook, 1999), the impact of nutrients on boring euendolithic communities of live corals deserves more attention.

The aim of the present study was to test the impact of enrichment by a single nutrient, phosphate, under controlled conditions in aquaria, using the tropical coral *S. pistillata*. Phosphate was chosen because it has been reported to affect the skeletal composition and structure of live corals, and to decrease skeletal density (Godinot et al., 2011a; Dunn et al., 2012).. Moreover, a recent study on dead shells showed that phosphate stimulates microbioerosion, in particular by boring cyanobacteria (Carreiro-Silva et al., 2012). Since it was shown that live corals are colonized by chlorophytes, cyanobacteria, and fungi (Le Campion-Alsumard et al., 1995a; Priess et al., 2000), we therefore hypothesize that phosphate enrichment can stimulate euendoliths growth in live colonies of *S. pistillata*, and thus, rates of carbonate dissolution. *S. pistillata* was selected for the present study because in this species, phosphate was already shown to increase tissue and skeletal growth, phosphate incorporation into the mineral fraction of the skeleton, as well as zooxanthellae specific growth rate, photosynthetic efficiency and phosphorus content (Godinot et al., 2011a). The study of the impact of phosphorus on euendoliths in live *S. pistillata* will thus improve the understanding of the effects of nutrients on live corals.

Methods

Experimental design

The experimental setup used in this study has already been described in a previous paper (Godinot et al., 2011a). Briefly, live nubbins (initial size of 1.3 ± 0.4 cm long and 0.6 ± 0.3 cm in diameter) of *S. pistillata* were cultured in duplicated aquaria under three continuous phosphate enrichments (0, 0.5 and 2.5 µmol L^{-1}). The 0.5 µmol L^{-1} enrichment represented a phosphate concentration which has been reported on some eutrophic reefs (Kinsey and Davies, 1979), whereas the 2.5 µmol L^{-1} enrichment was used to highlight the effect of phosphate on coral physiology. Corals were kept unfed to control for phosphorus enrichment, and light, temperature, salinity, algal development and nutrient concentrations were controlled in each aquarium (Godinot et al., 2011a). Three nubbins per treatment (9 nubbins in total) were sampled for euendolith observations after 15 weeks of phosphate enrichment, and were immediately fixed in a 4% solution of formaldehyde in buffered seawater.

Sample treatment

Nubbins were cut transversally in two halves for observation of euendoliths with light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) respectively.

The first halves were used to prepare longitudinal petrographic thin sections for light microscopy observations. The samples were dehydrated in a series of ethanol and acetone baths, then embedded in araldite as described by Tribollet (2008b). Several

millimeter thin slabs of skeleton were cut using a diamond circular saw, and were then mounted on microscope slides, ground to the quality of petrographic thin sections, briefly etched with 5% HCl, rinsed carefully, and stained with 5% toluidine blue to reveal the euendolithic filaments. Nine to twelve slides were prepared out of the 3 nubbins studied per treatment. We selected 5 good quality slides out of the 9 or 12 slides for measurements of the different biological variables related to boring microflora, after checking that they were representative of all slides per treatment. Sections were observed with a Nikon Eclipse LV100 microscope, on which a Nikon DS-RI1 camera was mounted.

The second halves of samples were used to prepare SEM sections. Samples were bleached with sodium hypochlorite prior embedding, then cut longitudinally, shortly etched with 5% HCl, rinsed and dried carefully, and then platinum-coated. Three samples per treatment were observed with a ZEISS Evo.LS.15 environmental SEM.

Analyses

Petrographic slides

Two semi-quantitative methods were selected to determine if phosphate had an effect on the overall distribution of microboring filaments in the skeletons, and to quantify the abundance of filaments in each treatment. In this latter technique, only non-porous areas of the skeleton (i.e. microscopic fields fully covered by skeleton) were selected for repeatability and accuracy of the abundance quantifications. This choice was made because of the highly porous structure of *S. pistillata* skeletons, which was of c.a. 50 ± 8 % (estimated on pictures of the petrographic slides with the software ImageJ).

The first semi-quantitative method consisted in selecting one representative slide out of the five per phosphate treatment to map in detail the spatial distribution of filaments across the entire sections of skeleton, i.e. porous and non porous areas. For this new approach of euendoliths distribution, pictures of the entire selected thin sections were taken and assembled using the software NIS-Elements D (Nikon). These pictures were converted to binary black and white pictures with ImageJ. The outlines of the skeletons were recovered with the software Adobe Illustrator, and colored distribution maps were drawn within those outlines. Maps were based on estimations of the abundance of euendolithic filaments, visually ranked from 1 to 5 by the same observer (respectively lowest and highest filament abundances encountered across all the samples). Abundances were estimated on 0.14 mm² optical fields, at c.a. 500 µm intervals across the whole thin sections (i.e. ca. 150 ± 25 measures per sample).

The second semi-quantitative method consisted in ranking the abundance of filaments on 30 randomly selected non-porous microscopic fields of 0.14 mm² per slide (5 slides, thus 150 measurements per phosphate treatment), in order to quantify and to compare the abundance of filaments among phosphate treatments. We thus observed a total surface area of 0.041 cm² per slide out of 0.85 cm² on average, with a porosity of 50 ± 8 %. Thus, quantifications were performed on c.a. 10% of the total surface area of the samples. The same scale as described above (ranks from 1 to 5) was used. To statistically compare the

abundance of filaments between phosphate treatments, ranks were matched to percentages of surface area covered by euendoliths. These percentages were determined for each rank of abundance as a preliminary step, using 5 representative photographs per rank which were analyzed with the software ImageJ. The minimum and maximum values found for each rank gave the range of percentages of bioeroded surface area attributed to that rank (presented in Table 1). The 30 abundance observations performed per slide were thus used to calculate the range of surface area covered by euendoliths on each slide. Medians of these ranges were compared among the three treatments using non-parametric Kruskal-Wallis tests, followed by U Mann-Whitney post-hoc paired tests, performed with the software StatView. Non-parametric tests were selected since the normality assumption was not respected.

Rank of abundance	Estimated bioeroded surface area	
	Min	Max
1	0.0 %	1.0 %
2	1.0 %	3.0 %
3	3.0 %	7.0 %
4	7.0 %	12.0 %
5	12.0 %	16.0 %

Table 1 | Range of percentages of bioeroded surface area attributed to each abundance rank for light microscopy measurements. Data are presented as the minimum and maximum value measured out of 5 measurements per rank.

SEM sections

SEM sections were observed to confirm the specific diversity of euendoliths observed on petrographic slides, and the semi-quantitative analyses performed. For that latter part, ten pictures were randomly taken per section (30 pictures per phosphate treatment) to quantitatively measure the surface area bioeroded by euendoliths using the software ImageJ (expressed in percent of the total surface area of the picture). The effect of phosphate enrichment was tested using a Kruskal-Wallis test followed by U Mann-Whitney post-hoc paired tests, performed with the software StatView.

Results

Nubbins measured on average c.a. 0.8 ± 0.3 cm in diameter at the end of the experiment, with a length of 3.3, 3.5, and 3.7 ± 1.0 cm long (respectively for the 0, 0.5 and 2.5 µmol L^{-1} treatments).

Euendolithic communities observed in the skeletons of live *S. pistillata* were mainly composed of *Ostreobium* sp. filaments (Fig. 1), with possibly fungi filaments as well. No other species were observed.

Those filaments were rather densely distributed in the middle part of the nubbins (yellow to red colors on Fig. 2), while they were less abundant at the apex of the corals (blue to yellow colors on Fig. 2). Differences were observed between the unenriched and the two phosphate-enriched corals (Fig. 2A): in the latter, filaments were even less abundant towards the most recently-calcified apical part of the nubbins (large blue and green areas on the right of Fig. 2B and C).

The abundance of euendoliths significantly decreased with phosphate enrichment on the petrographic thin sections, from 9.12 ±

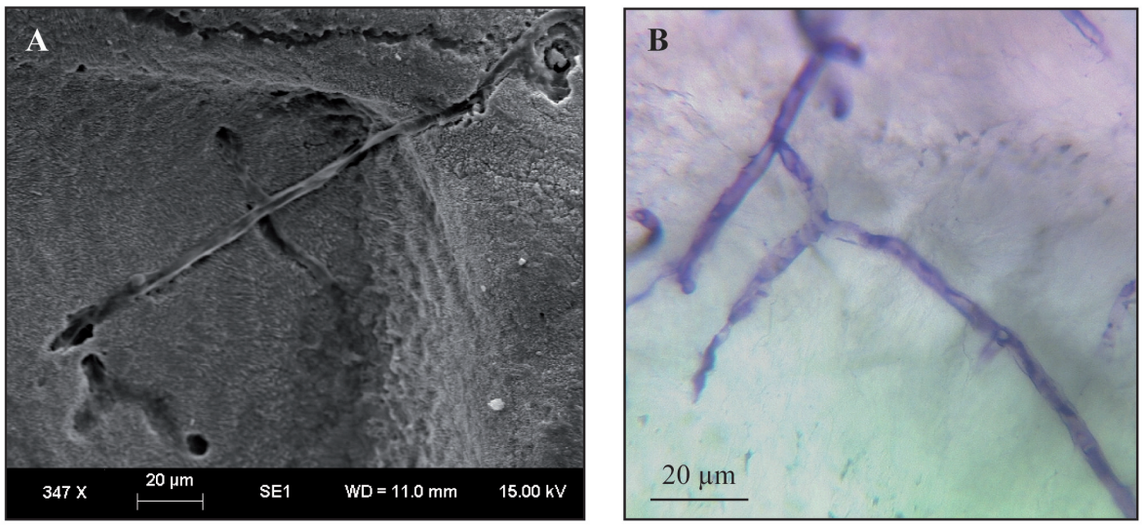


Figure 1 | Filaments of *Ostreobium* sp. boring inside the skeleton of the coral *S. pistillata*. **A**: photograph of filaments sheet and boring traces taken with an environmental scanning electron microscope. **B**: photograph of live filaments taken with light microscopy.

1.09 % of the non-porous surface area bioeroded in unenriched corals to 5.81 ± 0.77 % and 5.27 ± 0.34 % in 0.5 and 2.5 µmol L^{-1}-phosphate enriched corals respectively (Fig. 3; Kruskal-Wallis test, $df = 2$, $H = 7.58$, $p = 0.02$,). Differences between the two phosphate-enriched treatments were not significant (Mann-Whitney test, $U = 10$, $p = 0.60$). Bioeroded surface area estimated with SEM confirmed the decrease of abundance with phosphate enrichment (Kruskal-Wallis test, $df = 2$, $H = 6.25$, $p = 0.04$). Mann-Whitney post-hoc tests showed that, with the SEM technique, only the highest phosphate enrichment was significantly different from the other two phosphate treatments ($U = 280$, $p = 0.018$).

Discussion

This study is, to the best of our knowledge, the first to report on the distribution and abundance of euendoliths colonizing skeletons of live corals in a controlled experiment testing phosphate inputs. Species composition of euendolithic communities observed in *S. pistillata* is in agreement with the previous few observations made in skeletons of other live corals (*Porites*; Le Campion-Alsumard et al., 1995a), in which the ubiquitous chlorophyte *Ostreobium quekettii* dominated assemblages, with occasional filaments of fungi and of the cyanobacterium *Plectonema terebrans*. In *S. pistillata* however, filaments of the cyanobacterium *P. terebrans* were not observed, but may have been overlooked or confounded with fungi hyphae. The low diversity of euendoliths in *S. pistillata* confirms that only a few species can penetrate into skeletons of live corals. Euendoliths in *S. pistillata* were however distributed differently than in *Porites* colonies. They were localized across the skeletons of *S. pistillata* (unenriched treatment) while they were condensed in a green band beneath the surface of *Porites* colonies.

Article 7

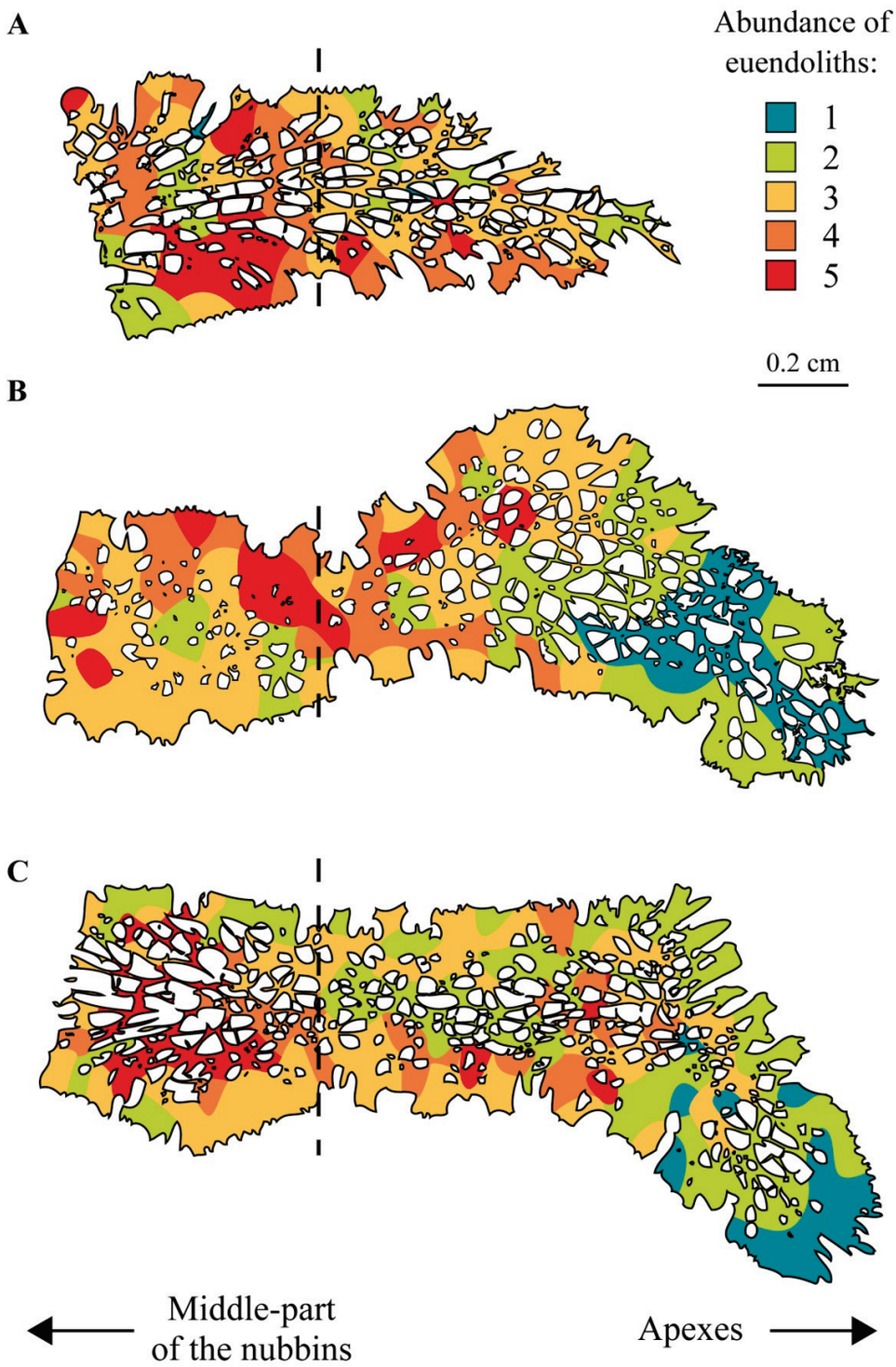


Figure 2 | Effect of long-term phosphate enrichment (15 weeks) on the spatial distribution of euendolithic filaments along the skeleton of *S. pistillata* nubbins: unenriched (**A**), 0.5 µmol L^{-1} P (**B**), and 2.5 µmol L^{-1} P (**C**). Observations were performed with light microscopy on longitudinal petrographic thin section of the nubbins. Maps are based on estimations of the abundance of filaments, visually ranked from 1 (blue, low abundance) to 5 (red, high abundance). Dashed lines mark the nubbin tips at the beginning of the experiment.

Article 7

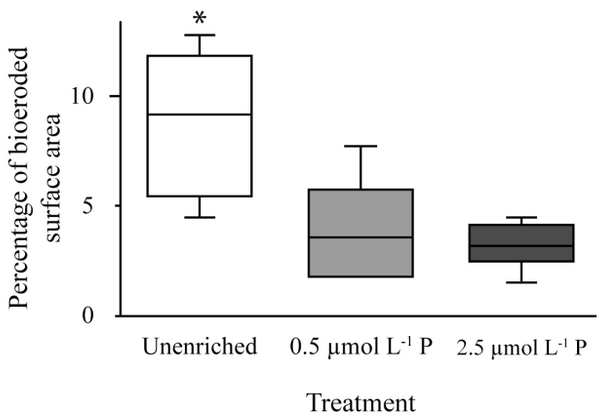


Figure 3 | Abundance of euendoliths estimated through the percentages of surface area bioeroded in each phosphate treatment. Data are presented as Tukey boxes calculated on n = 150 measurements per treatment. The star indicates treatments significantly different from the others.

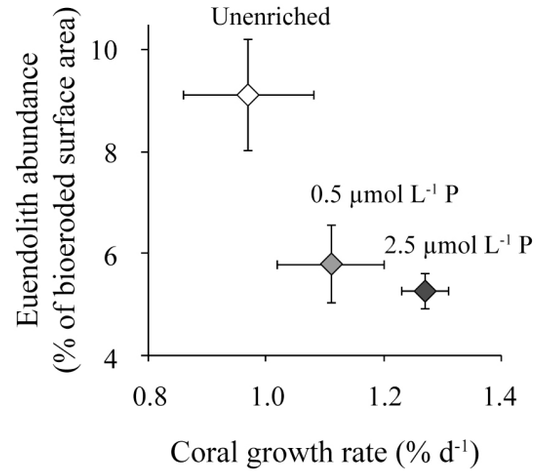


Figure 4 | Relationship between coral skeletal growth rates and the abundance of euendoliths. Skeletal growth rates are from Godinot et al. (2011) and were measured over 8 weeks of phosphate enrichment. Abundance of euendoliths was estimated based on the percentages of surface area bioeroded in each phosphate treatment after 15 weeks of exposure to phosphate treatments. Data are presented as the means ± SE, with n = 5 samples per phosphate treatment for the abundance, and n = 10 for growth rates.

The above variations in distribution may result from differences in structure, porosity, and growth rates among coral species. This strongly suggests that all coral species are not colonized the same way by euendoliths, as is also the case for dead carbonate substrates (Perry, 1998; Tribollet, 2008a).

If skeletal microdensity decreased in *S. pistillata* corals due to the continuous 15 weeks phosphate enrichment, similarly to *A. muricata* corals enriched for 16 weeks with phosphate (Dunn et al., 2012), this decrease did not lead to a faster colonization of the skeleton by euendoliths. On the contrary, euendoliths abundance decreased in phosphate-enriched corals, especially in the apexes (Fig. 2). This result may be linked to the increase in skeletal growth rates observed with phosphate enrichment in *S. pistillata* (Godinot et al., 2011a). An inverse relationship was found between the abundance of euendoliths (expressed as percentages of surface area bioeroded) reported in the present study and the skeletal growth rates reported by Godinot et al. (2011a) (Fig. 4). We thus hypothesize that the increased skeletal growth in the presence of added phosphate was too fast for the euendoliths to actively follow coral growth, and that euendoliths became diluted.

The decrease of euendolithic filament abundance, and thus microbioerosion, reported here was somewhat unexpected. It was in contradiction with the assumption of Dunn et al. (2012), who suggested that colonization by internal bioeroders increases with phosphate eutrophication. However, these authors based their

hypothesis on earlier observations of dead portions of live colonies of the branching coral *Acropora muricata* colonized by macroborers made by Sammarco and Risk (1990) and Risk et al. (1995). These latter studies did not report the impact of phosphate on microborers in live parts of the branching coral. The absence of impact of phosphate in the present study is, however, in agreement with the results reported by Carreiro-Silva et al.(2012) in dead substrates, who showed that only cyanobacteria are enhanced by phosphate enrichment. In the present study, the chlorophyte *Ostreobium* dominated communities.

Eutrophication in general has been reported to increase bioerosion by euendoliths in dead substrates (Zubia and Peyrot-Clausade, 2001; Chazottes et al., 2002; Carreiro-Silva et al., 2005, 2009). Chazottes et al. (2002) and Carreiro-Silva et al. (2005) highlighted the confounding roles of grazing and organic matter release in this positive response, which led to changes in euendolithic communities. These authors hypothesized that increased nutrient concentrations can initiate a feedback loop, where bioerosion by euendoliths and by grazers reinforce one another, leading to accelerated bioerosion of the reef framework. The latter confounding roles of grazing and organic matter release were absent in the present controlled study. Furthermore, the processes of bioerosion in dead substrates and live corals are likely to be very different (Le Campion-Alsumard et al., 1995a). Indeed, in dead substrates, euendoliths are in contact with the ambient seawater, where they can possibly benefit from high nutrient concentrations. In live corals, polyps and their symbiotic zooxanthellae form a protective barrier and actively take up the nutrients (D'Elia, 1977; D'Elia et al., 1983; Bythell, 1990; Godinot et al., 2009; Godinot et al., 2011a; Godinot et al., 2011b). Even though phosphate did reach the skeleton in the present study, as evidenced by the higher P:Ca ratio and phosphorus content of the mineral fraction of the skeleton of phosphate-enriched nubbins (Godinot et al., 2011a), it is not granted that this phosphate was available to euendoliths. In fact, phosphate was incorporated as calcium phosphate in the crystal lattice of the skeleton, and was probably not accessible by euendoliths. Another source of phosphate for euendoliths might have been localized within the pores of the skeleton. Indeed, skeletal pore water has been reported to be nutrient rich in some massive corals (Risk and Müller, 1983; Ferrer and Szmant, 1988), with phosphate concentrations elevated by 0.39 µmol L^{-1} above those encountered in ambient seawater. However, the main source of inorganic nutrients inside skeletal pore water was suggested to be regeneration by microbial euendoliths themselves rather than the overlying water column (Risk and Müller, 1983; Ferrer and Szmant, 1988). The very poorly connected pore structure of *S. pistillata* may have prevented circulation of nutrient-enriched skeletal water. Euendoliths in massive corals such as *Porites* colonies may however, respond completely differently as those corals have a slow growth rates (Pätzold, 1984) and a structure allowing a better circulation of seawater inside skeleton (Knackstedt et al., 2006).

By addressing issues of bioerosion by euendoliths in the context of nutrient enrichment in live corals, this study adds to the growing body of evidence on the

impacts of phosphorus on live corals, and adds to the understanding of euendolith dynamics in this type of substrate. Results from the present study indicate that coral skeletons of *S. pistillata* will not be further weakened by euendoliths when facing phosphate enrichment. A decrease of microbioerosion rates in phosphate-polluted areas could therefore be positive for living corals facing eutrophication, as it would represent one less stressor to cope with. Indeed, it was shown that when the corals *Porites lobata*, *Pocillopora eydouxi*, *Acropora cytherea*, *Acropora humulis*, and *Montipora studeri* are attacked by fungi filaments, they actively resist fungal penetration by depositing conical structures of dense repair aragonite in growing calices (Le Campion-Alsumard et al., 1995b; Bentis et al., 2000). This process is energetically costly, but will likely be reduced if euendoliths become diluted in skeletons of fast growing corals under phosphate enrichment. On the other hand, dilution of phototrophic euendoliths in live coral skeletons may have a negative impact on corals during bleaching events as euendoliths partially replace zooxanthellae, by providing food to their host, and thus a better resistance to thermal stress (Schlichter et al., 1995; Fine and Loya, 2002). Yet, to better understand the role of euendoliths in coral health, and as eutrophic reefs are generally impacted by terrestrial run-off rich in nitrates, ammonium, and organic matter in addition to phosphate, the present study needs to be followed by attempts at determining the separate and combined effects of the different nutrient sources on euendoliths colonizing various coral species and over longer periods of time.

Acknowledgements

We thank Cécile Rottier (CSM) for assistance in coral maintenance and physiological measurements. We thank Thierry Pilorge (LOCEAN) for assistance in sample inclusion. We are grateful to Claire Lazareth (LOCEAN) for help with the cutting and grinding equipment, as well as with the light microscope. We thank Sandrine Caquineau (LOCEAN) for assistance in manipulation of the platinum coater and the SEM. This research was supported by the government of the Principality of Monaco and the Institut de Recherche pour le Développement. Financial support to C.G. was provided by the École Normale Supérieure and the Centre Scientifique de Monaco.

References

Alker, A. P., Smith, G. W., and Kim, K.: Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Carribean sea fan corals, Hydrobiologia, 460, 105-111, 2001.

Bell, P. R. F., and Tomascik, T.: The demise of fringing coral reefs of Barbados and of regions in the Great Barrier Reef lagoon-impacts of eutrophication, Proceedings of the Colloquium on Global Aspects of Coral Reefs: Health, Hazards and History., 1993,

Bentis, C. J., Kaufman, L., and Golubic, S.: Endolithic fungi in reef-building corals (order: Scleractinia) are common, cosmopolitan, and potentially pathogenic, Biological Bulletin, 198, 254-260, 2000.

Bythell, J. C.: Nutrient uptake in the reef-building coral *Acropora palmata* at natural environmental concentrations, Mar. Ecol. Prog. Ser., 68, 65-69, 1990.

Article 7

Carreiro-Silva, M., McClanahan, T. R., and Kiene, W. E.: The role of inorganic nutrients and herbivory in controlling microbioerosion of carbonate substratum, Coral Reefs, 24, 214-221, 10.1007/s00338-004-0445-3, 2005.

Carreiro-Silva, M., McClanahan, T. R., and Kiene, W. E.: Effects of inorganic nutrients and organic matter on microbial euendolithic community composition and microbioerosion rates, Mar. Ecol. Prog. Ser., 392, 1-15, 10.3354/meps08251, 2009.

Carreiro-Silva, M., Kiene, W. E., Golubic, S., and McClanahan, T. R.: Phosphorus and nitrogen effects on microbial euendolithic communities and their bioerosion rates, Mar. Pollut. Bull., 64, 602-613, 10.1016/j.marpolbul.2011.12.013, 2012.

Chazottes, V., Campion-Alsumard, T. L., and Peyrot-Clausade, M.: Bioerosion rates on coral reefs: interactions between macroborers, microborers and grazers (Moorea, French Polynesia), Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 113, 189-198, 10.1016/0031-0182(95)00043-l, 1995.

Chazottes, V., Le Campion-Alsumard, T., Peyrot-Clausade, M., and Cuet, P.: The effects of eutrophication-related alterations to coral reef communities on agents and rates of bioerosion (Reunion Island, Indian Ocean). Coral Reefs, 375–390, 10.1007/s00338-002-0259-0, 2002.

D'Elia, C. F.: The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals., Limnol. Oceanogr., 22, 301-315, 1977.

D'Elia, C. F., Domotor, S. L., and Webb, K. L.: Nutrient uptake kinetics of freshly isolated zooxanthellae., Mar. Biol., 75, 157-167., 1983.

Domart-Coulon, I. J., Sinclair, C. S., Hill, R. T., Tambutté, S., and Ostrander, G. K.: A basidiomycete isolated from the skeleton of *Pocillopora damicornis* (Scleractinia) selectively stimulates short-term survival of coral skeletogenic cells, Mar. Biol., 144, 583-592, 2004.

Dunn, J. G., Sammarco, P. W., and LaFleur Jr, G.: Effects of phosphate on growth and skeletal density in the scleractinian coral Acropora muricata: A controlled experimental approach, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 411, 34-44, 10.1016/j.jembe.2011.10.013, 2012.

Ferrer, L. M., and Szmant, A. M.: Nutrient regeneration by the endolithic community in coral skeletons, Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium, 1988, 1-4,

Fine, M., and Loya, Y.: Endolithic algae: an alternative source of photoassimilates during coral bleaching., Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 269, 1205-1210, 2002.

Fine, M., Steindler, L., and Loya, Y.: Endolithic algae photoacclimate to increased irradiance during coral bleaching, Mar. Freshw. Res., 55, 115-121, 2004.

Fine, M., Meroz-Fine, E., and Hoegh-Guldberg, O.: Tolerance of endolithic algae to elevated temperature and light in the coral *Montipora monasteriata* from the southern Great Barrier Reef, The Journal of Experimental Biology, 208, 75-81, 2005.

Garcia-Pichel, F., Ramírez-Reinat, E., and Gao, Q.: Microbial excavation of solid carbonates powered by P-type ATPase-mediated transcellular Ca2+ transport, Proc. Natl. Acad. Sci., 107, 21749-21754, 10.1073/pnas.1011884108, 2010.

Godinot, C., Ferrier-Pagès, C., and Grover, R.: Control of phosphate uptake by zooxanthellae and host cells in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*., Limnol. Oceanogr., 54, 1627-1633, 10.4319/lo.2009.54.5.1627, 2009.

Godinot, C., Ferrier-Pagès, C., Montagna, P., and Grover, R.: Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral Stylophora pistillata Esper 1797 under phosphate enrichment, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 409, 200-207, 10.1016/j.jembe.2011.08.022, 2011a.

Godinot, C., Grover, R., Allemand, D., and Ferrier-Pagès, C.: High phosphate uptake requirements of the scleractinian coral Stylophora pistillata, The Journal of Experimental Biology, 214, 2749-2754, 10.1242/jeb.054239, 2011b.

Golubic, S., Friedmann, E. I., and Schneider, J.: The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms, Journal of Sedimentary Research, 51, 475-478, 10.1306/212f7cb6-2b24-11d7-8648000102c1865d, 1981.

Kinsey, D. W., and Davies, P. J.: Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth., Limnol. Oceanogr., 24, 935-940, 1979.

Knackstedt, M. A., Arns, C. H., Senden, T. J., and Gross, K.: Structure and properties of clinical coralline implants measured via 3D imaging and analysis, Biomaterials, 27, 2776-2786, 10.1016/j.biomaterials.2005.12.016, 2006.

Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., and Hutchings, P.: Microbial endoliths in skeletons of live and dead corals : *Porites lobata* (Moorea, french Polynesia), Mar. Ecol. Prog. Ser., 117, 149-157, 1995a.

Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., and Priess, K.: Fungi in corals : symbiosis or disease ? interaction between polyps and fungi causes pearl-like skeleton biomineralization, Mar. Ecol. Prog. Ser., 117, 137-147, 1995b.

McCook, L. J.: Macroalgae, nutrients and phase shifts on coral reefs: scientific issues and management consequences for the Great Barrier Reef, Coral Reefs, 18, 357-367, 1999.

Odum, H. T., and Odum, E. P.: Trophic structure and productivity of a windward coral reef community on Eniwetok atoll, Ecol. Monogr., 25, 291-320, 1955.

Pätzold, J.: Growth rhythms recorded in stable isotopes and density bands in the reef coral *Porites lobata* (Cebu, Philippines), Coral Reefs, 3, 87-90, 10.1007/bf00263758, 1984.

Perry, C. T.: Grain susceptibility to the effects of microboring: implications for the preservation of skeletal carbonates, Sedimentology, 45, 39-51, 10.1046/j.1365-3091.1998.00134.x, 1998.

Perry, C. T.: Factors controlling sediment preservation on a North Jamaican fringing reef: a process-based approach to microfacies analysis, Journal of Sedimentary Research, 70, 633-648, 10.1306/2dc4092d-0e47-11d7-8643000102c1865d, 2000.

Priess, K., Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., Gadel, F., and Thomassin, B. A.: Fungi in corals: black bands and density-banding of *Porites lutea* and *P. lobata* skeleton, Mar. Biol., 136, 19-27, 2000.

Risk, M. J., and Müller, H. R.: Porewater in coral heads: evidence for nutrient regeneration, Limnol. Oceanogr., 28, 1004-1008, 1983.

Risk, M. J., Sammarco, P. W., and Edinger, E. N.: Bioerosion in *Acropora* across the continental shelf of the Great Barrier Reef, Coral Reefs, 14, 79-86, 10.1007/bf00303427, 1995.

Sammarco, P. W., and Risk, M. J.: Large-scale patterns in internal bioerosion of *Porites*: cross continental shelf trends on the Great Barrier Reef, Mar. Ecol.-Prog. Ser., 59, 145-156, 10.3354/meps059145, 1990.

Schlichter, D., Zscharnack, B., and Krisch, H.: Transfer of photoassimilates from endolithic algae to coral tissue, Naturwissenschaften, 82, 561-564, 10.1007/bf01140246, 1995.

Schneider, J., and Torunski, H.: Biokarst on limestone coasts, morphogenesis and sediment production, Mar. Ecol., 4, 45-63, 10.1111/j.1439-0485.1983.tb00287.x, 1983.

Tomascik, T., and Sander, F.: Effects of eutrophication on reef-building corals. I. Growth rate of the reef building coral *Monstrea annularis.*, Mar. Biol., 87, 143-155., 1985.

Tribollet, A., and Payri, C.: Bioerosion of the coralline alga *Hydrolithon onkodes* by microborers in the coral reefs of Moorea, French Polynesia, Oceanologica Acta, 24, 329-342, 10.1016/s0399-1784(01)01150-1, 2001.

Tribollet, A., Decherf, G., Hutchings, P., and Peyrot-Clausade, M.: Large-scale spatial variability in bioerosion of experimental coral substrates on the Great Barrier Reef (Australia): importance of microborers, Coral Reefs, 21, 424-432, 10.1007/s00338-002-0267-0, 2002.

Tribollet, A., and Golubic, S.: Cross-shelf differences in the pattern and pace of bioerosion of experimental carbonate substrates exposed for 3 years on the northern Great Barrier Reef, Australia, Coral Reefs, 24, 422-434, 2005.

Tribollet, A., Langdon, C., Golubic, S., and Atkinson, M. J.: Endolithic microflora are major primary producers in dead carbonate substrates of Hawaiian coral reefs, J. Phycol., 42, 292-303, 2006.

Tribollet, A.: The boring microflora in modern coral reefs: a review of its roles, in: Current Developments in Bioerosion. , edited by: Wisshak, M., and Tapanila, L., Berlin-Heiderlberg, Springer-Verlag, 67-94, 2008a.

Tribollet, A.: Dissolution of dead corals by euendolithic microorganisms across the

northern Great Barrier Reef (Australia), Microb. Ecol., 55, 569-580, 10.1007/s00248-007-9302-6, 2008b.

Tribollet, A., Godinot, C., Atkinson, M. J., and Langdon, C.: Effects of elevated pCO_2 on dissolution of coral carbonates by microbial euendoliths., Global Biogeochem. Cy., 23, GB3008.3001-3007, 10.1029/2008GB003286, 2009.

Zubia, M., and Peyrot-Clausade, M.: Internal bioerosion of Acropora formosa in Réunion (Indian Ocean): microborer and macroborer activities, Oceanologica Acta, 24, 251-262, 10.1016/s0399-1784(01)01144-6, 2001.

Références bibliographiques

A

Allemand, D., Furla, P., et Bénazet-Tambutté, S. 1998. Mechnisms of carbon acquisition for endosymbiont photosynthesis in Anthozoa. *Canadian Journal of Botany/Revue canadienne de botanique* 76**:** 925-941.

Alker, A. P., Smith, G. W., et Kim, K. 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Carribean sea fan corals. *Hydrobiologia* 460**:** 105-111.

Aminot, A., et Kérouel, R. 2007. *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: Méthodes en flux continu*. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin.

Annis, E. R., et Cook, C. B. 2002. Alkaline phosphatase activity in symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) as a biological indicator of environmental phosphate exposure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 245**:** 11-20.

Anthony, K. R. N. 1999. Coral suspension feeding on fine particulate matter. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232**:** 85-106.

Anthony, K. R. N., et Fabricius, K. E. 2000. Shifting roles of heterotrophy and autotrophy in coral energetics under varying turbidity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 252**:** 221-253.

Atkinson, M. J. 1987a. Alkaline phosphatase activity of coral reef benthos. *Coral Reefs* 6**:** 59-62.

Atkinson, M. J. 1987b. Rates of phosphate uptake by coral reef flat communities. *Limnol. Oceanogr.* 32**:** 426-435.

Atkinson, M. J., Carlson, B., et Crow, G. L. 1995. Coral growth in high-nutrient, low-pH seawater: A case study of corals cultured at the Waikiki aquarium, Honolulu, Hawaii. *Coral Reefs* 14**:** 215-223.

Atkinson, M. J. 2011. Biogeochemistry of nutrients, p. 199-206. *Dans* Z. Dubinsky et N. Stambler [eds.], *Coral reefs: An ecosystem in transition*. Springer Netherlands.

B

Baghdasarian, G., et Muscatine, L. 2000. Preferential expulsion of dividing algal cells as a mechanism for regulating algal-cnidarian symbiosis. *The Biological Bulletin* 199**:** 278-286.

Barlow, S. B., et Triemer, R. E. 1986. Phosphatase localization in the endomembrane system of the Dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 34**:** 1021-1027.

Barnes, D. J., et Devereux, M. J. 1984. Productivity and calcification on a coral reef: A survey using pH and oxygen electrode techniques. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79**:** 213-231.

Barnes, D. J., et Chalker, B. E. 1990. Calcification and photosynthesis in reef-building corals and algae, p. 109-131. *Dans* Z. Dubinsky [ed.], *Coral reefs*. Ecosystems of the world. Elsevier.

Barnes, D. J., et Lough, J. M. 1996. Coral skeletons: Storage and recovery of environmental information. *Glob. Change Biol.* 2**:** 569-582.

Bashkin, V. N., et Howarth, R. W. 2003. *Modern biogeochemistry*. Kluwer Academic Press.

Battey, J. F., et Patton, J. S. 1987. Glycerol translocation in *Condylactis gigantea*. *Mar. Biol.* 95**:** 37-46.

Battey, J. F. 1992. Carbon metabolism in zooxanthellae-coelenterate symbiosis, p. 174-187. *Dans* W. Reisser [ed.], *Algae and symbiosis: Plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*. Biopress Limited.

Baturin, N. 2003. Phosphorus cycle in the ocean. *Lithology and Mineral Resources* 38**:** 101-119.

Beardall, J., Young, E., et Roberts, S. 2001. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences* 63**:** 44-69.

Behrenfeld, M. J., Bale, A. J., Kolber, Z. S., Aiken, J., et Falkowski, P. G. 1996. Confirmation of iron limitation of phytoplankton photosynthesis in the equatorial pacific ocean. *Nature* 383**:** 508-511.

Belda, C. A., Lucas, J. S., et Yellowlees, D. 1993. Nutrient limitation in the giant clam-zooxanthellae symbiosis: Effects of nutrient supplements on growth of the symbiotic partners. *Mar. Biol.* 117**:** 655-664.

Belda, C. A., et Yellowlees, D. 1995. Phosphate acquisition in the giant clam-zooxanthellae symbiosis. *Mar. Biol.* 124**:** 261-266.

Bell, P. R. F., et Tomascik, T. 1993. The demise of fringing coral reefs of Barbados and of regions in the Great Barrier Reef lagoon-impacts of eutrophication. *Dans* R.N. Ginsburg [ed.], Proceedings of the Colloquium on Global Aspects of Coral Reefs: Health, Hazards and History.

Bellwood, D. R., Hughes, T. P., Folke, C., et Nyström, M. 2004. Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429**:** 827-833.

Beman, J. M., Chow, C.-E., King, A. L., Feng, Y., Fuhrman, J. A., Andersson, A., Bates, N. R., Popp, B. N., et Hutchins, D. A. 2011. Global declines in oceanic nitrification rates as a consequence of ocean acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108**:** 208-213.

Benitez-Nelson, C. R. 2000. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Reviews* 51**:** 109-135.

Bentis, C. J., Kaufman, L., et Golubic, S. 2000. Endolithic fungi in reef-building corals (order: Scleractinia) are common, cosmopolitan, and potentially pathogenic. *Biological Bulletin* 198**:** 254-260.

Berkelmans, R., et 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.

Berner, R. A., Westrich, J. T., Graber, R., Smith, J., et Martens, C. S. 1978. Inhibition of aragonite precipitation from supersaturated seawater: A laboratory and field study. *American Journal of Science* 278**:** 816-837.

Björkman, K., et Karl, D. M. 1994. Bioavailability of inorganic and organic phosphorus compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaiian coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 111**:** 265-273.

Blank, R. J. 1987. Cell architecture of the dinoflagellate *symbiodinium* sp. Inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* 94**:** 143-155.

Boyd, R. K., DeFreitas, A. S. W., Hoyle, J., McCulloh, A. W., McInnes, A. G., Rogerson, A., et Walter, J. A. 1987.

Glycerol 1,2-cyclic phosphate in centric Diatoms. Observation by ^{31}P NMR *in vivo*, isolation, and structural determination. *J. Biol. Chem.* 262**:** 12406-12408.

Brahmi, C., Meibom, A., Smith, D. C., Stolarski, J., Auzoux-Bordenave, S., Nouet, J., Doumenc, D., Djediat, C., et Domart-Coulon, I. 2009. Skeletal growth, ultrastructure and composition of the azooxanthellate scleractinian coral *Balanophyllia regia*. *Coral Reefs*.

Brown, B. E., Dunne, R. P., Scoffin, T. P., et Le Tissier, M. D. A. 1994. Solar damage in intertidal corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105**:** 219-230.

Bucher, D. J., et Harrison, P. L. 2000. Growth response of the reef coral *Acropora longicyathus* to elevated inorganic nutrients: Do responses to nutrients vary among coral taxa?, p. 443-448. Proceedings 9th International Coral Reef symposium, Bali, Indonesia.

Burton, E. A., et Walter, L. M. 1990. The role of pH in phosphate inhibition of calcite and aragonite precipitation rates in seawater. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 54**:** 797-808.

C

Cantin, N. E., Cohen, A. L., Karnauskas, K. B., Tarrant, A. M., et McCorkle, D. C. 2010. Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea. *Science* 329**:** 322-325.

Capone, D. G., et Carpenter, E. J. 1999. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria : Historical and global perspectives. *Bulletin de l'Institut océanographique* 19**:** 235-256.

Carreiro-Silva, M., McClanahan, T. R., et Kiene, W. E. 2005. The role of inorganic nutrients and herbivory in controlling microbioerosion of carbonate substratum. *Coral Reefs* 24**:** 214-221.

Carreiro-Silva, M., McClanahan, T. R., et Kiene, W. E. 2009. Effects of inorganic nutrients and organic matter on microbial euendolithic community composition and microbioerosion rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 392**:** 1-15.

Carreiro-Silva, M., Kiene, W. E., Golubic, S., et McClanahan, T. R. 2012. Phosphorus and nitrogen effects on microbial euendolithic communities and their bioerosion rates. *Mar. Pollut. Bull.* 64**:** 602-613.

Catmull, J., Yellowlees, D., et Miller, D. J. 1987. NADP$^+$-dependent glutamate dehydrogenase from *Acropora formosa*: Purification and properties. *Mar. Biol.* 95**:** 559-563.

Chang, S. S., Prezelin, B. B., et Trench, R. K. 1983. Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *Mar. Biol* 76**:** 219-229.

Charpy, L., et Charpy-Roubaud, C. 1988. Phosphorus budget in an atoll lagoon, p. 547-550. 6th International Coral Reef Symposium.

Charpy, L. 2001. Phosphorus supply for atoll biological productivity. *Coral Reefs* 20**:** 357-360.

Chazottes, V., Le Campion-Alsumard, T., Peyrot-Clausade, M., et Cuet, P. 2002. The effects of eutrophication-related alterations to coral reef communities on agents and rates of bioerosion (Reunion island, Indian Ocean). *Coral Reefs***:** 375–390.

Coffroth, M. A., et Santos, S. R. 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* 156**:** 19-34.

Coles, S. L. 1997. Reef corals occurring in a highly fluctuating temperature environment at Fahal Island, Gulf of Oman (Indian Ocean). *Coral Reefs* 16**:** 269-272.

Coles, S. L., et Brown, B. E. 2003. Coral bleaching - capacity for acclimatization and adaptation. *Adv. Mar. Biol.* 46**:** 182-223.

Colman, A. S., et Holland, H. D. 2000. The global diagenetic flux of

phosphorus from marine sediments to the oceans: Redox sensitivity and the control of atmospheric oxygen levels, p. 53-75. *Dans* C.R. Glenn, L. Prevot-Lucas et J. Lucas [eds.], *Marine authigenesis: From global to microbial*. SEPM.

Connell, J. H. 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science* 199**:** 1302-1310.

Cook, C. B. 1983. Metabolic interchange in algae-invertebrate symbiosis. *Int. Rev. Cytol. Supp.* 14**:** 177-210.

Cook, C. B., et D'Elia, C. F. 1987. Are natural populations of zooxanthellae ever nutrient-limited? *Symbiosis* 4**:** 199-212.

Cooper, R. A., Bowen, I. D., et Lloyd, D. 1974. The properties and subcellular localization of acid phosphatases in the colourless alga, *Polytomella caeca*. *J. Cell Sci.* 15**:** 605-618.

Cotner, J. B., Ammerman, J. W., Peele, E. R., et Bentzen, E. 1997. Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sargasso sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 13**:** 141-149.

Crossland, C. J., et Barnes, D. J. 1977. Nitrate assimilation enzymes from two hard corals, *Acropora acuminata* and *Goniastrea australensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 57**:** 151-157.

Crossland, C. J. 1980. Release of photosynthetically-derived organic carbon from a hermatypic coral, *Acropora cf. Acuminata*. *Endocytobiology* 1**:** 163-171.

Crossland, C. J. 1983. Dissolved nutrients in coral reefs, p. 56-68. *Dans* D.J. Barnes [ed.], *Perspectives in coral reefs*. Brian Clouston Publisher.

Crossland, C. J., et Barnes, D. J. 1983. Dissolved nutrients and organic particulates in water flowing over coral reefs at Lizard Island. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 34**:** 835-844.

Cui, L., Cao, R., Li, J., Zhang, L., et Wang, J. 2006. High temperature effects on ammonium assimilation in leaves of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Plant Growth Regul.* 49**:** 127-136.

Cuif, J.-P., Dauphin, Y., Doucet, J., Salome, M., et Susini, J. 2003. Xanes mapping of organic sulfate in three scleractinian coral skeletons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67**:** 75-83.

Cuif, J. P., Dauphin, Y., Freiwald, A., Gautret, P., et Zibrowius, H. 1999. Biochemical markers of zooxanthellae symbiosis in soluble matrices of skeleton of 24 *Scleractinia* species. *Comp. Biochem. Physiol.* 123 - Part A**:** 269-278.

D

Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., France, S. C., McFadden, C. S., Opresko, D. M., Rodriguez, E., Romano, S. L., et Stake, J. L. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668**:** 127-173.

Davies, P. S. 1984. The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs* 2**:** 181-186.

Deane, E. M., et O'Brien, R. W. 1981. Uptake of phosphate by symbiotic and free-living dinoflagellates. *Arch. Microbiol.* 128**:** 307-310.

De Baar, H. J. W., Buma, A. G. J., Nolting, R. F., Cadee, G. C., Jacques, G., et Treguer, P. J. 1990. On iron limitation of the southern ocean: Experimental observation on the Weddell and Scotia seas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 65**:** 105-122.

DeBary, A. 1866. De la génération sexeulle dans les champignons. *Annls. Sci. Nat. Bot.* 5**:** 343-348.

De Kanel, J., et Morse, J. W. 1978. The chemistry of orthophosphate uptake from seawater on to calcite and

aragonite. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 42: 1335-1340.

D'Elia, C. F. 1977. The uptake and release of dissolved phosphorus by reef corals. *Limnol. Oceanogr.* 22: 301-315.

D'Elia, C. F., Webb, K. L., et Porter, J. W. 1981. Nitrate-rich groundwater inputs to Discovery bay, Jamaica: A significant source of N to local coral reefs? *Bull. Mar. Sci.* 31: 903-910.

D'Elia, C. F., Domotor, S. L., et Webb, K. L. 1983. Nutrient uptake kinetics of freshly isolated zooxanthellae. *Mar. Biol.* 75: 157-167.

D'Elia, C. F., Sanders, J. G., et Boynton, W. R. 1986. Nutrient enrichment studies in a coastal plain estuary: Phytoplankton growth in large-scale, continuous cultures. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 397-406.

D'Elia, C. F., et Wiebe, W. J. 1990. Biogeochemical nutrient cycles in coral-reef ecosystems, p. 26. Elsevier.

Demers, C., Hamdy, C. R., Corsi, K., Chellat, F., Tabrizian, M., et Yahia, L. H. 2002. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. *Bio-Med. Mater. Eng.* 12: 15-35.

Deslauriers, R., Ekiel, I., Byrd, R. A., Jarrell, H. C., et Smith, I. C. P. 1982. A ^{31}P-NMR study of structural and functional aspects of phosphate and phosphonate distribution in *Tetrahymena*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 720: 329-337.

Diaz, F., Raimbault, P., Boudjellal, B., Garcia, N., et Moutin, T. 2001. Early spring phosphorus limitation of primary productivity in a NW Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 51-62.

Domart-Coulon, I. J., Elbert, D. C., Scully, E. P., Calimlim, P. S., et Ostrander, G. K. 2001. Aragonite crystallization in primary cell culture of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*. *PNAS* 98: 11885-11890.

Domart-Coulon, I. J., Sinclair, C. S., Hill, R. T., Tambutté, S., et Ostrander, G. K. 2004. A basidiomycete isolated from the skeleton of *Pocillopora damicornis* (Scleractinia) selectively stimulates short-term survival of coral skeletogenic cells. *Mar. Biol.* 144: 583-592.

Domotor, S. L., et D'Elia, C. F. 1984. Nutrient uptake kinetics and growth of zooxanthellae maintained in laboratory culture. *Mar. Biol.* 80: 93-101.

Donner, S. D., et Potere, D. 2007. The inequity of the global threat to coral reefs. *Bioscience* 57: 214-215.

Doonan, B. B., et Jensen, T. E. 1980. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the Cyanobacteria *Coccochloris peniocytis* and *Anabaena cylindrica*. *Protoplasma* 102: 189-197.

Douglas, A. E., McAuley, P. J., et Davies, P. S. 1993. Algal symbiosis in Cnidaria. *Journal of Zoology* 231: 175-178.

Dykens, J. A., Shick, J. M., Benoit, C., Buettner, G. R., et Winston, G. W. 1992. Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. *J. Exp. Biol.* 168: 219-241.

Dunn, J. G., Sammarco, P. W., et LaFleur Jr, G. 2012. Effects of phosphate on growth and skeletal density in the Scleractinian coral *Acropora muricata*: A controlled experimental approach. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 411: 34-44.

E

Elser, J. J., Bracken, M. E., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., et Smith, J. E. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 10: 1135-1142.

Emsley, J. 2002. *The 13th element: The sordid tale of murder, fire, and phosphorus*. John Wiley & Sons, Inc.

Ertan, H. 1992. Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* 158**:** 35-41.

Estrada, M., Sala, M. M., van Lenning, K., Alcaraz, M., Felipe, J., et Veldhuis, M. J. W. 2008. Biological interactions in enclosed plankton communities including *Alexandrium catanella* and copepods : Role of phosphorus. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 355**:** 1-11.

F

Falkowski, P. G. 1983. Enzymology of nitrogen assimilation, p. 839-868. *Dans* E.J. Carpenter et D.G. Capone [eds.], *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press.

Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., et Porter, J. W. 1984. Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. *Bioscience* 34**:** 705-709.

Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., et McCloskey, L. 1993. Population control in symbiotic corals. Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. *Bioscience* 43**:** 606-611.

Falkowski, P. G. 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO_2 in the ocean. *Nature* 387**:** 272-275.

Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J., et Millero, F. J. 2004. Impact of anthropogenic CO_2 on the $CaCO_3$ system in the oceans. *Science* 305**:** 362-366.

Fernley, H. N. 1971. Mammalian alkaline phosphatases, p. 417-447. *Dans* P.D. Boyer [ed.], *The enzymes*. Academic Press.

Ferrer, L. M., et Szmant, A. M. 1988. Nutrient regeneration by the endolithic community in coral skeletons, p. 1-4. Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium.

Ferrier-Pagès, C., Gattuso, J. P., Dallot, S., et Jaubert, J. 2000. Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs* 19**:** 103-113.

Feuillade, J., Bielicki, G., et Renou, J.-P. 1995. ^{31}P-NMR study of natural phytoplankton samples. *Hydrobiologia* 300/301**:** 391-398.

Fine, M., et Loya, Y. 2002. Endolithic algae: An alternative source of photoassimilates during coral bleaching. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269**:** 1205-1210.

Furnas, M., Mitchell, A. W., Wellington, J., et Brady, B. 1988. Dissolved and particulate nutrients in waters of the Whitsunday Island group. *Dans* G.B.R.M.P. Authority [ed.]. Australian Institute of Marine Science.

Furnas, M. J. 1991. Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 36**:** 13-29.

G

Garcia-Pichel, F., Ramírez-Reinat, E., et Gao, Q. 2010. Microbial excavation of solid carbonates powered by P-type ATPase-mediated transcellular Ca^{2+} transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107**:** 21749-21754.

Gattuso, J.-P. 1987. Écomorphologie, métabolisme, croissance et calcification du scléractiniaire à zooxanthelles *Stylophora pistillata* (Golfe d'Aqaba, Mer Rouge). Influence de l'éclairement. Aix-Marseille II.

Gattuso, J.-P., Allemand, D., et Frankignoulle, M. 1999. Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community

levels in coral reefs: A review on interactions and control by carbonate chemistry. *Am. Zool.* 39**:** 160-183.

Gerencser, G. A., Levin, R., et Zhang, J. 2002. Sodium-phosphate symport by *Aplysia californica* gut (physiology). *Zool. Sci. (Tokyo)* 19**:** 163-166.

Glynn, P. W. 1993. Coral reef bleaching: Ecological perspectives. *Coral Reefs* 12**:** 1-17.

Glynn, P. W. 1997. Bioerosion and coral reef growth: A dynamic balance, p. 68–94. *Dans* C. Birkeland [ed.], *Life and death of coral reefs*. Chapman and Hall.

Godinot, C., Ferrier-Pagès, C., Montagna, P., et Grover, R. 2011. Tissue and skeletal changes in the scleractinian coral *Stylophora pistillata* Esper 1797 under phosphate enrichment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409**:** 200-207.

Goiran, C., Allemand, D., et Galgani, I. 1997. Transient Na^+ stress in symbiotic dinoflagellates after isolation from coral-host cells and subsequent immersion in seawater. *Mar. Biol.* 129**:** 581-589.

Goldman, J. C., McCarthy, J. J., et Peavey, D. G. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature* 279**:** 210-215.

Goodman, M., Bradley, D. F., et Calvin, M. 1953. Phosphorus and photosynthesis. I. Differences in the light and dark incorporation of radiophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 75**:** 1962-1967.

Goreau, T. 1956. Histochemistry of mucopolysaccharide-like substances and alkaline phosphatase in *Madreporaria*. *Nature* 177**:** 1029-1030.

Goreau, T. F. 1959. The physiology of skeleton formation in corals. I. A method for measuring the rate of calcium deposition by corals under different conditions. *The Biological Bulletin* 116**:** 59-75.

Goreau, T. J. 1977. Coral skeletal chemistry: Physiological and environmental regulation of stable isotopes and trace metals in *Montastrea annular*is, p. 291-315. Proc. R. Soc. Lond. B.

Grover, R., Maguer, J.-F., Reynaud-Vaganay, S., et Ferrier-Pagès, C. 2002. Uptake of ammonium by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Effect of feeding, light, and ammonium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 47**:** 782-790.

Grover, R., Maguer, J.-F., Allemand, D., et Ferrier-Pagès, C. 2003. Nitrate uptake in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Limnol. Oceanogr.* 48**:** 2266-2274.

Grover, R., Maguer, J.-F., Allemand, D., et Ferrier-Pagès, C. 2008. Uptake of dissolved free amino acids by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *J. Exp. Biol.* 211**:** 860-865.

Guinotte, J. M., et Fabry, V. J. 2008. Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1134-**:** 320-342.

H

Hagedorn, M., Carter, V. L., Ly, S., Andrell, R. M., Yancey, P. H., Leong, J.-A. C., et Kleinhans, F. W. 2009. Analysis of internal osmolality in developing coral larvae, *Fungia scutaria*. *Physiol. Biochem. Zool.* 83**:** 157-166.

Hayes, R. L., et Goreau, N. I. 1977. Cytodynamics of coral calcification, p. 433-438. Proceedings, Third Int. Coral reef Symp. Rosenthial School of Marine and atmospheric Science.

Hall, D. O., et Rao, K. K. 1987. *Photosynthesis*. Cambridge University Press.

Henderson, T. O., Glonek, T., Hilderbrand, R. L., et Myers, T. C. 1972. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the phosphonate and phosphate composition of the sea anemone, *Bunadosoma*, sp. *Arch. Biochem. Biophys.* 149**:** 484-497.

Herrera, F., Lopez, I., Egea, R., et Zanders, P. 1989. Short-term osmotic response of cells and tissues of the sea anemones, *Condylactis gigantea*. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 92**:** 377-384.

Hilderbrand, R. L. 1983. *The role of phosphonates in living systems*. CRC Press.

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., 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., et Hatziolos, M. E. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318**:** 1737-1742.

Hoegh-Guldberg, O. 2008. The future of coral reefs in a rapidly changing world, p. 95-107. *Dans* P.A. Hutchings, M.J. Kingsford et O. Hoegh-Guldberg [eds.], *Great barrier reef: Biology, environment and managment*. CSIRO Publishing.

Hollander, V. P. 1971. Acid phosphatases, p. 449-498. *Dans* P.D. Boyer [ed.], *The enzymes*. Academic Press.

Holmes, R. M., Aminot, A., Kérouel, R., Hooker, B. A., et Peterson, B. J. 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56**:** 1801-1808.

Hoogenboom, M., Rodolfo-Metalpa, R., et Ferrier-Pagès, C. 2010. Co-variation between autotrophy and heterotrophy in the mediterranean coral *Cladocora caespitosa*. *J. Exp. Biol.* 213**:** 2399-2409.

Houlbrèque, F., et Ferrier-Pagès, C. 2009. Heterotrophy in tropical scleractinian corals. *Biological Reviews* 84**:** 1-17.

Hutchins, D. A., Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M. E., Feng, Y., Portune, K., Bernhardt, P. W., et Mulholland, M. R. 2007. CO_2 control of *Trichodesmium* N_2 fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnol. Oceanogr.* 52**:** 1293-1304.

Hutchins, D. A., et Fu, F.-X. 2008. Linking the oceanographic biogeochemistry of iron and phosphorus with the marine nitrogen cycle., p. 1,627-621,653. *Dans* D.G. Capone, D.A. Bronk, M.R. Mulholland et E.J. Carpenter [eds.], *Nitrogen in the marine environment, 2nd ed.* Elsevier Press.

J

Jackson, A. E., Miller, D. J., et Yellowlees, D. 1989. Phosphorus metabolism in the coral-zooxanthellae symbiosis: Characterization and possible roles of two acid phosphatases in the algal symbiont *symbiodinium* sp. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 238**:** 193-202.

Jackson, A. E., et Yellowlees, D. 1990. Phosphate uptake by zooxanthellae isolated from corals. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 242**:** 201-204.

Jeffrey, S. W., et Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*1, and *c*2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz* 167**:** 191-194.

Johannes, R., Kinzie, R., Kimmerer, W., Shiroma, E., et Walsh, T. 1979. The impacts of human activities on Tarawa lagoon. Report to the Government of the Gilbert Islands.

Jokiel, P. L., Maragos, J. E., et Franzisket, L. 1978. Coral growth: Buoyant weight technique, p. 379-396. *Dans* D.R. Stoddart et R.E. Johannes [eds.], *Coral reef: Research methods*. Unesco.

K

Karako-Lampert, S., Katcoff, D. J., Achituv, Y., Dubinsky, Z., et 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? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311**:** 301-314.

Karl, D., Letelier, R., Tupas, L., Dore, J., Christian, J., et Hebel, D. 1997. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical north pacific ocean. *Nature* 388.

Karl, D. M., et Björkman, K. 2002. Dynamics of DOP, p. 249-258. *In* d. A. Hansell and c. A. Carlson [eds.]. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press.

Kimura, T., Watanabe, M., Kohata, K., et Sudo, R. 1999. Phosphate metabolism during diel vertical migration in the Raphidophycean alga, *Chattonella antiqua*. *J. Appl. Phycol.* 11**:** 301-311.

Kinsey, D. W., et Davies, P. J. 1979. Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth. *Limnol. Oceanogr.* 24**:** 935-940.

Kinzie, R. A., Jokiel, P. L., et York, R. 1984. Effects of light of altered spectral composition on coral zooxanthellae associations and on zooxanthellae *in vitro*. *Mar. Biol.* 78**:** 239-248.

Kittredge, J. S., Roberts, E., et Simonsen, D. G. 1962. The occurrence of free 2-aminoethylphosphonic acid in the sea anemone, *Anthopleura elegantissima*. *Biochemistry* 1**:** 624-628.

Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., Archer, D., Gattuso, J.-P., Langdon, C., et Opdyke, B. N. 1999. Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs. *Science* 284**:** 118-120.

Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., et Gattuso, J. P. 2001. The future of coral reefs in an age of global change. *International Journal of Earth Sciences* 90**:** 426-437.

Kleypas, J. A., Feely, R. A., Fabry, V. J., Langdon, C., Sabine, C. L., et Robbins, L. L. 2006. Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers. A guide for future research. Report of a workshop sponsored by NSF, NOAA & USGS.

Kleypas, J. A., Danabasoglu, G., et Lough, J. M. 2008. Potential role of the ocean thermostat in determining regional differences in coral reef bleaching events. *Geophysical Research Letters* 35**:** L03613.

Kolowith, L. C., Ingall, E. D., et Benner, R. 2001. Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnol. Oceanogr.* 46**:** 309-320.

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., et Yellowlees, D. 2001. ENCORE: The effect of nutrient enrichment on coral reefs. Synthesis of results and conclusions. *Mar. Pollut. Bull.* 42**:** 91-120.

Kortschak, R. D., Samuel, G., Saint, R., et Miller, D. J. 2003. EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr. Biol.* 13**:** 2190-2195.

Kuenzler, E. J., et Perras, J. P. 1965. Phosphatases of marine algae. *The Biological Bulletin* 128**:** 271-284.

Kugel, H., Mayer, A., Kirts, G. O., et Leibfritz, D. 1987. In vivo P-31 NMR measurements of phosphate metabolism in *Platymonas subcordiformis* as related to external pH. *Eur. Biophys. J.* 14**:** 461-470.

L

LaJeunesse, T. C., Loh, W. K. W., van Woesik, R., Hoegh-Guldberg, O., Schmidt, G. W., et Fitt, W. K. 2003. Low symbiont diversity in southern great barrier reef corals, relative to those of the caribbean. *Limnol. Oceanogr.* 48**:** 2046-2054.

LaJeunesse, T. C., Bhagooli, R., Hidaka, M., de Vantier, L., Done, T., Schmidt, G. W., Fitt, W. K., et Hoegh-Guldberg, O. 2004. Closely related *symbiodinium* spp. Differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284**:** 147-161.

Lang, J. 1973. Interspecific aggression by scleractinian corals. Ii. Why the race is not only to the swift. *Bull. Mar. Sci.* 23**:** 260-279.

Lapointe, B. E., et O'Connell, J. 1989. Nutrient-enhanced growth of *Cladophora prolifera* in Harrington sound, Bermuda: Eutrophication of a confined, phosphorus-limited marine ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 28**:** 347-360.

Lapointe, B., et Clark, M. 1992. Nutrient inputs from the watershed and coastal eutrophication in the Florida Keys. *Estuaries and Coasts* 15**:** 465-476.

LaVigne, M., Field, M. P., Anagnostou, E., Grottoli, A. G., Wellington, G. M., et Sherrell, R. M. 2008. Skeletal P/Ca tracks upwelling in Gulf of Panama coral: Evidence for a new seawater phosphate proxy. *Geophysical Research Letters* 35**:** 1-5.

Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., et Hutchings, P. 1995. Microbial endoliths in skeletons of live and dead corals : *Porites lobata* (Moorea, French Polynesia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117**:** 149-157.

Lecointre, G., et Le Guyader, H. 2001. *La classification phylogénétique du vivant*. Lavoisier.

Lehninger, A. L. 1985. ATP and cellular bioenergetics, p. 361-396. *In Flammarion [eds.], principles of biochemistry, 1st edition.*

Levitan, O., Rosenberg, G., Setlik, I., Setlikova, E., Grigel, J., Klepetar, J., Prasil, O., et Berman-Frank, I. 2007. Elevated CO_2 enhances nitrogen fixation and growth in the marine Cyanobacterium *Trichodesmium*. *Glob. Change Biol.* 13**:** 531-538.

Liebig, J. 1855. *Principles of agricultural chemistry: With special reference to the late researches made in england*. John Wiley.

Lough, J. M., Barnes, D. J., et Taylor, R. B. 1996. The potential of massive corals for the study of high-resolution climate variation in the past millennium, p. 355-371. *Dans* P.D. Jones, R.S. Bradley et J. Jouzel [eds.], *Climatic variations and forcing mechanisms of the last 2000 years*. Springer Verlag.

Loya, Y., Sakai, K., Yamazato, K., Nakano, Y., Sambali, H., et Van Woesik, R. 2001. Coral bleaching: The winners and the losers. *Ecol. Lett.* 4**:** 122-131.

M

Mallela, J., Hermann, J., Rapp, R., et Eggins, S. 2011. Fine-scale phosphorus distribution in coral skeletons: Combining X-ray mapping by electronprobe microanalysis and LA-ICP-MS. *Coral Reefs* 30**:** 813-818.

Maragos, J. E., Evans, C., et Holtus, P. 1985. Reef corals in Kaneohe bay six years before and after termination of sewage discharges (Oahu, Hawaiian archipelago). p. 188-194. Proceedings of the fifth international coral reef congress.

Markovich, D. 2010. Sulfate and phosphate transporters in mammalian renal and gastrointestinal systems. *Dans* G.A. Gerencser [ed.], *Epithelial transport physiology*. Springer.

Marsh, J. A. 1977. Terrestrial inputs of nitrogen and phosphates on fringing reefs on Guam, p. 331-336. International Coral Reef Symposium.

Martin, J. H., Gordon, R. M., et Fitzwater, S. E. 1991. The case for iron. *Limnol. Oceanogr.* 36**:** 1793-1802.

Martinez-Bilbao, M., Martinez, A., Urkijo, I., Llama, M. J., et Serra, J. L. 1988. Induction, isolation, and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous Cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* 170**:** 4897-4902.

Marubini, F., et Davies, P. S. 1996. Nitrate increases zooxanthellae population density and reduces skeletogenesis in corals. *Mar. Biol.* 127**:** 319-328.

Marubini, F., et Atkinson, M. J. 1999. Effects of lowered pH and elevated nitrate on coral calcification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 188**:** 117-121.

Mass, T., Einbinder, S., Brokovich, E., Shashar, N., Vago, R., Erez, J., et Dubinski, Z. 2007. Photoacclimation of *Stylophora pistillata* to light extremes: Metabolism and calcification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 334**:** 93-102.

McCook, L. J. 1999. Macroalgae, nutrients and phase shifts on coral reefs: Scientific issues and management consequences for the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 18**:** 357-367.

Meyer, J. L., Schultz, E. T., et Helfman, G. S. 1983. Fish schools: An asset to corals. *Science* 220**:** 1047-1049.

Mieog, J. C., et Van Oppen, M. J. H. e. a. 2007. Real-time PCR reveals a high incidence of symbiodinium clade D at low levels in four Scleractinian corals across the Great Barrier Reef: Implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs* 26**:** 449-457.

Miller, D. J., et Yellowlees, D. 1989. Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine Cnidarians: A critical review. *Proc. R. Soc. Lond.* 237B**:** 109-125.

Miller, D. J., et Ball, E. E. 2000. The coral *Acropora*: What it can contribute to our knowledge of Metazoan evolution and the evolution of developmental processes. *BioEssays* 22**:** 291-296.

Millero, F. J., et Sohn, M. L. 1992. *Chemical oceanography*. CRC Press.

Møller, M., Myklestad, S., et Haug, A. 1975. Alkaline and acid phosphatases of the marine diatoms *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 19**:** 217-226.

Montagna, P., McCulloch, M., Taviani, M., Mazzoli, C., et Vendrell, B. 2006. Phosphorus in cold-water corals as a proxy for seawater nutrient chemistry. *Science* 312**:** 1788-1791.

Moutin, T., Thingstad, T. F., van Wambeke, F., Marie, D., Slawyk, G., Raimbault, P., et Claustre, H. 2002. Does competition for nanomolar phosphate supply explain the predominance of the Cyanobacterium *Synechococcus*? *Limnol. Oceanogr.* 47**:** 1562-1567

Muller-Parker, G., Cook, C. B., et D'Elia, C. F. 1990. Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 60**:** 283-290.

Muller-Parker, G., Cook, C. B., et D'Elia, C. F. 1994. Elemental composition of the coral *Pocillopora damicornis* exposed to elevated seawater ammonium. *Pac. Sci.* 48**:** 234-246.

Muller-Parker, G., et D'Elia, C. F. 1997. Interactions between corals and their symbiotic algae, p. 96-113. *Dans* Birkeland [ed.], *Life and death of coral reefs*. Chapman and Hall.

Murphy, J., et Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27**:** 31-36.

Muscatine, L. 1967. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and

tridacna and its control by the host. *Science* 156**:** 516-519.

Muscatine, L., et Cernichiari, E. 1969. Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. *Biol. Bull.* 137**:** 506-523.

Muscatine, L., et Porter, J. W. 1977. Reef corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience* 27**:** 454-460.

Muscatine, L. 1980. Productivity of zooxanthellae, p. 381-402. *Dans* P.G. Falkowski [ed.], *Primary productivity in the sea*. Plenum.

Muscatine, L., Falkowski, P. G., Porter, J. W., et Dubinsky, Z. 1984. Fate of photosynthetic fixed carbon in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 222**:** 181-202.

Muscatine, L., Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Cook, P. A., et McCloskey, L. R. 1989a. The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral., p. 311-324. Proceedings of the Royal Society of London, Series B.

Muscatine, L., Porter, J. W., et Kaplan, I. R. 1989b. Resource partitioning by reef corals as determined from stable isotope composition. I. ^{13}C of zooxanthellae and animal tissue vs depth. *Mar. Biol.* 100**:** 185-193.

Muscatine, L., Ferrier-Pagès, C., Blackburn, A., Gates, R. D., Baghdasarian, G., et Allemand, D. 1998. Cell-specific density of symbiotic dinoflagellates in tropical Anthozoans. *Coral Reefs* 17**:** 329-337.

N

Neumann, H. 1968. Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases. *J. Biol. Chem.* 243**:** 4671-4676.

O

Odum, H. T., et Odum, E. P. 1955. Trophic structure and productivity of a windward coral reef community on Eniwetok atoll. *Ecol. Monogr.* 25**:** 291-320.

Odum, E. P. 1971. *Fundamentals of ecology*. Sounders, W. B.

Orr, J. O., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., et Yool, A. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437**:** 681-686.

P

Pick, U., et Weiss, M. 1991. Polyphosphate hydrolysis whithin acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halo-tolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 97**:** 1234-1240.

Pomeroy, L. R., et Kuenzler, E. J. 1967. Phosphorus turnover by coral reef animals, p. 474-482. *In* D. J. Nelson and C. F. Evans [eds.] Symposium on radioecology. Nat. Tech. Info. Serv.

Price, N. M., Ahner, B. A., et Morel, F. M. M. 1994. The equatorial pacific ocean: Grazer-controlled phytoplankton populations in an iron-limited ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 39**:** 520-534.

Puverel, S., Tambutté, E., Zoccola, D., Domart-Coulon, I., Bouchot, A., Lotto, S., Allemand, D., et Tambutté, S. 2005. Antibodies against the organic matrix in scleractinians: A new tool to

study coral biomineralization. *Coral Reefs* 24**:** 149-156.

Q

Quin, L. D. 1964. 2-aminoethyl-phosphonic acid in insoluble protein of the sea anemone *Metridium dianthus*. *Science* 144**:** 1133-1134.

Quin, L. D., et Quin, G. S. 2001. Screening for carbon-bound phosphorus in marine animals by high-resolution ^{31}P-NMR spectroscopy: Coastal and hydrothermal vent invertebrates *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 128**:** 173-185.

R

Rahav, O., Dubinsky, Z., Achituv, Y., et Falkowski, P. G. 1989. Ammonium metabolism in the zooxanthellate coral, *Stylophora pistillata*. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* 236**:** 325-337.

Rasmussen, C. E. 1988. The use of strontium as an indicator of anthro-pogenically altered environmental parameters., p. pp325-330. Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium, Australia.

Rasmussen, C. E., et Cuff, C. 1990. Enhanced nutrient levels in the marine environment and their effects on coral reefs., p. 13-20. Proceeding of the 4th Pacific Congress on Marine Science and Technology, Tokyo.

Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., Shepherd, J., Turley, C., et Watson, A. 2005. *Ocean acidification due to increasing atmo-spheric carbon dioxide*. The Royal Socitey.

Reaka-Kudla, M. L., Feingold, J. S., et Glynn, W. 1996. Experimental studies of rapid bioerosion of coral reefs in the Galápagos islands. *Coral Reefs* 15**:** 101-107.

Redfield, A. C. 1934. *On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. In* James Johnstone Memorial Volume. (ed. R.J. Daniel). University Press of Liverpool, pp. 177-192.

Redfield, A. C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *Am. Sci.* 46**:** 205-221.

Redfield, A. C., Ketchum, B., et Richards, F. A. 1963. The influence of organisms on the composition of sea-water, p. 26-77. *In m.N. Hill et al., editors. The sea. Interscience*.

Rees, T. A. V. 1991. Are symbiotic algae nutrient defficient? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 243**:** 227-233.

Renegar, D. A., et Riegl, B. M. 2005. Effect of nutrient enrichment and elevated CO_2 partial pressure on growth rate of Atlantic scleractinian coral *Acropora cervicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293**:** 69-76.

Reynaud, S., Leclercq, N., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagés, C., Jaubert, J., et Gattuso, J. P. 2003. Interacting effects of CO_2 partial pressure and temperature on photosynthesis and calcification in a scleractinian coral. *Glob. Change Biol.* 9**:** 1660-1668.

Richard, C. 2006. Mise au point de la technique de PAM (pulse amplitude modulation) fluorimétrie pour la mesure des paramètres photosynthétiques des Scléractiniaires à zooxanthelles. Ecole Pratique des Hautes Etudes.

Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P.-L., et Allemand, D. 2005. Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *The Journal of Experimental Biology* 208**:** 277-285.

Richmond, R. H., et Wolanski, E. 2011. Coral research: Past efforts and future horizons, p. 3-10. *Dans* Z. Dubinsky et N. Stambler [eds.], *Coral reefs: An ecosystem in transition*. Springer Netherlands.

Rosenberg, H. 1973. Phosphonolipids, p. 333–344. *Dans* G.B. Ansell, J.N. Hawthorne et R.M.C. Dawson [eds.],

Form and function of phospholipids. Elsevier.

Roth, E., Jeon, K., et Stacey, G. 1988. Homology in endosymbiotic systems: The term 'symbiosome', p. 220-225. *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. APS Press.

Rougerie, F., et Wauthy, B. 1986. Le concept d'endo-upwelling dans le fonctionnement des atoll-oasis. *Oceanologica Acta* 9**:** 133-148.

Rowan, R., et Powers, D. A. 1991. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71**:** 65-73.

Ruttenberg, K. C. 1993. Reassessment of the oceanic residence time of phosphorus. *Chemical Geology* 107**:** 405-409.

Ryther, J. H., et Dunstan, W. M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science* 171**:** 1008-1013.

S

Santos, S. R., Taylor, D. J., Kinzie, R. A., Hidaka, M., Sakai, K., et Coffroth, M. A. 2002. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23**:** 97-111.

Santos, S. R., Shearer, T. L., Hannes, A. R., et Coffroth, M. A. 2004. Fine-scale diversity and specificity in the most prevalent lineage of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, *Dinophyceae*) of the Caribbean. *Mol. Ecol.* 13**:** 459-469.

Schlesinger, W. H. 1997. *Biogeochemistry: An analysis of global change.* Academic Press.

Schlichter, D., Zscharnack, B., et Krisch, H. 1995. Transfer of photoassimilates from endolithic algae to coral tissue. *Naturwissenschaften* 82**:** 561-564.

Schneider, E. G. 1985. Activation of Na^+-dependent transport at fertilization in the sea urchin: Requirements of both an early event associated with exocytosis and a later event involving increased energy metabolism. *Dev. Biol.* 108**:** 152-163.

Schneider, J., et Le Campion-Alsumard, T. 1999. Construction and destruction of carbonates by marine and freshwater Cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 34**:** 417-426.

Scoffin, T. P., Stearn, W., Boucher, D., Frydl, P., Hawkins, C. M., Hunter, I. G., et Macgreathy, J. K. 1980. Calcium carbonate budget of a fringing reef on the west coast of Barbados: Part ii, erosion, sediments and internal structure. *Bull. Mar. Sci.* 30**:** 475-508.

Shick, J. M. 1990. Diffusion limitation and hyperoxic enhancement of oxygen consumption in zooxanthellate sea anemones, zoanthids, and corals. *The Biological Bulletin* 179**:** 148-158.

Shick, M., Lesser, M. P., et Jokiel, P. L. 1996. Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Glob. Change Biol.* 2**:** 527-545.

Sianoudis, J., Mayer, A., et Leibfritz, D. 1984. Investigation of intracellular phosphate pools of the green alga *Chlorella* using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Organic Magnetic Resonance* 22**:** 364-368.

Simkiss, K. 1964. Phosphates as crystal poisons of calcification. *Biological Reviews* 39**:** 487-505.

Smith, D. C., et Douglas, A. E. 1987. *The biology of symbiosis*. Arnold, E.

Smith, S. V., et Jokiel, P. L. 1978. Water composition and biogeochemical gradients in the Canton atoll lagoon *Atoll Res. Bull.* 221**:** 15-53.

Smith, S. V., et Atkinson, M. J. 1983. Mass balance of carbon and phosphorus in Shark Bay, Western Australia. *Limnol. Oceanogr.* 28.

Smith, S. V. 1984. Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine

environment. *Limnol. Oceanogr.* 29**:** 1149-1160.

Smith, J., Smith, C., et Hunter, C. 2001. An experimental analysis of the effects of herbivory and nutrient enrichment on benthic community dynamics on a Hawaiian reef. *Coral Reefs* 19**:** 332-342.

Snidvongs, A., et Kinzie, R. A. 1994. Effects of nitrogen and phosphorus enrichment on *in vivo* symbiotic zooxanthellae *Pocillopora damicornis. Mar. Biol.* 118**:** 705-711.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M. M. B., Miller, H. L. J., et Chen, Z. 2007. *Climate changee 2007: The physical science basis*. Cambrige Univ. Press. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. 142 p.

Sorokin, Y. 1990. Aspects of trophic relations, productivity and energy balance in coral-reef ecosystems. *Ecosyst. World* 25**:** 401-418.

Sorokin, Y. I. 1992. Phosphorus metabolism in coral reef communities: Exchange between the water column and bottom biotopes. *Hydrobiologia* 242**:** 105-114.

Spalding, M., Green, E. P., et Ravilious, C. 2001. *World atlas of coral reefs*. University of California Press.

Stambler, N., Popper, N., Dubinsky, Z., et Stimson, J. 1991. Effect of nutrient enrichment and water motion on the coral *Pocillopora damicornis*. *Pac. Sci.* 45**:** 299-307.

Stat, M., Morris, E., et Gates, R. D. 2008. Functional diversity in coral–dinoflagellate symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105**:** 9256-9261.

Steen, R. G. 1986. Impact of symbiotic algae on sea anemone metabolism: Analysis by in vivo ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Experimental Zoology* 240**:** 315-325.

Steven, A. D. L., et Broadbent, A. D. 1997. Growth and metabolic responses of *Acropora palifera* to long term nutrient enrichment, p. 867-872. Proc. 8th Int. Coral Reef Sym.

Stimson, J., et Kinzie, 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.

Swanson, J., et Floyd, G. L. 1979. Acid phosphatase in *Asteromonas gracilis* (Chlorophyceae, Volvocales): A biochemical and cytochemical characterization. *Phycologia* 18**:** 362-368.

Swanson, R., et Hoegh-Guldberg, O. 1998. Amino acid synthesis in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Mar. Biol.* 131**:** 83-93.

Swart, P. K., Healy, G., Greer, L., Lutz, M., Saied, A., Anderegg, D., Dodge, R. E., et Rudnick, D. 1999. The use of proxy chemical records in coral skeletons to ascertain past environmental conditions in Florida Bay. *Estuaries* 22**:** 384-397.

T

Tambutté, É., Allemand, D., et Jaubert, J. 1995. The *Stylophora pistillata* microcolony: A model for studying calcium transport process during coral biomineralization. *Bull. Inst. océanogr., Monaco, Proceedings of the 7th international symposium on biomineralization, "Biomineralization 93", D. Allemand and J. P. Cuif [eds.], N° spécial* 14**:** 79-87.

Tambutté, S., Tambutté, E., Zoccola, D., Caminiti, N., Lotto, S., Moya, A., Allemand, D., et Adkins, J. 2007. Characterization and role of carbonic anhydrase in the calcification process of the azooxanthellate coral *Tubastrea aurea*. *Mar Biol***:** 13 p.

Tanaka, T., Thingstad, T. F., Lovdal, T., Grossart, H. P., Larsen, A., Allgaier,

M., Meyerhöfer, M., Schulz, K. G., Wohlers, J., Zöllner, E., et Riebesell, U. 2008. Availability of phosphate for phytoplankton and bacteria and of glucose for bacteria at different pCO_2 levels in a mesocosm study. *Biogeosciences* 5**:** 669-678.

Tentori, E., et Allemand, D. 2006. Light-enhanced calcification and dark decalcification in isolates of the soft coral *Cladiella* sp. during tissue recovery. *Biol. Bull.* 211**:** 193-202.

Thomas, W. H. 1970a. On nitrogen deficiency in tropical pacific oceanic phytoplankton: Photosynthetic parameters in poor and rich water. *Limnol. Oceanogr.* 15**:** 380-385.

Thomas, W. H. 1970b. Effect of ammonium and nitrate concentration on chlorophyll increases in natural tropical pacific phytoplankton populations. *Limnol. Oceanogr.* 15**:** 386-394.

Tjeerdema, R. S. 2008. Application of NMR-based techniques in aquatic toxicology: Brief examples. *Mar. Pollut. Bull.* 57**:** 275-279.

Todd, B. D., Thornhill, D. J., et Fitt, W. K. 2006. Patterns of inorganic phosphate uptake in *Cassiopea xamachana*: A bioindicator species. *Mar. Pollut. Bull.* 52**:** 515-521.

Tomascik, T., et Sander, F. 1985. Effects of eutrophication on reef-building corals. I. Growth rate of the reef building coral *Monstrea annularis. Mar. Biol.* 87**:** 143-155.

Trench, R. K. 1971. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine Coelenterates. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 177**:** 225-235.

Trench, R. K. 1987. Dinoflagellates in non-parasitic symbioses, p. 530-570. *Dans* F.J.R. Taylor [ed.], *The biology of dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publications.

Tribollet, A., Langdon, C., Golubic, S., et Atkinson, M. J. 2006. Endolithic microflora are major primary producers in dead carbonate substrates of Hawaiian coral reefs. *J. Phycol.* 42**:** 292-303.

Tribollet, A. 2008a. The boring microflora in modern coral reefs: A review of its roles, p. 67-94. *Dans* M. Wisshak et L. Tapanila [eds.], *Current developments in bioerosion.* . Berlin-Heiderlberg, Springer-Verlag.

Tribollet, A. 2008b. Dissolution of dead corals by euendolithic microorganisms across the northern Great Barrier Reef (Australia). *Microb. Ecol.* 55**:** 569-580.

Tribollet, A., Godinot, C., Atkinson, M. J., et Langdon, C. 2009. Effects of elevated pCO_2 on dissolution of coral carbonates by microbial euendoliths. *Global Biogeochem. Cy.* 23**:** GB3008.3001-3007.

Tribollet, A., et Golubic, S. 2011. Reef bioerosion: Agents and processes. *Dans* Z. Dubinski et N. Stambler [eds.], *Coral reefs: An ecosystem in transition*. Springer.

Tyrrell, T. 1999. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400**:** 525-531.

V

van Moorsel, G. W. N. M. 1988. Early maximum growth of stony corals (Scleractinia) after settlement on artificial substrata on a Caribbean reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 50**:** 127-135.

Venn, A., Tambutté, E., Lotto, S., Zoccola, D., Allemand, D., et Tambutté, S. 2009. Imaging intracellular pH in a reef coral and symbiotic anemone. *PNAS* 106**:** 16574-16579.

Veron, J. E. N., et Stafford-Smith, M. G. 2000. *Corals of the world*. Australian Institute of Marine Science.

Viant, M. R., Pincetich, C. A., Walton, J. H., Tjeerdema, R. S., et Hinton, D. E. 2002. Utilizing in vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy to study sublethal stress in aquatic organisms. *Mar. Environ. Res.* 54**:** 553-557.

Virkki, L. V., Biber, J., Murer, H., et Forster, I. C. 2007. Phosphate

transporters: A tale of two solute carriers. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293**:** 643-654.

Vollenweider, R. A. 1976. Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 33**:** 58-83.

W

Wakefield, T. S., et Kempf, S. C. 2001. Development of host- and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Biol. Bull.* 200**:** 127-143.

Walter, L. M. 1986. Relative efficiency of carbonate dissolution and precipitation during diagenesis: A progress report on the role of solution chemistry. *Dans* D.L. Gautier [ed.], *Roles of organic matter in mineral diagenesis*. Society for Sedimentary Geology, special publication 38.

Walter M, G. 2002. Feeding behavior, epidermal structure and mucus cytochemistry of the scleractinian *Mycetophyllia reesi*, a coral without tentacles. *Tissue and Cell* 34**:** 232-245.

Watanabe, M., Kohata, K., et Kunugi, M. 1987. ^{31}P nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Hada) hada (Raphidophyceae). *J. Phycol.* 23**:** 54-62.

Watanabe, T., Fukuda, I., China, K., et Isa, Y. 2003. Molecular analyses of protein components of the organic matrix in the exoskeleton of two scleractinian coral species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136**:** 767-774.

Webb, K. L. 1981. Conceptual models and processes of nutrient cycling in estuaries, p. 25-46. *Dans* B.J. Neilson et L.E. Cronin [eds.], *Estuaries and nutrients*. Humana Press.

Westheimer, F. 1987. Why nature chose phosphates. *Science* 235**:** 1173-1178.

Wijgerde, T., Diantari, R., Lewaru, M. W., Verreth, J. A. J., et Osinga, R. 2011. Extracoelenteric zooplankton feeding is a key mechanism of nutrient acquisition for the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *The Journal of Experimental Biology* 214**:** 3351-3357.

Wilcox, T. P. 1998. Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: Morphology does not recapitulate phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10**:** 436-448.

Wilkerson, F. P., et Trench, R. K. 1986. Uptake of dissolved inorganic nitrogen by the symbiotic clam *Tridacna gigas* and the coral *Acropora* sp. *Mar. Biol.* 93**:** 237-246.

Wilkinson, C. 2008. *Status of coral reefs of the world: 2008*.

Williams, R. J. P., et Fraùsto da Silva, J. R. R. 1996. *The natural selection of the chemical elements: The environment and life's chemistry*. Oxford University Press, USA.

Wright, S. H. 1982. A nutritional role for amino acid transport in filter-feeding marine invertebrates. *Am. Zool.* 22**:** 621-634.

Wynne, D., et Rhee, G. Y. 1988. Changes in alkaline phosphatase activity and phosphate uptake in P-limited phytoplankton, induced by light intensity and spectral quality. *Hydrobiologia* 160**:** 173-178.

X

Xu, Y., Wahlund, T. M., Feng, L., Shaked, Y., et Morel, F. M. M. 2006. A novel alkaline phosphatase in the Coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) and its regulation by phosphorus. *J. Phycol.* 42**:** 835-844.

Y

Yentsch, C. M., Yentsch, C. S., et Perras, J. P. 1972. Alkaline phosphatase activity in the tropical marine blue-green alga, *Oscillatoria erythraea* ("Trichodesmium"). *Limnol. Oceanogr.* 17**:** 772-774.

Yellowlees, D., Rees, T. A. V., et Fitt, W. K. 1994. Effect of ammonium-supplemented seawater on glutamine synthetase and glutamate deshydrogenase activities in host tissue and zooxanthellae of *Pocillopora damicornis* and on ammonium uptake rates of the zooxanthellae. *Pac. Sci.* 48**:** 291-295.

Z

Zibrowius, H. 1980. Les scléractiniaires de la Méditerranée et de l'Atlantique nord-oriental. *Mémoires de l'Institut océanographique de Monaco* 11**:** 1-284.

Zubia, M., et Peyrot-Clausade, M. 2001. Internal bioerosion of *Acropora formosa* in Réunion (Indian Ocean): Microborer and macroborer activities. *Oceanologica Acta* 24**:** 251-262.

Résumé | Absorption et devenir du phosphore au sein de la symbiose corallienne

Les Scléractiniaires symbiotiques (coraux) qui se développent dans des eaux oligotrophes survivent grâce à une utilisation optimale des nutriments tels que le phosphore et l'azote. Alors que l'utilisation de l'azote par les coraux a été bien étudiée, ce n'est pas le cas du phosphore. L'enjeu principal de cette thèse a été d'évaluer l'utilisation du phosphore inorganique et organique dissous (PID, POD) par les coraux dans diverses conditions environnementales, ainsi que leurs besoins métaboliques en phosphore. Les résultats obtenus ont montré que l'absorption de PID, mesurée par déplétion dans le milieu, et de POD, mesurée via l'activité de l'alcaline phosphatase, dépendent de l'éclairement, de la présence de Dinoflagellés symbiotiques dans les tissus coralliens, de la présence d'azote inorganique, et du statut nutritionnel de l'hôte (réplétion en phosphore organique particulaire, POP, ingéré sous forme de plancton). Lors d'un stress de température, seul ou combiné à une acidification du milieu, l'absorption de PID a été affectée. Sous l'effet d'un enrichissement du milieu en PID, la photosynthèse et la calcification corallienne ont été augmentées, suggérant qu'en conditions oligotrophes, la symbiose est limitée par le phosphore. Enfin, des analyses en résonance magnétique nucléaire ont montré que le phosphore se trouve principalement sous forme de phosphate dans la symbiose, mais aussi de phosphonates chez l'hôte, et de polyphosphates et esters de phosphate chez les symbiotes. Un premier bilan de l'importance relative du PID, POD et POP a été établi à l'issue de ce travail, et un examen critique des outils permettant d'évaluer la limitation par le phosphore a été réalisé.

Mots clés | Oligotrophie | Scléractiniaires | Symbiose | Phosphore dissous | Phosphate | Limitation

Abstract | Uptake and fate of dissolved phosphorus within the coral symbiosis

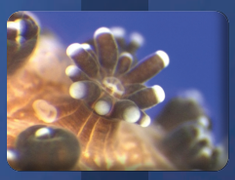
Symbiotic Scleractinian corals survive in oligotrophic reef waters owing to their efficient uptake of nutrients such as phosphorus and nitrogen. Although the use of nitrogen by corals has often been studied, this is not the case for phosphorus. The main aim of this work was to examine the use of dissolved inorganic and organic phosphorus (DIP, DOP) by corals under various environmental conditions, and to assess their metabolic demand for phosphorus. Results showed that DIP and DOP uptake, measured respectively with depletion experiments and with alkaline phosphatase activity assays, are dependent upon light, the presence of symbiotic Dinoflagellates within coral tissues, the availability of inorganic nitrogen, and the nutritional status of the host (repletion in particulate organic phosphorus, POP, ingested as plankton). During a temperature stress, alone or combined with a pH decrease, DIP uptake was affected. Upon DIP enrichment, coral calcification and photosynthesis increased, thus suggesting that, under oligotrophic conditions, phosphorus limits the symbiosis. Finally, nuclear magnetic resonance analyzes showed that phosphorus occurs as phosphate within the symbiosis, but also as phosphonates in the host, and as polyphosphates and phosphate esters in the symbionts. A first budget of the relative importance of DIP, DOP and POP was established at the end of this work, as well as a critical evaluation of the tools used to assess phosphorus limitation of the symbiosis.

Key words | Oligotrophy | Scleractinian corals | Symbiosis | Dissolved phosphorus | Phosphate | Limitation

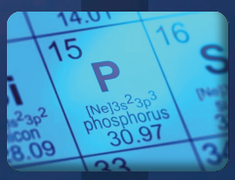
THESE

Oligotrophie

Scléractiniaires



Symbiose



Phosphore dissous
Phosphate

Limitation