HAL
open science

Effets de la disponibilité en sels nutritifs sur la réponse physiologique des coraux tropicaux dans le contexte du changement climatique

Leïla Ezzat

To cite this version:

Leïla Ezzat. Effets de la disponibilité en sels nutritifs sur la réponse physiologique des coraux tropicaux dans le contexte du changement climatique. Ecologie, Environnement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066306 . tel-01494790

HAL Id: tel-01494790

https://theses.hal.science/tel-01494790v1

Submitted on 24 Mar 2017

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.

Université Pierre et Marie Curie - Paris VI

Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement de l'Île de France

Centre Scientifique de Monaco| Equipe d'Ecophysiologie-Ecologie

Effets de la disponibilité en sels nutritifs sur la réponse physiologique des coraux tropicaux dans le contexte du changement climatique

Thèse de doctorat en Sciences de l'Environnement

Spécialisation : Ecophysiologie corallienne

Par Leïla Ezzat

Dirigée par Christine Ferrier-Pagès et Renaud Grover

Présentée et soutenue publiquement le 22 septembre 2016 à Monaco

Devant un jury composé de :

Dr. Christine Ferrier-Pagès	Directrice de thèse
Dr. Renaud Grover	Co-directeur de thèse
Pr. Paul Nival	Président du jury
Pr. Jörg Wiedenmann	Rapporteur
Pr. Amatzia Genin	Rapporteur
Pr. Giorgio Bavestrello	Examinateur

A mon grand-père, Ali, pour m'avoir transmis son goût pour le voyage

Remerciements

La thèse, la voici, l'achèvement d'un premier périple scientifique ! Trois années d'apprentissage, de partage de connaissances, de rencontres, de débats mais aussi un temps pour partir à la découverte de soi, de sa destinée professionnelle et humaine. De sincères remerciements aux personnes qui ont contribué à ce travail. Une étape importante de ma vie de jeune chercheur s'achève ici, à Monaco, et me permet d'envisager l'avenir d'une manière beaucoup plus sereine.

Merci tout d'abord aux deux rapporteurs de cette thèse, Pr. Amatzia Genin de l'Interuniversity Institute for Marine Science à Eilat (Israël) ainsi qu'au Pr. Jörg Wiedenmann de l'Université de Southampton (Angleterre), merci à eux de m'avoir inspirée dans mes recherches. De même, de chaleureux remerciements aux Pr. Paul Nival et Pr. Giorgio Bavestrello, merci à eux d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Mes remerciements s'en vont directement aux membres de mon comité de thèse, Pr. Maoz Fine qui nous a accueillis (Christine, Renaud et moi) à Eilat à trois reprises, toujours rassurant, disponible et efficace; Dr. Jean-Olivier Irisson, une oreille attentive et un conseiller statistique hors pair, merci à lui de m'avoir guidée depuis mon premier stage au LOV en 2010 ; Pr. Alexandre Buttler, qui a accepté de me suivre depuis le Lavaux suisse et qui me guide depuis 10 ans, date d'entrée à l'EPFL.

Merci à la direction du Centre Scientifique de Monaco représentée par le Pr. Patrick Rampal et Pr. Denis Allemand de m'avoir accueillie dans les locaux du CSM et de m'avoir octroyée une bourse d'étude. Le Pr. Denis Allemand a su être à l'écoute de mes nombreuses interrogations, de mes plaintes, d'ordre scientifique ou personnelle, avec, à la clé, une pointe d'humour et de finesse; à l'administration du CSM : Corinne Gaziello, Muriel Chilot, Patricia Serna et Barbara Blanchi, merci à elles de faciliter la vie du personnel du CSM quotidiennement. De très sincères remerciements à notre chère secrétaire scientifique, Alexandra Dias Mota; comment la remercier pour m'avoir assistée, nourrie (guacamole, boulettes de viande, ...et j'en passe..) pendant cette période, toujours très généreuse, disponible et à l'écoute de chacun d'entre nous !

Merci au soutien de l'Université Pierre et Marie Curie qui m'a permise de réaliser ce travail de thèse et notamment à Mme Laurence Touchon, de l'ED 129, dont l'aide a été des plus précieuses pour résoudre les épineux problèmes administratifs, loin des établissements parisiens.

Comment remercier en quelques mots mes deux directeurs de thèse, les Dr. Christine Ferrier-Pagès et Dr. Renaud Grover, une équipe de choc toujours à l'équilibre, qui a parcouru le chemin à mes côtés. A Christine, une encadrante et mère de famille nombreuse (ça continue à s'agrandir..) : Mes remerciements ne peuvent égaler les très nombreuses heures que vous avez passées à souligner, barrer...à soupirer et marmonner devant votre écran. A Renaud, un chimiste cuisinier ou cuisinier chimiste hors pair, un correcteur pointilleux, une oreille attentive et positive (oui je te vois lever les yeux au ciel) ! Merci pour les nombreuses heures de jeux et les fous rires qui m'ont permise de me détendre durant ces 4 années ! Je me rappellerai de notre fameux périple dans le cockpit du Paris-Nice. Merci à vous deux de m'avoir fait progresser et poussée à devenir plus autonome. S'en suivent des remerciements très spéciaux pour Jean-François Maguer, dévoué à son spectro de masse, sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

Merci aux membres de notre équipe d'Ecophysiologie; Au Dr. Eric Béraud, photographe de l'équipe, pour ses pointes d'humour toujours bien placées (aux bons moments)..et nos débats interminables sur la vie,...Au Dr. Stéphanie Reynaud, adepte de la plongée, des voyages et des bons "restos", merci à elle pour ses précieux encouragements et son sourire. Aux techniciens Cécile, Séverine et récemment Antoine. Merci à vous, chères techniciennes, de m'avoir tant appris, encadrée et aidée à la paillasse ainsi que durant les nombreuses séances de nettoyage! Oui..j'en ai cassé des potters, des résistances..et que sais-je encore ? Quelle patience pour le petit scarabé qui mixe encore des algues...; A Lulu : notre voyage en Norvège restera mémorable, à retenir notamment cette tentative de randonnée sous les trombes d'eau qui était particulièrement mythique...ainsi que notre séance gustative, du thon ? du poulet ?...ah..de la baleine...!...Courage pour cette dernière année ! Merci également aux nouveaux membres et post-doctorants, Vanessa et Jeroen, pour vos conseils, votre bonne humeur et motivation que vous transmettez à l'équipe! Aux anciens étudiants du CSM: Nathalie le Roy, Rémy, Andrea, Pascale, Claire, Julien D. et au futur papa Julien L. Merci pour les nombreuses séances psy mais aussi pour les bons moments passés ensemble. Un clein d'oeil à ma chère collaboratrice américaine Erica Towle.

Des pensées s'en vont également pour le personnel "tech" du CSM : Dominique Desgré, Eric Elia, Jorge, Robert, pour vos pointes d'humour bien placées et parfois moins bien placées..héhé! Merci à Dominique pour son aide précieuse au moment de la mise en place des expériences et pour les déjeuners à la grille.

A l'équipe de biologie médicale : Renaud Grépin, Gilles Pagès, Jérôme, Vincent, Scott, Yann, Benoit. Merci au Dr. Grépin de m'avoir encadrée durant nos manips d'extraction d'ARN...ce n'est pas fini ne t'inquiète pas...je reviens très vite. A Yann, bon courage à toi pour la suite,...qui s'annonce dans tous les cas très prometteuse.. (même si je ne comprends toujours rien à ce que tu fais..).

De chaleureuses pensées pour l'équipe de Biologie Polaire : à Céline et ses habitudes nutritionnelles particulières (ahah...!), Cindy qui doit couler des jours heureux en Martinique, Hannah et son rhum dévastateur; Aymeric et tout nouvellement Quentin et Victor, qui vit encore à l'heure espagnole ! Merci aux pinguins de m'avoir accueillie et recueillie pour ces derniers mois de rédaction! Merci également à Nathalie Hilmi de m'avoir autorisée à travailler dans le calme dans ses appartements ;).

Mes remerciements à l'équipe de physiologie : Didier Zocc pour ses sautes d'humeur qui me font toujours mourrir de rire, ses conseils et sa gentillesse; à l'artiste Nathalie Techer, pour sa générosité, sa gentillesse et ses bons petits plats; A Alex Venn pour ses insightful comments, Natacha, Philippe ainsi qu'Eric et Sylvie Tambutté.

A Carine, une amie fidèle, bretonne et gourmande de tout ce qui est gras et sucré. Merci à toi pour ta présence, ta patience et ton soutien durant les bons moments comme durant les périodes plus difficiles. Je n'oublierai pas ces belles randonnées et espère qu'il y en aura d'autres très rapidement. Courage pour la fin, tu y es presque ! Et bravo pour ton parcours !

Enfin à tous les autres amis, qu'ils soient en Valais, à Lausanne, à Paris, à Nice, aux US, Canada; français, suisses ou d'ailleurs. De chaleureuses pensées pour mes colocataires : Laure, David et Robin, merci d'avoir partagé ce petit bout de chemin à mes côtés, ces "restos" indiens, l'huile d'olive versée de manière outrageuse, ces conversations philosophiques sur tout et surtout sur n'importe quoi. Merci à l'équipe d'Art bloc pour les nombreuses séances de décrassage majeures, avec ou sans "bi" et de fous rire, de belles amitiés se sont crées dans la "puff" !

Bon courage à l'équipe de Coral Guardian, qui passe son temps entre la France et l'Indonésie... Merci à vous d'avoir partagé vos très belles photographies.

Merci à mes parents de m'avoir soutenue au cours de cette expérience, de m'encourager chaque jour et de croire en moi, merci à ma sœur Dina d'être toujours présente pour me remettre à ma place, à ma famille égyptienne, pour votre originalité et votre authenticité. Enfin, Merci à Amédé de Savoie et à sa famille pour m'avoir entourée par leur présence, leur soutien durant ces trois années.

Cette thèse de doctorat est dédiée à la personne qui m'a transmis le goût et la curiosité d'aller découvrir ce qu'il se passe au-delà de nos frontières. L'aventure ne fait que commencer !

Ce temps passé au CSM m'a fait ouvrir les yeux sur l'importance du travail d'équipe, de la cohésion de groupe et de la création de collaborations, de liens entre chercheurs, entre amis!
Sans vous toutes et tous je ne serais pas allée bien loin !

Figure 1. Colonie d'*Acropora millepora* aux Îles d'Hatamin, Indonésie. Photo : © Coral Guardian

Avant-Propos

Contenu

Cette thèse se présente sous la forme de cinq articles, dont trois déjà publiés (Axe I, article n°1, Axe II, article n°3 et n°4), un article en fin de préparation (Axe I, article n°2), ainsi que les premiers résultats d'un dernier article (Axe II, article n°5).

Financement

Cette thèse a été financée par le Centre Scientifique de Monaco (matériel, bourse d'étude, missions scientifiques et congrès) ainsi que par l'Institut Universitaire Européen des Sciences de la mer (analyse des échantillons en spéctrométrie de masse). La participation au cours de thèse intitulé : "Venice School of photosynthesis" a été entièrement financé par la Fondation Murray.

Contribution des auteurs

La contribution des différents auteurs sera présentée en fonction de leur ordre d'apparition dans le manuscrit. La participation de **Christine Ferrier-Pagès** et **Renaud Grover** ne s'est pas cantonnée à la supervision de l'étudiante mais ils ont également pris part à l'élaboration des plans expérimentaux, à la rédaction/correction des articles et du manuscrit de thèse. **Jean-François Maguer (FR)** a effectué toutes les analyses au spectromètre de masse et a contribué aux corrections des articles. **Maoz Fine (IL)** a non seulement suivi l'étudiante au cours de son parcours, en tant que membre du comité de thèse, mais nous a également accueilli dans son laboratoire à Eilat afin de réaliser les expériences de terrain. **Erica Towle (USA)** a participé à l'élaboration, à la réalisation, ainsi qu'à la rédaction de l'article n°4. **Chris Langdon (USA)**, encadrant d'Erica Towle, a participé aux corrections et à l'amélioration du précédent article. **Jean-Olivier Irisson (FR)** a fourni une importante expertise statistique lors des phases de conception de design expérimental et de correction d'articles; il a également suivi l'étudiante tout au long de son cursus. **Cécile Rottier** et **Antoine Labbe (MC)** ont grandement contribué au travail en laboratoire, notamment à l'extraction et l'analyse de centaines d'échantillons. Leïla Ezzat a contribué à l'élaboration des plans expérimentaux, réalisé toutes les expériences, la majorité du travail en laboratoire, effectué les analyses statistiques et rédigé les articles et manuscrit de thèse.

Liste des publications

2013

Ezzat L., Merle PL., Furla P., Buttler A., Ferrier-Pagès C. ***The Response of the Mediterranean Gorgonian Eunicella singularis to Thermal Stress Is Independent of Its Nutritional Regime.*** **PLoS One.**8 (5), e64370. doi: 10.1371/journal.pone.0064370

2014

Grover R. Ferrier-Pagès C., Maguer JF, **Ezzat L** and Fine M. ***Nitrogen fixation in the mucus of Red Sea corals***. **J. Exp. Biol.** 217 3962-3963. doi: 10.1242/jeb.111591

2015

Ezzat L**., Maguer JF., Grover R and Ferrier-Pagès C. ***New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral–dinoflagellate symbiosis under NH_4^+ and NO_3^- supply. **Proc. R. Soc. B.** 283:1812. doi: 10.1098/rspb.2015.0610

Desprat S., Díaz Fernández PM., Coulon T., **Ezzat L**, Pessarossi-Langlois J., Gil L., Morales-Molino C and Sánchez Goñi MF. ***Pinus nigra (European black pine) as the dominant species of the last glacial pinewoods in south-western to central Iberia: a morphological study of modern and fossil pollen.*** **J Biogeogr.** 10.1111/jbi.12566

2016

Ezzat L.,** Towle E., Irisson JO., Langdon C and Ferrier-Pagès C. ***The relationship between heterotrophic feeding and inorganic nutrient availability in the scleractinian coral T. reniformis under a short-term temperature increase. **Limnol Oceanogr.** 61: 89–102.10.1002/lno.10200

Ezzat L.,** Maguer JF., Grover R and Ferrier-Pagès C. ***Limited phosphorus availability is the Achilles heel of tropical reef corals in a warming ocean. **Sci. Rep.** 10.1038/srep31768

En préparation

Ezzat L.,** Fine M., Maguer JF., Grover R and Ferrier-Pagès C. ***Carbon and nitrogen acquisition strategies of shallow and deep holobionts of the Scleractinian coral S. pistillata.

Ezzat L.,** Rottier C., Labbe A and Ferrier-Pagès C. ***The combined effects of light intensity and temperature on the physiological response of a tropical reef coral exposed to nutrient limitation and/or enrichment

Seuls les articles accompagnés d'un astérisque (*) seront détaillés dans le manuscrit de thèse

Liste des communications orales

Ezzat L., Merle PL., Furla P., Buttler A., Ferrier-Pagès C. **The Response of the Mediterranean Gorgonian Eunicella singularis to Thermal Stress Is Independent of Its Nutritional Regime.** **(2013). The International Conference on Coelenterate Biology, 1-5 décembre, Eilat, Israël**

Ezzat L., Maguer JF., Grover R and Ferrier-Pagès C. **New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral–dinoflagellate symbiosis under NH_4^+ and NO_3^- supply.** **(2015). Hjort Summer School, 31 août au 4 septembre, Bergen, Norvège**

Ezzat L., Maguer JF., Grover R and Ferrier-Pagès C. **Limited phoshporus availability is the Achilles heel of tropical reef corals in a warming ocean.** **(2016). 13th International Coral Reef Symposium, 19-24 juin, Honolulu, USA.**

Résumé | Abstract

Les coraux constructeurs de récifs se développent généralement dans des eaux oligotrophes, caractérisées par de faibles concentrations en nutriments inorganiques, tels que l'azote et le phosphore. Cette limitation se voit accentuée avec le réchauffement climatique. Cependant, aux abords des côtes, l'eutrophisation des eaux entraîne un phénomène inverse, un excès de sels nutritifs qui peut provoquer la rupture de l'association corail-dinoflagellés. Les enjeux principaux de cette thèse ont été d'évaluer : 1) l'utilisation de l'azote et du phosphore inorganique par les coraux dans diverses conditions environnementales ; 2) l'effet d'une limitation ou d'un enrichissement en azote et/ou phosphore sur la physiologie corallienne. Les résultats obtenus ont montré que la forme et la source d'azote n'ont pas les mêmes effets sur la physiologie des coraux et que cet effet est également dépendant de la disponibilité en phosphore. En présence de faibles concentrations en phosphore, un enrichissement en ammonium stimule le métabolisme global et maintient l'association symbiotique en période de stress. Au contraire, un enrichissement en nitrate affecte négativement les processus de photosynthèse et de calcification, entraînant un blanchissement. Ces effets délétères sont exacerbés en présence de matière organique particulaire, mais estompés en présence de phosphore. En effet, les résultats ont montré une très grande dépendance entre la présence en phosphore et la santé corallienne. Ainsi, en période de stress thermique, les coraux ont la capacité d'augmenter leur taux d'absorption de phosphore, cet élément étant indispensable au métabolisme, à diverses échelles. Ces travaux apportent des éclaircissements sur les relations existant entre la disponibilité en sels nutritifs et l'équilibre nutritionnel au sein de la symbiose, et devraient permettre d'affiner les stratégies de gestions des écosystèmes récifaux.

Reef building corals are usually thriving in oligotrophic areas, characterized by low concentrations in inorganic nutrients, such as nitrogen and phosphorus. More, nutrient starvation is known to increase with global warming. However, in coastal environments, eutrophication leads to nutrient excess, which can induce the breakdown of the coral-dinoflagellate symbiosis. The major aims of this thesis were to assess: 1) the use and uptake rates of inorganic nitrogen and phosphorus by tropical corals in different environmental conditions; 2) the effects of nutrient limitation or enrichment on coral physiology. Results showed that the coral response differed according to the form and source of nitrogen and to the availability of phosphorus in the reef environment. In the presence of low phosphorus concentrations, ammonium supplementation enhanced coral metabolism and allowed coral colonies to overcome thermal stress. Conversely, nitrate enrichment negatively impacted photosynthesis and calcification processes, increasing coral bleaching susceptibility. These deleterious effects were enhanced when combined with organic matter supplementation, but repressed with addition of phosphorus. Indeed, results highlighted the tight relationship existing between phosphorus availability and coral health. During thermal stress, corals were able to increase their phosphorus uptake, this latter nutrient being essential for the holobiont metabolism. The outcomes of the thesis shed light into how marine symbioses cope with eutrophication, and this information is urgently required to refine risk management strategies.

Sommaire

REMERCIEMENTS 5

AVANT-PROPOS 9

CONTENU 9
FINANCEMENT 9
CONTRIBUTION DES AUTEURS 9
LISTE DES PUBLICATIONS 10
LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES 11

RÉSUMÉ | ABSTRACT 13

SOMMAIRE 15

TABLE DES ILLUSTRATIONS 19

LISTE DES FIGURES 19
LISTE DES TABLEAUX 20

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS 21

I. INTRODUCTION 25

1. GÉNÉRALITÉS 25

1.1 IMPORTANCE DES RÉCIFS CORALLIENS DANS LE MONDE 25
1.2 TAXONOMIE DES CNIDAIRES 28
1.2.1 LES ANTHOZOAIRES 29
1.3 LA SYMBIOSE 30
1.3.1 TAXONOMIE ET CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES DES DINOFLAGELLÉS SYMBIOTIQUES 32
1.3.2 MODE DE NUTRITION DE LA SYMBIOSE CORAIL-DINOFLAGELLÉ 34
1.3.3 BÉNÉFICES, COÛTS ET RUPTURE DE LA SYMBIOSE 37

2. NUTRIMENTS INORGANIQUES ET SYMBIOSE CORALLIENNE 40

2.1 BESOINS EN SELS NUTRITIFS 40
2.1.1 L'AZOTE : DISPONIBILITÉ EN MILIEU RÉCIFAL ET ABSORPTION PAR LES CORAUX 41
2.1.2 LE PHOSPHORE : DISPONIBILITÉ EN MILIEU RÉCIFAL ET ABSORPTION PAR LES CORAUX 48
2.2 DISPONIBILITÉ EN SELS NUTRITIFS – EFFET SUR LA SYMBIOSE CORALLIENNE 50
2.2.1 LA LIMITATION EN SELS NUTRITIFS 50
2.2.2 L'EUTROPHISATION : CONCENTRATIONS ANORMALEMENT ÉLEVÉES EN SELS NUTRITIFS 51
2.2.3 LES EFFETS COMBINÉS D'UNE EUTROPHISATION DES EAUX COMBINÉE AUX CHANGEMENTS CLIMATIQUES (AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE ET DE PCO2). 56

3. INCERTITUDES ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL 62

3.1 ACQUISITION DES SELS NUTRITIFS CHEZ LES CORAUX TROPICAUX DANS LE CONTEXTE DU RÉCHAUFFEMENT CLIMATIQUE: CAPACITÉS ET BESOINS 62
3.2 EFFETS D'UNE LIMITATION OU D'UN ENRICHISSEMENT EN SELS NUTRITIFS SUR LA RÉPONSE PHYSIOLOGIQUE DES CORAUX TROPICAUX DANS LE CONTEXTE DU RÉCHAUFFEMENT CLIMATIQUE 65

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES 73

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE : LE CHOIX DES MODÈLES 73

1.1 HEXACORALLIAIRES SCLÉRACTINIAIRES 73
1.2 ESPÈCE OCTOCORALLIAIRE 77

2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET MAINTENANCE DES COLONIES 78

2.1 MISE EN PLACE DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES 78
2.1.1 ENRICHISSEMENT EN SELS NUTRITIFS 78
2.1.2 NUTRITION HÉTÉROTROPHE DES COLONIES 79

3. EXTRACTIONS ET DOSAGES 80

3.1 EXTRACTION DU TISSU 80
3.2 DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE 80
3.3 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN SYMBIOTES 81
3.4 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN PROTÉINES 81

4. MESURES PHYSIOLOGIQUES 81

4.1 TAUX DE PHOTOSYNTHÈSE ET DE RESPIRATION 81
4.2 LA TECHNIQUE DE PAM FLUORIMÉTRIE: ACTIVITÉ DES PHOTOSYSTÈMES II 84
4.3 MESURE DE CALCIFICATION 86
4.4 TAUX DE PRÉDATION DE PROIES ZOOPLANCTONIQUES PAR LES CORAUX 86

5. UTILISATION DES ISOTOPES STABLES 87

5.1 LES ISOTOPES STABLES 87
5.2 L'UTILISATION DE L'ISOTOPE ^{13}C DU CARBONE POUR QUANTIFIER LE TRANSFERT DE PHOTOSYNTHÉTATS 87
5.3 L'UTILISATION DE L'ISOTOPE ^{15}N DE L'AZOTE POUR TRACER LE DEVENIR DES MOLÉCULES AZOTÉES AU SEIN DE LA SYMBIOSE 89
5.4 AUTRE TECHNIQUE DE MESURE DES TAUX D'ABSORPTION DES SELS NUTRITIFS 90

6. EXTRACTION D'ADN DES CORAUX DURS ET DU CORAIL MOU POUR LA DÉTERMINATION DU CLADE DE SYMBIODINIUM 91

7. STATISTIQUES 91

CHAPITRE III 95

AXIS I - UPTAKE RATES OF INORGANIC NUTRIENTS BY TROPICAL CORALS IN A WARMING OCEAN 95

3.1 SUMMARY OF THE RESULTS 95
ARTICLE N°1 99
ARTICLE N° 2 121

CHAPITRE IV 147

THE EFFECTS OF NUTRIENT LIMITATION OR ENRICHMENTS ON THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF TROPICAL CORALS IN A WARMING OCEAN 147

4.1 SUMMARY OF THE RESULTS **147**
ARTICLE N°3 153
ARTICLE N°4 173
ARTICLE N°5 192

CHAPITRE V **205**

DISCUSSION **205**

AXE I: ACQUISITION DES SELS NUTRITIFS CHEZ LES CORAUX TROPICAUX SCLÉRACTINIAIRES DANS LE CONTEXTE DU RÉCHAUFFEMENT CLIMATIQUE **205**
1.1 LE RÔLE DE L'HÔTE 206
1.2 LE RÔLE DES SYMBIOTES 207
1.3 LE RÔLE DES PARAMÈTRES ENVIRONNEMENTAUX : L'INTENSITÉ LUMINEUSE 207
2. RELATION ENTRE ACQUISITION D'AZOTE ET MÉTABOLISME AU SEIN DE LA SYMBIOSE 209
3. INFLUENCE D'UN STRESS DE TEMPÉRATURE SUR LES TAUX D'ACQUISITION D'AZOTE INORGANIQUE 213
4. LES CAPACITÉS DES ESPÈCES DE CORAUX TROPICAUX À ACQUÉRIR LE PHOSPHORE ET LEURS BESOINS 217
5. CONCLUSIONS AXE I ET PERSPECTIVES 218
AXE II: EFFETS D'UN ENRICHISSEMENT OU D'UNE DÉPLÉTION EN SELS NUTRITIFS SUR LA RÉPONSE PHYSIOLOGIQUE DES CORAUX TROPICAUX DANS LE CONTEXTE DU RÉCHAUFFEMENT CLIMATIQUE **220**
1. QUANTITÉ EN SELS NUTRITIFS MINIMALE REQUISE POUR UNE BONNE SANTÉ DES CORAUX 221
2. EFFET D'UN ENRICHISSEMENT EN AZOTE SEUL (EN PRÉSENCE DE FAIBLES CONCENTRATIONS DE PHOSPHORE (P<0.5)) 224
3. EFFETS COMBINÉS D'UN ENRICHISSEMENT EN AZOTE ET PHOSPHORE (P≥ 0.5) 226
4. EFFETS D'UN ENRICHISSEMENT SEUL EN PHOSPHORE 227
5. EFFETS COMBINÉS D'UN ENRICHISSEMENT EN SELS NUTRITIFS ET D'UN APPORT EN MATIÈRE ORGANIQUE 228
6. EFFETS DU TEMPS D'EXPOSITION 229
7. CONCLUSIONS DE L'AXE 2 ET PERSPECTIVES FUTURES 229

CHAPTER VI : ADDENTUM **237**

AXIS I: UPTAKE RATES OF INORGANIC NUTRIENTS BY TROPICAL CORALS IN A WARMING OCEAN **237**
1.1 THE ROLE OF THE HOST 238
1.2 THE ROLE OF THE SYMBIONTS 239
1.3 THE EFFECTS OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS : THE LIGHT INTENSITY 239
2. INTERACTIONS BETWEEN NITROGEN ACQUISITION RATES AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS 240
3. THE EFFECTS OF THERMAL STRESS ON NITROGEN UPTAKE RATES 244
4. THE CAPACITIES OF TROPICAL CORALS TO TAKE UP INORGANIC PHOSPHORUS AND THEIR NEEDS 248
5. CONCLUSION OF AXIS I AND PERSPECTIVES 249
AXIS II: THE EFFECTS OF NUTRIENT AVAILABILITY (LIMITATION AND/OR ENRICHMENT) ON THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF TROPICAL CORALS IN A WARMING OCEAN **251**
1. MINIMAL AMOUNT OF INORGANIC NUTRIENTS IS REQUIRED FOR CORAL HEALTH 252
2. EFFECTS OF NITROGEN ENRICHMENT ON CORAL PHYSIOLOGY (WITH LOW AMOUNTS OF PHOSPHORUS (P<0.5)) 255
3. COMBINED EFFECTS OF NITROGEN AND PHOSPHORUS ENRICHMENT 256
4. THE EFFECTS OF PHOSPHORUS ENRICHMENT 257
5. THE COMBINED EFFECTS OF INORGANIC NUTRIENTS AND ORGANIC FEEDING 258
6. DURATION OF THE EXPOSURE 259
7. CONCLUSIONS OF AXIS II AND PERSPECTIVES 260

ANNEXES **267**

ANNEXE 1: ARTICLE IN CO-AUTORSHIP **267**
ANNEXE 2 **270**
SUPPLEMENTARY MATERIAL ARTICLE N°1 270
ANNEXE 3 **276**
SUPPLEMENTARY MATERIAL ARTICLE N°2 276
ANNEXE 4 **279**
SUPPLEMENTARY MATERIAL ARTICLE N°3 279
ANNEXE 5 **289**
SUPPLEMENTARY MATERIAL ARTICLE N°4 289

BIBLIOGRAPHIE **295**

Table des illustrations

Liste des figures

FIGURE 1. COLONIE D'*ACROPORA MILLEPORA* AUX ÎLES D'HATAMIN, INDONÉSIE. PHOTO : CORAL GUARDIAN 7
FIGURE 2. RÉCIF CORALLIEN À PALMYRA ATOLL SOURCE : JIM MARAGOS/U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICES 25
FIGURE 3. REPRÉSENTATION DES TROIS TYPES DE RÉCIFS. SOURCE: THEGEOGRAPHERONLINE.NET 26
FIGURE 4. BIOGÉOGRAPHIE DES RÉCIFS CORALLIENS 27
FIGURE 5. L'EMBRANCHEMENT DES CNIDAIRES (SIMPLIFIÉ), D'APRÈS VERON ET STAFFORD-SMITH (2000) 28
FIGURE 6. SCHÉMA ET PHOTOGRAPHIE D'UN POLYPE DE CORAIL. (SOURCE : SCHÉMA ADAPTÉ DE NOAA & MARKUSZI ET PHOTOGRAPHIE E.TAMBUTTÉ) 30
FIGURE 7. DINOFLAGELLÉS SYMBIOTIQUES, SYMBIODINIUM SOURCE : SCI-ENCE.ORG 32
FIGURE 8. SCHÉMA D'UNE COUPE TRANSVERSALE DE TISSU CORALLIEN. (SOURCE : IMAGE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE EN TRANSMISSION (GATTUSO ET AL., 1999) ET SCHÉMA MODIFIÉ D'APRÈS E.TAMBUTTÉ 33
FIGURE 9. SCHÉMA SIMPLIFIÉ DÉCRIVANT LES RELATIONS NUTRITIONNELLES EXISTANT AU SEIN DE LA SYMBIOSE CORAIL-DINOFLAGELLÉS (MODE DE NUTRITION: AUTROTROPHIE) 34
FIGURE 10. LES CLASSES DE TAILLE DU PLANCTON : PICOPLANCTON, NANOPLANCTON, MICROPLANCTON ET MESOZOOPLANCTON PRENANT PART AU RÉGIME ALIMENTAIRE DES CORAUX SCLÉRACTINIAIRES. (A, B) MICROGRAPHIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE DE (A) *PROCHLOROCCOCUS SP.* (0.6 MM) AND (B) *SYNECHOCOCCUS SP.* (1 MM) (HTTP://WWW.LBL.GOV/ARCHIVE/JGI-MICROBE-CLUES.HTML). (C) IMAGE PRISE AU MICROSCOPE À ÉPIFLUORESCENCE METTANT EN ÉVIDENCE UNE CELLULE NANOFLLAGELÉE INDIQUÉE PAR LA FLÈCHE JAUNE (MARQUÉE PRÉALABLEMENT AU (DAPI), IMAGE DE (D) CILIÉS (LONGUEUR MOYENNE TOTALE EST DE 100 – 200 MM) PRISE AU MICROSCOPE À CONTRASTE DE PHASE ET (E) LARVE DE CRABE (LONGUEUR MOYENNE TOTALE EST DE 1000 MM). D'APRÈS HOULBRÈQUE & FERRIER-PAGÈS (2009) 36
FIGURE 11. EVÈNEMENT DE BLANCHISSEMENT OBSERVÉ AUX SEYCHELLES AU PRINTEMPS 2016. PHOTO: CHRIS BIRD 39
FIGURE 12 CYCLE DE L'AZOTE EN MILIEU OCÉANIQUE (MODIFIÉ D'APRÈS FRANCIS ET AL. (2007)) 42
FIGURE 13. MOYENNES DES CONCENTRATIONS EN FONCTION DE LA PROFONDEUR DES A) NO_3^-, B) NO_2^-, C) NH_4^+, D) PON (NOP) À PARTIR DE QUATRE STATIONS DE MESURE (SOUTHERN OCEAN IN 96-98; ARABIAN SEA 95; EQUATORIAL PACIFIC EN 92 ET OCEAN NORD ATLANTIC EN 89). LES DONNÉES ONT ÉTÉ OBTENUES VIA USJGOFS.WHOI.EDU. SOURCE : CAPONE ET AL. (2008). 43
FIGURE 14. SCHÉMA SIMPLIFIÉ REPRÉSENTANT LES DIFFÉRENTS PROCESSUS D'ABSORPTION D'AZOTE CHEZ LES CORAUX SCLÉRACTINIAIRES. D'APRÈS GODINOT ET AL. 2012 46
FIGURE 15. SCHÉMA SIMPLIFIÉ DÉCRIVANT LES CHANGEMENTS S'OPÉRANT AU SEIN DE L'ÉCOSYSTÈME RÉCIFAL, D'UN RÉGIME DOMINÉ PAR LES CORAUX VERS UNE DOMINATION DES MACROALGUES. A) L'HYPOTHÈSE DE LA DDAM (DISSOLVED ORGANIC CARBON-DISEASE-ALGAE-AND-MICROBES), B) LE CHANGEMENT DE RÉGIME INDUIT PAR DIFFÉRENTS FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES. SOURCE : GARREN (2016). 52
FIGURE 16. EXEMPLE DE MILIEU RÉCIFAL DOMINÉ PAR LES MACROALGUES. SOURCE : J.E.SMITH (SCRIPPS). 55
FIGURE 17. ILLUSTRATION DES DEUX PRINCIPALES ESPÈCES ÉTUDIÉES. A) *T. RENIFORMIS* ET B) *S. PISTILLATA*. SOURCE : CORAL.AIMS.GOV.AU ET CSM 73
FIGURE 18 ILLUSTRATIONS DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE CORAUX SCLÉRACTINIAIRES ÉTUDIÉS DANS LE CADRE DE LA THÈSE. A) *G. FASCICULARIS*, B) *P. CACTUS*, C) *P. DAMICORNIS*. SOURCE : CORAL.AIMS.GOV.AU 75
FIGURE 19. L'ESPÈCE OCTOCORALLIAIRE ÉTUDIÉE : *HETEROXENIA FUSCESCENS* 76
FIGURE 20. MISE EN PLACE D'UN SYSTÈME EXPÉRIMENTAL POUR L'EXPÉRIENCE N°4 RÉALISÉE AVEC E. TOWLE 78
FIGURE 21. MISE EN PLACE DU SYSTÈME PERMETTANT LES MESURES DES TAUX DE PHOTOSYNTHÈSE ET DE RESPIRATION .. 82
FIGURE 22. INCUBATION D'UNE BOUTURE DE *S. PISTILLATA* 89
FIGURE 23 CORRÉLATION DE PEARSON METTANT EN ÉVIDENCE LA RELATION EXISTANT ENTRE LE TAUX D'ABSORPTION D'AMMONIUM ET DE PHOTOSYNTHÈSE NETTE (T=2.57, P=0.019 AND P=0.52). LES POINTS COLORÉS REPRÉSENTENT LES DIFFÉRENTES ESPÈCES 207
FIGURE 24 CORRÉLATION DE PEARSON METTANT EN ÉVIDENCE LA RELATION EXISTANT ENTRE L'ABSORPTION DE NITRATES ET DE PHOSPHATES (T=2.87, P=0.01, P =0.56). LES POINTS COLORÉS REPRÉSENTENT LES DIFFÉRENTES ESPÈCES. 208
FIGURE 25. ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DÉCRIVANT LES RELATIONS EXISTANT ENTRE L'ABSORPTION D'AZOTE, DE PHOSPHORE ET LES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES CLÉS ÉTUDIÉS DANS LE CADRE DE L'ARTICLE N°1 À 25°C 209

Figure 26 Corrélation de Pearson mettant en évidence la relation existant entre l'absorption d'ammonium et les taux de photosynthèse nette (t=3.029, p=0.007, p=0.58) 211
Figure 27. Analyse en composante principale réalisée pour complémenter l'article n°1 avec les données obtenues à 30°C 213
Figure 28. Analyse en composante principale regroupant les différentes études réalisées sur la famille des Pocilloporidae et illustrant les effets des enrichissements en nutriments inorganiques sur la réponse physiologique du corail à 25°C 223
Figure 29 Pearson correlation highlighting the relationship between ammonium uptake rates and net photosynthesis (t=2.57, p=0.019 and p=0.52). Coloured dots represent the different species. 239
Figure 30 Pearson correlation highlighting the relationship between nitrate and phosphorus uptake rates (t=2.87, p=0.01, p =0.56). 240
Figure 31 Principal component analysis describing the relationship between nitrogen, phosphorus uptake rates and the physiological parameters that were studied in article n°1 at 25°C 241
Figure 32 Pearson correlation highlighting the relationship between ammonium uptake and net photosynthesis (t=3.029, p=0.007, p=0.58) at elevated temperature 243
Figure 33 Principal component analysis performed on the physiological parameters measured for the different species of Pocilloporidae that illustrats the effects of nutrient enrichments on coral physiology 252
Figure 34 Future challenges : taking into account several drivers of the reef ecosystem dynamics 260
Figure 35 Summary of the effects of nutrient enrichment on coral physiology at 25°C. Green color indicates a increase in the parameter, while red color indicates a decrease in the parameter. 261
Figure 36 Summary of the effects of nutrient enrichment on coral physiology at 30°C. Green color indicates a increase in the parameter, while red color indicates a decrease in the parameter. 262

Liste des tableaux

Table 1. Les différents types de symbiose 31
Table 2. Processus régissant le cycle de l'azote en milieu océanique 44
Table 3 Résumé succint des études portant sur les effets des sels nutritifs sur la physiologie corallienne61
Table 4 Summary and outcomes of the different experiments performed with distinct seawater nutrient enrichments 152
Table 5 Analyse en composante principale (ACP) effectuée sur les paramètres physiologiques mesurés dans le cadre de l'article n°1 à 25°C. Les cosinus directeurs et le pourcentage de variance expliquée sont exprimés pour chaque composante. 211
Table 6 Analyse en composante principale (ACP) effectuée sur les paramètres physiologiques mesurés lors de l'article n°1 à 25°C. Les cosinus directeurs et le pourcentage de variance expliquée sont donnés pour chaque composante 215
Table 7 Analyse en composante principale (ACP) effectuée sur les paramètres physiologiques mesurés pour les différentes espèces de Pocilloporidae illustrant les effets des enrichissements en sels nutritifs sur la physiologie. Les cosinus directeurs et le pourcentage de variance expliquée sont donnés pour chaque composante 222
Table 8 Perspectives futures : prendre en compte différents paramètres biotiques et abiotiques charactérisant le récif 228
Table 9 Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors des différentes expériences basées sur l'effet des enrichissements en sels nutritifs. La couleur rouge correspond à une diminution des paramètres physiologiques alors que la couleur verte correspond à une augmentation. "H" correspond à un apport hétérotrophe. 230
Table 10 Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors des différentes expériences basées sur l'effet des enrichissements en sels nutritifs sur la physiologie du corail à 30°C. La couleur rouge correspond à une diminution des paramètres physiologiques alors que la couleur verte correspond à une augmentation. La couleur rouge correspond à une diminution des paramètres physiologiques alors que la couleur verte correspond à une augmentation. "H" correspond à un apport hétérotrophe. .. 231

Principales abréviations

Abréviation	Définition
ADN	Acide désoxyribo-nucléique
ATP	Adénosine triphosphate
C	Carbone
COD	Carbone organique dissous (DOC)
CO_2	Dioxyde de carbone
C_L	Carbone perdu
C_{meas}	^{13}C mesuré dans un échantillon contrôle (%)
C_{nat}	Abondance naturelle de ^{13}C dans un échantillon contrôle (%)
C:N:P	Rapport atomique entre le contenu en carbone, azote et phoshpore
COP	Carbone organique particulaire (POC)
COT	Carbone organique total (TOC)
DDAM	Dissolved organic carbon-Disease-Algae-and-Microbes
FSW	Eau de mer filtrée (filtered seawater)
Fv/Fm	Efficacité photosynthétique
GDH	Glutamine déshydrogénase
GOGAT	Glutamine oxoglutarate aminotransférase
GS	Glutamine synthétase
H_2O	eau
M_c	Masse de C (mg) de tissu ou symbiotes ou de mucus
MOD	Matière organique détritive (DOM)
MOP	Matière organique particulaire (POM)
M_{sample}	Masse d'échantillon lyophilisé (mg)
M_{sk}	$CaCO_3$ produit par le processus de calcification
N	Azote
N_2	Diazote
NH_4	Ions NH_4^+ ammonium
NO_2	Ions nitrite NO_2^-
NO_3	Ions nitrate NO_3^-

N:P	Rapport atomique entre le contenu en azote et en phosphore
NPQ	Quenching non-photochimique (Non-photochemical quenching)
O_2	Dioxygène
PAR	Radiations induisant la photosynthèse (Photosynthetically active radiation)
P_c	C brut fixé par la photosynthèse des symbiotes (µg C cm^{-2} h^{-1})
P_G	Taux de photosynthèse brute (µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})
Pn	Taux de photosynthèse nette (µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})
PO_4	Ions orthophosphates ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-})
P_Q	Quotient photosynthétique (1.1 mol O_2: mol C)
R	Taux de respiration de l'holobionte (umol O_2 cm^{-2} h^{-1})
Rc	C respiré par l'holobionte (µg C cm^{-2} h^{-1})
Rh	C respiré par l'hôte (µg C cm^{-2} h^{-1})
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (ROS en anglais)
RQ	Quotient respiratoire (0.8 mol C : mol O_2)
Rs	C respiré par les symbiotes (µg C cm^{-2} h^{-1})
S	Surface des boutures coralliennes (cm^{-2})
Ts	Quantité de C transféré des symbiotes à l'hôte (µg C cm^{-2} h^{-1})
ρ_H	Taux d'incorporation de C dans les tissus de l'hôte
ρ_{POC}	Taux d'incorporation de C dans le COP excrété
ρs	Taux d'incorporation de C dans les symbiotes
rETR	Taux de transport relatif d'électrons

Chapitre I.
Introduction

I. Introduction

1. Généralités

1.1 Importance des récifs coralliens dans le monde

Les récifs coralliens comptent parmi les plus anciens écosystèmes de la planète, leur origine remontant à plus de 700 millions d'années, durant l'aire paléozoique (Stanley Jr 2013). Aujourd'hui, les récifs constituent l'une des plus grandes structures réalisées par des organismes vivants, les coraux scléractiniaires symbiotiques. Ces derniers sont caractérisés par une endo-symbiose mutualiste associant des animaux sessiles, les polypes, appartenant au règne des Cnidaires (ordres des scléractiniaires et hydrocoralliaires), à des dinoflagellés du genre *Symbiodinium*, communément appelés zooxanthelles.

Figure 2. Récif corallien à Palmyra Atoll
Source : Jim Maragos/U.S. Fish and Wildlife Services

Les polypes puisent dans l'eau de mer des minéraux nécessaires à la formation et à la précipitation de leur squelette composé de carbonate de calcium ($CaCO_3$), dont la croissance avoisine les 4 ±1 kg de $CaCO_3$ par année et par m^2 (Barnes and Chalker 1990) (pour un toit récifal hétérogène). Souvent comparés aux forêts tropicales humides, les récifs coralliens comptent parmi les écosystèmes les plus productifs de la planète, en abritant plus du quart de la biodiversité marine mondiale (Knowlton et al. 2010). La formation des récifs est principalement influencée par les phénomènes liés à la tectonique des plaques ainsi qu'à l'hydrodynamisme. On distingue trois types de récifs (Figure 3) :

Les récifs frangeants, qui se forment en bordure côtière et sont constitués de platiers recouverts de débris de coraux morts (localisations : Réunion, Antilles, Mer rouge).

Les récifs-barrières qui sont, quant à eux, situés à une distance importante des côtes. Ils sont séparés de la terre ferme par un lagon (localisations : Nouvelle-Calédonie, Australie)

Les atolls, qui représentent d'anciens récifs de haute mer, pour lesquels l'île dont ils sont initialement issus a partiellement, voire totalement, disparu (localisations : Iles Kiribati, Polynésie française)

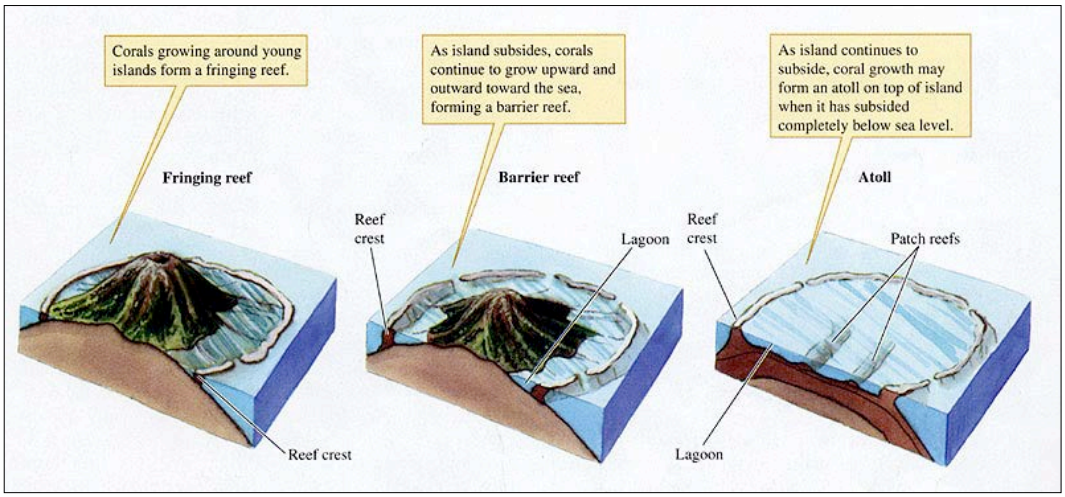


Figure 3. Représentation des trois types de récifs. Source: thegeographeronline.net

Les récifs se répartissent principalement sur le pourtour de la ceinture équatoriale, dans les zones tropicales et subtropicales, entre 30°N et 30°S. La distribution bathymétrique, qui est comprise, en moyenne, entre 0 et 30 mètres, dépend fortement de l'irradiance solaire (zone photique) et de la température de l'eau de mer, avec une croissance optimale des coraux entre 22 et 28°C. La superficie totale occupée par les récifs coralliens est estimée à 300 000 km^2, soit 0,1% de la surface totale des océans. Deux zones biogéographiques peuvent être regroupées en fonction de la richesse spécifique et géomorphologique ainsi que de la biodiversité (Figure 4) :

- *la zone indo-pacifique* : la zone la plus vaste présentant une forte richesse spécifique, comprenant entre autre la Malaisie, les Philippines, l'Indonésie, la Grande Barrière de corail en Australie qui s'étend sur plus de 2000 km de long (représentant 17% des récifs).
- *la zone tropicale de l'Atlantique ouest* : elle représente un vingtième de la zone indo-pacifique et se situe principalement autour des Bermudes ainsi que des Caraïbes.
- la zone du Moyen-Orient et tout particulièrement la Mer Rouge

Alors qu'ils se répartissent sur une zone très restreinte (Figure 4), les écosystèmes récifaux abritent plus de 25% de la biodiversité marine mondiale, avec près de 4000 espèces de poissons recensées, dont 1500 sur la Grande Barrière australienne uniquement (Spalding et al. 2001).

Outre leur importance en terme de biodiversité marine, les récifs fournissent des biens et des services multiples et diversifiés à l'homme et concernent plus de 100 pays à travers le monde. On considère, à ce jour, que 30 millions de personnes, pour la plupart résidant dans les pays à faible revenu, dépendraient directement de ces écosystèmes pour leur subsistance (Wilkinson et al. 2008). Ce chiffre atteint 500 millions de vies humaines si l'on tient compte des services rendus en matière de protection des côtes, d'opportunités d'emplois dans les domaines du tourisme et des loisirs ainsi que dans l'industrie pharmaceutique, suite à la valorisation d'organismes founissant des molécules d'intérêts médicaux (Wilkinson et al. 2008).

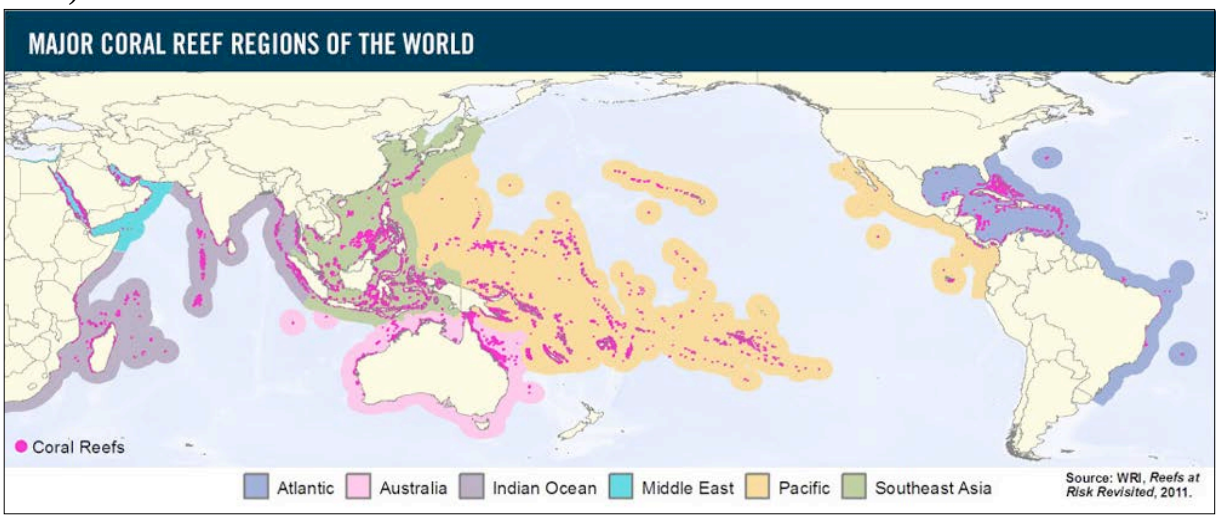


Figure 4. Biogéographie des récifs coralliens

Les coraux sont également étudiés dans le domaine de la paléoécologie, leur mode de développement ayant peu évolué, ils représentent alors de vrais repères chronologiques. Grâce à des marqueurs biogéochimiques tels que les rapports isotopiques du carbone et de l'oxygène, les analyses élémentaires de coupes de squelettes coralliens sont susceptibles de fournir des données quantitatives sur la température de l'eau, les conditions d'ensoleillement ainsi que la salinité en un point donné, en fonction du temps (Wyndham et al. 2004).

1.2 Taxonomie des Cnidaires

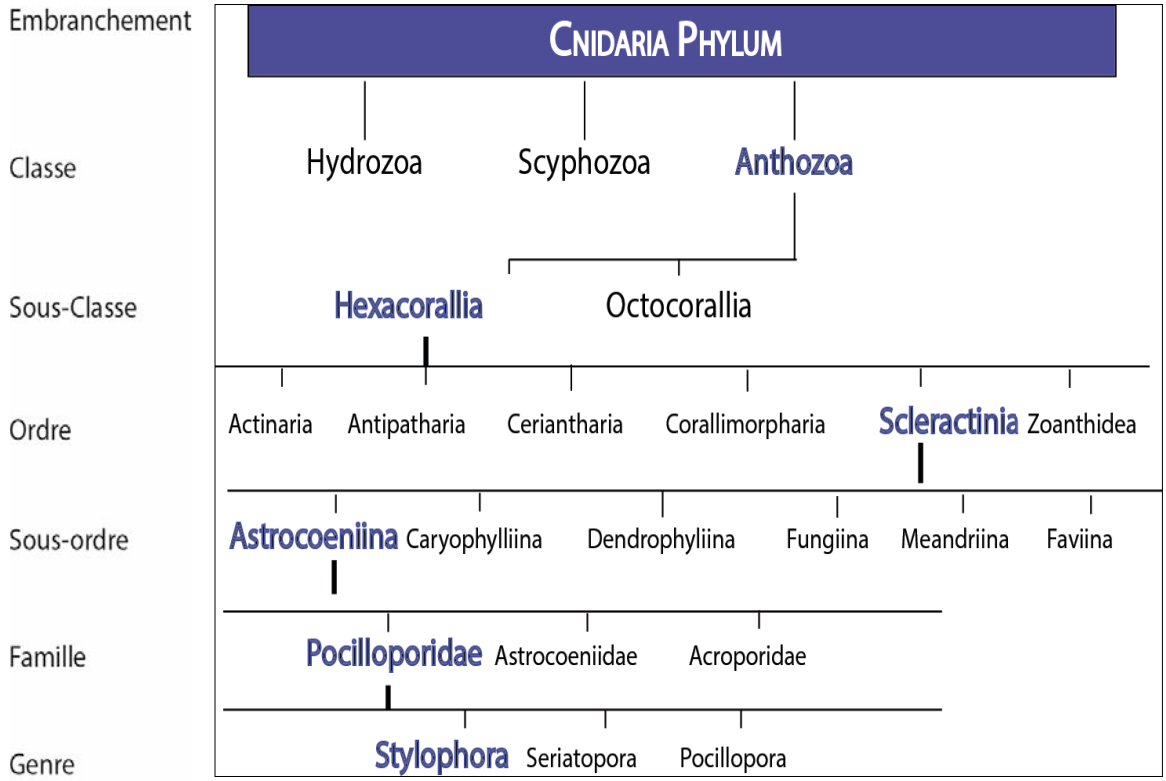


Figure 5. L'embranchement des Cnidaires (simplifié), d'après Veron et Stafford-Smith (2000)

Les premiers fossiles de Cnidaires datent du Précambrien, il y a plus de 700 millions d'années (Stanley Jr 2013). À ce jour, l'embranchement comprend plus de 10 000 espèces réparties en trois groupes : les Anthozoaires, les Hydrozoaires et les Scyphozoaires, ces deux derniers appartenant au sous-embranchement des Méduzoaires (Figure 5) (Marques and Collins 2004). Ces organismes, dits diploblastiques, sont formés de deux feuillets cellulaires embryonnaires : l'endoderme et l'ectoderme, tous deux séparés par la mésoglée, primitivement acellulaire. L'endoderme ou gastroderme contient la cavité gastrovasculaire, un tissu spécialisé dans la digestion et l'absorption des nutriments et composé d'un orifice servant à la fois de bouche et d'anus. L'ectoderme ou épiderme, composé de cellules myoépithéliales, glandulaires, nerveuses et neurosensorielles, inclue la région orale couvrant la bouche et les tentacules (Goldberg 2013; Grassé 1987).

Les tentacules des cnidaires (du grec ancien « knidē », en français « urticant ») contiennent des cellules urticantes, les cnidocystes (ou nématocystes), caractéristiques de l'embranchement. Les cnidaires présentent un cycle biologique particulier, alternant ou pas une forme libre et planctonique, la méduse et une forme benthique, sessile, le polype. Les classes de Cnidaires citées plus haut se définissent par le stade biologique atteint par l'organisme. Ce travail, concerne principalement la classe des Anthozoaires, et le terme « corail » désignera uniquement, sauf spécification contraire, les coraux Scléractiniaires, constructeurs de récifs.

1.2.1 Les Anthozoaires

Le terme « Anthozoaire » provient des racines greques *anthos*, signifiant fleur et *zõion* : animal. Cette classe « d'animaux fleurs » regroupe les anémones de mer, les alcyonaires, les gorgones, les plumes de mer ainsi que les coraux. Ils se présentent uniquement sous la forme de polype fixé, seul, ou formant des colonies. Dans ce dernier cas, les polypes se soudent les uns aux autres et peuvent créer des colonies de plusieurs mètres de long. Certains organismes sécrètent un squelette de carbonate de calcium, tels que les coraux, d'autres ne le font pas, comme les anémones. La reproduction s'effectue par bourgeonnement, scission ou lacération, ou encore de manière sexuée en libérant ovules et spermatozoïdes dans la colonne d'eau. Les larves nouvellement nées, appelées planulae, se fixeront rapidement à un substrat afin de former un nouveau polype.

La classe des Anthozoaires comprend environ 6000 espèces réparties en cinq sous-classes, dont deux sont encore présentes aujourd'hui :

- La sous-classe **des Hexacoralliaires**. Ces Anthozoaires sont caractérisés par une symétrie d'ordre six ou d'un multiple de six. Les Hexacoralliaires comprennent 7 ordres dont celui des Scléractiniaires auxquels appartiennent la plupart des coraux tropicaux. **Les Scléractiniaires** représentent l'ordre principal des coraux durs, caractérisés par un squelette composé de carbonate de calcium sous forme d'aragonite.
- La sous-classe **des Octocoralliaires.** Ces organismes présentent une symétrie d'ordre huit ou d'un multiple de huit. Le corail rouge de Méditerranée (*Corallium rubrum*) ainsi que le corail mou *Heteroxenia fuscescens* (étudié dans le cadre de ce travail), en font partie.

Le polype d'Anthozoaire est composé d'une couronne formée de 6 ou 8 tentacules et d'un orifice (bouche ou anus) prolongé par un canal oesophagien, le stomodeum, s'ouvrant sur la cavité gastrovasculaire ou coelentéron (Figure 6).

Comme mentionné en début de chapitre, la clé du succès et du développement des récifs coralliens dans les océans du monde entier réside dans l'association mutualiste endo-symbiotique entre l'hôte animal et des dinoflagellés photosynthétiques.

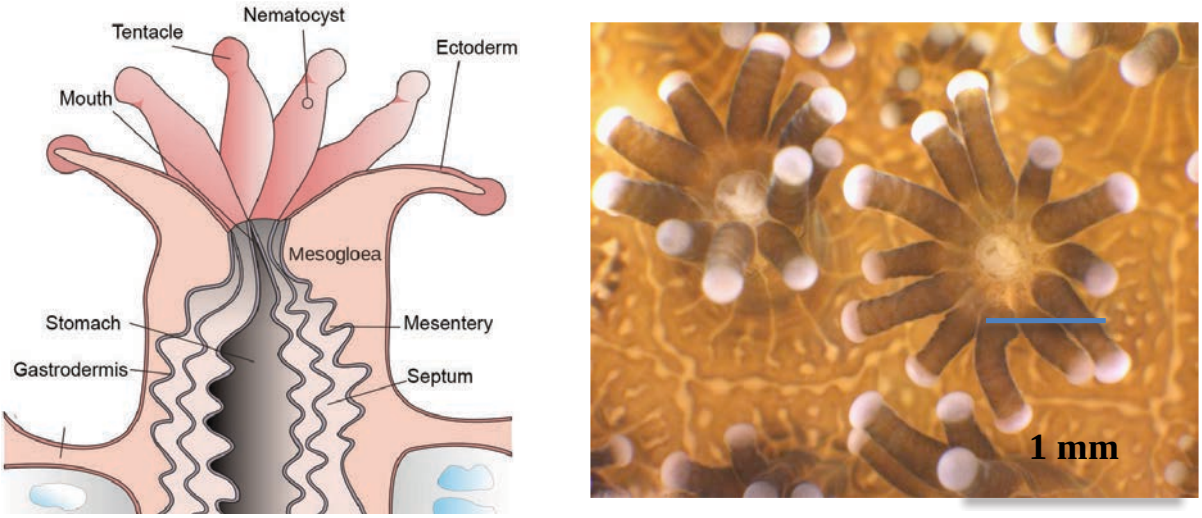


Figure 6. Schéma et Photographie d'un polype de corail. (Source : schéma adapté de NOAA & MarkusZi et Photographie E.Tambutté)

1.3 La symbiose

Dans le cadre de ses travaux effectués sur les lichens, Anton de Bary, en 1866, qualifie la symbiose comme étant une « association entre deux types d'organismes vivants qui persiste dans le temps » (Bary 1866). Cette définition a cependant donné lieu à de nombreux débats durant le 20ème siècle, et la symbiose est aujourd'hui définie comme une association intime et durable entre différentes espèces (Goff 1982) et incorpore le caractère dynamique de l'association, à travers le temps et l'espace (Bronstein 1994). Les symbioses animales et végétales sont omniprésentes dans notre environnement et génèrent une incroyable biodiversité sur la planète (Brucker and Bordenstein 2012). Les deux organismes clés sont l'hôte et le symbiote, ce dernier étant le plus petit des deux. Différents types de symbioses, présentés dans la

Table 1 ont été répertoriés d'après la nature de leurs interactions et leur localisation. La symbiose corail-dinoflagellé, dans laquelle le corail prend le rôle de l'hôte et les dinoflagellés celui des symbiotes, est définie comme une endo-symbiose intracellulaire puisque les algues se situent au sein de l'endoderme de l'animal (Muscatine and Porter 1977).

Elle est mutualiste car les deux partenaires peuvent tirer avantage de l'association. Elle se réfère comme étant obligatoire car elle est nécessaire à la survie de l'hôte animal, qui voit son métabolisme très réduit lors d'une perte de symbiotes (phénomène de blanchissement qui sera décrit plus tard). Cependant, cette association est facultative pour les dinoflagellés qui existent également sous une forme libre, au sein du phytoplancton.

Type	Description
Nature de l'interaction	
Mutualisme	une association qui profite aux deux partenaires (ex. : la symbiose corail-dinoflagellé, les mycorhizes)
Commensalisme	une association qui ne profite qu'à un seul des deux partenaires, sans que l'autre soit lésé (ex. : les crabes sont commensaux des moules)
Parasitisme	une association qui favorise un seul partenaire au détriment du second (ex. *le Plasmodium*, un protozoaire, dont certaines espèces peuvent transmettre le paludisme)
Localisation	
Endosymbiose intracellulaire	le symbiote est localisé dans les cellules de l'hôte (ex. : la symbiose corail-dinoflagellé)
Endosymbiose extracellulaire	le symbiote est localisé dans les tissus de l'hôte, en dehors des cellules (ex. : dinoflagellés et bénitiers)
Ectosymbiose	le symbiote est localisé en dehors de l'hôte (ex. : anémones et poissons clown)

Table 1. Les différents types de symbiose

1.3.1 Taxonomie et caractéristiques biologiques des dinoflagellés symbiotiques

Le terme dinoflagellé provient du grec, « dino » : toupie. Ces algues unicellulaires photosynthétiques (famille des phytoflagellés), apparues il y a plus de 400 millions d'années, arborent deux flagelles leur permettant d'effectuer des déplacements tournoyants et des migrations verticales. On en distingue deux types : les dinoflagellés « nus » et les dinoflagellés « cuirassés » arborant une enveloppe protectrice composée de cellulose. Ils se caractérisent par un comportement alimentaire très varié. En effet, certains sont hétérotrophes, d'autres autotrophes, et la plupart sont mixotrophes (Stoecker 1999). Les dinoflagellés associés aux coraux Scléractinaires font partie du règne des Alvéolés et plus particulièrement au genre *Symbiodinium sp*. Alors que tous les dinoflagellés du genre *Symbiodinium* étaient apparentés à l'espèce *Symbiodinium microadriaticum* (Freudenthal 1962), des analyses moléculaires ont permis de distinguer 8 différents groupes génétiques, ou « clades » (A à H) (Rowan 1998) associés aux invertébrés marins.

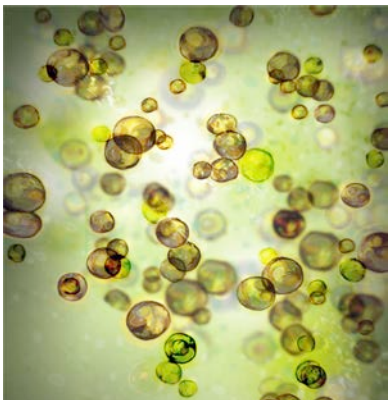


Figure 7. Dinoflagellés symbiotiques, Symbiodinium Source : sci-ence.org

Des clades spécifiques de dinoflagellés sont souvent associés à des groupes d'hôtes bien définis (Baker 2003). Cependant, des variations peuvent exister en fonction de l'espèce, de la géographie et de la profondeur (LaJeunesse et al. 2004). De plus, chaque clade de *Symbiodinium* est composé de variantes génétiques multiples (Goldberg 2013). De nos jours, plus de 100 génotypes de *Symbiodinium* ont pu être distingués (Baker 2003). Les clades généralement associés aux coraux Scléractiniaires sont A-D, F et G (Coffroth and Santos 2005; Goldberg 2013; LaJeunesse 2001).

Les dinoflagellés symbiotiques des coraux (6-15 µM de diamètre) se situent dans le cytoplasme endodermique de l'hôte et plus précisément au sein de la vacuole animale que l'on nomme "symbiosome" (Figure 8)(Trench 1993). Le nombre de symbiotes par vacuole animale est généralement de un ou deux mais peut quelquefois être supérieur à six (Muscatine et al. 1998). Les facteurs qui régulent cette densité sont multiples et complexes.

Ils peuvent dépendre notamment de l'état nutritionnel de l'hôte, de la disponibilité en sels nutritifs et de la quantité de lumière disponible (Jones and Yellowlees 1997). Cependant, la densité de symbiotes est plus souvent exprimée en nombre de cellules algales présentes par cm^2 de surface de squelette. Cette densité est d'environ 1.5 million de cellules par cm^2 dans des conditions normales de développement (Muscatine et al. 1998). Les dinoflagellés symbiotiques peuvent être acquis par l'hôte soit par l'endocytose de symbiotes libres présents dans la colonne d'eau (transmission horizontale) ou par une transmission directe du parent vers l'embryon (transmission verticale) (Trench and Winsor 1987).

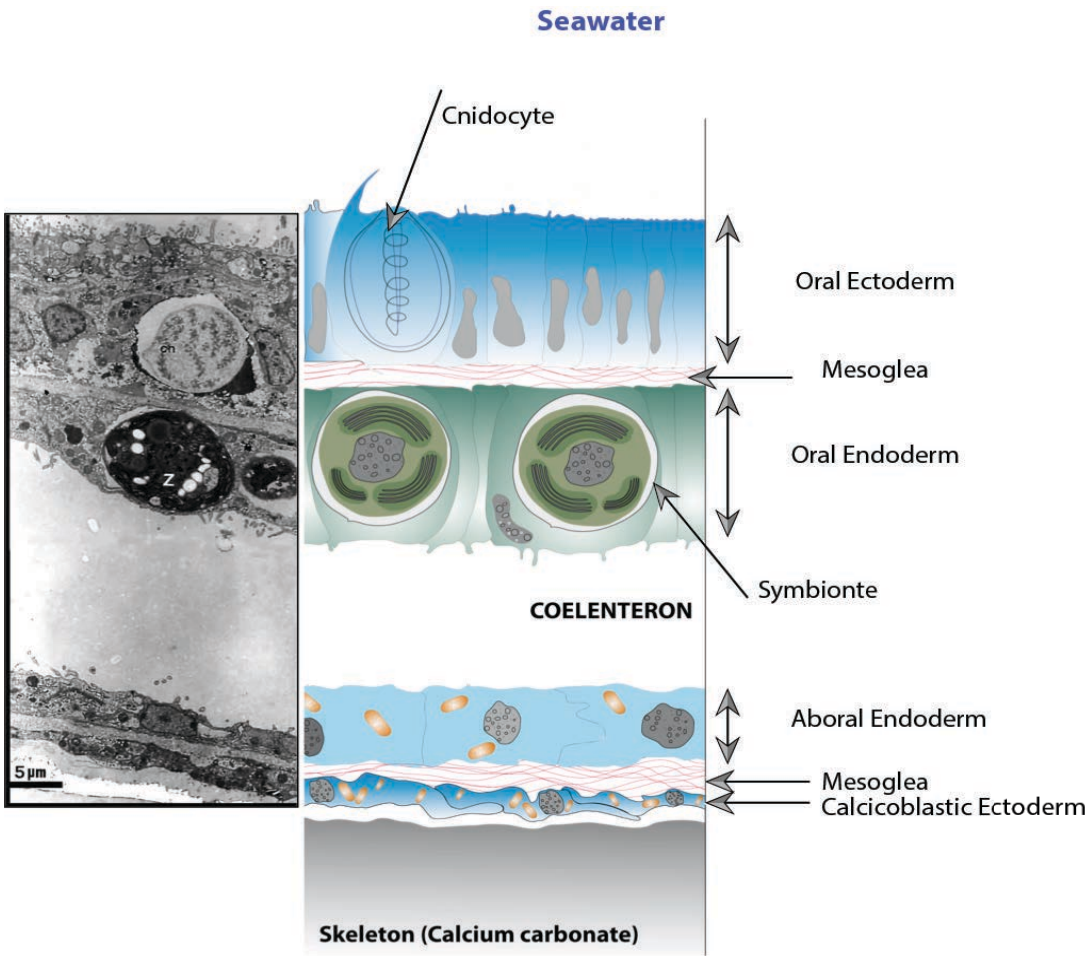


Figure 8. Schéma d'une coupe transversale de tissu corallien. (Source : Image au microscope électronique en transmission (Gattuso et al., 1999) et schéma modifié d'après E.Tambutté

1.3.2 Mode de nutrition de la symbiose corail-dinoflagellé

Grâce à la présence des symbiotes, l'hôte corallien acquiert une nouvelle voie métabolique, **l'autotrophie**. Par la photosynthèse, les symbiotes produisent des éléments carbonés de faible poids moléculaire, tels que le glucose et le glycérol qui entrent dans la composition de sucres et/ou de lipides mais qui sont cependant très pauvres en azote et en phosphore (Burriesci et al. 2012; Muscatine 1967). La majorité de ces photosynthétats (75%-95%) sont, par la suite, transférés à l'hôte animal (Muscatine et al. 1984; Tremblay et al. 2012) selon un processus induit par des stimuli chimiques appelés « Host release factor » (Davy and Cook 2001). La contribution des photosynthétats à la respiration animale peut atteindre jusqu'à 100% de ses besoins métaboliques journaliers (Muscatine et al. 1984; Muscatine et al. 1981) bien que ce pourcentage puisse varier en fonction des conditions environnementales (lumière, température, pCO_2 etc.) ainsi que de la disponibilité en nutriments organiques ou inorganiques (Tremblay et al. 2014; Tremblay et al. 2012). Ils sont donc principalement métabolisés par le corail avant d'être incorporés dans ses tissus (Falkowski et al. 1984). Les photosynthétats et autres molécules organiques transférées des symbiotes à l'hôte contribuent également à accroître la production de squelette en favorisant la précipitation des ions Ca^{2+} et HCO_3^- sous forme de cristaux d'aragonite au niveau du site de calcification.

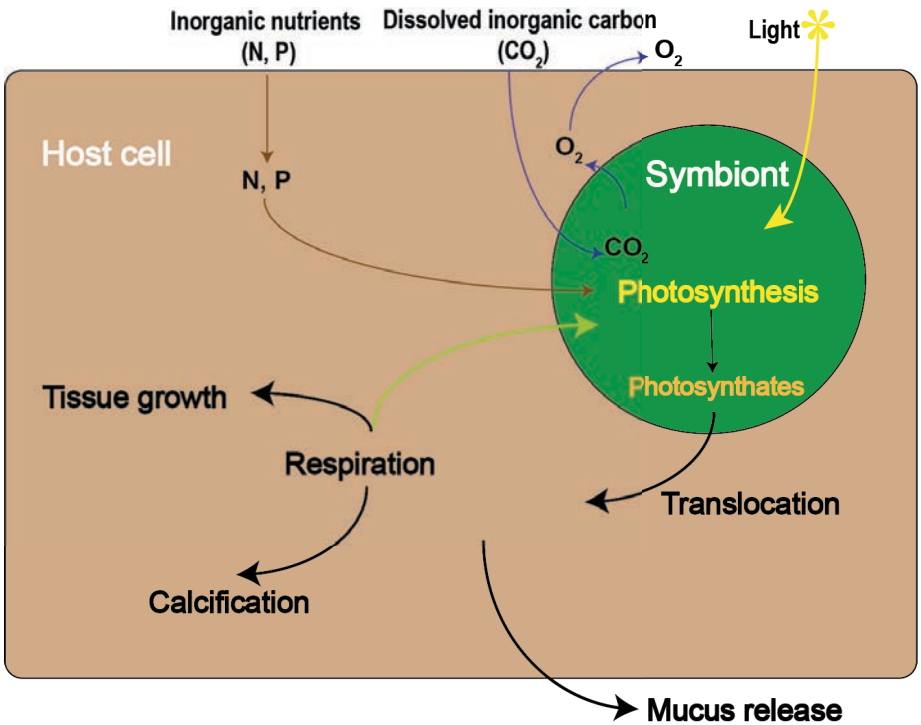


Figure 9. Schéma simplifé décrivant les relations nutritionnelles existant au sein de la symbiose corail-dinoflagellés (mode de nutrition: autrotrophie)

Les photosynthétats entrent dans le processus de calcification par l'intermédiaire de la matrice organique, qui serait principalement constituée de protéines riches en acides aminés pouvant être sulfatées ou glycolysées, de sucres sulfatés, de phospholipides et d'eau (Allemand et al. 2011; Tambutté et al. 2007; Watanabe et al. 2003). Le rôle de la matrice organique consiste à exercer un contrôle biologique de la calcification, qui impose au squelette sa morphologie et son taux de croissance. En plus de fournir des molécules entrant dans la composition de la matrice organique, les photosynthétats sont également une source d'énergie pour l'hôte et la calcification, qui est un processus très consommateur d'énergie (Barnes and Chalker 1990). Hormis la fixation de carbone inorganique via la photosynthèse, les algues sont capables d'absorber et d'assimiler des éléments inorganiques dissous afin de synthétiser des acides aminés et composés phosphorés. Les déchets azotés et phosphorés résultant du métabolisme de l'animal peuvent être recyclés par les symbiotes pour leurs propres besoins métaboliques.

En plus du caractère autotrophe, l'hôte corallien est également **hétérotrophe** (Voir Figure 10). En effet, de nombreuses études ont confirmé la variété de son régime alimentaire (Grottoli 2002; Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009; Houlbrèque et al. 2004a; Houlbrèque et al. 2004b; Muscatine 1973) constitué de matière organique dissoute (MOD) et particulaire (MOP) vivante ou détritique (voir la revue de (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009)). Le corail dispose d'un certain nombre de cellules urticantes, présentes dans ses tentacules et au bord de sa bouche, les cnidocystes, qui facilitent la capture des proies (Sorokin 1990). De nombreuses espèces de coraux symbiotiques sont en effet capables d'absorber la matière organique dissoute (MOD), principalement sous la forme d'hydrates de carbone, d'acides aminés libres dissous ainsi que d'urée, présents en très faibles concentrations dans l'eau de mer, de l'ordre du micromolaire (Goreau et al. 1971; Grover et al. 2006; Grover et al. 2008; Stephens 1960; Stephens 1962). Les sédiments et la colonne d'eau contiennent de la matière organique particulaire (MOP), vivante ou détritique également assimilable par les coraux (Lopez and Levinton 1987). Le type de proies retrouvées dans l'intestin de l'animal est très varié et ne reflète pas systématiquement la disponibilité dans la colonne d'eau (Palardy et al. 2005; Palardy et al. 2006).

Principalement, les polypes sont capables d'ingérer du picoplancton (Bak and Meesters 1998; Ferrier-Pagès and Gattuso 1998; Sorokin 1973), du nanoplancton (Houlbrèque et al. 2004b) ainsi que le micro- et mesoplancton (Palardy et al. 2005; Palardy et al. 2006). Les coraux sont connus pour être des prédateurs voraces de zooplancton, pouvant ingérer entre 0.5 et 6 particules par polype et par heure (Sebens et al. 1997).

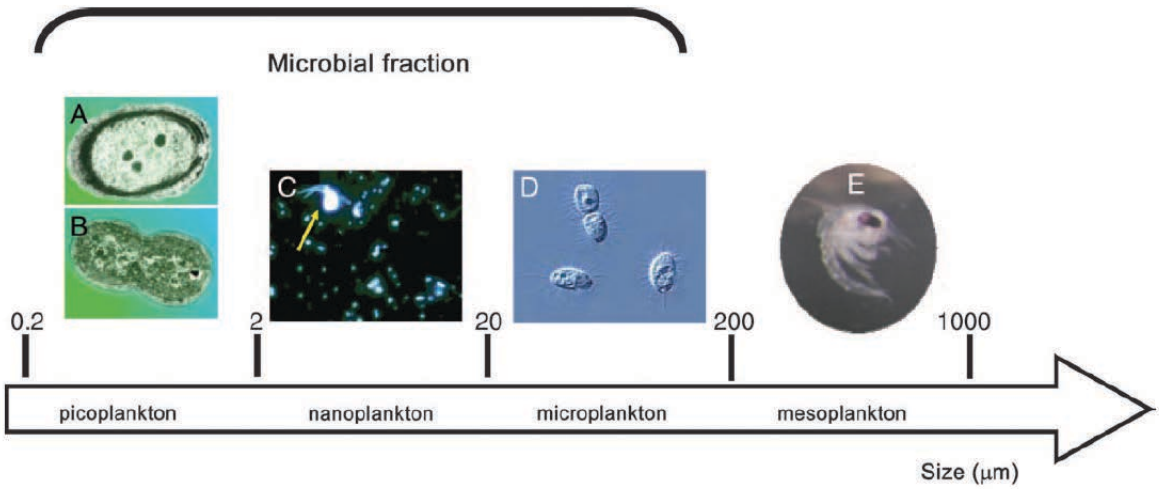


Figure 10. Les classes de taille du plancton : picoplancton, nanoplancton, microplancton et mesozooplancton prenant part au régime alimentaire des coraux scléractiniaires. (A, B) Micrographie électronique à balayage de (A) *Prochloroccocus sp*. (0.6 mm) and (B) *Synechococcus sp*. (1 mm) (http://www.lbl.gov/Archive/JGI-microbe-clues.html). (C) Image prise au microscope à épifluorescence mettant en évidence une cellule nanofllagelée indiquée par la flèche jaune (marquée préalablement au (DAPI), Image de (D) ciliés (longueur moyenne totale est de 100 – 200 mm) prise au microscope à contraste de phase et (E) larve de crabe (longueur moyenne totale est de 1000 mm). D'après Houlbrèque & Ferrier-Pagès (2009)

Alors que les récifs coralliens se développent en milieu oligotrophe, la prédation de plancton contribue de manière non-négligeable aux besoins en azote et carbone de l'animal, et est suggérée comme l'un des mécanismes participant à la résilience et au maintien de l'écosystème récifal (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009). Les deux modes de nutrition, l'autotrophie et l'hétérotrophie, sont étroitement liés dans l'association symbiotique. Des études ont en effet montré une corrélation positive entre l'apport autotrophe et l'ingestion de zooplancton (Leal et al. 2015; Tremblay et al. 2015). Plusieurs expériences de la thèse, détaillées dans les chapitres suivants, visent à déterminer la relation entre la disponibilité en éléments inorganiques et l'ingestion de proies planctoniques.

1.3.3 Bénéfices, coûts et rupture de la symbiose

Comme mentionné plus tôt, les deux partenaires tirent chacun avantage de l'association symbiotique. Le principal bénéfice pour l'hôte est d'ordre énergétique : en métabolisant les produits de la photosynthèse des symbiotes, il stimule sa respiration cellulaire, sa capacité à se reproduire, ainsi que sa croissance tissulaire et squelettique (Allemand et al. 2004; Muscatine and Cernichiari 1969; Shick et al. 1991). Quant aux dinoflagellés, de par leur localisation dans les tissus de l'animal, ils bénéficient d'un environnement propice à leur développement, favorisé par le métabolisme de l'hôte puisqu'ils profitent directement du CO_2 résultant de la respiration cellulaire animale et tirent profit des produits du catabolisme de l'hôte avant de les lui retransmettre sous forme de molécules assimilables (Douglas and Willatts 1994).

Si l'association symbiotique est à l'origine d'importants bénéfices mutuels, d'ordre trophiques principalement, elle est contrainte à un certain nombre d'adaptations (Bronstein 2001). Afin de maximiser le processus de photosynthèse de ses symbiotes, l'hôte animal doit se développer dans des eaux peu profondes, principalement dans la zone euphotique. En conséquence, il est confronté à de fortes radiations lumineuses qui induisent des conditions hyperoxiques durant la journée (Furla et al. 2011; Muller-Parker and D'Elia 1997). Quant aux symbiotes, ils doivent transférer la plupart de leurs photosynthétats à l'hôte et requièrent, pour ce faire, un apport constant de CO_2 et de nutriments inorganiques (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Muller-Parker and D'Elia 1997; Rees 1991).

Cnidaires et dinoflagellés en symbiose ont développé de nombreux mécanismes d'adaptation menant au bon équilibre de l'association. Cependant, leur union peut se révéler fragile. En effet, leur statut sédentaire les rend particulièrement sensibles aux variations environnementales dont les brusques changements peuvent provoquer une expulsion massive et brutale des endosymbiotes et/ou une perte des pigments leur étant associés en cas de stress (Glynn 1993). La rupture de la symbiose est alors appelée « blanchissement » (de l'anglais *bleaching*) et peut être associée à un taux de mortalité variable de l'animal (Hoegh-Guldberg 1999; Lesser and Farrell 2004). Ce phénomène peut avoir diverses origines. On distingue des facteurs de stress à l'échelle globale de la planète et à une échelle plus régionale.

À l'échelle globale, les coraux et récifs sont affectés par le changement climatique (Anthony et al. 2015), qui induit un réchauffement global de l'atmosphère terrestre et des eaux de surface (CO_2 et CH_4). La concentration de CO_2 dans l'air (398.08 ppm – Mauna Loa Octobre 2015), qui ne cesse d'augmenter depuis le début de la révolution industrielle (~1850, 276 ppm), modifie également les équilibres chimiques des carbonates dans l'eau de mer (production d'acide carbonique), avec, pour conséquence, une acidification de ces eaux océaniques (Gattuso et al. 2015). Entre 1750 et 2000, les océans ont absorbé plus du tiers des rejets de CO_2 émis par l'homme. Le pH a diminué de ~0,1 unité (8,2 à 8,1), et pourrait continuer de dégringoler de 0,7 unités d'ici 2300 (Hönisch et al. 2009; Zeebe et al. 2008). Entre 1950 et 2009, la température des eaux de surface s'est élevée en moyenne de 0,65°C, 0,41°C et 0,31°C dans les océans Indien, Atlantique et Pacifique respectivement (Hoegh-Guldberg 2014). La stratification des couches de surface a, quant à elle, augmenté de 4% entre 1971 et 2010, réduisant la concentration en oxygène dissous ainsi que la disponibilité en nutriments inorganiques (Rhein et al. 2013).

À l'échelle locale, les principaux facteurs de stress proviennent des activités anthropiques (humaines) tels que les rejets agricoles et urbains (nitrates, phosphates) et industriels (Wear and Thurber 2015). Ces derniers influencent les cycles biogéochimiques au sein de la colonne d'eau (Smith et al. 1999) et favorisent également le développement excessif d'algues et de pathogènes, entrant en compétition directe avec les espèces coralliennes pour l'accès aux ressources nutritionnelles du milieu, à l'espace et à la lumière (McCook et al. 2001). D'autres facteurs, tels que la surpêche, les techniques de pêche destructrices (pêche au cyanure ou à la dynamite), le tourisme de masse, les mouillages sauvages,.. augmentent le risque de dégradation des récifs (Gil et al. 2015; Sale and Hixon 2014). Ces facteurs de stress ont des effets directs et parfois irréversibles sur les écosystèmes récifaux.

L'acidification de l'eau de mer affecte directement la croissance des organismes calcifiants, tels que les coraux, (Kroeker et al. 2013) en modifiant les conditions physico-chimiques de la sécrétion de leur squelette calcaire ($CaCO_3$). De plus, la diminution du pH de l'eau de mer favorise la dissolution des carbonates déjà présents au sein des écosystèmes (Evenhuis et al. 2015; Hoegh-Guldberg et al. 2007; Kleypas and Langdon 2006). L'augmentation de la température de surface de l'eau de mer peut, quant à elle, être une des principales causes de blanchissement et avoir des conséquences irréversibles sur la survie du corail, qui se développe à ~2°C en-dessous de sa limite thermique maximale (Hoegh-Guldberg 1999). Six évènements de blanchissement majeurs ont été reportés entre les années 1979 et 1999 (Hoegh-Guldberg 1999).

Actuellement, un épisode blanchissement massif, l'un des pires recensé, et renforcé par le phénomène El Niño, menace actuellement 95% des récifs coralliens du territoire américain et atteindra l'Océan Indien début 2016 (NOAA, http://www.noaa.gov/el-ni%C3%B1o-prolongs-longest-global-coral-bleaching-event).

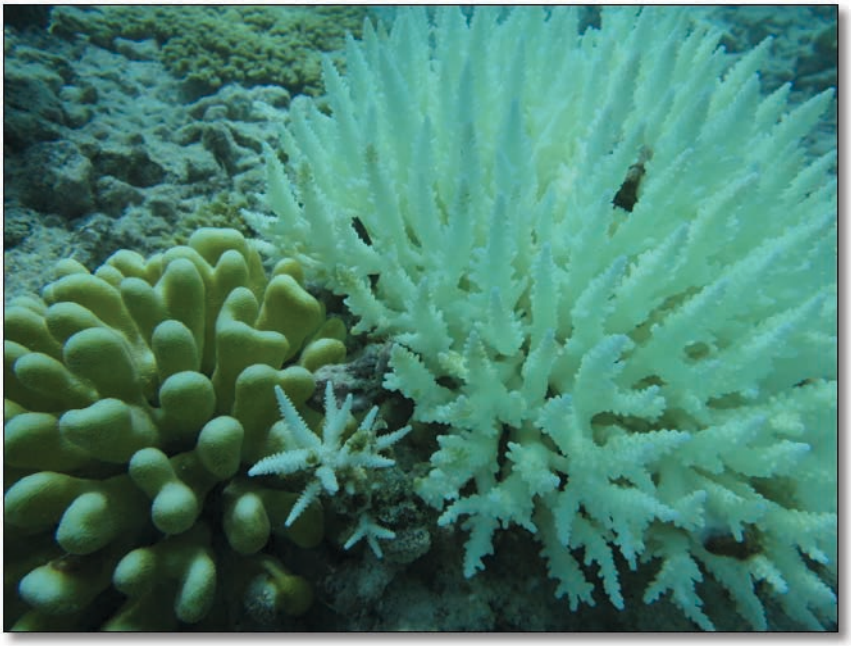


Figure 11. Evènement de blanchissement observé aux Seychelles au printemps 2016. Photo: © Christopher Bird

De plus, les changements globaux influent sur d'autres paramètres climatiques et physico-chimiques pouvant affecter la survie des écosystèmes coralliens. La fréquence des phénomènes météorologiques extrêmes tels que les tempêtes, ouragans, cyclones, tsunamis s'est vue augmentée, tout comme le niveau de la mer ainsi que la salinité de l'eau due à un accroissement de l'évaporation (Church et al. 2013; Durack et al. 2012; Vose et al. 2014). Par ailleurs, la réponse à un stress et son intensité dépendent également du génotype de symbiotes présents au sein de l'hôte corallien (Baums et al. 2013; Fitt et al. 2000) mais également de la morphologie de l'espèce corallienne en question (Van Woesik et al. 2012). Ainsi, le blanchissement serait le résultat de divers facteurs, agissant parfois en synergie (température et lumière), ayant des conséquences aussi bien à une échelle locale que globale. Le nombre, ainsi que la sévérité des évènements de blanchissement, ont été décrits comme « signal biologique » des conséquences du changement climatique (Hughes et al. 2003). Au vue de ces observations alarmantes, il est impératif que la communauté scientifique s'attèle à de nouvelles études dans le but de comprendre les mécanismes clés, déterminant la santé et le devenir de ces organismes.

2. Nutriments inorganiques et symbiose corallienne

2.1 Besoins en sels nutritifs

Les coraux, comme la plupart des animaux, ne peuvent synthétiser les molécules essentielles dont ils ont besoin pour leur croissance et leur reproduction. Cependant, la présence des dinoflagellés leur permet de bénéficier des voies métaboliques autotrophes et favorisent ainsi leur développement dans des milieux oligotrophes. Les dinoflagellés, comme tout autotrophe, peuvent en effet utiliser les micro- et macro-nutriments inorganiques dissous dans l'eau (encore appelés sels nutritifs) et les transformer en molécules organiques essentielles au fonctionnement et développement de l'association symbiotique (holobionte) (D'Elia 1977; Muscatine and D'elia 1978). Les micro-nutriments sont ceux que les organismes requièrent en faibles quantités, tels que les métaux (cobalt, chrome, cuivre, fer, manganèse, zinc, etc), les vitamines et composés halogénés (brome et iode, par exemple). Ce sont, pour la plupart, des cofacteurs qui favorisent l'activité de certaines réactions enzymatiques du métabolisme, comme la photosynthèse (Boisson et al. 2004). Les macro-nutriments tels que le carbone, l'azote et le phosphore, qui font l'objet de cette thèse, et sont détaillés ci dessous, sont nécessaires en quantité plus importante car ils entrent dans la composition des constituants essentiels des organismes vivants. En participant à la synthèse des chaines d'acides aminés (protéines) et nucléiques, l'azote constitue l'unité de base de construction d'un organisme. Le terme « protéine » ne tient pas seulement compte des composés structurels des tissus et organes mais aussi des enzymes et des hormones qui sont essentielles aux fonctionnement et au développement du vivant. Le phosphore, tout comme l'azote, est un élément clé du développement des organismes vivants (Elser 2012). Bien que très peu représenté dans la biosphère, il compose les molécules indispensables à la vie, telles que l'ARN et l'ADN, ainsi que les phospholipides au sein des membranes cellulaires (Elser 2012; Ferrier-Pagès et al. 2016). De plus, la plupart des réactions chimiques et mécanismes enzymatiques sont alimentés par l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP (L'adénosine-5′-triphosphate), molécule composée de 3 groupements phosphate très riches en énergie.

Comme mentionné précédemment, les récifs coralliens sont reconnus pour leur taux de productivité primaire élevé, en dépit des faibles concentrations en sels nutritifs des eaux environnantes (Sorokin 2013). Plusieurs processus expliquent ce paradoxe: i) des échanges importants d'eau et de nutriments entre l'océan environnant et les récifs (Wyatt et al. 2013).

Ainsi, même si les concentrations en sels nutritifs sont faibles, les quantités totales transportées par les courants sont importantes (Crossland and Barnes 1983); ii) un recyclage des nutriments très élevé au sein même du récif (D'Elia and Wiebe 1990; Odum and Odum 1955), et de la symbiose corail-dinoflagellés (Muscatine and Porter 1977).

2.1.1 L'azote : Disponibilité en milieu récifal et absorption par les coraux

L'azote, de symbole N, est l'unique constituant du gaz majoritaire (N_2) qui compose notre atmosphère (78%). L'azote est un élément qui entre dans la composition de nombreuses molécules fondamentales du vivant telles que les acides nucléiques (ARN, ADN), et les acides aminés (protéines, enzymes), et qui représente une base essentielle de toute activité organique. En milieu marin, il est présent dans des composés très divers à des degrés d'oxydation qui lui confèrent des réactivités très variables. Le cycle de l'azote, en milieu marin, est probablement le plus complexe, puisqu'il englobe des processus qui opèrent à tous les niveaux de l'écosystème, depuis l'échelle microscopique (procaryotes) jusqu'à celle des cycles biogéochimiques.

Les principales sources récifales d'azote incluent le transport advectif latéral (en provenance de l'océan), ou vertical (remontée d'eaux profondes ou upwellings), le ruissellement côtier et l'érosion éolienne, les résurgences, la fixation d'azote atmosphérique par les diazotrophes ainsi que la régénération bactérienne de l'azote particulaire (D'Elia 1988). D'autres avancées ont mis en évidence l'importance des retombées atmosphériques, incluant la poussière comme source d'azote (Garrison et al. 2003). Dans l'eau de mer, l'azote est à la fois présent sous des formes gazeuses, dissoutes et particulaires. Parmi ces composés dissous, le diazote N_2 est la forme la plus abondante, mais il constitue un cas à part puisqu'il n'est exploitable que par une communauté de bactéries et cyanobactéries capables de le réduire en ammonium afin de l'intégrer (Capone et al. 2008). Bien que l'azote dissous soit présent à tous les degrés d'oxydation allant de -3 à +5, les formes considérées comme directement utilisables par les organismes vivants sont le nitrate (NO_3^-), le nitrite (NO_2^-) et l'ammonium (NH_4^+) pour les formes inorganiques, l'urée et les acides aminés pour les formes organiques (Capone et al. 2008).

Dans le cadre de ce travail, seules les formes inorganiques dissoutes ont été prises en compte et seront détaillées dans la suite du manuscrit.

Le nitrate est la forme la plus oxydée et la plus stable en dehors des zones anoxiques, et il est consommé en abondance par les organismes photosynthétiques marins. À la surface de l'océan, les concentrations en nitrate passent sous le niveau de détection, sauf dans les hautes latitudes et les régions de faibles latitudes sujettes aux upwellings (Capone et al. 2008). La concentration de nitrate augmente par la suite en fonction de la profondeur, du fait de phénomènes engendrés par la pompe biologique (Capone et al. 2008). Au contraire, les concentrations en nitrite et ammonium sont maximales entre 50 et 80 m, c'est-à-dire dans la partie inférieure ? de la zone euphotique, puis décroissent au-delà de ces profondeurs (Figure 13) (Capone et al. 2008). Dans les régions oligotrophes, les concentrations en ammonium et nitrite sont bien plus faibles que celles des nitrates (Capone et al. 2008). Elles varient entre 0,2 et 0,5 µM pour le NH_4^+, de 0, 3 à 1 µM pour le NO_3^- (Bythell 1990; D'Elia and Wiebe 1990; Furnas 1991) et avoisinent 0.05 µM pour le nitrite. Cependant, les concentrations de NH_4^+ et NO_3^- mesurées peuvent être bien plus élevées, comme en Polynésie Française, où la teneur en nitrate a atteint 31 µM sur le site de Vaiare (Rouzé et al. 2015), à Guam (Tumon Bay) où la concentration a excédé les 8.4 mg L^{-1} (Denton et al. 2005).Les mécanismes clés du cycle de l'azote, détaillés dans la Table 2 et sur la Figure 12 incluent : la fixation de l'azote, l'ammonification, la nitritification, la dénitrification, le processus « d'oxydation anaérobie de l'ammonium» ou encore Anammox, la régénération ainsi que l'assimilation de l'azote (D'Elia and Wiebe 1990; Rädecker et al. 2015). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes tout particulièrement concentrés sur les mécanismes d'absorption, d'assimilation et de fixation d'azote, et seules ces trois voies seront examinées plus en détail dans la suite du manuscript.

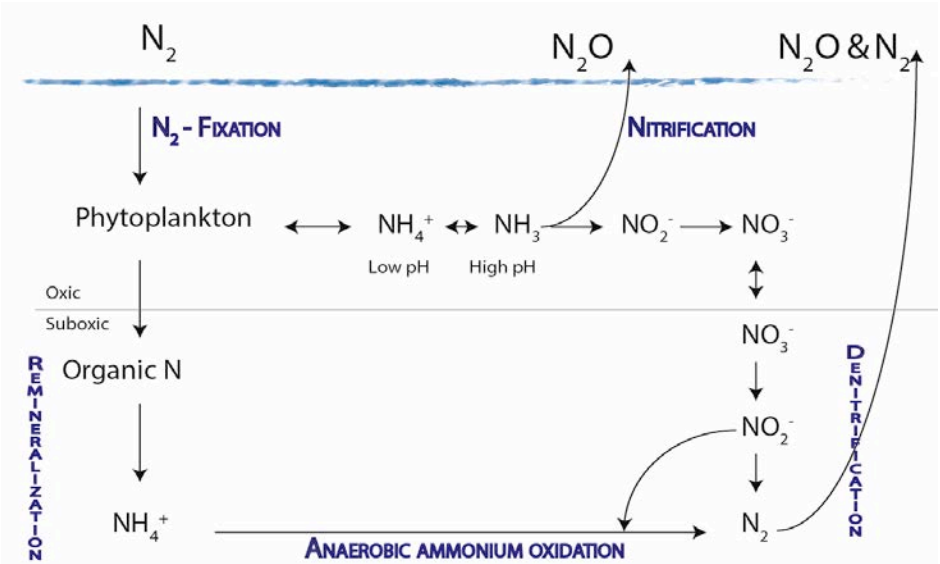


Figure 12 Cycle de l'azote en milieu océanique (Modifié d'après Francis et al. (2007))

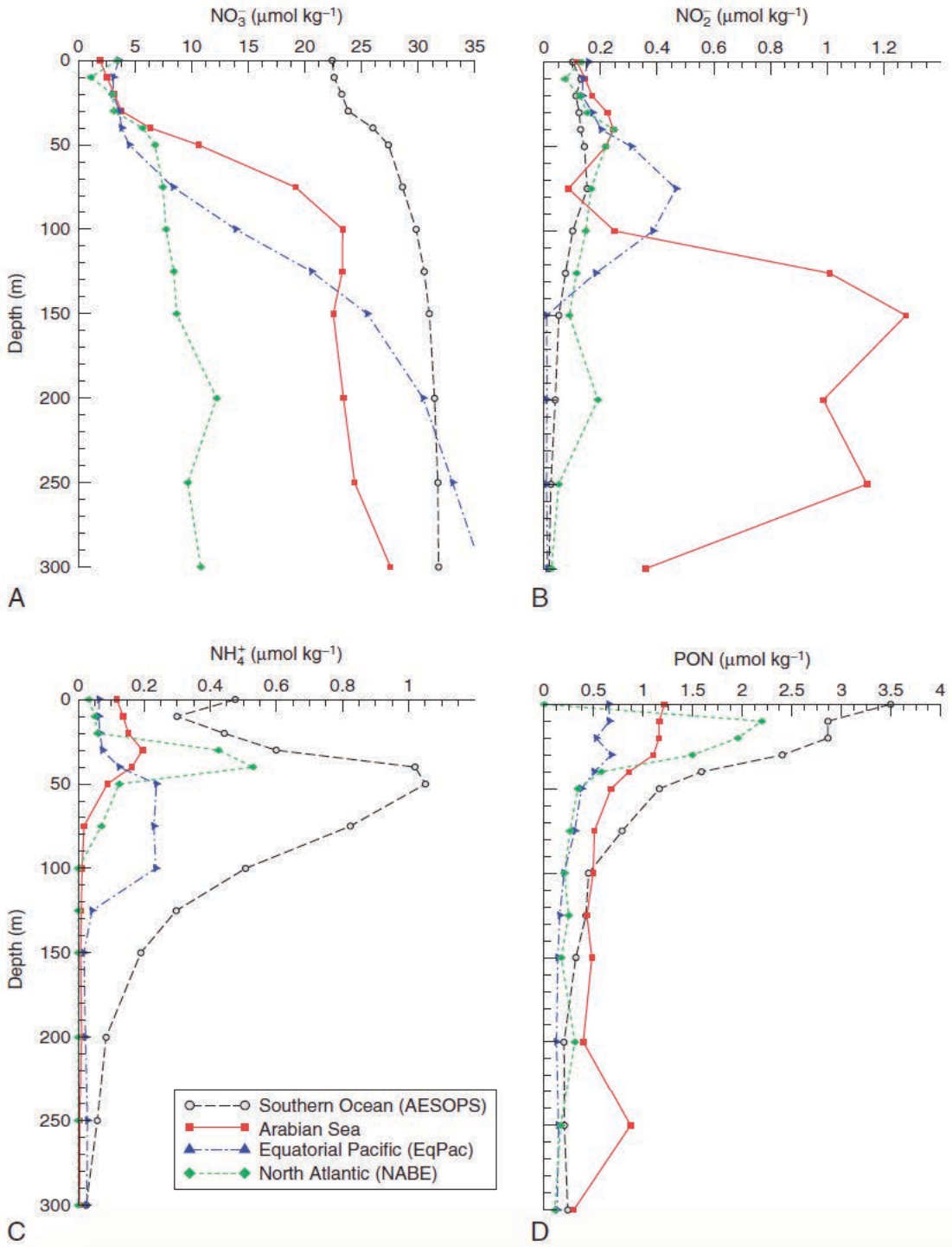


Figure 13. Moyennes des concentrations en fonction de la profondeur des A) NO_3^-, B) NO_2^-, C) NH_4^+, D) PON (NOP) à partir de quatre stations de mesure (Southern Ocean in 96-98; Arabian Sea 95; Equatorial Pacific en 92 et Ocean nord atlantic en 89). Les données ont été obtenues via usjgofs.whoi.edu. Source : Capone et al. (2008).

Processus	Description
La fixation d'azote	*La fixation de l'azote* au sein du récif s'effectue grâce aux microorganismes, appelé diazotrophes, ayant la capacité de réduire l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_4) via le complexe enzymatique de nitrogénase (Larkum et al. 1988).
La nitrification	*La Nitrification* est un processus s'opérant en deux étapes: l'oxydation de l'ammonium en nitrite et du nitrite en nitrate par différentes bactéries chemioautotrophes. Elle a lieu en général dans des environnements riches en oxygène (aérobique) (Webb and Wiebe 1975).
La réduction du nitrate et la dénitrification	*La réduction du nitrate et la dénitrification* se présentent sous la forme de deux voies, généralement contrôlées par des bactéries anaérobiques, obligatoires ou facultatives, qui utilisent le NO_3^- en tant qu'accepteur final d'électron lors de la respiration. Une des deux voies mène à la production d'ammonium, via les nitrate et nitrite réductases (D'Elia and Wiebe 1990), et la seconde, la dénitrification, au N_2O et/ou du N_2, qui sera/seront par la suite relargué(s) dans le milieu.
L'ammonification et la régénération de l'ammonium	La production d'ammonium à partir de matière organique se réfère à la voie d'ammonification. L'ammonium est soit excrété par les organismes tels que les poissons, echinodermes, zooplancton, organismes filtreurs, soit reminéralisé suite à la dégradation de matière organique par les détritivores et les bactéries (D'Elia and Wiebe 1990; D'Elia 1988). Les excréments de poissons de récifs contiennent en effet des concentrations très fortes en azote et plus particulièrement en ammonium (N :P=48), favorisant ainsi la croissance des coraux (Crossland and Barnes 1974; Meyer and Schultz 1985; Shantz et al. 2015). Quant à la régénération de l'azote organique, elle peut avoir lieu dans différents compartiments de l'écosystème, aussi bien au sein de la symbiose corallienne que dans les sédiments.
L'oxydation anaérobie de l'ammonium (Annamox)	L'oxydation anaérobie de l'ammonium est une voie métabolique microbienne opérée par des bactéries provenant de l'embranchement : des planctomycètes. Durant ce processus, le cation NH_4^+ est oxydé par l'anion nitrite NO_2^- pour former du diazote, N_2. Ce processus fournit entre 30-50% de l'azote total compris dans l'océan (Devol 2003) et joue un rôle majeur dans la limitation de la productivité primaire.

Table 2. Processus régissant le cycle de l'azote en milieu océanique

L'absorption et l'assimilation de l'azote inorganique dissous par la symbiose

Les animaux ne peuvent, en général, pas assimiler l'azote inorganique mais l'excrètent sous forme de déchets métaboliques dans leur environnement (Muscatine et al. 1979). La symbiose corail-dinoflagellé représente une exception à cette règle (Miller and Yellowlees 1989). En effet, les coraux, via la présence des symbiotes, sont capables d'assimiler l'azote inorganique, sous forme d'ammonium et de nitrate (Bythell 1990; Crossland and Barnes 1977; Grover et al. 2003; Grover et al. 2008; Grover et al. 2002; Miller and Yellowlees 1989; Pernice et al. 2012; Yellowlees et al. 2008) et organique (Grover et al. 2006). Comme explicité plus haut, les Cnidaires ont développé une endosymbiose intracellulaire. Chaque symbiote est indépendamment isolé du cytoplasme animal par une vésicule connue sous le nom de membrane périalgale, délimitant l'espace périalgal. Cet agencement présente de nombreuses implications pour le transport des métabolites entre l'hôte et ses symbiotes.

En ce qui concerne l'ammonium, une fois assimilé, il est incorporé dans la synthèse de glutamate qui va ensuite être utilisé pour la production des acides aminés non essentiels par le jeu des transaminases. L'hôte et les symbiotes sont à même d'assimiler l'ammonium puisqu'ils possèdent tous les deux les enzymes glutamine synthétase (GS) et glutamate déhydrogénase (GDH) (Figure 14) (Rahav et al. 1989). L'ammonium est assimilé par les symbiotes par un transport actif, via la voie glutamine synthétase/glutamine:2-oxoglutarate aminotransferase (GS/GOGAT) (Yellowlees et al. 1994). L'enzyme GOGAT, présente uniquement chez les symbiotes, est requise pour la régénération du glutamate, afin que la GS procède à l'assimilation de l'ammonium (Miller and Yellowlees 1989; Yellowlees et al. 2008). Étant donné que l'hôte animal et ses symbiotes sont à même d'assimiler l'ammonium, reste à savoir où se trouve le principal site d'assimilation ? Deux hypothèses ont été émises : D'Elia et al. (1983) ont proposé l'hypothèse de la « déplétion-diffusion » où le symbiote serait majoritairement responsable de l'assimilation du NH_4^+ via la création d'un gradient de concentration entre l'environnement marin, l'hôte animal et le symbiote lui-même.
Dans la même lignée, des travaux ont également montré une influence positive de la lumière sur l'assimilation d'ammonium par l'holobionte corallien ainsi que la sécrétion d'ammonium pour les cnidaires aposymbiotiques (Muscatine and D'elia 1978), soutenant l'hypothèse de D'Elia et al (1983).

Cependant, Wang and Douglas (1998) ont montré que des coraux maintenus à l'obscurité, et recevant une source de carbone organique (α-cétoglutarate) présentaient des taux d'assimilation d'ammonium similaires aux coraux maintenus en conditions éclairées. Ce résultat suppose que l'assimilation d'ammonium par l'hôte n'est pas négligeable et qu'elle requière un apport constant de carbone, via la photosynthèse à la lumière, ou via l'ajout de carbone organique, à l'obscurité.

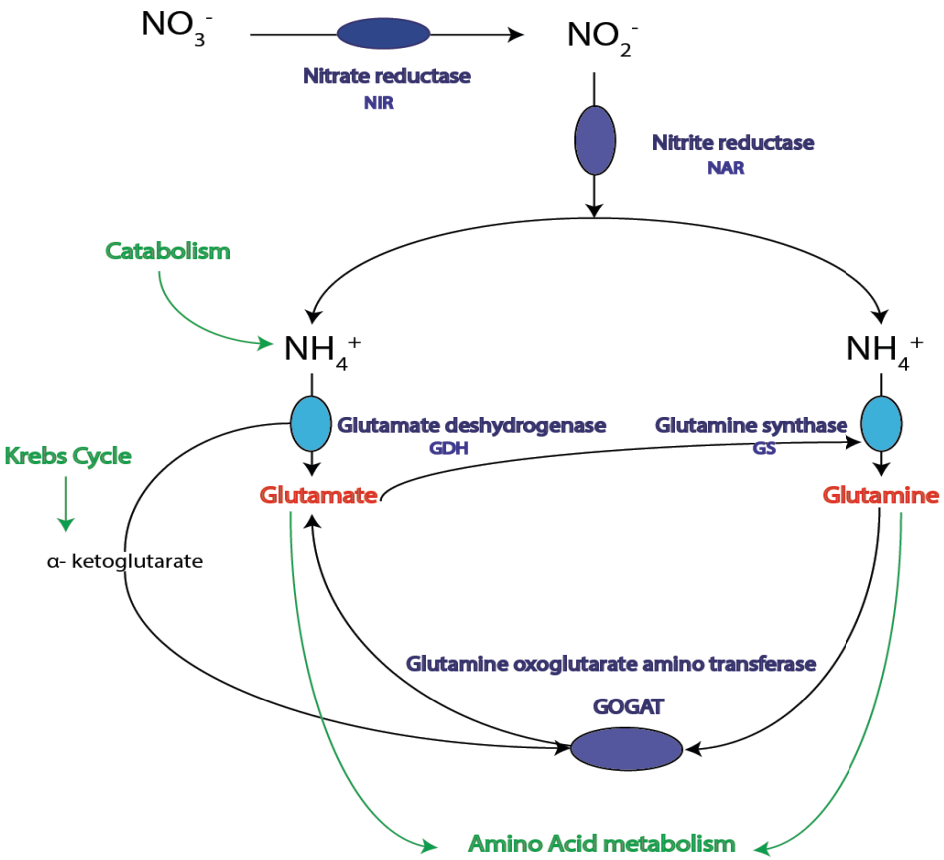


Figure 14. Schéma simplifié représentant les différents processus d'absorption d'azote chez les coraux Scléractiniaires. D'après Godinot et al. (2012)

Néanmoins, des travaux récents, réalisés au moyen d'enrichissements isotopiques de l'azote, ont montré que le principal site d'assimilation de l'ammonium se situe dans la fraction algale, et ceci, dès la première heure d'expérimentation (Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Pernice et al. 2012). Le transfert d'ammonium s'opère par la suite des symbiotes vers l'hôte en moins de 6 heures (Kopp et al. 2013). De plus, les taux d'assimilation semblent varier d'une espèce de corail à l'autre et en fonction des conditions environnementales (Kopp et al. 2013).

En ce qui concerne l'assimilation du nitrate par le corail, elle s'opère exclusivement via les symbiotes, par le biais de deux enzymes, la nitrate et la nitrite réductase (Figure 14)(Crossland and Barnes 1977; Grover et al. 2003; Leggat et al. 2007; Miller and Yellowlees 1989). Le nitrate est converti en nitrite via l'enzyme nitrate réductase, dont les séquences d'ADNc sont présentes chez *Symbiodinium* (Leggat et al. 2007). Le nitrite est ensuite réduit en ammonium via la nitrite réductase. Ces enzymes n'ont jamais été identifiées chez les animaux mais uniquement chez les plantes (Crossland and Barnes 1977). Chez le phytoplancton, mais également chez les coraux, l'induction de la nitrate réductase s'opère après quelques heures en présence de nitrate (Vergara et al. 1998) et lorsque les concentrations en ammonium dans l'eau sont très faibles (Grover et al. 2003; Guerrero et al. 1981; Vergara et al. 1998). Bien que le nitrate soit disponible en plus grande concentration dans le milieu récifal, ses taux d'absorption sont cependant plus faibles que ceux de l'ammonium (Grover et al. 2008; Grover et al. 2002). Une des causes possibles serait d'ordre énergétique. Les processus d'absorption et d'assimilation de l'ammonium requièrent moins d'énergie que ceux du nitrate, du fait du coût énergétique élevé requis pour sa réduction préalable en ammonium (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013; Song and Ward 2004).

Plusieurs facteurs biotiques ou abiotiques influent sur les taux d'absorption d'azote. Ainsi, il existe une corrélation positive entre le taux d'absorption et la concentration en azote dans l'eau de mer (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Wilkerson and Trench 1986) chez les espèces *Pocillopora damicornis*, *Porites meandrina* et *Stylophora pistillata*. Les taux d'absorption d'ammonium chez *S. pistillata* varient de 2 à 30 ng N cm^{-2} h^{-1} pour des concentrations en NH_4^+ < 0,5 µM, et de 120 à 519 ng N h^{-1} cm^{-2} pour des concentrations entre 1 à 5 µM (Grover et al. 2002). Pour le nitrate, elles varient entre 1,2 et 6,1 ng N h^{-1} cm^{-2} pour des concentrations comprises entre 0.3 et 3 µM (Grover et al. 2003). L'intensité luminieuse, étroitement liée à l'activité photosynthétique des symbiotes, semblent également modifier l'absorption d'ammonium et/ou de nitrate chez les cnidaires (Grover et al. 2002; Muscatine and D'elia 1978; Wilkerson and Trench 1986) tout comme chez le phytoplancton et les plantes en général (Lillo 2008; MacIsaac and Dugdale 1972; Maguer et al. 2015). De même, le status nutritionnel de l'animal joue un rôle majeur, puisqu'un animal préalablement nourri avec du zooplancton diminue son taux absorption d'azote, plus particulièrement d'ammonium (Grover et al. 2002).

Récemment, une étude a mis en évidence une diminution significative des taux d'absorption d'azote (ammonium et nitrate) lors d'un stress thermique chez l'espèce *S. pistillata* (Godinot et al. 2011c). Inversement, la diminution du pH de l'eau de mer n'a présenté aucun effet significatif excepté lorsque ce facteur agissait en synergie avec la température (Godinot et al. 2011c).

Le devenir de l'azote

Chez les symbioses algues-invertébrés, comme chez les anémones de mer, la plus grande fraction de l'ammonium absorbée par les dinoflagellés est assimilée sous forme de trois acides aminés : la glutamine, le glutamate et l'aspartate (Roberts et al. 1999), qui peuvent être ensuite utilisés dans la synthèse de molécules organiques et/ou transférés à l'hôte animal (Falkowski et al. 1993; Muscatine and Porter 1977; Swanson and Hoegh-Guldberg 1998; Wang and Douglas 1999). L'azote, se voit donc être un élément indispensable au développement de l'association corail-dinoflagellé. En présence d'ammonium ou de nitrate, la densité de symbiotes, les concentrations en protéines et chlorophylle augmentent (Bythell 1990; Falkowski et al. 1993; Ferrier-Pagès et al. 2001; Muscatine et al. 1989; Snidvongs and Kinzie III 1994; Stimson and Kinzie 1991), suggérant que la croissance et la biomasse du corail seraient limitées par la concentration en N dans le milieu. Cependant, les expériences portant sur l'effet des enrichissements en azote sur la symbiose présentent des résultats très contreversés, ceci pour diverses raisons, qui seront discutées dans la suite du manuscrit.

2.1.2 Le phosphore : Disponibilité en milieu récifal et absorption par les coraux

L'élément phosphore (P)[1] se retrouve en très faible concentration dans la lithosphère et son cycle biogéochimique, unique, ne présente aucune composante atmosphérique. **Les principales sources naturelles de P** proviennent de la croute terrestre, dont certains minéraux primaires tels que l'apatite. Le phosphore est transporté en milieu marin de plusieurs manières : L'érosion éolienne ou hydrique des sols (apatite-fluoroapatite), le lessivage des terres cultivées (forme adsorbée, minérale, organique et engrais), les effluents urbains (urines, selles et détergents) ainsi que par d'autres phénomènes, comme le volcanisme sous-marin et les remontées de minéraux via les sources hydrothermales.

[1] Dans le cadre de ce travail, afin de simplifier la lecture, nous utiliserons les termes « phosphore » : se rapportant à l'atome lui-même ainsi que toutes le molécules contenant cet atome. Le « phosphate », quant à lui, désignera les ions orthophosphates.

Comme l'azote, **le phosphore apparaît sous diverses formes dans les écosystèmes récifaux**, en ions orthophosphates (PO_4^{3-} ; HPO_4^{2-} ; $H_2PO_4^-$; H_3PO_4, selon le pH) et phosphates condensés, appelés pyro-, méta- ou polyphosphates selon leur structure pour les formes inorganiques ou sous l'aspect d'esters de phosphates et de phosphonates, pour les formes organiques. Ces différentes formes sont divisées en deux phases, **particulaire ou dissoute**. La phase particulaire regroupe toutes les grosses molécules vivantes ou détritiques (planctons, bactéries, déchets métaboliques) et la phase dissoute, toutes les particules phosphorées solubles dans la colonne d'eau. Les espèces coralliennes peuvent absorber certaines de ces formes, le phosphore inorganique dissous (PID), et organique dissous (POD) ainsi que le phosphore organique particulaire (POP) (Björkman and Karl 1994). **Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons particulièrement au PID, la forme caractérisée par un très faible coût métabolique et de ce fait, la plus utilisée par les organismes benthiques (Björkman and Karl 1994).**

Au sein des récifs, comme mentionné plus haut, la plus forte productivité étant celle des organismes benthiques, c'est donc à ce niveau que l'on retrouvera les concentrations les plus importantes de phosphore (D'Elia and Wiebe 1990). Cependant, le phosphore présent dans la colonne d'eau sera la forme préférée par les coraux afin de satisfaire leurs besoins métaboliques. Les concentrations de POD sont de l'ordre de 0.1 µM (Charpy 2001; Furnas and Mitchell 1988) et varient entre 0.05 et 0.5 µM pour le PID (Atkinson 1987; Kinsey and Davies 1979a).

Certains récifs peuvent pourtant présenter des concentrations de P supérieures à la moyenne, comme dans les zonnes équatoriales soumises à de forts épisodes d'upwelling, près des Galapagos 0.6 µM ou alors dans le détroit d'Hormuz (0.43 µM) (Kleypas et al. 1999) et jusqu'à 2 µM dans le golf de Panama (Szmant 1997).

Le cycle du phosphore en milieu marin fait intervenir plusieurs composantes et de nombreuses formes de phosphore, le rendant ainsi très complexe (Baturin 2003). Il est caractérisé à la fois par des processus chimiques et biologiques. En effet, c'est par l'altération et l'érosion superficielles des roches ignées (roches magmatiques) que le phosphore a été transporté jusqu'aux océans où il est directement réintégré dans les sédiments sous forme de déchets organiques (organismes morts), ou de particules avant de reformer des roches sédimentaires phosphatées (Smil 2000). Cependant, en milieu récifal, et principalement dans la zone photique, une fraction du phosphore (PID et POD) est assimilée (recyclée) par les organismes benthiques et notamment le plancton sous forme de biomasse.

À ce jour, il n'existe aucune représentation complète du cycle du phosphore en milieu récifal, hormis la description théorique établie par Claire Godinot (2012). **Dans le cadre de ce travail, nous nous attarderons principalement sur l'étude de l'absorption du phosphore inorganique dissous (PID) par la symbiose, comme processus conjoint à l'absorption de l'azote.**

L'absorption du PID, chez les coraux, s'opère via un transport actif chez les symbiotes (Jackson and Yellowlees 1990; Muller-Parker et al. 1990; Todd et al. 2006) mais également chez l'hôte corallien, grâce à un cotransporteur de type sodium/phosphate chez *S. pistillata* (Godinot 2012). Les facteurs abiotiques, tels que la lumière et la température, ont des effets positifs sur l'absorption et l'assimilation de phosphore au sein de la symbiose (D'Elia 1977; Godinot 2012; Jackson and Yellowlees 1990; Sorokin 1992). De plus, l'absorption de P est liée au status nutritionnel de l'hôte, cette dernière diminuant lorsque l'animal est nourri (Godinot 2012). Selon Godinot et al. (2011c), l'absorption du PID augmente lors des périodes de stress thermique. L'acidification de l'eau de mer, quant à elle, n'aurait pas d'effet sur les taux d'acquisition du phosphore (Godinot et al. 2011c).

2.2 Disponibilité en sels nutritifs – effet sur la symbiose corallienne

Alors que les sels nutritifs semblent indispensables au développement des coraux, très peu d'études se sont intéressées à l'importance de la disponibilité en sels nutritifs sur les performances physiologiques du corail. Ainsi, on ne connaît pas les seuils de concentrations pour lesquels on observerait une limitation ou un effet néfaste sur la physiologie corallienne.

2.2.1 La limitation en sels nutritifs

La théorie de la limitation fut formulée sous le nom de « Loi du minimum » par Justus von Liebig dans les années 1850. Ce chercheur a mis en lumière l'importance majeure des sels minéraux présents dans le sol pour la croissance des plantes. Enoncée dans sa théorie de l'alimentation minérale des plantes (von 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 ». Généralisée par la suite, la loi établit que si l'un des nutriments venait à manquer alors tous les autres présents seraient inutiles, en terme de rendement de croissance. Ainsi, on qualifie de limitant un nutriment dont l'abscence ou la faible concentration dans le milieu empêche la croissance optimale d'un organisme, et cela même en présence d'une forte concentration d'un autre élément nutritionnel.

Les études menées à l'échelle d'un récif suggèrent que la croissance des organismes benthiques et phototrophes pélagiques est limitée par l'azote et/ou le phosphore (Furnas et al. 2005; Lapointe 1997; Tyrrell 1999), car les eaux environnantes sont très oligotrophes. Les récifs peuvent cependant maintenir une très forte productivité primaire grace à plusieurs processus :

1) des échanges importants d'eau et de nutriments entre l'océan environnant et les récifs. Ainsi, même si les concentrations en sels nutritifs sont faibles, les quantités totales transportées par les courants sont importantes ;

2) un recyclage des nutriments très élevé au sein même du récif (D'Elia and Wiebe 1990; Odum and Odum 1955).

Déterminer les seuils de concentrations d'azote et de phosphore pour lesquels la croissance des coraux scléractiniaires devient limitante est d'une importance considérable afin de prédire leur développement dans un milieu donné et leur résistance à d'autres stress environnementaux liés aux changements globaux.

2.2.2 L'eutrophisation : concentrations anormalement élevées en sels nutritifs

Effets à l'échelle de l'écosystème récifal

Au cours des dernières décennies, l'augmentation de la concentration en sels nutritifs dans l'eau de mer, résultant des activités anthropiques, e.g. urbaines, agricoles et industrielles, a souvent été associée au déclin des écosystèmes récifaux côtiers et notamment au phénomène de blanchissement.

L'usage excessif de fertilisants, les défrichements de terres agricoles, les exutoires d'eaux usées influencent le rejet, via le ruissellement, de quantités sans précédent d'azote et de phosphore dans l'écosystème marin. Les concentrations mesurées diffèrent en fonction des sources de pollution. Par exemple, les régions soumises à d'intenses activités agricoles ou urbaines présentent très souvent des concentration élevées en azote (Carpenter et al. 1998; Howarth et al. 1996).

En revanche, les eaux usées municipales et industrielles ainsi que le ruissellement provenant de zones à haute activité bovine relarguent d'importantes quantités de phosphore au sein des écosystèmes côtiers (Conley et al. 2009).

Les activités humaines induisent ainsi de profonds changements dans les cycles biogéochimiques (N, P) et dans la stœchiométrie associée aux éléments clés de l'écosystème (Sterner and Elser 2002). Par exemple, Devlin & Brodie (2005) ont observé un apport de sels nutritifs 400 fois supérieur sur la Grande Barrière de corail à la suite d'importantes précipitations. Selon la théorie du « bottom-up process », le type de producteurs primaires, ainsi que la teneur en sels nutritifs de l'eau, contrôlent la structure de l'écosystème (Littler et al. 2006). Une des conséquences principales des enrichissements en sels nutritifs, observée à l'échelle du récif, est l'augmentation de la productivité primaire et de la biomasse algale benthique (Lapointe et al. 2004; Pomeroy 1974; Smith and Schindler 2009). En plus des macroalgues, de nombreuses espèces d'algues filamenteuses, appartenant aux Chlorophytes, Rhodophytes, Phaeophytes et Cyanobactéries peuvent ainsi, en conditions eutrophisées, devenir les composants majeurs des récifs (Vermeij et al. 2010). L'eutrophisation des eaux, actant en synergie avec d'autres facteurs (température; pression de la pêche), peut également induire une propagation de maladies des coraux (Ruiz-Moreno et al. 2012; Vega Thurber et al. 2014; Zaneveld et al. 2016), selon le schéma décrit en Figure 15.

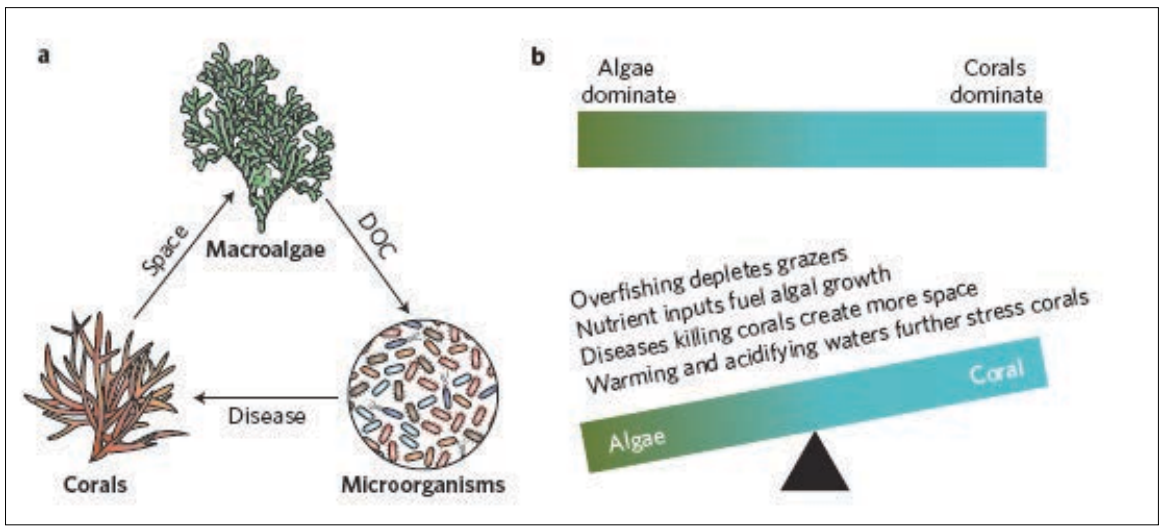


Figure 15. Schéma simplifié décrivant les changements s'opérant au sein de l'écosystème récifal, d'un régime dominé par les coraux vers une domination des macroalgues. a) L'hypothèse de la DDAM (Dissolved organic carbon-Disease-Algae-and-Microbes), b) Le changement de régime induit par différents facteurs biotiques et abiotiques. Source : Garren (2016).

En effet, en favorisant la croissance des algues, les sels nutritifs augmentent l'excrétion de carbone organique dissout algal (DOC), qui sert de substrat principal pour le développement de bactéries pathogènes pour les coraux. Les maladies affectant les coraux, et entrainant leur mortalité, libèrent plus d'espace pour les algues.

La prolifération des macroalgues induit ainsi des compétitions pour le substrat, les sources nutritionnelles et/ou la lumière (Burkepile et al. 2013; Costa Jr et al. 2000; Fabricius 2005; Garren 2016), accélérant la perte de biodiversité et les modifications de la composition des communautés coralliennes (Vitousek et al. 1997). Les algues benthiques profitent de ces conditions eutrophisées lorsque les herbivores, qui les consomment, sont peu abondants (Burkepile and Hay 2006). L'effet d'un enrichissement en sels nutritifs sera donc différent selon l'abondance des herbivores (Burkepile and Hay 2006).

Les modifications des communautés benthiques, en défaveur des coraux, sont observées dans les récifs du monde entier, que ce soient ceux des Caraïbes (Mumby 2009), de la Grande Barrière de corail en Australie (Cheal et al. 2010), de Nouvelle-Calédonie (Vieira et al. 2015), des Iles de la Ligne (Line Islands) (Barott et al. 2012), mais également en mer Rouge (Haas et al. 2010). De forts épisodes d'upwelling dans le Golfe d'Eilat ont produit des blooms importants de phytoplancton, favorisant la croissance excessive d'algues filamenteuses et induisant des mortalités massives de colonies coralliennes (Genin et al. 1995). Suite à ces observations, des efforts considérables ont été déployés afin de mettre en évidence les effets négatifs de l'eutrophisation, et notamment d'un enrichissement en sels nutritifs (azote et phosphore) sur la physiologie du corail, in situ (voir Table 3).

L'effet direct des sels nutritifs sur la physiologie corallienne est cependant encore très peu compris, les nombreuses études réalisées à ce sujet présentant des résultats incertains et/ou contradictoires. Une des causes de la présente controverse est la capacité qu'ont certaines espèces de corail à se développer dans des zones eutrophisées (Kleypas et al. 1999; Szmant 2002). En effet, l'augmentation de la productivité primaire planctonique dans des eaux chargées en sels nutritifs pourrait être un avantage pour les coraux, qui ont ainsi à disposition une quantité plus importante de nourriture (Bongiorni et al. 2003; Borell and Bischof 2008; Fabricius 2005; Ferrier-Pages et al. 2003; Sawall et al. 2011). De plus, la présence de sels nutritifs favorise également la croissance des symbiotes coralliens, et leur contenu en chlorophylle, ce qui peut augmenter les taux de photosynthèse, de respiration et de calcifcation, tout comme la biomasse du corail (Sawall et al. 2011).

Cette étude, parmi d'autres, confirme que certaines espèces de coraux développent une plasticité trophique ainsi qu'une capacité de photoacclimatation plus importantes que d'autres, leur permettant ainsi de se développer dans des environnements très variés (Ferrier-Pages et al. 2003; Kleypas et al. 1999; Lirman and Fong 2007; Sawall et al. 2011).

Pour la plus vaste majorité des espèces de coraux, les pollutions marines ainsi que la dégradation de la qualité des eaux côtières a d'ores et déjà causé des pertes importantes en terme de biodiversité. La croissance démographique incessante alliée au développement côtier, ne feront qu'amplifier et aggraver ces phénomènes. Par conséquent, une meilleure compréhension des effets de l'eutrophisation sur les milieux récifaux, et particulièrement sur la physiologie corallienne, est nécessaire et cruciale afin d'optimiser les techniques de gestion et de conservation de ces écosystèmes.

L'enrichissement en sels nutritifs : effets sur la physiologie du corail

Nutritionnellement, les coraux scléractiniaires dépendent principalement de leur association avec les dinoflagellés symbiotiques contenus dans leurs tissus (Muscatine 1990). Le statut nutritionnel des symbiotes est déterminant puisqu'il influence directement le rendement photosynthétique et donc le métabolisme de l'animal (Dubinsky and Jokiel 1994). Alors que certaines études ne montrent aucun effet d'un enrichissement en sels nutritifs sur la densité algale ou le taux de photosynthèse (Fabricius et al. 2005; Ferrier-Pagès et al. 2001; Nordemar et al. 2003), d'autres travaux montrent une augmentation des concentrations en symbiotes et/ou pigments chlorophylliens, protéines et taux de photosynthèse (Marubini and Davies 1996; Muscatine et al. 1989; Snidvongs and Kinzie III 1994; Stambler et al. 1991; Steven and Broadbent 1997). De nombreuses études présentent également des résultats controversés sur les taux de croissance et de densité du squelette corallien (Voir Table 3). Par exemple, Dunn et al. (2012) montre qu'un enrichissement en phosphate de 0.5 mg/L influence positivement le taux de croissance chez *Acropora muricata* alors qu'il décroit significativement la densité de son squelette, le rendant plus poreux et donc plus sensible aux perturbations et aux phénomènes météorologiques extrêmes. Par contre, Godinot et al. (2012) montre une augmentation de la calcification de *S. pistillata* sous 0,5 µM de phosphate, et une diminution significative des endolithes du squelette, qui sont responsables en partie de la diminution de porosité.

L'enrichissement en sels nutritifs semble aussi avoir des effets négatifs sur le taux de recrutement et la survie des larves de corail (Koop et al. 2001), réduisant ainsi la fertilisation, la taille des œufs et la croissance (Richmond and Hunter 1990), mais peu d'études récentes ont été réalisées à ce sujet.

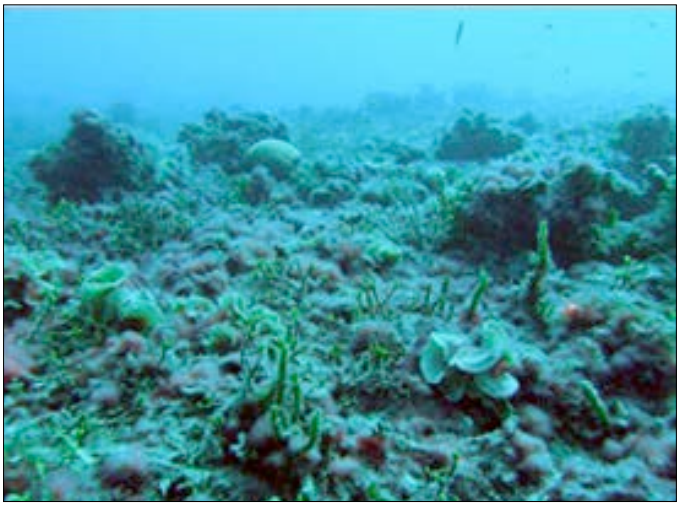


Figure 16. Exemple de milieu récifal dominé par les macroalgues. Source : J.E.Smith (Scripps).

Une récente méta-analyse réalisée par Shantz & Burkepile (2014) suggère, sans le tester, que l'effet d'un excès en sels nutritifs dans l'eau de mer sur la physiologie corallienne dépendrait à la fois de l'espèce de corail étudiée, de la source d'azote présente dans le milieu (ammonium ou nitrate), de la provenance de l'enrichissement (excrétion de poisson vs. source anthropique) ainsi que de la présence ou de l'absence de phosphore. Les résultats de leur analyse suggèrent qu'une modification de la concentration en éléments inorganiques dans le milieu affecterait directement la dynamique de l'association corail-dinoflagellé et modifierait également la susceptibilité de la symbiose aux facteurs de stress abiotiques, associés principalement aux changements climatiques.

De plus, Wiedenmann et al. (2013) ont observé un lien étroit entre le ratio N:P décrivant l'environnement récifal et la susceptibilité des espèces coralliennes au blanchissement. En effet, ces auteurs suggèrent qu'un ratio N:P déséquilibré caractérisé par une forte concentration en azote et une déplétion en phosphore ou une limitation en azote et phosphore favoriserait la rupture de l'association symbiotique.

2.2.3 Les effets combinés d'une eutrophisation des eaux combinée aux changements climatiques (augmentation de température et de pCO2).

L'augmentation de la température de surface de l'eau de mer et l'eutrophisation des eaux représentent, de nos jours, les deux facteurs les plus sérieux menaçant les récifs coralliens (Fabricius et al. 2013). Le stress thermique affecte considérablement les organismes, certains ayant déjà atteint la limite de leur capacité à survivre (Visser 2008). Pour les coraux symbiotiques, les périodes de fortes chaleurs peuvent induire des dysfonctionnements au niveau de l'appareil photosynthétique des symbiotes et sur le long terme, un événement de blanchissement (Brown 1997). Alors que les dinoflagellés symbiotiques subviennent à plus de 75% des besoins métaboliques de leur hôte, la perte de leur principale source nutritionnelle serait la cause d'importantes mortalités (Glynn 2012). De même, comme mentionné plus haut, l'enrichissement en sels nutritifs résultant des rejets anthropiques est souvent associé à la dégradation des récifs. Par conséquent, des colonies coralliennes se développant dans des milieux riches en éléments inorganiques et étant soumises à des périodes de fortes hausses des températures pourraient être particulièrement menacées. Cependant, les effets de l'action combinée de l'enrichissement en sels nutritifs et d'un stress thermique sur la physiologie corallienne sont encore trop peu compris (Fabricius et al. 2013).

Une étude récente en laboratoire montre un effet bénéfique d'un enrichissement modéré en azote sur le maintien du métabolisme et notammment des pigments chlorophylliens coralliens lors d'une période de stress de température (Béraud et al. 2013).

A contrario, Wiedenmann et al. (2013) montre qu'un enrichissement en azote couplé à une faible concentration de phosphate dans l'eau augmenteraient la susceptibilité des coraux au blanchissement lors d'un stress de température ou de lumière. Wiedenmann et al. (2013) suggèrent alors qu'un déséquilibre dans le rapport N :P du milieu induirait un dysfonctionnement dans le métabolisme animal, et dans le cas présent, une limitation en phosphore de la symbiose, menant au blanchissement de l'organisme corallien.

Etudes	Contexte	Nature des sels nutritifs	Concentrations (µM)	Observations
Kinsey & Davis (1979a)	in situ	NH_4 (urée) et PO_4	N:P=20 :2	Baisse du taux de calcification de 50% attribuée au P (poison)
Meyer et al. (1983)	In situ	NH_4 et PO_4	N:P=4 :0.2	Augmentation de 37% de la croissance tissulaire sous enrichissement combiné N,P
Meyer and Schultz (1985)	In situ	NH_4 et PO_4	N:P=1 :0.06	Augmentation de la croissance
Tomascik & Sander (1985)	In situ	NH_4, PO_4 et NO_3	NH_4=3, NO_3=4.5, P=2 N:P=7.5 :2	Baisse du taux de photosynthèse et de la croissance (50-90%)
Muscatine et al. (1989)	Exp.	NH_4 et PO_4	N:P =20 :2	Pas d'effet du P Augmentation de la densité de symbiotes avec N,P et des protéines.
Stambler et al. (1991)	In situ	NH_4 et PO_4	N=2-15 P=2.5	Baisse de la croissance de 90% attribuée au N. Augmentation de la concentration en chlorophylle et en symbiotes.
Snidvongs & Kinzie (1994)	Exp.	NH_4 et PO_4	N:P=15 :1.2	Augmentation de la concentration en chlorophylle
Atkinson et al. (1995)	Exp.	NH_4 et NO_3 et PO_4	NH_4=2, NO_3=5, PO_4=0.6	Augmentation de la croissance

Marubini & Davis (1996)	In situ	NO_3	N:1-20	Augmentation de la concentration en symbiotes, chlorophylle et protéine mais une baisse dans le taux de squeletogenèse (Squelette fragilisé)
Steven & Broadbent (1997)	In situ	NH_4 et PO_4	N:P=20 :2	N+P : Augmentation la concentration en chlorophylle N+P et P : Augmentation de la conc. en symbiotes et de la croissance N : baisse de la croissance (10-20%) mais augmentation de la concentration en chlorophyll.
Ferrier-Pagès et al. (2000)	Exp.	NH_4 et PO_4	NH_4=9 -20 PO_4=0.2 à 2.8	N=20uM ou P=2uM : Baisse de la croissance de 60% N, P : baisse de 75% de la croissance Enrichissements en N ou NP permettent une meilleure résilience des coraux alors que le P ne change rien.
Ferrier-Pagès et al. (2001)	Seawater	NaNO3	N:2uM	L'enrichissement n'a pas changé la concentration en symbiotes et les taux de photosynthèse. Baisse de la calcification (23%)
Koop et al. (2001) ENCORE Project	In situ	NH_4 et PO_4	N:P=36 :5.1	N, P and NP : baisse de la calcification chez *P.damicornis* N : baisse de la calcification chez *A. palifera* P :augmentation de la calcification chez *A.palifera* et *A.longicyathus* mais une baisse de la densité du squelette. Baisse de la calcification chez *S.pistillata* et *P.damicornis*
Harrison & Ward (2001)	Exp. In situ	NH_4 et PO_4	N:P = 0.65 : 0.2 1.65 :1.02 10.65 :10.02 100.65 :100.02 10 :2	Taux de survie à 90% Baisse de la fertilité de 68% Baisse de la fertilité à 70% Baisse de la fertilité à 74% Pas d'effets majeurs, mais lorsque présents, négatifs.
Bassim & Sammarco (2003)	Exp.	NH_4	N=20	Effets combinés de la température et de l'ammonium sur des larves de coraux azooxanthellées. Effets néfastes des deux facteurs, et exhacerbés lorsque combinés.

Bruno et al.(2003)	In situ exp.	NH_4, NO_3, PO_4	NH_4=1-11 NO_3=1-6-4 PO_4=0.9-4.6	Lorsque l'azote et le phosphore augmentent dans le milieu, le taux de developpement des yellow band diseases augmente aussi
Bongiorni et al. (2003)	In situ	NH_4 (ferme à poissons) and PO_4	N:P=2.35 :0.12 Pour les conditions enrichies	Augmentation 3x plus importante du poids et de l'extension linéaire pour les coraux maintenus dans la ferme à poissons. Augmentation de la taille des oocytes en conditions enrichies et baisse de la concentration en lipides.
Nordemar et al. (2003)	Exp.	NO_3	N=15	L'enrichissement réduit le taux de production primaire L'augmentation de la température couplée à l'enrichissement en nitrate décroit le taux de production primaire.
Loya et al. (2004)	In situ	NH_4 et NO_3, NO_2, PO_4 Enrichis à la ferme à poisson.	NO_2=0.095 vs. 0.075 µM NO_3=0.385 vs. 0.284 µM, PO_4=0.123 vs. 0.045 µM et NH_4=1.016 vs. 0.057 µM	*S. pistillata*. Augmentation du nombre d'oocytes par polypes chez coraux enrichis. Moins de planulae par polype durant la période de reproduction chez les coraux enrichis.Taille des oocytes et le nombre d'oocytes arrivant à maturation avant la phase de fécondation étaient plus élevés en milieu préservé.
Schloeder & D'Croz (2004)	Exp.	NO_3	N=20	Effets de l'enrichissement dépendent de la morphologie du corail. *P. damicornis* beaucoup plus affecté par le nitrate (30% survie après 30 jours) que *P. lobata* (90% de survie). Augmentation de la quantité de symbiotes et de chlorophylle sous nitrate. Combinaison de l'enrichissement en nitrate et de la température provoquent un blanchissement de symbiotes. *P. damicornis* moins résistant que *P. lobata*.
Langdon & Atkinson (2005)	Exp.	NH_4 et PO_4	N:P=109 :13 enrichies	Le traitement enrichi a mené à : Une augmentation de la production nette de carbone de 48%, une baisse de la calcification de 16% Les coraux enrichis sont moins sensibles à un changement dans l'état de saturation de l'aragonite

Reneger & Reigl (2005)	Exp.	NO_3 et PO_4	N:P = 4.98 : 2.09 10.01 :4.06	Baisse de la croissance de 67% Baisse de la croissance de 86%
Voss & Richardson (2006)	Exp.	NO_3	N:1,2,3 uM	Augmentation de la disponibilité en nutriment peut favoriser le developpement et les effets négatifs des maladies
Tanaka et al. (2007)	Exp.	NO_3 et PO_4	N:P =<5 :<0.3	La concentration en chlorophyll a augmenté de 2.6 fois La photosynthèse nette a été stimulée de 2.8 La biomasse tissulaire de l'hôte et des symbiotes de 2 fois et la calcification de 1.3 fois
Faxneld et al. (2010)	Exp.	NO_3	N=5 vs 0.3	Une expérience de 24h sur *T. mesenterina*. Stress combiné nitrate, température et faible salinité Effet de la température et des stress combinés plus importants que effet du nitrate.
Holcomb et al. (2010)	Exp.	NO_3 et PO_4	N:P=5 :0.3	La calcification décroit de 35% avec l'enrichissement en nutriments Les nutriments ont pallié l'effet négatif de la baisse de pH
Chauvin et al. (2011)	In situ	NH_4, NO_3 et PO_4	N:P=0.24-0.8+0.21-13.4:(0.08-0.22)	Les taux de photosynthèse et de calcification étaient supérieurs pour les coraux enrichis. Ils semblent également moins sensibles aux baisses de pH.
Sawall et al. (2011)	In situ	Chl a conc. 1.5-2.9 ug L^{-1} Suspended partic. matter : 20 mg L^{-1}	?	Stimulation du métabolisme du corail. Augmentation des conc. en symbiotes, chlorophylle, protéines et des taux de photosynthèse nette, brute, respiration et calcif.
Dunn et al. (2012)	Exp.	PO_4	0.09-0.5 mg/L	Augmentation de la croissance due à l'augmentation de la densité de symbiotes, et réduction de la densité du squelette.
Béraud et al. (2013)	Exp.	NH_4	N:P =3 :0.5	A 26°C, baisse dans la densité des symbiotes mais augmentation de la concentration en chlorophylle. A 31°C, l'enrichissement en ammonium permet de maintenir le métabolisme du corail en augmentant les pigments

Burkepile et al. (2013)	In situ	Excrétion provenant des poissons (ammonium)	N=34.7 mg m^{-2} d^{-1}	Effets des excrétions de poissons sur la communauté récifale. Contexte-dépendant. Corrélation positive entre l'excrétion de nutriments provenant des poissons et la croissance des macroalgues. Réduction de la quantité de juvéniles.
Fabricius et al. (2013)	Exp. Nat.SW	NO_3	NO_3 Sédiments	Effets délétères d'un enrichissement en nitrate combiné à un apport de matière organique sous forte température
Vega-Thurber et al. (2014)	In situ	N et PO_4	N:P=3.9:0.27	L'enrichissement en nutriment augmente la présence de points noirs et les risques de blanchissement
Wiedenmann et al. (2013)	Exp. Artificial SW	NO_3 et PO_4	Faible conc. : N:P=0.7:0.006 Forte conc. : N:P=6.5:0.3 Conc. déséquilibrée : N:P=3:0.07	Fv/Fm>0.5 Blanchissement important des coraux Fv/Fm>0.5 Augmentation de la concentration en symbiotes Résistant aux fortes lumières Fv/Fm<0.5 Blanchissement des coraux s'accentue lorsque exposés à la lumière et à de fortes températures
Tanaka et al. (2014)	Exp.	NH_4, NO_3, NO_2 et PO_4	Faible conc. : N:P=0.55:0.02 Forte conc. : N:P=3:0.2	Baisse de la concentration en symbiotes mais augmentation de la concentration en chl a. Coraux moins sensible à l'augmentation de pCO_2 lorsqu'enrichis.
Hoadley et al. (2016)	Exp.	NO_3, NO_2 et PO_4	0.4 et 0.2 vs. 3.5 et 0.3 µmol de NO_3/NO_2 et PO_4	Effets combinés de la température, des nutriments et d'une baisse de pH sur la physiologie de *T. reniformis* en association avec *S. trenchii* (33°C). Température influençant le plus la réponse des coraux. L'enrichissement en nutriments a atténué les effets combinés de la température et de la pCO_2

Table 3 Résumé succint des études portant sur les effets des sels nutritifs sur la physiologie corallienne

3. Incertitudes et hypothèses de travail

Comme décrit dans les chapitres précédents, de nombreux travaux se sont attachés à étudier les relations existant entre la disponibilité en sels nutritifs et la physiologie des coraux, voir de l'écosystème récifal. Cependant, et malgré l'effort scientifique réalisé, des incertitudes et incompréhensions persistent. Cette thèse visait à combler certaines lacunes encore existantes, et les résultats acquis permettent de mettre en lumière les capacités nutritionnelles des coraux tropicaux ainsi que les effets d'un manque ou d'un excès en nutriments inorganiques sur la physiologie corallienne dans le contexte du réchauffement climatique.

3.1 Acquisition des sels nutritifs chez les coraux tropicaux dans le contexte du réchauffement climatique: capacités et besoins

Incertitude 1 : *Différentes espèces coralliennes ont-elles les mêmes capacités à absorber l'azote et le phosphore ? Ces capacités dépendent-elles du clade de* Symbiodinium *associé à l'hôte, de la morphologie de l'hôte, ou de l'holobionte (ensemble hôte-dinoflagellé) ?*

Bien que de nombreux travaux aient mesuré les taux d'absorption d'ammonium, de nitrate, ou de phosphore de coraux tropicaux ou de dinoflagellés isolés (Bythell 1990; D'Elia et al. 1983; D'Elia 1977; Domotor and D'Elia 1984; Franzisket 1974; Godinot et al. 2009; Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Miller and Yellowlees 1989; Muscatine and D'elia 1978; Webb and Wiebe 1978; Wilkerson and Trench 1986) deux études à ce jour (Baker et al. 2013; Pernice et al. 2015) ont **comparé** les taux d'absorption/d'assimilation de ces sels nutritifs par deux différents holobiontes maintenus dans les mêmes conditions de culture en symbiose avec les clades de *Symbiodinium* C et D. Les résultats obtenus ont montré que les coraux infectés avec le clade C de *Symbiodinium* présentaient des capacités d'assimilation de nitrate plus importantes que ceux arborant le clade D, en condition contrôle (Baker et al. 2013; Pernice et al. 2015). Il en a été conclu que l'absorption d'azote était dépendante du symbiote. Ces premiers résultats sont importants pour expliquer la variabilité observée dans les taux d'absorption des sels nutritifs et leur utilisation par l'holobionte. Une capacité plus importante de certains holobiontes à utiliser cette source nutritionnelle pourrait expliquer leur distribution dans des zones géographiques pauvres en sels nutritifs ainsi qu'une résistance plus prononcée aux stress environnementaux.

Objectif du travail de thèse : Réaliser l'étude inverse de Baker et al. (2013) et Pernice et al. (2015), c'est-à-dire mesurer l'absorption d'azote et de phosphore par un même clade de *Symbiodinium* (clade C1) associé à 4 hôtes (espèces de coraux) différents, afin d'estimer le rôle du clade, de l'hôte ou de l'holobionte, dans l'absoprtion des sels nutritifs. Une espèce supplémentaire a également été introduite dans l'étude : *Heteroxenia fuscescens*, en symbiose avec *Symbiodinium* clade D1. Cette espèce de corail mou présente une caractéristique unique avec la pulsation rythmique de ses polypes. Kremien et al. (2013) ont montré que les pulsations augmentent significativement le taux de photosynthèse des symbiotes en diminuant le mélange au sein de la couche limite et en empêchant la refiltration de l'eau par les polypes voisins. Les hypothèses testées étaient les suivantes : 1) l'absorption des sels nutritifs est comparable chez tous les coraux scléractiniaires si elle dépend uniquement du symbiote, qui est identique chez tous les coraux ; au contraire, elle sera différente si elle dépend de l'hôte, ou de l'holobionte ; 2) l'absorption des sels nutritifs est plus faible chez *H. fuscescens* si elle dépend du symbiote (le clade D est en effet moins efficace que le clade C) ou supérieure si cette absorption dépend de l'hôte et de ses pulsations.

Incertitude 2 : *Y-a t'il des différences dans les taux d'acquisition, de rétention et de transfert d'ammonium et de nitrate chez un même hôte (Stylophora pistillata) en symbiose avec deux clades de Symbiodinium différents (clade A1 et C) ? Autrement dit, certains symbiotes sont ils plus efficaces à acquérir l'azote ?*

La plupart des études testant l'effet du clade sur la physiologie des coraux traitent des bénéfices que prodiguent les différentes associations symbiotiques pour la résistance aux stress thermique des coraux (Finney et al. 2010; Lesser et al. 2010; Rowan and Knowlton 1995; Rowan et al. 1997). Cependant, seuls deux travaux se sont intéressés aux avantages nutritionnels que pourraient conférer la diversification en *Symbiodinium* à l'holobionte corallien. L'étude réalisée par Baker et al. (2013) montre que l'assimilation du carbone et de l'azote sont dépendantes du clade de symbiote ainsi que de la température chez *Acropora tenuis* infecté avec le clade C1 ou D1 (Baker et al. 2013). Ainsi, le clade C1 serait plus efficace à acquérir à la fois le carbone et l'azote que le clade D1 en condition normale de développement, alors que le contraire est observé lors d'un stress thermique. Par la suite, Leal et al. (2015) démontre, chez des anémones, que la diversification en *Symbiodinum* influence également la quantité et la qualité de photosynthétats transférés à l'hôte corallien ainsi que ses capacités hétérotrophes (Leal et al. 2015).

Au vu de ces premiers résultats, il est nécessaire de poursuivre les études afin de mieux comprendre comment l'identité génétique des symbiotes influence la capacité nutritionnelle de l'association symbiotique.

Objectif du travail de thèse : Dans le Golfe d'Eilat, en Mer Rouge, l'espèce *Stylophora pistillata* est associée à deux clades de *Symbiodinium* différents selon la profondeur à laquelle elle se développe : le clade A1 en surface et le clade C en profondeur (> 40 m). L'objectif du travail était donc d'étudier les capacités nutritionnelles de l'espèce de corail *S. pistillata* associée aux clades différents, A1 et C. Les hypothèses testées sont que :1) chaque clade est adapté à l'environnement lumineux de surface et de profondeur et confère à l'hôte des avantages en terme d'acquisition de carbone (photosynthèse); 2) Chaque clade présente des capacités d'absorption des sels nutritifs différentes, en fonction de leur environnement.

Incertitude 2 : *Quel est l'impact d'un stress thermique, induisant le blanchissement des coraux, sur leurs taux d'absorption d'azote et de phosphore? Autrement dit, lorsque les coraux perdent leurs symbiotes, sont-ils encore capables d'acquérir les sels nutritifs essentiels à leur métabolisme ? Cette capacité est-elle liée au clade de symbiote associé à l'hôte ?*

L'un des premiers effets d'un stress thermique sur les coraux est la perte des symbiotes (blanchissement), ce qui entraîne inéluctablement une diminution des capacités photosynthétiques de l'holobionte, et un stress nutritionnel, puisque plus de 90% des besoins énergétiques de l'hôte sont assurés par les dinoflagellés symbiotiques, grâce à leur assimilation de nutriments inorganiques via la photosynthèse. Il a alors été montré que les coraux mettent en place diverses stratégies pour compenser leurs pertes nutritionnelles : i) certaines espèces puisent dans leurs réserves lipidiques (Díaz-Almeyda et al. 2011; Imbs and Yakovleva 2012; Luo et al. 2009), ii) d'autres réduisent leur métabolisme et leurs taux de respiration (Coles and Jokiel 1977), iii) certains coraux augmentent leurs taux de capture du zooplancton (hétérotrophie) (Ferrier-Pagès et al. 2010). Alors que ces voies alternatives ont été plus ou moins étudiées, la capacité des coraux à augmenter leur taux d'absorption de sels nutritifs au cours d'un stress thermique pour compenser la perte de leur symbiotes n'a fait l'objet que d'une étude (Godinot et al. 2011a) sur l'espèce *S. pistillata* Les résultats obtenus ont montré que si les taux d'absoprtion de phosphore semblaient effectivement être augmentés, ceux de nitrate/ammonium étaient significativement diminués.

Ces résultats sont toutefois en accord avec la théorie de Wiedenmann et al. (2013), qui suggère que le blanchissement est exacerbé en présence de fortes concetnrations en nitrates et d'une dépletion en phosphates dans l'eau de mer. Ainsi les coraux réguleraient leur absorption d'azote et de phosphore pour maintenir un rapport N :P favorable à l'intérieur de leurs tissus.

Objectif du travail de thèse : Mesurer les taux d'absorption d'azote et de phosphore par plusieurs espèces de coraux, en symbiose avec différents clades de symbiotes, et soumises à un stress thermique. Cette expérience nous permettra de généraliser les premiers résultats obtenus par Godinot et al. (2011a) et donc de vérifier : i) si les taux d'absorption d'azote diminuent chez toutes les espcèes de coraux, et si cette diminution est liée à la perte des symbiotes ou à une régulmation de l'hôte ; ii) si les taux d'absorption de phosphore sont par contre augmentés chez tous les coraux, indépendamment du blanchissement. Les hypothèses testées sont que, sous un stress thermique : 1) les coraux vont augmenter l'absorption de phosphore pour éviter une carence suite à la perte des symbiotes, et une fragilisation des membranes des symbiotes ; 2) les coraux vont diminuer l'absorption d'azote, soit suite à la perte des symbiotes, ce qui induirait une carence en azote, soit pour éviter un excés d'azote par rapport au phosphore à l'intérieur des tissus coralliens.

3.2 Effets d'une limitation ou d'un enrichissement en sels nutritifs sur la réponse physiologique des coraux tropicaux dans le contexte du réchauffement climatique

Incertitude 1 : *Le corail a-t'il une réponse physiologique différente selon le type d'enrichissement azoté (la forme chimique; ammonium ou nitrate) présent dans le milieu ?*

Les différentes études réalisées, aussi bien en laboratoire qu'*in situ*, révèlent une large variabilité dans la réponse physiologique des coraux à la présence de concentrations élevées d'azote dans le milieu. Certains travaux montrent une baisse drastique de la calcification de l'animal et de la production primaire lors d'un enrichissement des eaux en azote inorganique (Ferrier-Pages et al. 2000; Ferrier-Pagès et al. 2001; Koop et al. 2001; Nordemar et al. 2003), de même qu'une augmentation des maladies au sein des colonies (Vega Thurber et al. 2014; Voss and Richardson 2006).

D'autres études, au contraire, mettent en évidence un effet positif sur la calcification, la croissance linéaire des colonies, la concentration en chlorophylle et protéines, la densité de symbiotes (Bongiorni et al. 2003; Tanaka et al. 2007) ou encore sur les taux de photosynthèse (Chauvin et al. 2011). Ces contradictions sont liées au fait que différentes formes d'azote (ammonium ou nitrates) ont été utilisées, à différentes concentrations, et que l'enrichissement a été réalisé en présence ou non d'autres sels nutritifs, comme les phosphates. De plus, les premières études testant l'effet d'un enrichissement en azote ou en phosphore sur la physiologie des coraux ont utilisé des concentrations en nutriments inorganiques dissous très élevées, bien plus importantes que celles normalement mesurées dans les récifs (Kinsey and Davies 1979a; Koop et al. 2001; Marubini and Davies 1996; Muscatine et al. 1989; Snidvongs and Kinzie III 1994; Stambler et al. 1991), et qui pouvaient induire une réponse biaisée par rapport à celle observée naturellement. Dans leur méta-analyse, Shantz & Burkepile (2014) suggèrent, sans le tester, que l'effet d'un enrichissement en azote dépendrait de la forme de N présente dans le milieu (ammonium ou nitrate) ainsi que de sa provenance (anthropique ou naturelle). En effet, les mécanismes d'assimilation d'ammonium ou de nitrate par le corail ainsi que le coût énergétique leur étant associé diffèrent et pourraient ainsi engendrer des réponses métaboliques différentes voir contraires, comme pour les plantes terrestres (Johnson et al. 2003; Kim et al. 2015; Topinka and Robbins 1976).

Objectif du travail de thèse : L'objectif était de tester, pour la première fois, l'effet d'un enrichissement équivalent en ammonium, ou nitrate, sur la physiologie des coraux et sur le budget de carbone de l'association symbiotique (assimilation de carbone inorganique, transfert des symbiotes à l'animal hôte, rétention dans les tissus coralliens, et excrétion sous forme de mucus). En effet, chez les plantes, la croissance et la productivité primaire sont étroitement liées à la disponibilité en azote (Crawford 1995), tout comme chez les algues benthiques (Topinka and Robbins 1976) et les dinoflagellés symbiotiques (Muscatine et al. 1989). L'hypothèse testée est que l'ammonium a un effet différent des nitrates, à la fois sur la réponse physiologique des coraux, ainsi que sur le budget de carbone de l'association symbiotique.

Incertitude 2: *La réponse des coraux à un enrichissement des eaux en sels nutritifs dépend-elle du rapport N:P? Autrement dit, un déséquilibre dans la disponibilité en azote par rapport au phosphore aurait-elle un effet négatif sur la physiologie des coraux?*

Une seule étude, publiée récemment, (Wiedenmann et al. (2013) a émis l'hypothèse qu'un rapport N:P déséquilibré – c'est-à-dire éloigné du rapport de Redfield (16:1) – ou présentant une carence dans un des éléments (Moore et al. 2013) – suite à une modification des cycles biogéochimiques – serait un facteur déterminant pour la santé des coraux. L'étude réalisée par Wiedenmann et al. (2013) montre qu'une déplétion presque totale du milieu en phosphore (0.007 µM), combinée à un enrichissement en nitrate (3 µM), accélérerait la susceptibilité des coraux au blanchissement. Les organismes coralliens, comme tout autre système biologique, auraient donc besoin de se développer dans un environnement où les rapports N:P seraient à l'équilibre. Cependant, d'autres études tendent à contredire la théorie de Wiedenmann et al. (2013) : ce sont des études dans lesquelles le milieu est moins déplété en phosphore (0.2 µM), et enrichi en ammonium (1-3 µM), au lieu des nitrates (Béraud et al. 2013; Bongiorni et al. 2003; Ferrier-Pages et al. 2000; Meyer et al. 1983), ou des études dans lesquelles le milieu est enrichi en nitrate (5-10 µM), mais dont les concentrations en phosphore sont significativement plus élevées que celles utilisées par Wiedenmann (2013)(0.3-5 µM) (Holcomb et al. 2010; Renegar and Riegl 2005; Tanaka et al. 2014; Tanaka et al. 2007). Les questions qui se posent sont alors de savoir si la santé des coraux dépend de: i) la forme d'azote, indépendemment de la concentration en phosphore, et/ou ii) du rapport N:P, dont le seuil reste à déterminer; et/ou iii) de la présence de phosphore, independemment de la forme d'azote.

Objectif du travail de thèse : Tester les effets de plusieurs rapports N:P sur la physiologie corallienne, en considérant l'ammonium ou le nitrate comme source principale d'azote et en faisant varier les concentrations de phosphore (0.05-0.1 µM, 0.5 µM et 2 uM) dans le milieu. Certaines expériences ont également été suivies d'un stress thermique dans le but d'étudier l'impact combiné de la température et d'un déséquilibre du ratio N:P sur l'association corail-dinoflagellé.

Incertitude 3 : *Quel est l'effet individuel, ou couplé, d'un enrichissement en sels nutritifs et en matière organique particulaire sur la physiologie des coraux ? Cet effet est-il différent en condition de croissance normale et lors d'un stress thermique ?*

Pour comprendre l'effet de l'eutrophisation sur la santé des coraux, il faut comprendre l'effet individuel et croisé des différents composants ou responsables de l'eutrophisation : des concentrations élevées en sels nutritifs (majoritairement nitrates et phosphates), mais aussi en phytoplancton et zooplancton (dont la croissance est augmentée en présence des sels nutritifs), et en particules sédimentaires détritiques transportées par les fleuves ou les rivières. Or ces composants, pris individuellement, ont des effets différents sur les coraux : les sédiments diminuent la disponibilité en lumière, et donc la croissance des coraux, tout en augmentant le développement des maladies (Fabricius 2005; Fabricius et al. 2013). Les sels nutritifs, majoritairement nitrates et phosphates, ont également tendance à avoir un effet négatif sur la croissance des coraux, bien que ce ne soit pas toujours le cas (Fabricius 2005). Le zooplancton et phytoplancton, ou particules organiques vivantes, au contraire, augmentent significativement le métabolisme du corail (Fabricius 2005; Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009) ainsi que sa résilience aux stress thermiques (Grottoli et al. 2006; Rodrigues and Grottoli 2007; Tolosa et al. 2011). Les composants de l'eutrophisation ont donc des effets, a priori, contraires sur la physiologie corallienne, certains diminuant la santé des coraux, d'autres l'améliorant. Jusqu'à présent, seules deux études ont mis en lumière les effets conjoints des différents composants de l'eutrophisation et d'un stress thermique sur la physiologie corallienne (Fabricius 2005; Fabricius et al. 2013). Fabricius et al. (2013) ont notamment observé, in situ, une réduction de la croissance du squelette corallien lorsque les colonies étaient maintenues en enrichissements combinés de sels nutritifs et de matière organique particulaire. Ces observations suggèrent que les effets synergiques de ces deux paramètres diffèrent de leurs effets individuels, cela en période de croissance normale ou de stress.

Objectif du travail de thèse : Etudier, en laboratoire, dans des conditions contrôlées, les effets individuels et combinés d'un enrichissement en zooplancton (nutriments organiques) et en sels nutritifs (nutriments inorganiques) sur l'ingestion de proies ainsi que les taux de photosynthèse et de calcification du corail scléractiniaire *Turbinaria reniformis*, en condition de croissance normale et lors d'un stress de température. Pour ce faire, plusieurs rapports N :P ont été testés (N :P=2 :0.5 ; 0.5 :0.1) avec ou sans apport hététrotrophe dans le but de mettre en évidence le paramètre principal influençant le devenir du système.

Incertitude 4 : *Quelle est la réponse physiologique des coraux soumis à une limitation en nutriments inorganiques dissous (azote et phosphore) ?*

La plupart des études s'intéressant aux effets d'une disponibilité en nutriments inorganiques sur la réponse physiologique des coraux ont majoritairement considéré des quantités élevées de sels nutritifs dans le milieu et non l'inverse. Cependant, le changement climatique et plus particulièrement le réchauffement atmosphérique modifie la chimie de la surface des océans, en renforçant la stratification de la colonne d'eau (Van de Waal et al. 2009). Cela induit une déplétion en nutriments beaucoup plus importante dans les couches superficielles de certaines régions océaniques (IPCC, 2007) et influence ainsi les taux d'acquisition de nutriments des coraux ainsi que leur métabolisme. De ce fait, connaître la réponse physiologique des coraux à une limitation en nutriments est essentielle afin d'appréhender leur devenir dans ces milieux. Une seule étude récente réalisée par Wiedenmann et al. (2013), au moyen d'eau de mer artificielle, a montré qu'une limitation combinée en nitrate et phosphore de la symbiose (N:P=0.7:0.006) induisait un blanchissement des colonies après 12 semaines lorsque soumises à des conditions lumineuses et thermales normales.

Objectif du travail de thèse : Le but de l'expérience était de maintenir des colonies de *S. pistillata* dans des conditions appauvries en nutriments inorganiques dissous (nitrate et phosphore ; N<0.5 et P<0.05), au moyen d'un lit fluidisé contenant des biopellet, de comparer leur réponse physiologique à celle de coraux maintenus en conditions oligotrophes "habituellement" rencontrées (N:P=0.5:0.05) et enrichies en ammonium (N:P=2:0.05). De plus, les boutures ont été exposées à différents stress, lumineux et thermique afin d'évaluer leurs capacités de survie.

Chapitre II.
Matériels & Méthodes

II. Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique : Le choix des modèles

Plusieurs espèces ont été choisies dans le cadre de ce travail, et ceci en fonction de leur morphologie et de leurs caractéristiques physiologiques.

1.1 Hexacoralliaires Scléractiniaires

***Stylophora pistillata* (Esper, 1797)**

Le choix du modèle biologique s'est tout d'abord porté sur le corail scléractiniaire *Stylophora pistillata* (Esper, 1797), provenant de la famille des Pocilloporidae. Cette espèce ovovipare, largement répandue dans la région Indo-Pacifique ainsi qu'en Mer Rouge se développe entre 1 et plus de 80 mètres de profondeur, dans des habitats très diversifiés, allant du lagon aux plateaux récifaux soumis à la force des vagues (Veron and Stafford-Smith 2002). De type branchu, la morphologie et la couleur qu'il arbore dépendent principalement des conditions spécifiques du milieu qu'il colonise (intensité lumineuse, turbidité, force des vagues, etc.). En Mer Rouge, *S. pistillata* est en symbiose avec le clade A de *Symbiodinium* en surface, tandis qu'il peut s'associer avec les clades A et C en profondeur (Byler et al. 2013). En Afrique du sud, des colonies arborent le clade C (Macdonald et al. 2008) et même D dans l'Océan Indien (Mieog et al. 2007). Une étude phylogénique a montré que les colonies de *S. pistillata*, originaires du Golfe d'Aqaba (Mer Rouge), et utilisées dans le cadre de nos expériences en laboratoire sont associées au clade A. Dans une expérience de terrain à Eilat (Mer rouge), nous avons également utilisé des colonies en symbiose avec les clades A et C. De par sa facilité de maintien en aquarium et son taux de calcification rapide, un nombre de boutures important peut être généré en très peu de temps (Tentori and Allemand 2006). De plus, cette espèce est souvent référencée comme modèle d'étude dans la littérature, facilitant l'accès à une large gamme de données, tant sur sa morphologie, sa physiologie que sur sa génétique.

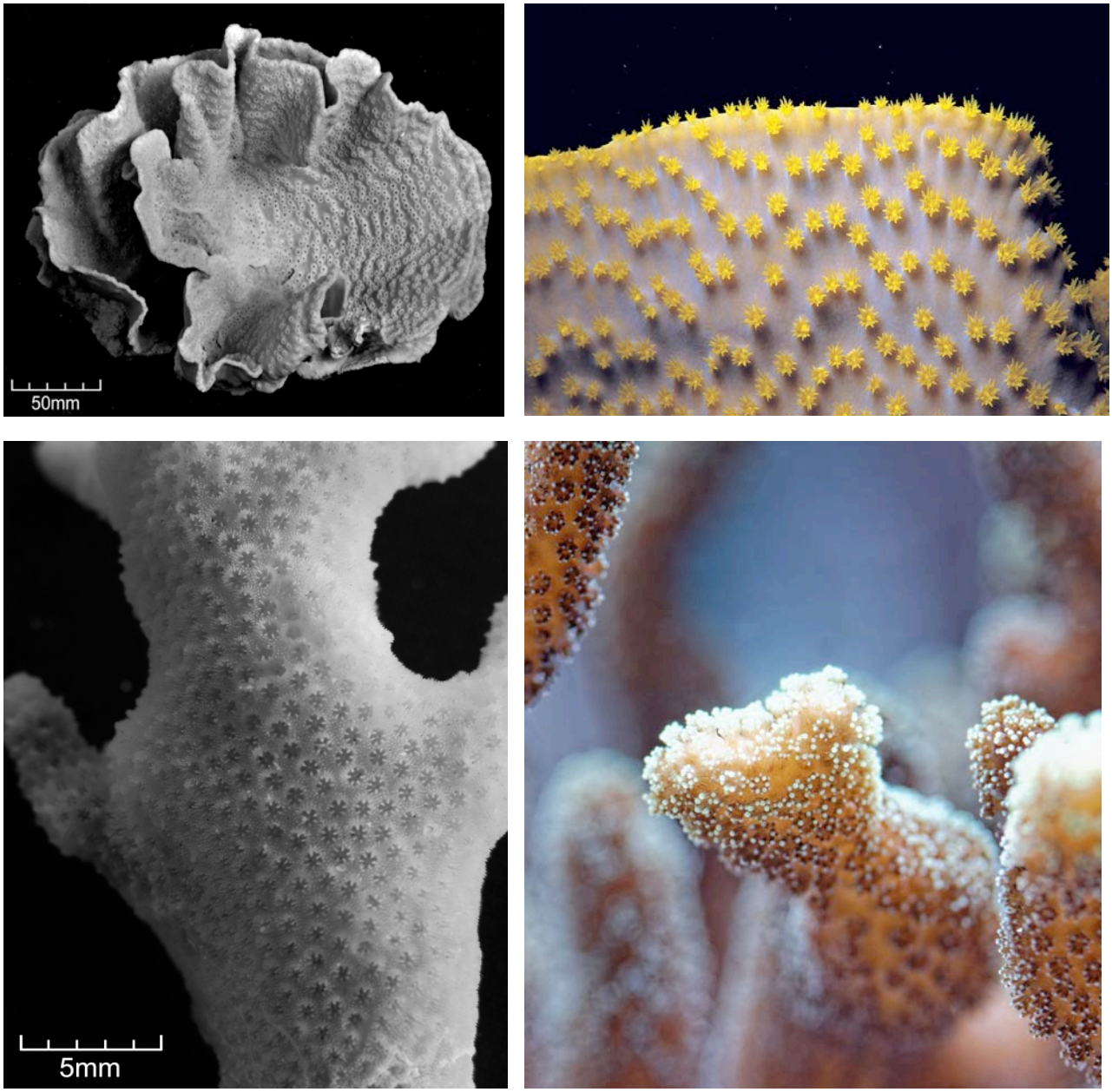


Figure 17. Illustration des deux principales espèces étudiées. a) *T. reniformis* et b) *S. pistillata*. Source : coral.aims.gov.au et CSM

***Galaxea fascicularis* (Linnaeus, 1767)**

G. fascicularis, appartenant à la famille des *Oculinidae,* est une espèce qui arbore de larges polypes et dont les colonies forment des dômes. Elle colonise un grand nombre d'habitats et affectionne les récifs frangeants longeant les côtes, où les colonies peuvent atteindre 5 m de diamètre (Veron 2000b). On la retrouve principalement dans la région Indo-Pacifique, y compris en Mer Rouge. Elle peut être associée avec le clade C et/ou D (Zhou et al. 2011). Dans le cadre de cette thèse, les colonies arborent le clade C1 et proviennent originellement de Mer Rouge.

***Pavona cactus* (Forskal, 1775)**

P. cactus appartient à la famille de Agariciidae et est caractérisée par de fins feuillets, contorsionnés de couleur brune ou verdâtre. Il colonise les lagons ainsi que les pentes supérieures des récifs frangeants, tenus à l'abri des vagues. On le retrouve principalement en Mer Rouge ainsi qu'en région Indo-Pacifique et dans le Golfe d'Aden (Veron 2000b). Il affectionne les eaux peu profondes et les environnements turbides, où les colonies peuvent atteindre jusqu'à 10 m de diamètre. Au laboratoire, les colonies proviennent de Mer Rouge et sont en symbiose avec le clade C de *Symbiodinium*.

***Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758)**

Provenant de la même famille que *S. pistillata*, les Pocilloporidae, *P. damicornis* est une espèce branchue très abondante, colonisant les eaux peu profondes, et formant des amas imbriqués. De couleur brune, verte ou rose, elle possède une large distribution dans les régions Indo-Pacifiques ainsi qu'en Mer Rouge. *P. damicornis* représente une des espèces principales responsable de la construction des récifs. Ils possèdent un taux de croissance très rapide, favorisé par l'hydrodynamisme. Les colonies utilisées dans cette thèse proviennent du Pacifique et arborent le clade C1 (Karako-Lampert et al. 2004)

***Turbinaria reniformis* (Bernard, 1896)**

Les espèces coralliennes du genre *Turbinaria,* issues de la famille des Dendrophylliidae, sont décrites comme les plus diversifiées à l'heure actuelle (Veron 2000b). *T. reniformis* est une espèce majoritairement distribuée dans la zone Indo-Pacifique, en Mer Rouge ainsi que le long des côtes bordant l'Afrique de l'est. Elle forme de larges peuplements sur les récifs frangeants, où les eaux sont généralement turbides.

Sa morphologie se compose de lames unifaciales de couleurs jaune-verte et de corallites coniques très épais, et ancrés dans la structure. Les colonies étudiées dans le cadre de la thèse sont originaires de Mer Rouge, du Golfe d'Aqaba, et arborent le clade C1.

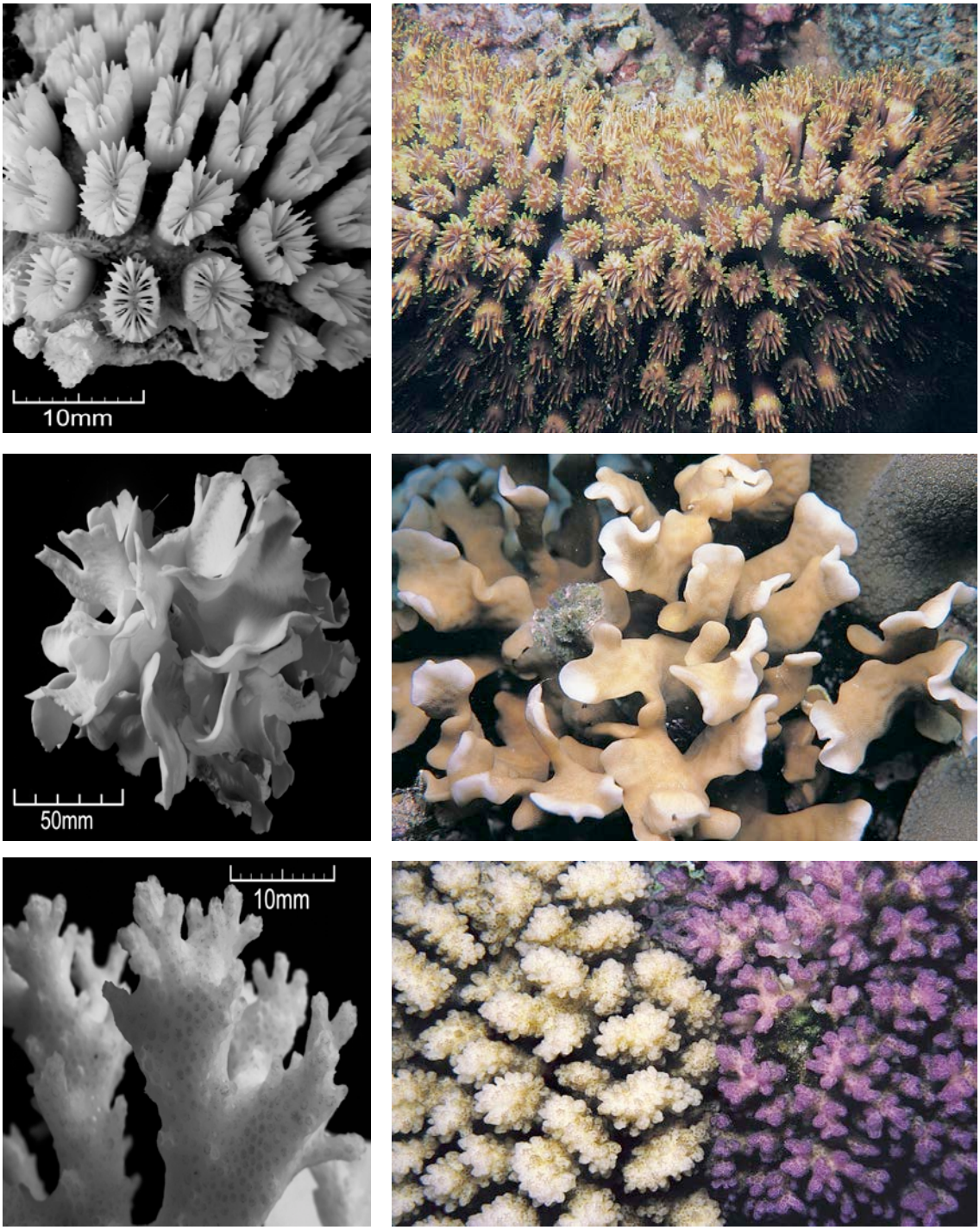


Figure 18 Illustrations de différentes espèces de coraux scléractiniaires étudiés dans le cadre de la thèse. a) *G. fascicularis*, b) *P. cactus*, c) *P. damicornis*. Source : coral.aims.gov.au

1.2 Espèce Octocoralliaire

***Heteroxenia fuscescens* (Ehrenberg, 1834)**

L'espèce de corail symbiotique mou, *H. fuscescens*, provient de la même classe d'organismes que les coraux Scléractiniaires, les Anthozoaires, mais de la sous-classe des Octocoralliaires et de la famille des Xenidae. Les tiges portant les polypes atteignent 5 cm de long, et sont prolongées par un anneau formé de grandes tentacules (Nx8). Les polypes grandissent et s'agglutinent jusqu'à former de grandes colonies (60cm). Ces dernières se développent dans les lagons ou les baies, à de faibles profondeurs avec un hydrodynamisme modéré. La caractéristique principale de cette espèce réside dans la « pulsation rythmique » et unique de ses tentacules. À ce jour, les bénéfices de ce mécanisme conférés à l'animal sont encore très peu connus. Une étude récente (Kremien et al. 2013) a montré que la pulsation des polypes favorise une certaine turbulence à travers la couche limite présente autour de la bouche de l'animal. Ce mouvement empêche la re-filtration de l'eau par les polypes voisins et influence positivement le taux de photosynthèse. Dans le cadre de nos expériences, l'espèce était associée au clade D de *Symbiodinium*.

Figure 19. L'espèce Octocoralliaire étudiée : *Heteroxenia fuscescens*

2. Préparation du matériel biologique et maintenance des colonies

2.1 Mise en place des conditions expérimentales

Les différentes espèces de coraux utilisées dans le cadre de nos études proviennent, pour la plupart, du Golfe d'Aqaba, en mer Rouge (Israël). Elles ont été conservées dans du papier bulle durant le voyage et ramenées rapidement au CSM où elles furent maintenues plusieurs mois en conditions contrôlées. Afin de répondre aux besoins des différentes études, une technique nommée « bouturage » (reproduction asexuée) a été employée pour sectionner les colonies mères en fragments ou « boutures » (nubbin en anglais), de 2-4 cm de long. Les boutures sont par la suite suspendues dans les aquariums par des fils en nylon (*S. pistillata, G. fascicularis et P. damicornis*), ou déposées sur le fond de l'aquarium (*T .reniformis, P. cactus et H. fuscescens*). Trois semaines après le bouturage, le tissu recouvre la partie du squelette qui a été sectionnée, et la bouture est prête à être utilisée.

Les boutures sont maintenues dans des aquariums de 20 L en conditions contrôlées. Les aquariums sont continuellement alimentés en eau de mer méditerranéenne, pompée à plus de 50 m de profondeur, présentant de faibles concentrations en nutriments inorganiques dissous : <0.5 µM d'ammonium et de nitrates, <0.2 µM de phosphate ainsi qu'en chlorophylle a (0.2 – 0.3 µg Chl a l^{-1} ; Ferrier-Pagès et al., 2001). L'eau de mer est chauffée au moyen de thermo-résistances (Visi-Therm® MOD VTX 300, Aquarium Systems), contrôlées au moyen d'un régulateur électronique, et est brassée avec une pompe (Mini-Jet MN404 Aquarium Systems). Une intensité lumineuse, contrainte à une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité, est assurée par l'utilisation de lampes halogènes métalliques (Philips, HPIT 400W, Distrilamp, France) et calibrée grâce à un capteur lumineux (LI-1000, LI-COR) à une intensité induisant le processus de photosynthèse (« Photosynthetically Active Radiation » ou PAR). Les conditions contrôlées reproduites en laboratoire sont similaires à celles observées *in situ* en ce qui concerne la température ainsi les paramètres biogéochimiques charactérisant l'eau de mer.

2.1.1 Enrichissement en sels nutritifs

Dans le cadre de ce travail, plusieurs expériences ont nécessité la manipulation précise des concentrations de sels nutritifs pour étudier leurs effets sur la physiologie des coraux.

Pour ce faire, une pompe péristaltique, réglée à un débit donné, et reliée à une cuve tampon, a assuré un enrichissement constant dans les aquariums contenant les boutures. Les cuves tampon étaient préalablement remplies et ajustées aux bonnes concentrations d'ammonium (NH_4Cl), de nitrates ($NaNO_3$) ou de phosphates (NaH_2PO_4). De même, les débits d'arrivée d'eau de mer « normale » étaient réglés conformément à la concentration désirée.

Les concentrations en sels nutritifs ont été contrôlées au moyen d'un auto-analyseur (Technicon – Alliance Instrument, AMS, France). Les coraux ont été incubés entre 3 et 4 semaines avant le début des mesures physiologiques et les aquariums nettoyés chaque semaine pour éviter la prolifération d'algues, pouvant introduire un biais dans les conditions expérimentales.

2.1.2 Nutrition hétérotrophe des colonies

L'effet de la nutrition hétérotrophe seule ou en combinaison avec d'autres traitements a été étudié durant la thèse. Après le bouturage, les fragments de coraux sont « nourris » deux fois par semaine avec du zooplancton, des nauplii d'*Artemia salina*, afin d'accélérer leur cicatrisation. La préparation des nauplii comprend une période de 24h durant laquelle les cystes d'*Artemia salina* vont éclore, libérant les nauplii. Ces derniers sont filtrés, puis distribués directement ou congelés. Lors des expériences, les coraux étaient en général nourris, soit tôt le matin, soit tard le soir, afin de se rapprocher des conditions *in situ*.

Figure 20. Mise en place d'un système expérimental pour l'expérience n°4 réalisée avec E. Towle

3. Extractions et dosages

3.1 Extraction du tissu

La mesure des paramètres physiologiques tels que les concentrations en symbiotes, chlorophylle, protéine ainsi que la respiration des symbiotes isolés et l'analyse de la composition isotopique des compartiments (algal/animale) de la symbiose passent par une première étape qui est : l'extraction du tissu de l'holobionte. Le détachement de ce dernier s'effectue au moyen d'un jet d'air et de quelques millilitres d'eau de mer filtrée (10 mL à 0.45 µm) appliquée sur l'échantillon de corail jusqu'à sa disparition totale de la surface du squelette corallien. La solution d'eau de mer contenant le tissu est homogénéisée, broyée au moyen d'un « potter grinder » (40 mL Dounce tissue grinders, Wheaton) et son volume final noté avant de la transvaser dans un tube Falcon 15 mL. A partir de là, des échantillons peuvent être prélevés pour le comptage du nombre de symbiotes (500 µL), l'extraction et le dosage des protéines (500 µL). Selon les besoins, le tube pourra être centrifugé (8000 g, 10 mn, 4°C) afin de séparer la fraction algale, qui va culotter, du tissu animal qui va demeurer dans le surnageant.

3.2 Dosage de la chlorophylle

Après centrifugation (Centrifugeuse Sigma 4K15) à 4°C, les symbiotes sont resuspendus dans 5 mL d'acétone à 99% et conservés à 4°C durant 24h. Le lendemain, la solution est centrifugée à 11 000 g pendant 15 mn à 4°C, à nouveau pour culotter les algues. La lecture de l'absorbance s'effectue à 630 nm et 663 nm pour les deux pics d'absorbance de la chl c_2 et a respectivement et à 750 nm afin de quantifier la turbidité du milieu. Le dosage est réalisé au moyen d'un spectrophotomètre UVmc^2 (Safas, Monaco). La concentration en chlorophylle dans le milieu est calculée selon l'équation établie par Jeffrey & Humphrey (1975).

$$[\text{Chl a}] = 11.43 \times (A663 - A750) - 0.64 \times (A630 - A750)$$

$$[\text{Chl } c_2] = -3.63 \times (A663 - A750) + 27.09 \times (A630 - A750)$$

3.3 Détermination de la concentration en symbiotes

La concentration en symbiotes se mesure grâce à un compteur de particules (Counter coulter, Beckman Coulter, Villepinte, France). Un tube muni d'une petite ouverture sur la paroi est immergée dans un bécher qui contient des particules en suspension dans un électrolyte de faible concentration. Deux électrodes sont placées, l'une à l'intérieur du tube et l'autre à l'extérieur du tube, mais à l'intérieur du bécher. Un trajet de courant est fourni par l'électrolyte lorsqu'un champ électrique est appliqué L'appareil compte le nombre de fois où le champ électrique est interrompu. L'amplitude du signal (hauteur) reflète la taille de la particule. Des valeurs de seuil permettent de définir une répartition par taille. Pour le comptage, un volume de 100 à 500 µL de tissus extraits est dilué avec 10 mL d'isoton (Beckman Coulter) et comptés automatiquement.

3.4 Détermination de la concentration en protéines

Le contenu en protéine se mesure au moyen du kit BCAssay (Uptima, Interchim) et d'après le protocole de Hoogenboom et al. (2010b). L'extrait du tissu est d'abord incubé dans une solution de NaOH 0.25 M, pendant 5 heures à l'étuve (60°C), puis mélangé au réactif. Les protéines réduisent le Cu^{2+} en Cu^{+}, qui s'associe avec l'acide bicinchoninique (BCA) pour former un complexe pourpre très stable. La lecture de l'absorbance s'effectue à 562 nm au moyen d'un spectrofluorimètre Xenius ® (Safas, Monaco). La gamme étalon est crée au moyen du sérum d'albumine bovine (0 à 1000 µg L^{-1}).

4. Mesures physiologiques

4.1 Taux de photosynthèse et de respiration

Afin d'établir les taux de production et de consommation d'oxygène par les coraux, les boutures sont placées individuellement dans des chambres de 50 mL en plexiglas (sur fil ou sur support). Ces dernières sont remplies avec de l'eau de mer filtrée (0.45 µm), continuellement agitée par un barreau aimanté, et fermées hermétiquement. Les chambres peuvent être exposées à plusieurs intensités lumineuses, dépendant de l'expérience (pour les mesures de photosynthèse nette, P_n) ou sont maintenues à l'obscurité, pour les mesures de respiration (*R*). Les chambres d'expérimentation sont chauffées à la température désirée au moyen d'un bain marie. Une optode Unisense (une fibre optique) est fixée sur le couvercle de

la chambre et reliée à un oxymètre (OXY-4, Chanel fiber-optic oxygen meter, PreSens, Regensburg, Germany) permettant le calcul de la concentration d'O_2 dans le milieu.

Les optodes ont été calibrées de la manière suivante : le 0% d'O_2 est établi en saturant l'eau de mer filtrée contenue dans les chambres avec de l'azote (N_2). Le 100% d'O_2 est réalisé en bullant l'eau de mer filtrée avec de l'air, au moyen d'une mini pompe. Cette dernière mesure dépend de la température du milieu requise ainsi que de sa salinité. La lecture des variations de concentration en O_2 (production ou consommation) au cours du temps s'effectue par le biais d'un logiciel informatique. Par la suite, une régression de ces valeurs est calculée en tenant compte du volume d'eau précis contenu dans la chambre d'incubation. Le taux de photosynthèse brute (P_g) se calcule en additionnant R à P_n. Une fois les mesures réalisées, les boutures sont congelées à -20°C pour la détermination des concentrations en symbiotes, en chlorophylle et/ou protéine. Les valeurs de production ou de consommation d'O_2 par les coraux sont normalisées par leur surface (µmol O_2 cm^{-2} h^{-1}), ou leur quantité de protéine (µmol O_2 mg prot h^{-1}).

Les taux de respiration des symbiotes extraits du tissu animal sont utiles pour compléter le modèle du budget de carbone et notamment pour le calcul du transfert des photosynthétats (détaillé ci-dessous, (Tremblay et al. 2012)). Pour cela, les tissus sont directement extraits de micro-colonies vivantes, comme mentionné plus haut, et centrifugés à température de culture des coraux. Après la centrifugation, le culot de symbiotes est resuspendu dans de l'eau de mer filtrée et le tube est laissé au repos, dans les conditions de température et de lumière de culture, durant une vingtaine de minutes. Les mesures de respiration s'effectuent de la même manière qu'énoncé plus haut et sont normalisées par la surface de la bouture.

Conversion en équivalent carbone

Les valeurs de P_g et *R*, préalablement normalisées en µmol O_2 cm^{-2} h^{-1}, sont par la suite converties en équivalent carbone selon l'équation d'Antony & Fabricius (2000) pour les insérer dans la modélisation du budget de carbone.

$$P_C = (P_g \times 12) / (P_Q)$$

$$R_C = R \times 12 \times R_Q$$

Où P_C : la quantité de carbone fixé (µg C)

R_C : la quantité de carbone consommé (µg C)

P_Q : le quotient photosynthétique équivalent à 1.1 mol O_2 : mol C

R_Q : le quotient respiratoire équivalent à 0.8 mol C : mol O_2

12 représente la masse molaire du carbone

Les taux de photosynthèse ont été estimés sur une photopériode de 12 heures et ceux de respiration sur 24 heures.

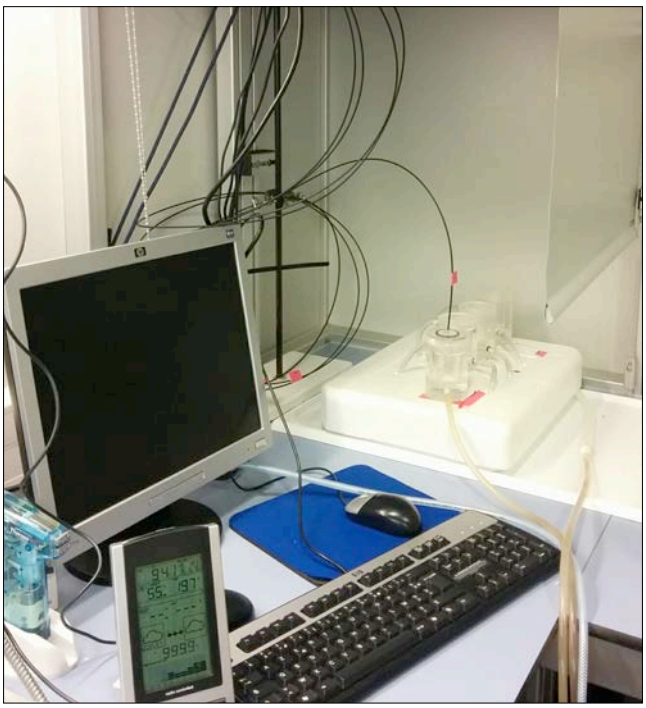


Figure 21. Mise en place du système permettant les mesures des taux de photosynthèse et de respiration

4.2 La technique de PAM fluorimétrie: activité des photosystèmes II

La fluorimétrie à pulsations d'amplitude modulée ou « Pulse Amplitude modulation (PAM) » permet la détection de la fluorescence chlorophyllienne au moyen d'une lumière de mesure à pulsations d'amplitude modulée (Schreiber et al. 1986). Le système nous renseigne sur l'efficacité photosynthétique des photosystèmes II (PSII). La PAM fluorimétrie peut être adaptée au milieu aquatique grâce au Diving-PAM, un appareil muni d'une fibre optique étanche permettant de transmettre le signal sous l'eau. L'appareil fonctionne de la manière suivante : un flash est émis à une forte intensité lumineuse, de manière à produire une saturation rapide de la chaîne de transport d'électrons et d'occasionner la fermeture temporaire des centres réactionnels des PSII. Le processus de transport d'électrons est momentanément inhibé et toute « l'énergie » est réémise en fluorescence.

Le fluorimètre enregistre différents quenchings, le quenching photochimique (sous forme de fluorescence) et non-photochimique (Schreiber et al. 1986), présentés dans les paragraphes ci-dessous.

A) L'efficacité photosynthétique *(maximum quantum yield of PSII)*

Après un certain temps d'adaptation à l'obscurité (5-10 min), les centres réactionnels des PSII sont « ouverts », c'est-à-dire prêts à fonctionner, car il n'y a plus d'électrons à transporter à travers la chaine photosynthétique, la perte d'énergie sous forme de chaleur est également minimale. La fluorescence réémise (mesurée en l'absence de lumière actinique[2]) est minimale, on la note F_0. Le flash saturant va entraîner la fermeture massive de tous les centres réactionnels fonctionnels du PSII, augmentant la fluorescence, qui atteint sa valeur maximale : F_m. La fluorescence est proportionnelle à l'énergie lumineuse que le photosystème aurait transmis à la chaine photosynthètique, c'est-à-dire au quenching photochimique. La fluorescence variable F_v résulte de la différence entre F_m et F_0. Ainsi, la mesure de l'efficacité photosynthétique se calcule au moyen de l'équation suivante :

$$F_v/F_m = (F_m-F_0)/F_m$$

Chez les plantes terrestres, 80% de l'énergie lumineuse reçue par les PSII est utilisée pour la photosynthèse (F_v/F_m = 0.8 ; (Björkman and Demmig 1987)). Dans le cas des coraux, cette valeur varie entre 0.5 et 0.7 (Jones et al. 1998) dans les conditions normales.

[2] La lumière actinique est une lumière qui induit la photosynthèse

B) ΔF/Fm' : L'efficacité photosynthétique effective (Effective quantum yield of PSII)

L'efficacité photosynthétique effective ou encore nommée « paramètre de Genty » (Genty et al. 1989) mesure l'efficacité photosynthétique lorsque les photosystèmes sont éclairés et qu'une partie d'entre eux est « fermée », c'est à dire en train de transférer des électrons (donc pas disponible pour en capter d'autres). ΔF/Fm' représente le rendement quantique des centres ouverts du PSII dans ces conditions. Fm' représente la fluorescence maximale mesurée à la lumière.

$$\Delta F/Fm' = (Fm'-F)/Fm'$$

C) Le taux de transport d'électrons relatif (rETR)

Le taux de transport d'électrons se mesure en multipliant l'efficacité photosynthétique effective par la quantité de lumière absorbée au niveau du PSII (Genty et al. 1989) et équivaut à :

$$rETR = \Delta F/Fm' \times 0.5 \times PAR$$

Le PAR ou « photosynthetically active radiation » est mesurée en µmol photons m^{-2} s^{-1} et exprime la quantité de lumière reçue par les photosystèmes. On considère que les deux photosystèmes (Photosystème I et II) reçoivent la même part de lumière, justifiant la valeur de 0.5. Lorsqu'une « rapide light curve » (RLC) est réalisée, le rETR est mesuré successivement à différentes intensités lumineuses. En théorie, la RLC peut être comparée à une courbe P/I (Photosynthèse-Irradiance).

D) Le NPQ : Le quenching non photochimique *(non-photochemical quenching)*

Le NPQ permet de décrire l'énergie dissipée sous forme de chaleur, et compare ainsi la fluorescence maximale à l'obscurité (Fm) à la fluorescence maximale soumise à un éclairement (Fm') et ceci selon l'équation suivante :

$$NPQ = (F_m-F_{m'})/F_{m'}$$

La mesure de ce paramètre est un bon indicateur du degré de photoprotection mis en place par l'organisme pendant une période de stress.

4.3 Mesure de calcification

Les mesures de croissance du squelette ont été réalisées au moyen de la technique du « buoyant weight » ou pesée dans l'eau (Davies 1989). Cette méthode consiste à peser les boutures alors qu'elles sont immergées dans de l'eau de mer maintenue à une température de consigne. La masse « humide » du fragment est ramenée à un poids sec, dépendant de la densité de l'eau. Ce dernier paramètre tient compte de la salinité du milieu, de la température mesurée ainsi que de la densité du squelette de l'espèce étudiée. La différence de poids mesurée durant une période donnée indique la quantité de carbonate de calcium qui a été déposée (µg $CaCO_3$ h^{-1} cm^{-2}), cette dernière étant convertie en µg de carbone (µg C) selon l'équation suivante :

$$C_c = M_{sk} \text{ x } (12/100)$$

Où $\mathbf{M_{sk}}$ représente la masse de carbonate de calcium déposée (µg $CaCO_3$) et est normalisée par heure et par cm^2 et **12/100** est le rapport des masses molaires du carbone sur celle du carbonate de calcium.

4.4 Taux de prédation de proies zooplanctoniques par les coraux

Des expériences ont visé à estimer la capacité hétérotrophe des coraux dans différentes conditions environnementales, en mesurant le nombre de proies ingérées par les polypes des micro-colonies. Pour ce faire, les boutures ont été incubées dans des chambres en plexiglas de 900 mL prévues à cet effet (Houlbrèque et al. 2004a) selon la méthode de Vogel & LaBarbera (1978). Les chambres sont remplies avec de l'eau de mer filtrée (0.45µm), placées dans un bain marie, maintenues à une température de consigne et sont équipées d'une hélice permettant un mélange continu à une vitesse dépendant de l'espèce étudiée et du type de nourriture distribuée. Les taux d'ingestion sont évalués à l'éclairement de culture, en établissant une régression de la concetnration des proies au cours du temps. Après apport de ca. 2000 nauplii d'*Artemia salina* dans la chambre d'incubation, des échantillons de 10 mL d'eau de mer sont prélevés au moyen d'une pipette en verre. Les artemia contenus dans la pipette sont alors comptés visuellement. Cet exercice, répété trois fois pour chaque temps de prélèvement, permet de compter le nombre de proies présentes à un temps donné (T0mn, T15mn, T30mn, T45mn, T60mn, T90mn).

5. Utilisation des isotopes stables

5.1 Les isotopes stables

Les isotopes sont des atomes portant le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent. Les isotopes stables, par opposition aux isotopes radioactifs ne se décomposent pas en d'autres éléments au cours du temps. Il existe, à ce jour, 80 éléments comportant au moins un isotope stable tels que le ^{13}C, ^{12}C, ^{15}N et ^{14}N. Dans le cadre de la thèse, l'utilisation des isotopes stables du carbone et de l'azote a permis de tracer le devenir de l'élément via les diverses voies métaboliques caractérisant la symbiose corail-dinoflagellé, dans des conditions particulières (enrichissement, lumière, température).

5.2 L'utilisation de l'isotope ^{13}C du carbone pour quantifier le transfert de photosynthétats

Ce chapitre va résumer le concept du modèle établi par Tremblay et al. (2012), détaillé dans la thèse de Pascale Tremblay (2012), et se basant sur l'utilisation de l'isotope stable du carbone (^{13}C) pour quantifier le taux de photosynthétats transférés des symbiotes vers l'hôte corallien. Cette technique a été utilisée à plusieurs reprises tout au long de la thèse.

A) Le « pulse-chase »

La technique du « pulse-chase » a pour but de suivre la dynamique du transfert de photosynthétats dans le temps. Elle vise, dans une première période dite de « pulse », à incuber individuellement les boutures de coraux pendant un temps voulu, dans des béchers préalablement remplis avec de l'eau de mer filtrée enrichie avec du bicarbonate marqué au ^{13}C ($NaH^{13}CO_3$, 98% d'atome, 372382, Sigma-Aldrich). Une partie des fragments sont congelés après la période de « pulse ». Dans le même laps de temps, des échantillons d'eau peuvent être prélevés afin de mesurer les taux de carbone organique total excrétés par la bouture de corail. Dans un deuxième temps, les boutures restantes sont transférées dans des béchers contenant de l'eau de mer filtrée non enrichie (période de « chase »). Les colonies sont alors prélevées et congelées après un temps donné (24 h, 48 h, 4 j) pour évaluer la cinétique du transfert de molécules carbonées au sein de la symbiose.

B) Séparation des phases et traitement des échantillons

La séparation des tissus animaux et des symbiotes s'effectue de la même manière qu'énoncé précédemment. Après avoir centrifugé les échantillons, le surnageant, contenant le tissu animal est récupéré dans un tube Falcon 50 mL. Les symbiotes sont re-suspendus à plusieurs reprises dans de l'eau de mer filtrée afin de les purifier d'une quelconque contamination animale, centrifugés à nouveau pour récupérer le culot. Culot et surnageant sont directement congelés à l'azote liquide et placés à -20°C avant d'être lyophilisés. Un fraction des lyophylisats obtenus sont placés dans des capsules en étain, à raison de 1 mg de poudre pour les algues et de 10 mg de poudre pour le tissu animal, pour être analysées afin de déterminer les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ et $^{15}N/^{14}N$, ainsi que les concentrations en carbone et en azote dans les échantillons. Ces mesures sont réalisées au moyen d'un spectromètre de masse (Delta Plus, Thermofisher Scientific) couplé à un analyseur élémentaire C/N (Flash EA, Thermofisher Scientific) par le Dr. Maguer à l'Institut Universitaire européen de la Mer (Plouzané, France).

Le carbone acquis, fixé via la photosynthèse (P_C) peut suivre diverses voies métaboliques : il peut être incorporé dans la biomasse algale (ρ_s) ou animale (ρ_h), respiré par l'animal (R_H) ou les symbiotes (Rs) ou encore excrété dans l'environnement sous forme de carbone organique particulaire et dissous (COP, COD), ou carbone organique total (COT). La quantité de carbone allouée à la calcification du squelette n'a pas été incluse au modèle puisqu'il a été montré qu'environ 25% de carbone inorganique dissous provient du milieu extérieur et que 75% proviendrait de la respiration de l'holobionte (Rc= R_H + Rs) (Erez 1978; Furla et al. 2000).

Le bilan général se résume donc de la manière suivante :

$$P_C = R_C + \rho_s + \rho_h + \rho_{TOC}$$

Les équations détaillées du modèle concernant les taux d'incorporation du carbone dans l'animal, le pourcentage de carbone fixé restant dans les divers compartiments, la quantité de carbone perdue par la respiration ou l'excrétion de carbone organique total ainsi que la quantité de photosynthétats transférés sont disponibles dans la thèse de Pascale Tremblay (2012).

5.3 L'utilisation de l'isotope ^{15}N de l'azote pour tracer le devenir des molécules azotées au sein de la symbiose

Le paragraphe suivant détaille les étapes permettant de suivre le devenir des molécules azotées au sein de la symbiose, technique préalablement développée par Grover et al. (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002) adaptée des équations de Dugdale & Wilkerson (1986).

La préparation de l'échantillon incluant la séparation des fractions animale et algale s'effectue de la même manière que celle énoncée dans le chapitre précédent (2.5.2). Dans le but de quantifier les flux d'azote, et donc les taux d'absorption entre le milieu extérieur et les fractions animale et algale, plusieurs paramètres ont été pris en compte : l'enrichissement ^{15}N dans les tissus coralliens ainsi que dans le milieu extérieur, le temps d'incubation ainsi que la biomasse de la bouture.

$$\rho = \frac{N_{mes} - N_{natural}}{(N_{enr} - N_{mes})\, t_{inc}\, S} \times M_{sample} \times M_N \times 10^6$$

N_{mes}: % ^{15}N measured in the sample
$N_{natural}$: natural abundance ^{15}N in control nubbins
N_{enr}: ^{15}N enrichment of the incubation medium
t_{inc}: incubation time of the nubbins (h)
S: nubbin surface area (cm^2)
M_{sample}: mass of the freeze-dried sample (mg)
M_N: particulate nitrogen mass (mg) per mg of tissue or zooxanthellae

L'enrichissement ^{15}N est mesuré sous la forme de :

Atom % excess : (*At.* %Nmes) – (*At.* %Nnatural)

5.4 Autre technique de mesure des taux d'absorption des sels nutritifs

La technique de déplétion (Godinot et al. 2009) a également été utilisée pour mesurer les taux d'absorption d'ammonium, de nitrate et de phosphate par les boutures de coraux. Les fragments de colonies (5 réplicats), préalablement nettoyés, ont été disposés individuellement dans des béchers contenant 200 mL d'eau de mer filtrée et maintenus dans un bain marie à la température et à l'intensité lumineuse désirées. Trois béchers supplémentaires, ne contenant aucune bouture, ont servi de blancs de mesure qui évaluent les dérives aléatoires qui pourraient être causés par l'adsorption du sel nutritif sur les parois du bécher, à sa consommation par des bactéries ou encore à la contamination de l'air. Les coraux sont acclimatés durant 30 minutes avant d'enrichir le milieu à la concentration désirée de NH_4Cl, $NaNO_3$ ou NaH_2PO_4 par le biais d'une solution mère. Un barreau aimanté a servi à homogénéiser le mélange. Des échantillons d'eau (10 mL) sont prélevés au moyen d'une seringue reliée à un filtre de 0,45 µm et cela immédiatement après le début de l'enrichissement, puis de manière séquencée, après 15 min, 30 min, 45 min, 60 min et 90 min. Les concentrations en ammonium ont été déterminées de deux manières, immédiatement après l'échantillonnage selon la méthode de Holmes et al. (1999) à l'aide d'un spectrofluorimètre Xenius ® (Safas, Monaco) ou à l'aide d'un autoanalyser de sels nutritifs (Technicon, Alliance Instrument, AMS, France) comme pour le nitrate et le phosphate.

Le taux d'absorption de sel nutritif est calculé comme la différence de concentration mesurée entre les temps de prélèvement initial et final (T0 et T90), après avoir corrigé les données des blancs de mesure, de la diminution du volume des béchers et vérification de la linéarité de la déplétion tout au long de l'expérience. Les taux d'absorption sont normalisés par la quantité de protéine, la densité de symbiotes ou la surface (cm^2) de chaque échantillon.

Figure 22. Incubation d'une bouture de *S. pistillata*

6. Extraction d'ADN des coraux durs et du corail mou pour la détermination du clade de Symbiodinium

L'extraction d'ADN de coraux durs et mous a eu pour but de déterminer le clade de *Symbiodinium* présent au sein des tissus de l'hôte animal. Pour les coraux scléractiniaires, l'extraction a suivi le protocole du kit « Genomic DNA buffer set » (Qiagen) et pour le corail mou, le « DNeasy Plant Mini kit » (Qiagen). Pour les deux types d'extraction, le corail est tout d'abord pilé dans du N_2 avec ou sans EDTA puis traité avec les divers tampons des kits respectifs. A la fin de l'extraction, l'ADN est quantifié puis stocké à 4°C avant de procéder aux étapes suivantes. La détermination du clade de *Symbiodinium* suit le protocole développé par Santos et al., (2002). Le séquençage est établi sur 600-700 paires de base du gène ribosomal associé aux chloroplastes (23S).

7. Statistiques

Tous les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-types ou erreurs standards (s.e.m ou SE). Afin de vérifier la normalité du jeu de données en question, un test de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro Wilk a été appliqué. L'homogénéité des variances a été vérifiée au moyen du test de Levene. Si ces conditions étaient remplies, l'effet des divers facteurs était testé au moyen d'analyses de variance (ANOVA simple, à deux facteurs ou analyse à mesures répétées) et suivi d'un test de comparaison multiple des moyennes (Tukey HSD). Si la normalité des données n'était pas vérifiée, et ceci, même après correction avec un logarithme naturel ou une racine carrée, des tests non-paramétriques étaient utilisés. Les valeurs étaient considérées significatives dans le cas où $p < 0.05$. Les analyses statistiques effectuées dans le cadre de la thèse ont été traitées au moyen du logiciel libre R (3.2.0) ou de Statistica version 10 (Softonic)

Chapitre III.

Axe 1- Acquisition des sels nutritifs chez les coraux tropicaux dans le contexte du réchauffement climatique : capacités et besoins

Photo : Coral Guardian

Chapitre III

Axis I - Uptake rates of inorganic nutrients by tropical corals in a warming ocean

3.1 Summary of the results

The following chapter summarizes the results obtained in two experiments performed according to the hypotheses presented in the introduction.

Aim 1: Do different coral species have the same capacities to acquire dissolved inorganic nitrogen and phosphorus? Do the uptake rates rely on the Symbiodinium genotype only, on the host genotype or on the whole holobiont?

To investigate whether the uptake rates of key nutrients (ammonium, nitrate and phosphorus) rely on the symbiont genotype (as suggested by Baker et al. (2013) and Pernice et al. 2015)) or are also related to the host, we chose four hard coral species (*T. reniformis*, *P. cactus*, *P. damicornis*, and *G. fascicularis)*, which harboured the same clade, C1, of *Symbiodinium.* We compared the uptake rates of 3 µM ammonium, nitrate and phosphorus under normal living conditions (25°C, 150 µmoles photons m^{-2} s^{-1}) and hypothesized that similar uptake rates, for each nutrient, would be observed for all species if these rates were only governed by the symbiont genotype. Otherwise, if the host plays a central role in nutrient acquisition, uptake rates would differ between coral holobionts. We introduced another coral species, *H. fuscescens*, harbouring clade D1, and tested whether this association was more or less competitive in acquiring nitrogen and phosphorus under normal living conditions compared to coral species in association with clade C1, as previously suggested (Baker et al. 2013). Results from Paper 1 showed that the uptake rates of ammonium and nitrate differed from one species to another (from 0.09 to 0.3 µmol N (mg prot)$^{-1}$ h^{-1}), and within the same *Symbiodinium* clade (from 9.66 E08 cell^{-1} h^{-1} to 1.09 E07 cell^{-1} h^{-1}). In addition, species also differed in their preference for nitrate or ammonium, since NO_3 was taken up at a higher rate than NH_4 in *P. cactus* (0.34 umol NO_3 h^{-1} mg prot^{-1} against 0.08 NH4 h^{-1} mg prot^{-1}) but the contrary was observed in *T. reniformis*. (0.05 µmol NO_3 h^{-1} mg prot^{-1} against 0.15 µmol NH_4 h^{-1} mg prot^{-1}) Finally, uptake rates of nitrogen and phosphorus by clade D1 were not significantly different from those of the other clades.

On the contrary to nitrogen, all coral species presented similar rates of PO_4 acquisition when normalized per mg prot^{-1} h^{-1} (0.05 to 1.5 µmol P (mg prot)$^{-1}$ h^{-1}) but differed when normalized by cell^{-1} h^{-1} (1.01 E08 to 7.1 E08). All together, these results suggest that the requirements in and/or capacity to take up inorganic nutrients in tropical corals do not depend on the symbiont clade only, but the host is also involved in this process.

In the second study, we investigated whether the scleractinian Red Sea coral *S. pistillata*, hosting *Symbiodinium* clade A in surface waters (5m depth) and clade C in deep environment (>40 m depth), presents distinct trophic strategies in carbon and nitrogen acquisition according to its depth location. For this purpose, we measured the photosynthetic rates of *S. pistillata* holobionts at two different light intensities, corresponding to the irradiances received in surface (350 µmoles photons m^{-2} s^{-1}) and below 40 m depth (20 µmole photons m^{-2} s^{-1}). We coupled these measurements to isotopic analyses in order to estimate the rates of carbon and nitrogen assimilation by shallow and deep holobionts and quantify their predation rates. Results first showed that clade C-holobionts were able to photosynthesize at 20 µmoles photons m^{-2} s^{-1}, and to present high rates of carbon translocation as well as high P :R (6.52±4.54), on the contrary to clade A-holobionts which only respired at this low light level. This result suggests that deep clade-C holosymbionts have a competitive advantage for carbon acquisition in deep environments. Clade A and C-holosymbionts had also a distinct pattern of nitrogen acquisition (both ammonium and nitrate) and allocation within the symbiosis. Clade A-holobionts presented a 6 and 1,5-3 fold higher uptake rate and retention of ammonium and nitrate at 350 and 20 µmoles photons m^{-2} s^{-1} than clade C-holobionts respectively. This higher uptake of inorganic nitrogen in clade A-holobionts can be explained by a lower availability of organic nitrogen (zooplankton) in surface waters, and by lower rates of plankton capture compared to clade C-holobionts. In addition, both holobionts exhibited unequal preferences and allocation patterns of nitrogen within the symbiosis. Clade A-holobionts showed a preferential uptake of ammonium than nitrate and a major accumulation of nitrogen in the algal fraction. In contrast, clade C-holobionts presented similar rates of ammonium and nitrate assimilation, mainly due to the low rates of ammonium uptake in comparison to clade A-holobionts. Whether this result is due to an ammonium repletion in the symbiosis is not consistent with the C:N ratio and N contents of deep holobionts, suggesting that clade C-holosymbionts are less efficient in scavenging nitrogen from the seawater than clade A-holobionts.

Indeed, the C :N ratio together with the C and N contents (umol mg^{-1}) showed that clade C-holobionts were nitrogen depleted in their algal and animal tissue fractions compared to clade A-holobionts. In conclusion, although Symbiodinium clade C confers its host an advantage for carbon acquisition, it is not efficient in acquiring inorganic nitrogen

Aim 2: What is the impact of a thermal stress-inducing bleaching on the uptake rates of nitrogen and phosphorus?

For this purpose, we tested the same 5 coral species related to article 1, either in symbiosis with clade C1 or D1. The species were however maintained for 10 days under a thermal stress (30°C) inducing bleaching and uptake rates measured at 30°C were compared with those obtained at 25°C. Following bleaching in all coral species (loss of symbionts and/or chlorophyll) rates of photosynthesis decreased for two coral holobionts (*P. cactus* and *P. damicronis*). Nitrogen acquisition (either ammonium or nitrate, or both) decreased in three out of the five coral species investigated (*P. cactus*, *P. damicornis* and *G. fascicularis* ; 50-100% decrease), suggesting that this decrease is a general response of corals to thermal stress. *P. damicornis* presented the lowest ammonium and nitrate uptake rates, which were correlated with the largest decrease in oxygen production. On the contrary to the above species, nitrogen uptake rates were not impacted in *H. fuscescens.* Rates of phosphorus uptake significantly increased in four out of the five species, again suggesting that it is a global response of corals to thermal stress. This higher demand in phosphorus was tightly correlated with a significant loss in chlorophyll content and differed from one coral species to another, as well as within the same *Symbiodinium* clade. For example, phosphorus uptake rate was higher in *P. damicornis* than *G. fascicularis*.

Article n°1

Limited phosphorus availability is the Achilles heel of tropical reef corals in a warming ocean

Scientific reports | Août 2016

[1]Leïla Ezzat, [2]Jean-François Maguer, [1]Renaud Grover and [1]Christine Ferrier-Pagès

Résumé

Au cours du XXème siècle, la température de surface de l'eau de mer a drastiquement augmenté, conduisant à de profondes modifications des cycles biogéochimiques et des processus écologiques. L'augmentation de la température est également responsable des évènements de blanchissement massif (pertes de symbiotes et/ou de pigments photosynthétiques) des symbioses autotrophes, telle que l'association corail-dinoflagellé. L'expulsion des symbiotes peut induire une déficience nutritionnelle importante chez l'animal puisque ces derniers représentent la principale source de nutriments de l'association symbiotique. En effets, les dinoflagellés puisent dans le milieu des sels nutritifs essentiels (dont l'azote et le phosphore), qui sont ensuite transformés en molécules organiques d'intéret, puis transférées à l'hôte. Cependant, l'impact nutritionnel du blanchissement corallien est encore peu connu, puisque la capacité des coraux à absorber les sels nutritifs en période de stress n'a pratiquement jamais été étudiée. Nous avons donc évalué les taux d'acquisition d'azote et de phosphore chez cinq espèces de coraux maintenus en condition de croissance "normale" et durant un stress de température. Nos résultats indiquent une réduction importante des taux d'acquisition d'azote durant le stress thermique, alors que les taux d'acquisition de phosphore ont significativement augmenté chez la plupart des espèces étudiées, suggérant un rôle clé de ce nutriment. Des expériences additionnelles ont montré que, pendant la période de stress, le phosphore permettait de maintenir une densité de symbiotes optimale anisi que des taux de photosynthèse élevés, et stimulait le transfert de photosynthétats ainsi que la rétention du carbone dans les tissus de l'hôte. Ces résultats mettent en lumière les capacités de différents holobiontes coralliens à absorber les sels nutritifs lors d'une période de stress thermique. Ils soulignent notamment l'importance du phosphore pour la maintenance de la symbiose.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.

[2]LEMAR - UMR 6539 UBO/CNRS/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

Limited phosphorus availability is the Achilles heel of tropical reef corals in a warming ocean

Scientific reports | August 2016

[1]Leïla Ezzat, [2]Jean-François Maguer,[1]Renaud Grover and [1]Christine Ferrier-Pagès

Abstract

During the 20th century, seawater temperatures have significantly increased, leading to profound alterations in biogeochemical cycles and ecosystem processes. Elevated temperatures have also caused massive bleaching (symbiont/pigment loss) of autotrophic symbioses, such as in coral-dinoflagellate association. As symbionts provide most nutrients to the host, their expulsion during bleaching induces host starvation. However, with the exception of carbon, the nutritional impact of bleaching on corals is still unknown, due to the poorly understood requirements in inorganic nutrients during stress. We therefore assessed the uptake rates of nitrogen and phosphate by five coral species maintained under normal and thermal stress conditions. Our results showed that nitrogen acquisition rates were significantly reduced during thermal stress, while phosphorus uptake rates were significantly increased in most species, suggesting a key role of this nutrient. Additional experiments showed that during thermal stress, phosphorus was required to maintain symbiont density and photosynthetic rates, as well as to enhance the translocation and retention of carbon within the host tissue. These findings shed new light on the interactions existing between corals and inorganic nutrients during thermal stress, and highlight the importance of phosphorus for symbiont health.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.

[2]LEMAR - UMR 6539 UBO/CNRS/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

Introduction

Mutualistic marine symbioses, which are widely distributed both geographically and taxonomically (Saffo 2001) involve partnerships between ectothermic organisms (Six 2009). These associations, which are thus particularly sensitive to thermal stress, are already strongly affected by climate change (Doney et al. 2012). Among them, the coral-dinoflagellate symbioses, which dominate tropical benthic ecosystems, experience severe bleaching events in warming waters (Roth et al. 2012). Bleaching results from the breakdown of the symbiosis and the subsequent expulsion of the corals' endosymbiotic dinoflagellates and/or the reduction in photosynthetic pigments (Hoegh-Guldberg et al. 2007). However, dinoflagellates play a central role in the coral host nutrition (Muscatine et al. 1984). They photosynthesize energy-rich compounds (called photosynthates), which are massively transferred to the host for its own energetic requirements and growth (Muscatine et al. 1984). They also recycle the host metabolic wastes (Rosset et al. 2015) and take up dissolved inorganic nitrogen (DIN) and phosphorus (DIP) from seawater (Grover et al. 2003; Pernice et al. 2012; Rosset et al. 2015). Dissolved nutrients are then transformed into essential organic molecules either respired by or stored in the symbiotic association (Miller and Yellowlees 1989). In turn, the coral host, like all animals, is able to prey on a wide range of detrital and living particles (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009), and shares this nutrient source with its algae (Tremblay et al. 2014). As most corals rely on their endosymbionts for their nutrition and survival, the increasing frequency in bleaching events may lead to a global collapse of coral reefs all around the world oceans by the 2050s (Hoegh-Guldberg et al. 2007). There is therefore a crucial need to discern which factors, in addition to thermal stress, reduce or exacerbate the bleaching susceptibilities of scleractinian corals.

Nutrient availability is one of the key biological factors, which has to be taken into account to further explain the corals' response to thermal stress (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009; Langdon and Atkinson 2005; Wooldridge 2013): it is indeed quite clear now that consumption of particulate organic nutrients such as plankton (i.e. heterotrophic feeding (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009)) allows corals to overcome the decrease in autotrophic nutrient acquisition by symbionts (Grottoli et al. 2006) during or after thermal stress. Therefore, species that are able to increase their heterotrophic capacities will have a higher resistance and resilience to bleaching (Ferrier-Pagès et al. 2010; Grottoli et al. 2006; Palardy et al. 2005).

Availability in dissolved inorganic nitrogen and phosphorus (DIN and DIP respectively) in reef environments can also strongly affect coral bleaching susceptibility (Tanaka et al. 2007; Wooldridge 2013). However, whether these nutrients reduce or exacerbate bleaching is still subject to debate, because of the following contradicting results; on the one hand, a moderate DIN and DIP enrichment was shown to reduce bleaching and enhance coral photosynthetic performance and calcification under non-stressful (Godinot et al. 2009; Tanaka et al. 2007) and stressful conditions (Béraud et al. 2013; Chauvin et al. 2011; Holcomb et al. 2010; Langdon and Atkinson 2005). On the other hand, high DIN concentrations can also stimulate symbiont cell division (Cunning and Baker 2013; Falkowski et al. 1993), which in turn may induce a cascading of events (such as higher retention of photosynthates in symbiont cells and CO_2 limitation) resulting in coral bleaching (Rädecker et al. 2015; Wooldridge 2013). Wiedenmann et al. (2013) finally pulled things together and proposed a conceptual model, in which the N:P ratio of inorganic nutrients in seawater was the most important factor in explaining coral bleaching. In particular, these authors showed that nitrate enrichment, coupled to phosphorus starvation resulted in an increase of sulpho- to phospholipid ratios in *Symbiodinium*, and caused a destabilization of their thylakoid membranes, increasing the corals' bleaching susceptibility.

Significant changes in seawater N:P ratios will occur in the future, due to ocean warming and/or eutrophication of coastal waters (Santos et al. 2014; Van de Waal et al. 2009). Rising sea surface temperatures can indeed enhance near surface stratification, which will inhibit vertical mixing, and reduce access to nutrients by corals (Tyrrell 1999). Conversely, nitrogen fixation activity of coral-associated microorganisms will increase (Santos et al. 2014), as well as nutrient concentrations in eutrophicated coastal areas (Johnson and Harrison 2015). Whilst corals will not be able to change their nutritive environment, they can modulate their interaction with it. Yet, little is known about the corals' ability to regulate DIN and DIP uptake rates under thermal stress. In particular, no study has explored i) the corals' capacity to decrease the nitrate and increase the phosphorus uptake rates under thermal stress to keep a balanced N:P ratio inside the holobiont tissue (Wiedenmann et al. 2013), and ii) whether this capacity depends on the symbionts or the host. The first aim of this study was therefore to investigate which member of the symbiotic association (the symbionts, the host or both), drives the uptake of inorganic nutrients and whether thermal stress affects this uptake.

For this purpose, we used a set of aquaria either maintained at 25°C or 30°C, and we measured the thermally induced variations in DIN and DIP uptake rates by four scleractinian coral species (*Turbinaria reniformis*, *Pocillopora damicornis*, *Pavona cactus* and *Galaxea fascicularis*) in symbiosis with the same clade C1 of *Symbiodinium*. We also considered a fifth species, the soft coral *Heteroxenia fuscescens*, in symbiosis with clade D1. We tested the hypotheses that i) uptake rates will be similar in all scleractinian coral species (and different in the soft coral species) if they only depend on the symbiont activity, or they will vary both as a function of the host and of its physiological state; ii) thermal stress will affect the uptake of inorganic nutrients; iii) corals will decrease their nitrogen and increase their phosphate uptake rates, to avoid phosphorus limitation, which may exacerbate bleaching (Wiedenmann et al. 2013). In addition, as *H. fuscescens* presents rhythmic pulsations, which enhance photosynthesis (Kremien et al. 2013), we tested the hypothesis (Wild and Naumann 2013) that these pulsations would also enhance the uptake of nutrients, under both normal and thermal stress conditions. The second aim of this study was to assess the importance of phosphorus availability for the coral resistance to thermal stress. For this purpose, we exposed one of the above species (*Pocillopora damicornis*) to a 2 µM DIP enrichment and compared its physiology and stress resistance to non-enriched corals. We tested the hypothesis that phosphorus enrichment will improve the resistance of corals to thermal stress. Broadly, our results provide detailed insights into the changes in the acquisition of inorganic nutrients by scleractinian and soft coral species and they further confirm the relevance of studying shifts in N:P ratios to assess the response of reef corals to future climate change.

Materials & Methods

First experiment: experimental design and biological material

The first experiment was conducted with four tropical scleractinian coral species, belonging to different families, *Turbinaria reniformis* (Dendrophylliidae), *Pocillopora damicornis* (Pocilloporidae), *Pavona cactus* (Agariciidae), *Galaxea fascicularis* (Oculinidae) and the soft coral species *Heteroxenia fuscescens* (Xeniidae). All corals originated from the Red Sea and maintained in aquaria for several months at 25°C ± 0.5. The total daily light received by our corals in these conditions (13 E m^{-2} d^{-1} which corresponds to 150 µmol photons m^{-2} s^{-1}) was equivalent to the one received on reefs at 3-5 m depth (a typical ideal day with no cloud generates a total of 14 E $m^{-2}d^{-1}$ day at 3m depth, while a cloudy day generated 6.2 E $m^{-2}d^{-1}$ (Davies 1991). A total of 48 nubbins per species was prepared by cutting 4 parental colonies (12 nubbins per colony) with a bone cutter for hard corals or scissors for soft corals. Nubbins were then evenly divided in twelve 20 L tanks (with 4 nubbins per species per tank) in order to maximize the genetic diversity. Aquaria received a continuous supply of oligotrophic seawater (< 0.5 µM dissolved inorganic nitrogen and < 0.1 µM inorganic phosphorus) at a flow rate of 20 L h^{-1} (i.e. one tank renewal every hour). Control conditions were maintained using submersible resistance heaters (Visi-ThermH Deluxe, Aquarium Systems, France) and metal halide lamps (Philips, HPIT 400W, Distrilamp, Bossee, France). Submersible pumps ensured proper water mixing inside each tank. Nubbins were fed twice a week for 2 weeks with *Artemia salina* nauplii to improve their recovery. Three weeks prior to the experiments, feeding was stopped to minimize the impact of organic nutrients on the uptake rates of inorganic nutrients (described below). Before the measurements, four nubbins from each species (one per colony) were frozen at -80°C for the *Symbiodinium* clade determination. DNA was extracted using the DNeasy Plant mini Kit (Qiagen) for *H. fuscescens* and the PowerSoil DNA Isolation Kit (MO-BIO) for the other species. For the determination of symbiont phylogeny, we followed the protocol of Santos et al. (2002), and sequenced a 600 to 700 bps fragment of chloroplastic 23S ribosomal gene. All coral species harboured *Symbiodinium* clade C1, with the exception of *H. fuscescens*, which hosted clade D1 (see S1).

Uptake of inorganic nutrients at 25°C and 30°C

Six aquaria were kept under control conditions. In the remaining six tanks, seawater temperatures were raised from 25°C ± 0.5°C (time T_0-25°C) to 30°C ± 0.5°C over a 10 day-period (0.5°C per day) and maintained constant for 10 days (time T_1-30°C). Samples from the 5 coral species were collected from both the control and experimental tanks at T_0 and T_1 to assess their photosynthetic performances as well as their uptake rates of DIN and DIP (NH_4, NO_3, PO_4) as described below. Nubbins were then frozen at -20°C prior to the determination of the chlorophyll and protein content as well as the symbiont density.

Throughout the experiment, inorganic nutrient concentrations were measured in the different aquaria twice a week using an Autoanalyzer (Alliance Instrument, AMS, France), following the protocol of Le Corre & Tréguer (1978). Concentrations remained below 0.5 µM for total DIN and below 0.1 µM for DIP. Net photosynthesis (P_n) and respiration (R) rates were assessed at 0 and 150 µmol photons m^{-2} s^{-1} on four coral nubbins per species (from 4 different colonies) and temperature using the respirometry technique (Hoogenboom et al. 2010b). Gross photosynthesis (Pg) was assessed by adding the absolute value of R to Pn. Data were normalized to total protein content and surface area for hard coral species. For protein and chlorophyll concentrations as well as symbiont density, tissue was removed from the skeleton in FSW using an air-brush, homogenized using a potter grinder and divided into three aliquots for each measurement, performed according to Rodolfo-Metalpa et al. (2006) for symbionts, Jeffrey & Humphrey (1975) for chl a and c_2 and Smith et al. (1985) using a BCAssay kit (Interchim, Montluçon, France) for protein content determination. Surface area of nubbins were assessed using the wax dipping technic (Veal et al. 2010).

Inorganic nutrient uptake was assessed, at the same time for the control and experimental tanks, at T_0 and T_1, by the depletion technique (Godinot et al. 2011b). In short, for each nutrient and incubation time, four nubbins per species (one nubbin per colony) were placed in individual 200-mL beakers maintained in a water bath at the respective experimental temperatures (25°C or 30°C) and light intensity (150 µmol photons m^{-2} s^{-1}). Three control beakers, without coral nubbin, were used to monitor for potential changes in water chemistry due to adsorption onto beaker surface, consumption by microbial activity, or to air contamination. After a 30 min acclimation period for corals, seawater was enriched with a stock solution of either 10 mM NH_4Cl, $NaNO_3$, or NaH_2PO_4, in order to reach a final concentration of 3µM for all nutrients. Stirring bars were added to ensure a proper homogenization of the nutrient mixture in the beakers.

Water samples (10 mL) were collected from each beaker and filtered through a 45 micron syringe filter immediately after the enrichment and then subsequently after 15 min, 30 min, 45 min, 60 min and 90 min. Ammonium concentrations were determined immediately after sampling, according to the spectrofluorimetric method of Holmes et al. (1999). Samples for nitrate and phosphate were frozen, prior to measurements using an autoanalyzer (Alliance Instrument, AMS, France). Uptake rates of each inorganic nutrient were calculated as the difference in concentration between the 0 and 90 minutes time points, after data correction for the diminution of the beakers' volume and verification of the linearity in the depletion during the experiment. Uptake rates were normalized to the symbiont density (which changed during the thermal stress) or to the total protein content, which did not change during the whole experiment. N-uptake:P-uptake ratios were calculated at T_0 and T_1 by dividing the total amount of nitrogen (NH_4 and NO_3) by the amount of phosphorus taken up.

Effect of soft coral pulsation on the uptake rates of inorganic nutrients

Polyp pulsation by *H. fuscescens* under non stressful conditions was shown to improve photosynthesis, by enhancing oxygen and inorganic carbon exchange between seawater and polyp tissue (Kremien et al. 2013) and was suggested to favor uptake of inorganic nutrients (Wild and Naumann 2013). To investigate whether thermal stress had an effect on the rhythmic pulsation of this species, we monitored the number of tentacle pulsation per minute of four nubbins of *H. fuscescens* maintained under non-stressful (25°C) and thermal stress (30°C) conditions. In addition, we also assessed the effect of polyp pulsation on the uptake rates of inorganic nutrients (NH_4, NO_3 and PO_4). For this purpose, additional 32 coral nubbins (8 nubbins per colony) were cut from 4 parental colonies, different from the ones used for the uptake rates assessment. A clove oil solution (Phytosun aroms; Omega Pharma, France) was chosen to anaesthetize corals and inhibit their movements. For this experiment, each coral nubbin was only maintained for 1h30 under a diluted clove oil solution (0.2 ppt). A concentration lower than 0.5 ppt was shown to be completely harmless to corals (Boyer et al. 2009; Frisch et al. 2007),. In addition, preliminary tests were performed to test the harmlessness of the clove oil at different dilutions, by comparing rates of photosynthesis and respiration as well as chlorophyll and symbionts concentrations with and without clove oil addition. We didn’t observe any effect of clove oil on the above parameters for concentrations below 0.5 ppt (results not shown).

Following optimization, eight nubbins per nutrient were disposed in distinct 200-mL beakers, half of them were placed in FSW with clove oil and the other half in FSW only (control condition). When coral tentacles were totally immobilized by the clove oil, NH_4, NO_3 or PO_4 solutions were added to reach a final concentration of 3 µM, N or P, and nutrient depletion was followed as described above. Nutrient uptake rates were normalized to the total protein concentration of each nubbin.

Second experiment: Carbon budget under PO_4^{3-} supply

Based on the results obtained in the first experiment, we tested the effects of phosphate enrichment and thermal stress on the carbon budget of *Pocillopora damicornis*, which was chosen as a model species. We used ^{13}C-bicarbonate, to follow the inorganic carbon incorporation rate and transfer between the host and symbionts, as described in (Tremblay et al. 2012). 160 nubbins were generated from four parental colonies and equally distributed among 8 aquaria maintained under control conditions as previously described. Corals were exposed to: 1) natural seawater, called control conditions, with low nutrient levels (0.5µM N and 0.1 µM P; 4 aquaria) and 2) phosphorus enriched conditions, called "P" (0.5 µM N and 2 µM P; 4 aquaria). Tanks were continuously supplied with a solution of sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) pumped from a stock solution via a peristaltic pump. The stock solution was renewed every three days and added to the tanks at a constant flow rate of 0.3 L h^{-1}. Nutrient concentrations in the tanks were monitored twice a week using an Autoanalyzer (Alliance Instrument, AMS, France). Nubbins were maintained under these conditions at 25°C (T_{25}) for four weeks. Seawater temperatures were then raised from 25°C ± 0.5°C to 30°C ± 0.5°C over a 10 day-period in half of the tanks and was kept constant for 7 days (T_{30}).

Rates of net photosynthesis (Pn), R and Pg, as well as zooxanthellae density, were measured as previously described at 0 and 150 µmol photons m^{-2} s^{-1} on six nubbins per treatment at T_{25} and T_{30}. Symbiont respiration rates were assessed on six freshly isolated symbiont samples according to Tremblay et al. (2012). The resulting oxygen fluxes were converted to carbon equivalent based on molar weights according to Anthony & Fabricius (Anthony and Fabricius 2000). The maximum relative electron transport rate (rETRmax) and the non-photochemical quenching (NPQmax) were assessed on the same six coral nubbins, at 25°C and 30°C at different light levels using a Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometer (Walz, Germany) according to Ralph and Gademann (2005).

Calcification rates were measured on six nubbins per treatment using the buoyant weight technique(Davies 1989). All results were normalized to the surface area of each respective nubbin.

The carbon budget was assessed at the end of T_{25} and T_{30} using the $H^{13}CO_3$ labelling technique according to Tremblay et al. (2012). For each treatment, eight nubbins (2 per colony) were disposed in individual beakers filled with 200mL FSW, enriched with a final concentration of 0.6mM of $NaH^{13}CO_3$ (98 atom %^{13}C, no. 372382, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Nubbins were incubated for 5h and transferred to beakers containing non-enriched seawater (FSW) for two chase periods (0 and 24h). At the end of each chase period, 4 nubbins were directly frozen at -20°C to assess ^{13}C enrichment in animal tissue and symbionts. Additionally, four control nubbins were incubated in non ^{13}C- enriched seawater. The resulting %^{13}C enrichment was quantified using a Delta Plus Mass spectrometer coupled to a C/N analyser (Thermofisher Scientific, Bremen, Germany).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Statistica 10. Data were checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and for Homoscedasticity using Levene's test. Data were log-transformed if necessary. Two ways ANOVAs were used to test i) the effect of temperature and coral species (independent factors) on nutrient uptake rates, and other physiological parameters measured in the first experiment; ii) the effect of temperature and phosphorus enrichment (independent factors) on all parameters measured in the second experiment. Calcification rates and the maximum rETR and NPQ were analysed using a general linear model for parametric repeated measures analysis of variance with "Temperature" as dependent variable and "Treatment" as categorical predictor. In case the assumption of sphericity (independency of the repeated measures) was not fulfilled, the hypotheses were tested using the multivariate approach (Wilks test) for repeated measurements. Differences in the rates of carbon assimilation and the percentage of carbon remaining within the symbiosis, were assessed using three-ways ANOVA (with temperature, phosphorus enrichment and host-symbiont compartments as independent factors). A t-test was finally processed to test the effect of clove oil on nutrient uptake rates by *H. fuscescens*. In case significant differences were observed between treatments, analyses were followed by a posteriori test (Tukey's test). Differences were considered significant when $p<0.05$.

Results

First experiment

Physiological parameters

Significant differences were observed between species and temperature for symbiont density and chlorophyll content per mg protein (ANOVA, p=0.008 and p=0.0106, Fig.1a, 1b). At 25°C, *H. fuscescens* presented the highest concentration of chlorophyll (Tukey HSD, p<0.04, Fig.1a), while *G. fascicularis* had the highest symbiont density (Tukey HSD, p<0.05). At 30°C, all coral species experienced a decrease in either symbiont density or chlorophyll content. Chlorophyll concentrations indeed decreased for all species compared to 25°C (ANOVA, p<0.0001) except for *P. cactus* (Tukey HSD, p=0.11). Symbiont density was significantly reduced compared to control conditions in *P. cactus*, *P. damicornis* and *T. reniformis* (Tukey HSD, p<0.03). A significant effect of species and temperature was observed for the rates of respiration (R), net photosynthesis (P_n), and gross photosynthesis (P_g) normalized to protein content (ANOVA, p_1<0.0001; p_2=0.005, p_3<0.0001, Fig.1c, 1d). Both at 25°C and 30°C, *P. cactus* showed the lowest rate of P_n and R (and thus P_g) (Tukey HSD, p<0.03 for Pn, and p<0.001 for R), while *T. reniformis* showed higher respiration rates compared to the other species (Tukey HSD, p<0.008) except *H. fuscescens* (Tukey HSD, p>0.05). At 30°C, *P. cactus* and *P. damicornis* showed a significant reduction in P_n compared to 25°C (Tukey HSD, p=0.002 and p=0.006 respectively).

Uptake of inorganic nutrients at 25°C and 30°C

Species and temperature significantly affected nutrient uptake rates normalized to protein content (ANOVA, p=0.008, Fig.2, Fig.3), or to symbiont density (ANOVA, p<0.039, see Supplementary Table S2). At 25°C, *P. cactus* presented one of the highest NO_3 uptake rate per protein content (Tukey HSD, p<0.03, Fig.2b, Fig.3), and one of the highest PO_4 uptake rate per symbiont cell (Tukey HSD, p<0.014, Supplementary Table S2). Ammonium uptake rate per symbiont cell was higher for *P. damicornis* compared to *P.cactus*, *G. fascicularis* and *H. fuscescens*. *P.damicornis* presented higher N-uptake:P-uptake ratios, around 9, compared to *T.reniformis and H.fuscescens* (Tukey HSD, p<0.004, Supplementary Table S2). Thermal stress had a significant effect on nutrient uptake rates, normalized to protein. At 30°C, NH_4 uptake rates significant decreased in *P. damicornis* (Tukey HSD, p<0.03, Fig.2a), while NO_3 uptake rates decreased in *P. damicornis*, *P.cactus* and *G. fascicularis* (Tukey HSD, p<0.02).

Effects of thermal stress on nitrogen uptake rates normalized to symbiont cell were significant in the presence of nitrate, with a net observed decrease in the acquisition rate of NO_3 in *P. cactus* (Supplementary Table S8, Tukey HSD, $p<0.05$) and a further but not significant decrease for *T. reniformis and G. fascicularis* (Tukey HSD, $p>0.05$). PO_4 uptake rates significantly increased in *T. reniformis, G. fascicularis, H. fuscescens* and *P. damicornis* when normalized to protein content (Tukey HSD, $p<0.04$, Fig. 2c, Fig.3), and in the first three species when normalized to symbiont cell (Tukey HSD, $p<0.01$, see Supplementary Table S2). They however significantly decreased for *P. cactus* (Tukey HSD, $p<0.05$). Regarding the effect of tentacle pulsation of the soft coral *H. fuscescens* on nutrient uptake, pulsation rates did not vary significantly between 25°C and 30°C (10 puls/min at 25°C to 8.5 puls/min at 30°C; T-test, $p>0.05$). However, nitrogen uptake rates significantly decreased as tentacles stopped pulsating (ANOVA, $pNH_4=0.009$; $pNO_3=0.033$, see Supplementary Table S4). A similar but non-significant trend was observed for the PO_4 uptake rate (ANOVA, $pPO_4>0.05$). *P.damicornis* and *G.fascicularis* showed a drastic decrease in their N-uptake:P-uptake ratios (Tukey HSD, $p<0.0074$, Supplementary Fig. S3).

Figure 1. a) Total chlorophyll content (µg chl (a+c_2) (mg prot)$^{-1}$) and b) Zooxanthellae density (nb Zoox (mg prot)$^{-1}$) of the five different coral species at 25°C (white color) and 30°C (black color), c) Rates of net photosynthesis (µmol O_2 h^{-1} (mg prot)$^{-1}$) and d) respiration (µmol O_2 h^{-1} (mg prot)$^{-1}$) for the different coral species at 25°C and 30°C. Data are expressed by means ± standard deviations. Significant effects of the temperature factor were highlighted by an asterisk (*).

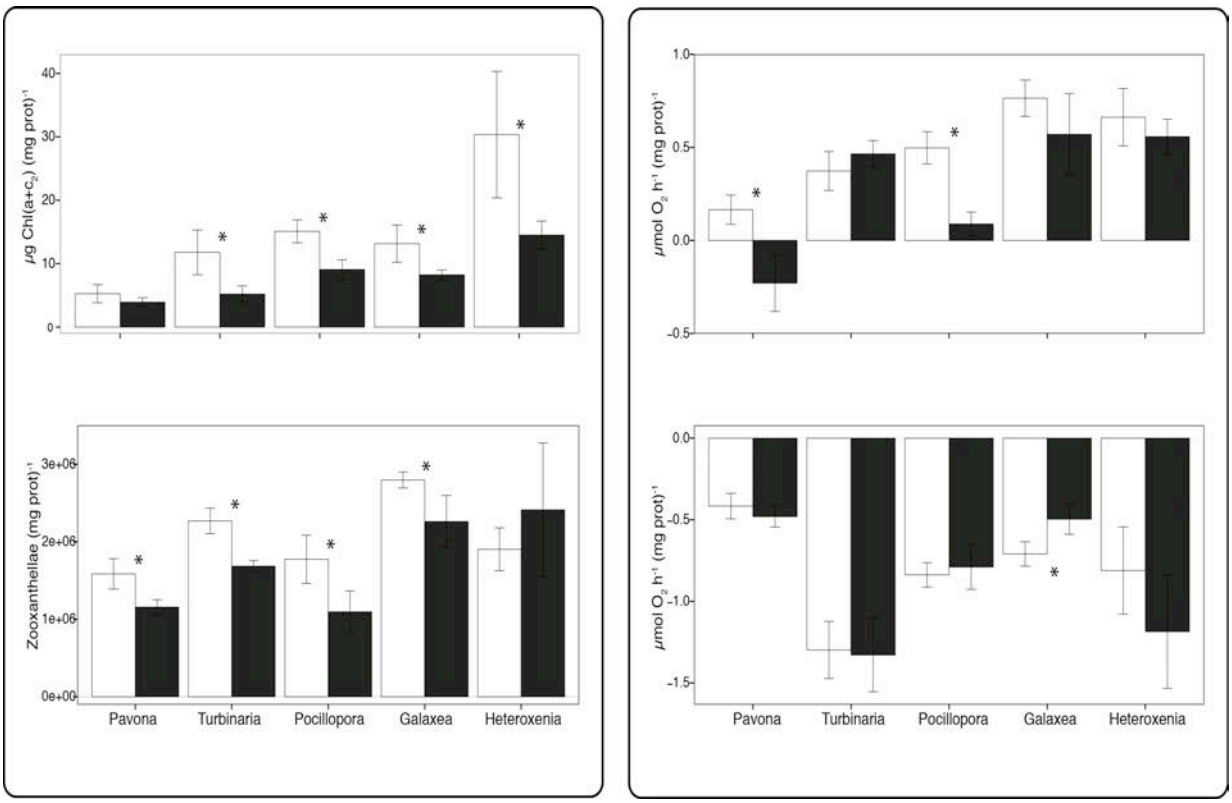
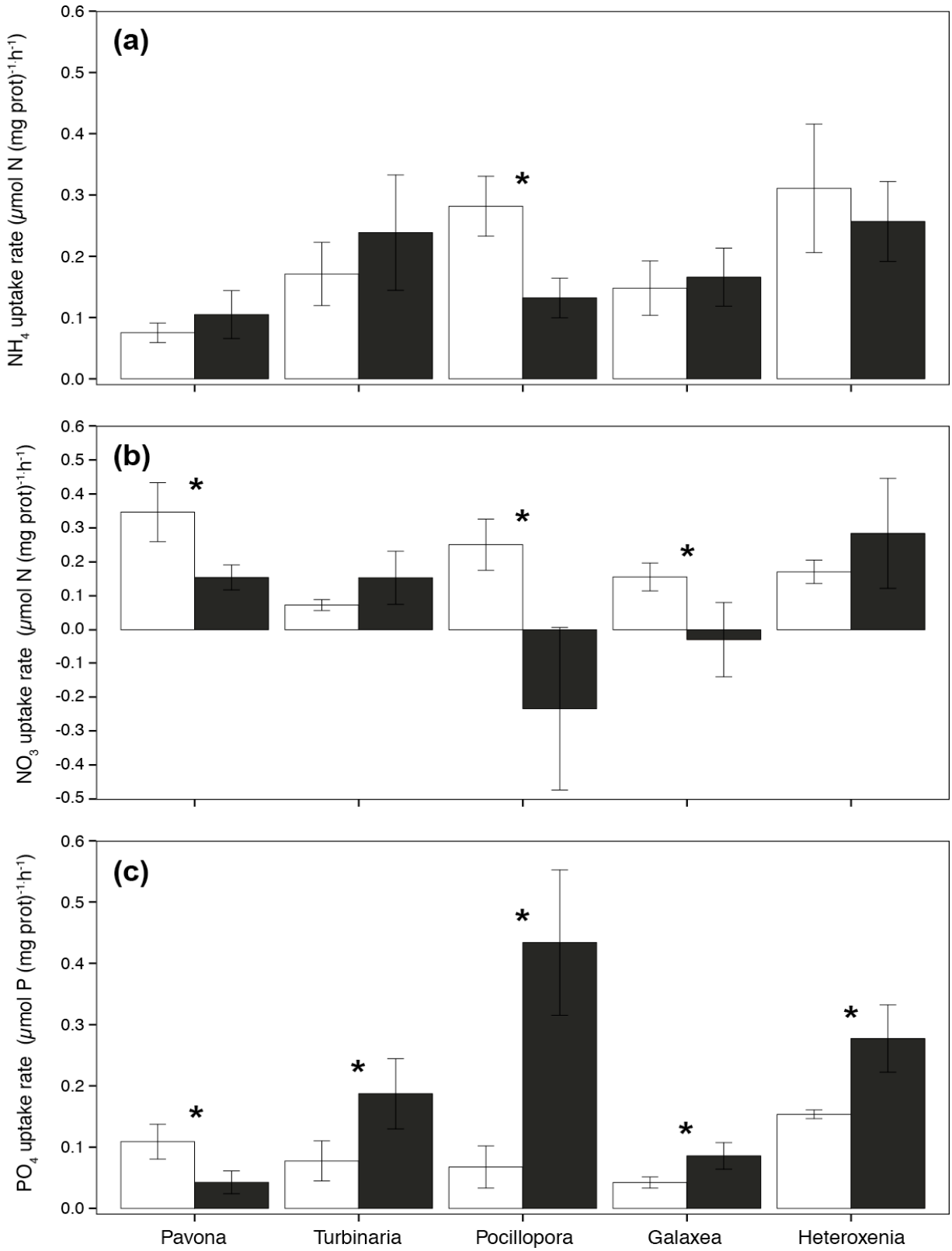


Figure 2. a) Uptake of ammonium (µmol NH_4 h^{-1} (mg prot)$^{-1}$) b) nitrate (µmol NO_3 h^{-1} (mg prot)$^{-1}$)) and c) phosphorus (µmol PO_4 h^{-1} (mg prot)$^{-1}$)) for the different species at 25°C (white color) and 30°C (black color). Data are expressed by means ± standard deviations. Significant effects of the temperature factor were highlighted by an asterisk (*).



2nd Experiment: Effect of thermal stress and phosphate enrichment on the rates of carbon assimilation and translocation

At 25°C, no significant difference was observed between control and P-enriched corals regarding the symbiont density, the rETR max and NPQmax, and the gross photosynthesis expressed in equivalent carbon (PgC) (Tukey HSD, p>0.05). After one week at 30°C, control corals showed a significant decrease in symbiont density per surface area (-20%, Tukey HSD, p=0.008, Supplementary Fig. S6), in the rates of PgC (Tukey HSD, p=0.049, Supplementary Fig. S5) and NPQmax (Tukey HSD, p=0.048, from 0.36 to 0.25). Conversely, corals maintained under PO_4^{3-} enrichment did not show any significant sign of bleaching nor change in their rates of gross photosynthesis compared to those at 25°C (Tukey HSD, p> 0.05). They maintained high values of rETRmax (74 against 55 in control corals) and NPQmax (0.33 against 0.25 in control nubbins) with increasing temperature, higher than control corals (Tukey HSD, prETR=0.023; pNPQ=0.021, Fig.4c) In addition, at 25°C, ^{13}C-bicarbonate labelling showed significant interactions between compartments (either zooxanthellae or animal tissue) and treatment for the rate of carbon assimilation (ANOVA, p<0.0001). While carbon was equally incorporated in symbiont and animal tissue in control corals (Tukey HSD, p>0.05, Fig.4a), tissues from corals maintained under phosphorus enrichment showed a higher carbon incorporation rate and percentage (50% against 14%) (Tukey HSD, p<0.001). The same trend was observed at 30°C (34% against 12%; Tukey HSD, p<0.001).

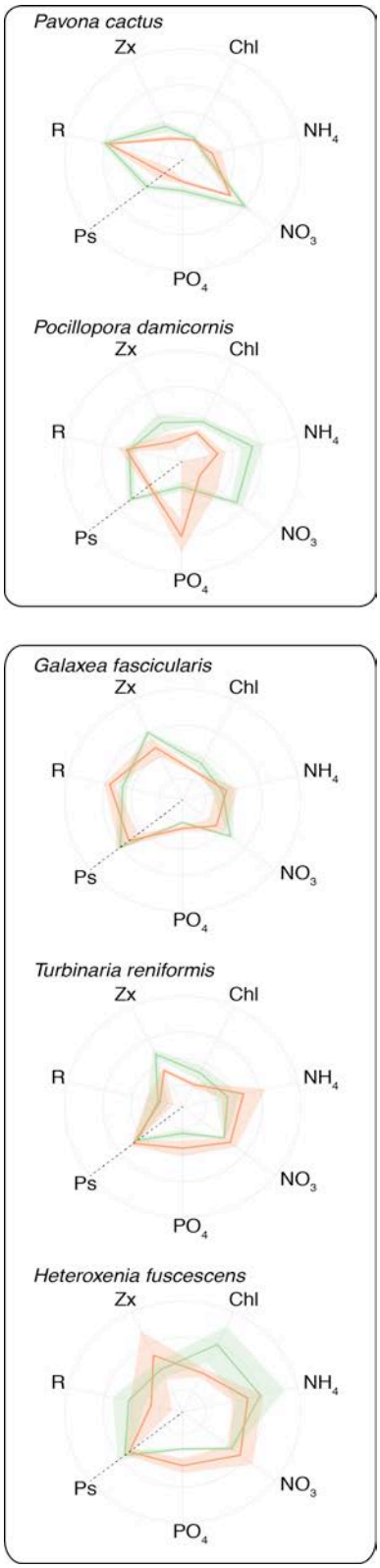
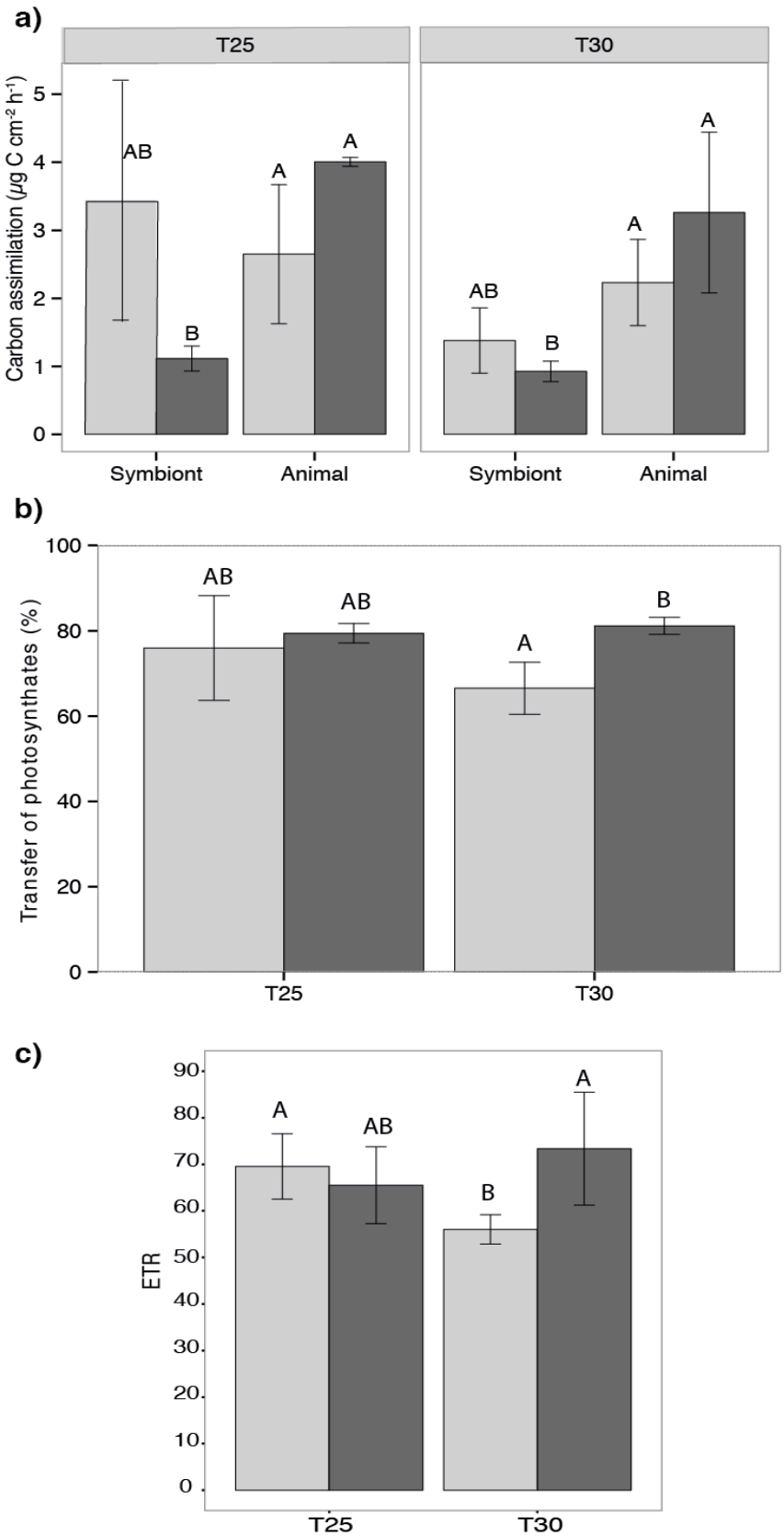


Figure 3. Radar plots highlighting the behavior of each coral species according to the different temperature steps (25°C, green color and 30°C, red color) studied parameters: Rates of NH_4, NO_3, PO_4 uptake, chlorophyll and zooxanthellae concentrations as well as net photosynthesis and respiration rates (µmol O_2 h^{-1} (mg prot)$^{-1}$).

Carbon translocation rates were also higher in P-enriched corals at 30°C compared with control corals (81% against 67%; Tukey HSD p=0.013, Fig.4b). Symbiont respiration rates were two times higher at 25°C and 30°C for control corals compared to enriched nubbins, with values of 0.5 µg C cm^{-2} h^{-1} against 1-1.3 µg C cm^{-2} h^{-1} for control (Tukey HSD, p25°C=0.017; p30°C=0.0014), while the percentage of carbon respired was higher in enriched corals than control nubbins at 30°C (44% against 25%; Tukey HSD, $p<0.05$). Finally, no significant differences were observed for the calcification rates either at 25°C and 30°C, with equivalent values arising 14 to 16 µg C cm^{-2} h^{-1} at 25°C and from 11 to 13 µg C cm^{-2} h^{-1} at 30°C for control and enriched nubbins (ANOVA, $p>0.05$).

Figure 4. a) Carbon assimilated (µg C h^{-1} cm^{-2}) either in the symbiont or animal tissue compartments, b) Percentage of carbon transferred from the symbiont to the animal tissue and c) Maximum relative electron transport rate (rETRmax) according to the different temperature steps and the nutrient treatments (Control corals: light grey, Enriched corals: dark grey)



Discussion

Our analysis of the DIN and DIP uptake rates of four scleractinian and one soft tropical coral species shows that both the host and the symbionts regulate the uptake of nutrients and points to higher DIP uptake rates under thermal stress. In addition, corals maintained under DIP enrichment avoided bleaching and maintained high rates of photosynthesis, conversely to control, non-enriched corals, which experienced both a decrease in symbiont density and in the acquisition of inorganic carbon. All together, these observations strongly suggest that phosphorus is an essential nutrient for the symbiosis during stress events. Conversely, nitrogen uptake rates significantly decreased under thermal stress, either due to coral bleaching and/or to avoid excess nitrogen in the coral tissue. Overall, our results highlight the importance of nitrogen and phosphorus availability in the coral response to thermal stress.

The capacity to take up and assimilate inorganic nutrients in corals is linked to the presence of symbionts in their tissue, since asymbiotic corals are not able to use this nutritional source (Muscatine and D'elia 1978). In addition, it has been shown that uptake rates increase with light and thus with the symbionts' photosynthetic activity (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Muscatine and D'elia 1978). All together, these observations suggest that the uptake of inorganic nutrients is driven by the symbionts. However, in this study, DIP and DIN uptake rates normalized to symbiont cell or holobiont biomass, as well as the ratios of DIN:DIP uptake, presented a threefold variation among the scleractinian species hosting the same *Symbiodinium* clade. This result suggests that the observed changes in uptake rates were either due to the metabolism of the host or more certainly of the host-symbiont association, which should be considered as a whole organism (Hoadley et al. 2015). The variability in DIN:DIP uptake potentially reflects different nutrient needs and ecological trade-offs in the allocation of nitrogen and phosphorus amongst macromolecules associated with diverse functions (Moore et al. 2013). Furthermore, *H. fuscescens* exhibited higher DIN uptake rates during its pulsating activity, as previously demonstrated for the jellyfish *Cassiopeia* sp. (Jantzen et al. 2010). Rhythmic pulsations were already shown to improve photosynthesis by preventing seawater refiltration (Kremien et al. 2013). All together, these results suggest that the host has implemented mechanisms to enhance the supply of nutrients to its symbionts. These pulsations might have prevented bleaching of *H. fuscescens* under thermal stress, although this can also be attributed to clade D1, more thermal resistant than clade C1 (LaJeunesse et al. 2010).

All scleractinian coral species bleached in response to thermal stress with a reduction in rates of net photosynthesis for *P. cactus* and *P. damicornis*. Despite this loss of symbionts and/or chlorophyll, rates of phosphate acquisition per protein content or symbiont cell were significantly enhanced in four out of the five species investigated, and for both clades C1 and D1. Since the same trend was observed with *S. pistillata* in symbiosis with another *Symbiodinium* clade (clade A)(Godinot et al. 2011c), increased phosphate uptake seems to be a general response of corals to thermal stress, independently of the clade genotype or on the polyp activity. Although it might only be due to a temperature dependency of the phosphorus transporters at the cell membranes (D'Elia 1977), our results tend to confirm the fact that phosphorus is actively needed in corals to offset the negative effect of thermal stress (Wiedenmann et al. 2013) and that corals underpin an active control mechanism for phosphorus uptake and allocation, as observed in plants (Amtmann and Blatt 2009). Indeed, our second experiment, in which DIP enrichment of the seawater prevented bleaching and increased the photosynthetic efficiency and the translocation of photosynthates during thermal stress, highlights the importance of phosphorus to maintain the physiological functions in corals under thermal stress. Wiedenmann et al. (2013) also demonstrated that limited phosphorus availability induces a shift from phospholipids to sulpholipids in symbiont membranes, and increases the susceptibility of corals to temperature-induced bleaching (Tchernov et al. 2004). In addition to being a structural membrane component, phosphorus takes part in the synthesis of nucleic acids and other energy generation processes (Beardall et al. 2009). It is also involved in cellular signalling via thylakoid protein phosphorylation (Vener 2007). It has to be noticed that although corals are able to increase their rates of phosphorus acquisition under warming conditions, a minimal concentration of inorganic phosphorus, which remains to be determined, is required to avoid bleaching.

In contrast to phosphorus, three coral species (*P. cactus*, *P. damicornis* and *G. fascicularis)* out of the five investigated showed a significant decrease in nitrogen uptake rates normalized to protein content. Nitrogen uptake rates normalized to symbiont cell, however, remained unchanged between 25 °C and 30 °C, except for nitrate in *P. cactus*. A similar finding was observed with the scleractinian coral *S. pistillata* associated with clade A1 symbionts (Godinot et al. 2011c), which significantly decreased both nitrate and ammonium uptake rates down to zero, at 33 °C. These results suggest that the reduction in nitrogen uptake is a general response of corals to thermal stress, independently of the clade genotype.

Whether this reduction is a consequence of bleaching (and reduced symbiont activity), or is due to a physiological control or feedback aimed at decreasing the amount of nitrogen entering the symbiotic association, requires further investigation. Both hypotheses have pros and cons. The first hypothesis is in agreement with studies showing that nitrogen uptake is mostly driven by the symbionts (D'Elia et al. 1983; Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Pernice et al. 2012). In *H. fuscescens*, which did not experience any bleaching or decrease in photosynthetic activity, due to its pulsating activity and/or its association with the thermally resistant clade D1 (Baker 2001; Jones et al. 2008; LaJeunesse et al. 2010), no decrease in nitrogen uptake rate was indeed observed. A decrease in nitrogen uptake rates in the scleractinian coral species may lead to nitrogen limitation, which in turn may impair protein repair (Falkowski et al. 1993), weaken the photosynthetic capacities, and decrease carbon fixation, as already noted in mulberry leafs (Chaitanya et al. 2001). This may explain why a supplementation of seawater with ammonium or nitrate was shown to increase the resilience of coral species to stress-induced bleaching (Béraud et al. 2013; Chauvin et al. 2011; Tanaka et al. 2014). On the other hand, the second hypothesis is in agreement with studies showing an increased bleaching susceptibility of heat-stressed corals in presence of high nitrogen and low phosphorus concentrations (Nordemar et al. 2003; Schlöder and D'Croz 2004; Shantz et al. 2016; Wiedenmann et al. 2013). High nitrogen availability for symbionts during thermal stress tends to favour symbiont growth and reduce the amount of photosynthates transferred to the host (Wooldridge 2013), together with inducing a higher phosphorus limitation (Wiedenmann et al. 2013). This could explain the reduction in nitrogen uptake rates by the symbiotic association during thermal stress, in order to reduce the amount of nitrogen available to symbionts.

Overall, the decrease in the N:P uptake ratios during thermal stress, which is consistent for most coral species, may imply that the corals internally experience an increase in their N:P ratio, maybe due to reallocation of nitrogen that was stored in tissue reserves (Miller and Yellowlees 1989). The relevance of the N:P ratio for terrestrial and marine symbiotic associations has recently been discussed through a meta-analysis (Shantz et al. 2016) which showed that a decoupling in mutualism performance occurs whenever phototrophs benefit from nutrient enrichment at the expense of their heterotrophic partners. It has also been demonstrated in recent studies (Ezzat et al. 2015; Wiedenmann et al. 2013), in which changes in seawater nutrient ratios induced changes in carbon acquisition, translocation and allocation within the symbiosis.

The benefits that the symbiotic association retrieves from a low N:P ratio are highlighted in our second experiment, in which the supplementation of seawater with 2 µM phosphate, and the subsequent decrease in the N:P ratio, prevented bleaching, increased the photosynthetic capacities, the carbon translocation, as well as the carbon retained into animal biomass during thermal stress.

Understanding how corals respond to alterations in seawater N:P ratio, or how they adjust their internal N:P ratio in response to environmental changes, is an important task for coral reef research today. Our results clearly show that corals are phosphorus-limited during thermal stress and that they are able to increase their acquisition of phosphorus independently of the *Symbiodinium* clade involved in the symbiotic association. Further investigations, which will trace the fate of nitrogen and phosphorus within the symbiosis at elevated temperatures, are however needed to bring detailed insights into the processes involved in the nutrient acquisition and allocation by corals under thermal stress.

Acknowledgments

We would like to thank C. Rottier, A. Labbe and D. Desgre for laboratory assistance and technical help during the experimental setup as well as Robin Cristofari, Jeroen van de Water, Jérôme Durivault, Didier Zoccola, Nathalie Le Roy and Rémy Melkonian for their advices throughout the experiment. Many thanks to Pr. Denis Allemand, Director of the Centre Scientifique de Monaco for scientific support. Finally, we are grateful to two anonymous reviewers as well as the Editorial board for their constructive and helpful comments on the manuscript. This project was supported by the CSM and the Institut Européen de la mer. Financial support to L.E. was provided by the Centre Scientifique de Monaco.

Please have a look at the appendix n°4 for further details on the statistical analyses and supplementary results.

Article n° 2

Carbon and nitrogen acquisition strategies of shallow and deep holobionts of the Scleractinian coral *S. pistillata*

En préparation | Juillet 2016

[1]Leïla Ezzat, [2,3]Maoz Fine, [4]Jean-François Maguer, [1]Renaud Grover and [1]Christine Ferrier-Pagès

Résumé

Certaines espèces de coraux répondent aux changements environnementaux en s'associant à différents clades de symbiotes et en formant ainsi des holobiontes distincts. La plupart des études portant sur le rôle physiologique des algues symbiotiques ont ciblé leur capacité thermotolérante, alors que leur importance nutritionnelle reste encore peu connue. Nous avons donc étudié l'effet de la diversité génétique en *Symbiodinium* sur les stratégies trophiques de l'espèce de corail tropical *S. pistillata*, originaire de la Mer Rouge. *S.pistillata* est associé au clade A en surface et au clade C en profondeur (50 m). Globalement, Stylophora-clade C présentait un taux de fixation de carbone significativement plus faible que Stylophora-clade A, quelque soit l'éclairement reçu. Cependant, Stylophora-clade C a maintenu un rapport P:R > 1 sous faibles éclairements, alors que ce rapport est inférieur à 1 pour Stylophora-clade A. Par la suite, l'efficacité photosynthétique du clade C sous faible lumière présente cependant un coût physiologique important : une plus faible efficacité à absorber l'azote inorganique dissous (ammonium et nitrate) comparé à l'association avec le clade A. De plus, bien que Stylophora-clade C présentait des taux de prédation supérieures à son congénère de surface, son contenu en carbone et azote était significativement réduit comparé à Stylophora-clade A. Ceci suggère que les apports autotrophes et hétérotrophes étaient insuffisants afin de couvrir les besoins métaboliques nutritionnels journaliers de Stylophora-clade C. De manière générale, ces résultats montrent que le recrutement du clade C permet à l'espèce *S. pistillata* de s'acclimater à différentes profondeurs et de maintenir une connectivité entre les communautés de surface et de profondeur, moyennant un coût métabolique significatif.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine 1er, 98000 MC

[2]The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel

[3]The Interuniversity Institute for Marine Science, 88000 Eilat, Israel

[4]Laboratoire de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, UBO/CNRS/IRD/IFREMER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané

Carbon and nitrogen acquisition strategies of shallow and deep holobionts of the Scleractinian coral *S. pistillata*

In prep. | July 2016

[1]Leïla Ezzat, [2,3]Maoz Fine, [4]Jean-François Maguer, [1]Renaud Grover and [1]Christine Ferrier-Pagès

Abstract

Some reef building corals respond to changes in their environmental conditions by recruiting various symbiont communities, and forming distinct holobionts. Most studies on the functional significance of the symbiont clades have focused on their thermal tolerance while their nutritional significance is still poorly known. Here, we provide new insights into the influence of *Symbiodinium* genotype diversity on the trophic strategies of the Red Sea coral *S. pistillata* associated with clade A *Symbiodinium* in shallow waters and clade C in deep environments. Overall, clade C-holobionts presented a lower autotrophic carbon acquisition than clade A-holobionts, due to a much lower irradiance received in their deep environment, but were able to maintain positive P:R ratios > 1.0 under low light, in contrast to clade A-holobionts whose P:R ratio decreased to below 0.5. The benefit of hosting clade C in low light environment came at a cost: an overall lower efficiency in the acquisition of dissolved inorganic nitrogen (ammonium and nitrate) compared to clade A-holobionts. Altough clade C-holobionts had higher feeding rates, their total carbon and nitrogen contents were significantly reduced compared to clade A-holobionts, suggesting that both autotrophic and heterotrophic inputs were, at the time of our experiment, insufficient to sustain maximal daily metabolic nutritional requirements of clade C-holobionts. Broadly, these results show that clade C recruitment allows *S. pistillata* to acclimate to different depth habitats and to maintain a vertical connectivity between shallow and deep reef communities, but this acclimation comes at a significant metabolic cost.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine 1er, 98000 MC

[2]The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel

[3]The Interuniversity Institute for Marine Science, 88000 Eilat, Israel

[4]Laboratoire de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, UBO/CNRS/IRD/IFREMER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané

Introduction

Coral reefs support one of the most diverse and productive biological communities on earth. Their success owe from the symbiotic relationship that corals build with photoautotrophic dinoflagellate algae, commonly named zooxanthellae, that can sustain up to 95% of the daily energetic demand of the holobiont (Muscatine 1990; Muscatine et al. 1984). While symbionts need light and constrain their host to thrive in shallow water areas, corals can however form large structures named mesophotic reefs, in deeper waters. Mesophotic reefs refer to deep but light-dependent coral ecosystems (Hinderstein et al. 2010), thriving between 30 m and 80 m in the Caribbean (Kahng et al. 2010), to more than 100 m in some locations with exceptionally clear waters, such as the Red Sea (Lesser et al. 2009; Winters et al. 2009). Although photosynthesis is limited by the low light levels, these reefs host a wide diversity of taxa due to numerous upwelling events and internal waves, that deliver significant amounts of inorganic nutrients and particulate organic matter (Leichter and Genovese 2006; Lesser et al. 2009).

Corals present adaptations to grow under low irradiance conditions. In order to increase and optimize the light capture and rates of autotrophic carbon production at depth >30 m, corals undergo morphological changes (Einbinder et al. 2009; Mass et al. 2007; Nir et al. 2011) as well as modifications in the photo-physiological traits of their zooxanthellae (Lesser et al. 2000; Lesser et al. 2009; Wyman et al. 1987). They also compensate their low photosynthate production by increasing the heterotrophic input (Alamaru et al. 2009; Crandall et al. 2016; Einbinder et al. 2009; Lesser et al. 2010; Mass et al. 2007; Muscatine et al. 1989). Corals can finally harbour different *Symbiodinium* clades depending on the depth at which they thrive (Finney et al. 2010; Lesser et al. 2010). For example, in some Caribbean corals, *Symbiodinium* A and B were found predominant in tissue exposed to high irradiance (surface waters) while *Symbiodinium* C was dominant in shaded tissue of deep corals (Rowan and Knowlton 1995; Rowan et al. 1997). Similar observations have been made in the northern Red Sea with the species *S. pistillata*, which shifts from hosting clade A in shallow waters to clade C in deeper environments, below 40 m depth (Mass et al. 2007; Winters et al. 2009). Although numerous studies have now acknowledged the diversity and flexibility of *Symbiodinium* under different light environments, the functional significance of these associations remains unexplored.

It has been suggested that physiological diversifications in *Symbiodinium* species can confer ecological growth advantages to their associated coral host, by presenting different thermal and light tolerances as well as capacities in nutrient acquisition (Abrego et al. 2008; Jones and Berkelmans 2010; Little et al. 2004; Venn et al. 2008b). Among studies on the functional significance of the clades, most of them have focused on their thermal tolerance (Berkelmans and Van Oppen 2006; Howells et al. 2012; Hume et al. 2016; Silverstein et al. 2015) while their nutritional significance is still poorly known, although it has important physiological consequences for the host (Baker et al. 2013; Leal et al. 2015; Loram et al. 2007; Starzak et al. 2014). Baker et al (2013) however showed that the acquisition of nitrogen and carbon by *Acropora tenuis* was clade- and temperature dependent. Other studies on sea anemones also demonstrated that *Symbiodinium* genotypic diversity affects the quantity and the quality of photosynthates translocated to their animal host (Leal et al. 2015; Loram et al. 2007; Starzak et al. 2014), as well as the heterotrophic capacities of the host (Leal et al. 2015). Overall, these studies suggest that symbiont diversity directly relates to the trophic plasticity of the holobiont. Because acquisition of both auto-and heterotrophic nutrients is critical for coral growth and reproduction (Ferrier-Pages et al. 2000; Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009; Muscatine et al. 1989; Muscatine and Porter 1977), as well as for their resilience to stress (Grottoli et al. 2006) , a better understanding of the nutritional capacities of the corals associated with different Symbiodinium clades will thus help predict the response of each association to a change in its environmental conditions. Until now, no direct simultaneous comparison exists between auto-and heterotrophic performance of shallow and deep corals associated with different *Symbiodinium* genotypes, although deep reefs can serve as asylums for corals under climate change conditions (Bongaerts et al. 2010; Riegl and Piller 2003).

Here, we address how *Symbiodinium* genotypic diversity changes the holobiont capacity to acquire both organic and inorganic nutrients such as carbon and nitrogen. For this purpose, we studied the Red Sea coral *S. pistillata*, which harbours clade A1 in shallow waters and clade C in deeper environments, forming two different holobionts for the same species. We measured their grazing rates, as well as their photosynthesis rates and acquisition of ^{13}C-bicarbonate and ^{15}N-ammonium (NH_4) and nitrate (NO_3), under the light conditions of surface and deep waters. Inorganic carbon and nitrogen acquisition by the symbionts, together with host prey capture, provide the proxies to score nutritional plasticity of these symbioses. All together, these measurements will provide information to how *S. pistillata* survive both in shallow and deep environments.

Getting new insights into the trophic behaviour and the metabolic processes associated with mesophotic corals is essential to understand the ecology and biology of these unique habitats as well as the vertical connectivity existing between shallow and deep environments, which may be of great importance for the future health and resilience of their associated ecosystems.

Material and Methods

Biological material and experimental setup

Experiments were performed Mid November 2015 at the IUI, in the Gulf of Eilat (Israël). Ten mother colonies of the Red Sea coral *Stylophora pistillata* were sampled directly on the reef, in front of the Marine Station. Five colonies were taken at 5 m depth and five others were sampled at 50 m depth. The main *Symbiodinium* genotype hosted by each colony was checked according to the protocol of Santos et al. (2002). As repeatedly observed (Byler et al. 2013; Lampert-Karako et al. 2008; Mass et al. 2007; Nir et al. 2014; Winters et al. 2009), the main clade associated to shallow colonies was A1 while C populated the deep colonies. Fifteen nubbins of about 3 cm long were then cut from each mother colony, tagged, and briefly distributed in 4 open tanks for clade A and four other tanks for clade C. Aquaria were continuously supplied with unfiltered oligotrophic seawater from the reef, and maintained in outdoor water tables with photon flux density (PFD) sets that corresponded to those found at 50 m and 5 m at the month of collection. Ambient PFD was calibrated with data from the International Monitoring Program in the Gulf of Eilat (http://www.iui-eilat.ac.il/NMP/Default.aspx). These PFDs (13.8 mol photons m^{-2} d^{-1} for surface and 0.8 mol photons m^{-2} d^{-1} for deep holobionts) were obtained by applying filters above and around the tanks. The water tables received continuous water flow from seawater maintained at 24°C, which was the mean temperature between the surface temperature (24.5°C) and the deep one (23.5°C). Coral nubbins were maintained maximum 2 days until the achievement of the measurements described below.

Rates of net photosynthesis, respiration and Chlorophyll content measurements

Changes in oxygen production were monitored for 60 minutes on 5 nubbins per holobiont (Clade A and C) (from 5 mother colonies) at 0 µmol photons m^{-2} s^{-1} (R, respiration), and at two mean irradiances corresponding to the surface and deep mean PFD levels: 350 µmol photons m^{-2} s^{-1} (shallow, High light, HL) and 20 µmol photons m^{-2} s^{-1} (deep, Low light, LL) respectively.

Nubbins were individually placed in glass chambers, filled with a known volume of 0.45 µM filtered seawater (FSW) and homogenized with a stirring bar. Glass chambers were maintained at 24°C by the use of a water bath equipped with a Unisense optode (oxygen-sensitive minisensor) connected to the Oxy-4 software (Chanel fiber-optic oxygen meter, Presens, Regensburg, Germany). Optodes were calibrated against air-saturated and dinitrogen-saturated water for the 100% and 0% oxygen, respectively. Estimations of net photosynthesis (P_n) at LL and HL and R were measured by regressing oxygen production against time. Gross photosynthesis (P_g) was assessed by adding R to P_n. At the end of each incubation, coral nubbins were frozen at -20°C prior to the subsequent determination of total chlorophyll content according to Hoogenboom et al. (Hoogenboom et al. 2010b). Briefly, coral tissue was extracted from its skeleton in 10 mL filtered sea water (FSW) with an air-brush, homogenized with a potter grinder and transferred into a 15 mL tube before being centrifuged at 8000 g for 10 mn at 4°C. The pellet was re-suspended into 5 mL 99% acetone and stored at 4°C overnight. The next day, samples were centrifuged at 11 000 g for 15 min at 4°C before assessing the chlorophyll content according to the equations of Jeffrey and Humphrey (1975). Data were normalized to the surface area (cm^2) of each nubbin using the wax-dipping technique (Davies 1989). Conversions of oxygen fluxes to carbon equivalents, based on molar weights, were calculated according to Antony and Fabricius (2000). P:R ratio, which traduces the autotrophic capability of an organism to self-maintenance was obtained with the following equation : $P:R = (P_C \times 12)/(R_C \times 24)$, *where* $P_C = Pg \times 12/P_Q$ and $R_C = R \times (12\times R_Q)$. P_C represents the amount of carbon acquired during photosynthesis; 12 is the C molecular mass; P_Q is the photosynthetic quotient, equivalent to 1.1 mol O_2: mol C; R_C is the amount of carbon consumed by respiration and R_Q is the respiratory quotient, equal to 0.8 mol C:mol O_2 (Muscatine et al. 1981). Net photosynthesis was considered to be efficient for 11h light (length of the day in November in Eilat: http://www.iui-eilat.ac.il/NMP/Default.aspx) and respiration for 24h. P:R ratio was calculated about a period time of 24h.

Additional nubbins (n=5 per condition from 5 mother colonies) were used to assess the respiration rates of freshly isolated symbionts. For this, tissues were extracted from live coral samples in 10 mL of FSW and centrifuged at the corresponding temperature. After centrifugation, pellets were re-suspended in 20 mL FSW and disposed for 20 min in aquaria before processing to the respiration rate measurements as previously exposed. Data were normalized to the surface area of each nubbin.

Chlorophyll a fluorescence of photosystem II (PSII)

The maximum photosynthetic efficiency of PS II (Fv/Fm) was assessed on 5 nubbins per condition using an imaging pulse amplitude modulation (PAM) fluorometer [DIVING-PAM, Walz, Germany(Schreiber et al. 1986)]. After a 10 min dark acclimation, nubbins were exposed to a weak pulse of red light (F_0 values; max. intensity <1 mol photon m^{-2} s^{-1}, width 3µs, frequency 0.6kHz) and then to a saturating pulse (F_m values; max. intensity 5000 µmol photon m^{-2} s^{-1}, width 800 ms). Rapid light curves (RLC) were processed on coral nubbins exposed during 20 s to 10 different light intensities (from 0 to 1200 µmoles photons m^{-2} s^{-1}). The relative electron transport rate (rETR) as well as the non-photochemical quenching (NPQ) values were also estimated.

$NaH^{13}CO_3$ and $^{15}NH_4Cl$, $^{15}NaNO_3$ labelling

The following incubations were performed according to Tremblay et al. (2012) and Grover et al.(2002) (according to Figure 1). For each holobiont (clade A and C), 40 coral nubbins (8 per colony) were placed in individual beakers filled with 200 mL FSW. Beakers and corals were transferred back to the outdoor water tables; 20 beakers were incubated under low light (20 µmol photons m^{-2} s^{-1}) and the other 20 beakers under high light (350 µmol photons m^{-2} s^{-1}) for 5 hours (T0). In addition, for each light level, 10 beakers were enriched with 0.6 mM $NaH^{13}CO_3$ (98 atom %^{13}C, #372382, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 3 µM $^{15}NH_4Cl$ (98 atom %^{15}N, #24858029, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) while 10 beakers received 0.6 mM $NaH^{13}CO_3$ and 3 µM $^{15}NaNO_3$ (98 atom %^{15}N, #24862444, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). The concentrations have been chosen to provide sufficient enrichment for further analysis. At the end of the 5 hours incubation, half nubbins were sampled for T0 while the other half were transferred into non-enriched seawater for one chase period of 24 hours (T24). All nubbins were frozen at -20°C at the end of each time point (T0 and T24) before tissue extraction (air pick), separation of the zooxanthellae from the animal tissue by centrifugation and freeze-drying of the extracts for conservation. The subsequent determination of %^{13}C, %^{15}N, C and N measurements in the algal and animal compartments were performed by the use of a Delta plus Mass spectrometer (Thermofisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to a C/N analyser (Flash EA, Thermofisher Scientific). Assimilation rates of bicarbonate, ammonium and nitrate in symbionts and host tissues were calculated according to the equations fully described in Tremblay et al. (2012) and Grover et al.(2003). Data were normalized according to the coral surface area.

Grazing rate

Grazing rates were determined at each light level (LL, HL) on 10 nubbins per holobiont (from 5 colonies) following Houlbreque et al. (2004a) by incubating individual fragments in 400 mL plexiglas chambers. Chambers were connected to a water bath to maintain the temperature constant. After the full expansion of the polyps, the experiment started by delivering 1000 Artemia salina nauplii L^{-1} (previously quantified using a Bogorov counting chamber). Artemia concentration was then determined in triplicate after 0, 15 min, 30 min, 45 min and 60 min, and nauplii were replaced in the chamber after counting. Three additional chambers without coral were used to account for a possible decrease in nauplii concentration due to natural death. Feeding rates were calculated as the decrease in the number of preys during the incubation, and were normalized to the nubbin surface area.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 10 (Statsoft, Chicago, IL). All data were expressed as means ± standard deviation. Normality and homoscedasticity of the data residuals were tested using Kolmogorov-Smirnov (using Lilliefors corrections) and Levene tests, and data were log-transformed when required. A one-way ANOVA was used to test the holobiont “clade” effect (Shallow/Deep) on the chlorophyll content, rETR, NPQ, Fv/Fm and on the respiration rates. Two-way ANOVAs were performed on the rates of net and gross photosynthesis as well as on the grazing rate and C and N content (µmol mg^{-1}) to test the effects of the clade and light (LL/HL). A similar test was assessed on C:N measurements with clade and fraction as factors. A general linear model for parametric repeated measure analysis of variance (ANOVA) was performed on the rates of carbon and nitrogen (ammonium and nitrate) assimilation as well as on the rates and percentage of photosynthate translocation using the different time points (T0 and T24h) as dependent variables and light and clade as categorical predictors. The independency of repeated measures (assumption of sphericity) was tested. If not fulfilled, the hypotheses were tested using the multivariate approach (Wilks test) for repeated measurements. Moreover, we have to acknowledge the fact that no significant differences were observed between the two sets of ^{13}C measurements for all treatments and at any timesteps. When there were significant differences, the analyses were followed by *a posteriori* testing (Tukey's test). Finally, a Pearson correlation was used to attest the relationship between i) carbon fixation and translocation, feeding rates and ii) ammonium, iii) nitrate assimilation rates in the algal fraction at T24. P-values were considered for $p<\alpha$, $\alpha = 0.05$.

Results

Physiological measurements

No visual stress or bleaching was detected in any of the examined corals. Grazing rates and chlorophyll concentration were significantly lower in clade A than clade C-holobionts (Fig. 2a),b) ; Table 1, ANOVA, $p<0.05$ and $p=0.0208$). Clade A-holobionts also showed lower maximal photosynthetic efficiency (F_v/F_m), (0.48 ± 0.08) compared to clade C-holobionts (0.63 ± 0.02) (ANOVA, $p<0.001$). On the contrary, $rETR_{max,}$ $NPQ_{max,}$ and respiration rates (R) were significantly higher in clade A than clade C holobionts (Table 1c,d, Figure S1, Tukey HSD, $p<0.038$, $p<0.05$ and $p<0.001$). Overall, high light stimulated Pn in both holobionts (Fig. 1 Supplementary ; Tukey HSD, $p<0.0001$). While Pn was not different between holobionts under high light, it was lower in clade A-holobionts under low light (Fig. 1 Supplementary Tukey HSD, $p<0.0001$). Therefore, clade A-holobionts reduced their P:R values with decreasing light intensities from 2.27±0.36 to 0.35±0.27 (Tukey HSD, $p=0.003$). While clade C-holobionts showed significantly higher P:R than clade A-holobionts (Tukey HSD, $p<0.018$), their P:R ratio did not significantly change with irradiance, 11.62±4.87 to 6.5±4.53 at high and low light respectively (Tukey HSD, $p>0.05$).

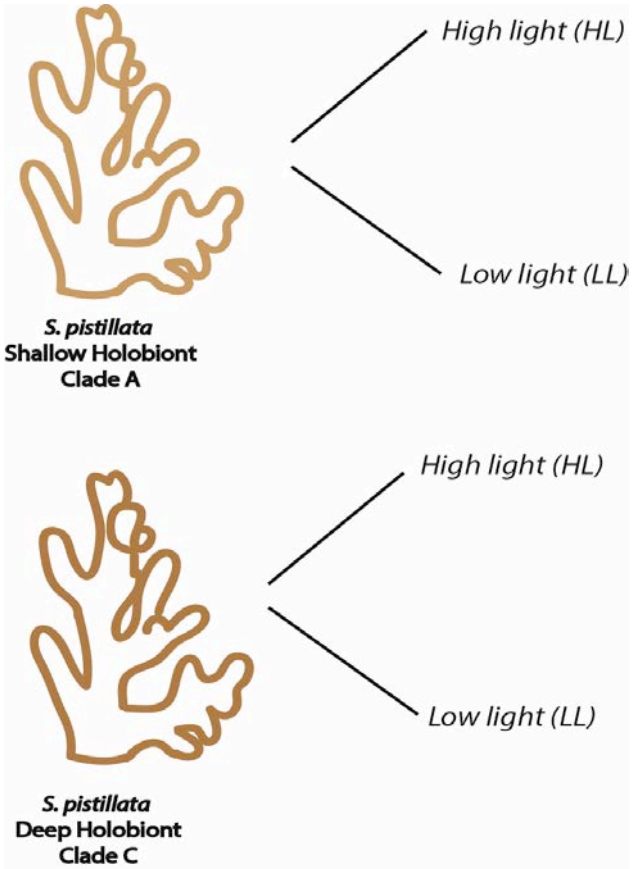
$NaH^{13}CO_3$ labelling – Carbon assimilation within the symbiosis

Effect of light on carbon acquisition and allocation within the symbiosis

In both holobionts, at T0 and T24, high light significantly increased the amount of carbon fixed (Figure 3a). ; Table 2 ; Tukey HSD, $p<0.01$), translocated from the symbionts to the host (Figure 3b) ; Tukey HSD, $p<0.0032$) and incorporated into the symbionts (Figure 4a) ; Tukey HSD, $p<0.0001$) or into the host tissue (Tukey HSD, $p=0.03675$). After 24h under high light, there was also a significant amount of carbon fixed in the symbionts lost as respiration and/or mucus (Tukey HSD, $p<0.0001$).

Comparison between holobionts

Under high light, at T0, clade A *Symbiodinium* fixed and translocated 30 to 50% more carbon than clade C *Symbiodinium* (Figure 3a) ; Table 2 ;Tukey HSD, $p<0.0002$), suggesting a higher photosynthetic efficiency of clade A *Symbiodinium* at this light level. However, similar amounts of autotrophic carbon were retained in the host tissue and symbionts of both holobionts (Table 2, Tukey HSD, $p>0.05$). This observation indicates that clade A holobionts immediately lost a large fraction of the fixed carbon into respiration and/or mucus release.



^{13}C-$^{15}NH_4$	^{13}C-$^{15}NO_3$	Pn	Pg	R	Chl	rETR	NPQ	Fv/Fm	Feeding
Sampling at T0 & T24 **N=10 x 2**		**N=5**				**N=5**			**N=5**
Sampling at T0 & T24 **N=10 x 2**		**N=5**							**N=5**
T0 & T24 **N=10 x 2**		**N=5**							**N=5**
T0 & T24 **N=10 x 2**		**N=5**				**N=5**			**N=5**

Figure 1. Detailed table summarising the experimental set up and the different parameters studied according to the number of nubbins used per timesteps. T0 (5h incubation) and T24 (chase)

After 24h (T24), similar values of carbon incorporation rates were still observed in clade A and C Symbiodinium (Tukey HSD, $p>0.05$), but slightly more carbon was retained in the host tissue (Tukey HSD, $p=0.0194$). Overall, these observations suggest that the carbon remaining for the growth of the symbionts and host tissue was similar in both holobionts under high light. At low light, carbon fixation of clade A Symbiodinium tended to be 50% lower than for clade C Symbiodinium, although not significant because of the high variation observed. Carbon translocation rates were however 30% lower in clade A-holobionts although similar amounts of autotrophic carbon were incorporated into the host tissue and symbionts (Table 2, Tukey HSD, $p>0.05$). These observations again suggest that, while carbon fixation and translocation were different between the two holobionts, the amount of carbon allocated to host and symbiont growth was equivalent.

$^{15}NH_4Cl$, $^{15}NaNO_3$ labelling-Nitrogen assimilation within the symbiosis

Ammonium assimilation

At both light levels and timesteps (T0 and T24), clade A symbionts retained ten to twenty times more NH_4 than their host (Figure 5a) ; Table 3 ; Tukey HSD, $p<0.0001$), while clade C symbionts retained the same amount of NH_4 as their host (Table 3 ; Tukey HSD, $p>0.2566$). All together, these results showed that clade A symbionts translocated 4.8 – 5.8 % of the total NH_4 assimilated to their host while clade C symbionts translocated 29.8 to 14.5 % at T0 and T24 respectively. In addition, clade A-symbionts assimilated in total between 66 and 90% more NH_4 than clade C- at any timesteps (Tukey HSD, $p<0.0282$) Conversely, there was no significant difference in the amount of ammonium assimilated in the animal compartment (Tukey HSD, $p<0.05$). Finally, NH_4 incorporation in clade C symbionts increased after 24h incubation (Tukey HSD, $p<0.023$).

Nitrate assimilation

Higher values of NO_3 assimilation were found in the algal fraction compared to the animal tissue compartment for both holobionts at any timesteps and light conditions (Figure 5b ; Table 3 ; Tukey HSD, $p<0.0001$). Overall, the percentage of NO_3 translocation from the symbionts to the host was ca. 7.7 to 2.74 % for clade A and 19.75 to 5.1% for clade C-holobionts between T0 and T24. An increase in NO_3 assimilation was observed between T0 and T24 in both clade C and clade A symbionts at any timesteps and light intensities (Table 3 ; Tukey HSD, $p<0.05$), except for clade A symbionts exposed to low light (Tukey HSD, $p=0.8743$) despite a clear tendency.

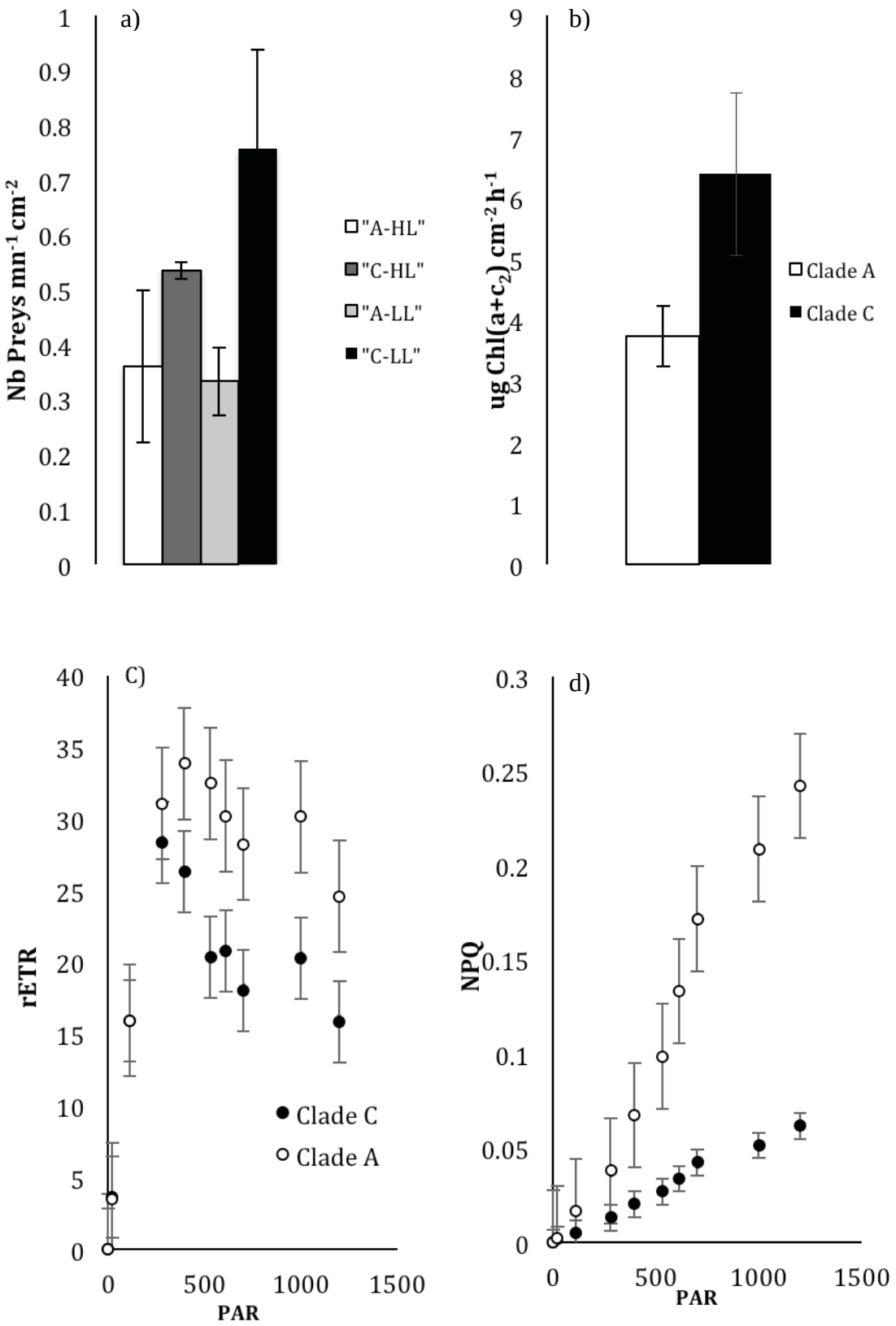


Figure 2. a) Grazing rates (nb prey cm^{-2} mn^{-1}), b) Total chlorophyll concentration (ug Chl($a+c_2$) cm^{-2}), c) rETR and d) NPQ for clade A and C-holobionts according to the light intensity received in their natural environment

In the animal tissue, NO_3 incorporation did not vary according to the time of incubation, except for clade A-holobionts at low light, which showed a two times decrease of their NO_3 assimilation compared to T0 (Tukey HSD, $p<0.05$).

C :N

Clade C symbionts showed higher C:N ratio compared to clade A symbionts (Figure 6. ; Tukey HSD, $p<0.001$), whereas the C:N of the animal fraction was not significantly different, although tended to be higher for clade C-holobiont (Tukey HSD, $p>0.05$). The observed difference in C:N between holobionts were due to 1) lower carbon content (µmol C mg^{-1}) of clade C holobionts, mainly in the host (Tukey HSD, $p<0.05$; Figure 2 Supplementary) ; and to 2) lower nitrogen content (µmol N mg^{-1}) of clade C- holobionts in both the host and symbionts (Tukey HSD, $p<0.05$; Figure 3 Supplementary).

Correlation between studied parameters

A significant positive correlation was observed between the carbon fixation and translocation rates ($r=0.918$; d.f.=18 ; $p<0.05$). Again significant but negative correlations were observed between a) the NH_4 assimilation and feeding rates ($r=-0.737$; d.f=18 ; $p<0.05$), b) the NO_3 assimilation and feeding rates ($r=-0.853$; d.f=18 ; $p<0.05$).

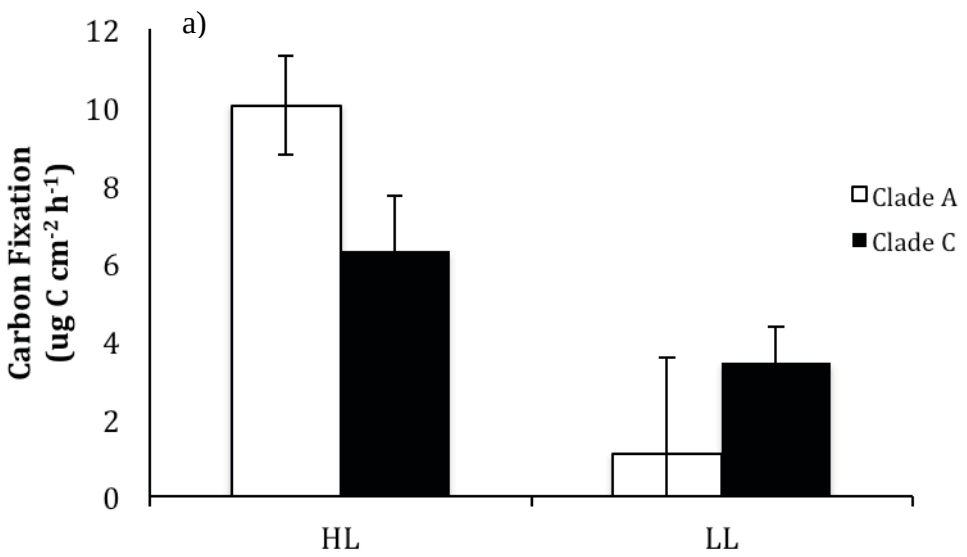


Figure 3. Rates of a) Carbon fixation (ug C cm^{-2} h^{-1}) and b) Carbon translocation (ug C cm^{-2} h^{-1}) for clade A and C-holobionts according to the light intensity

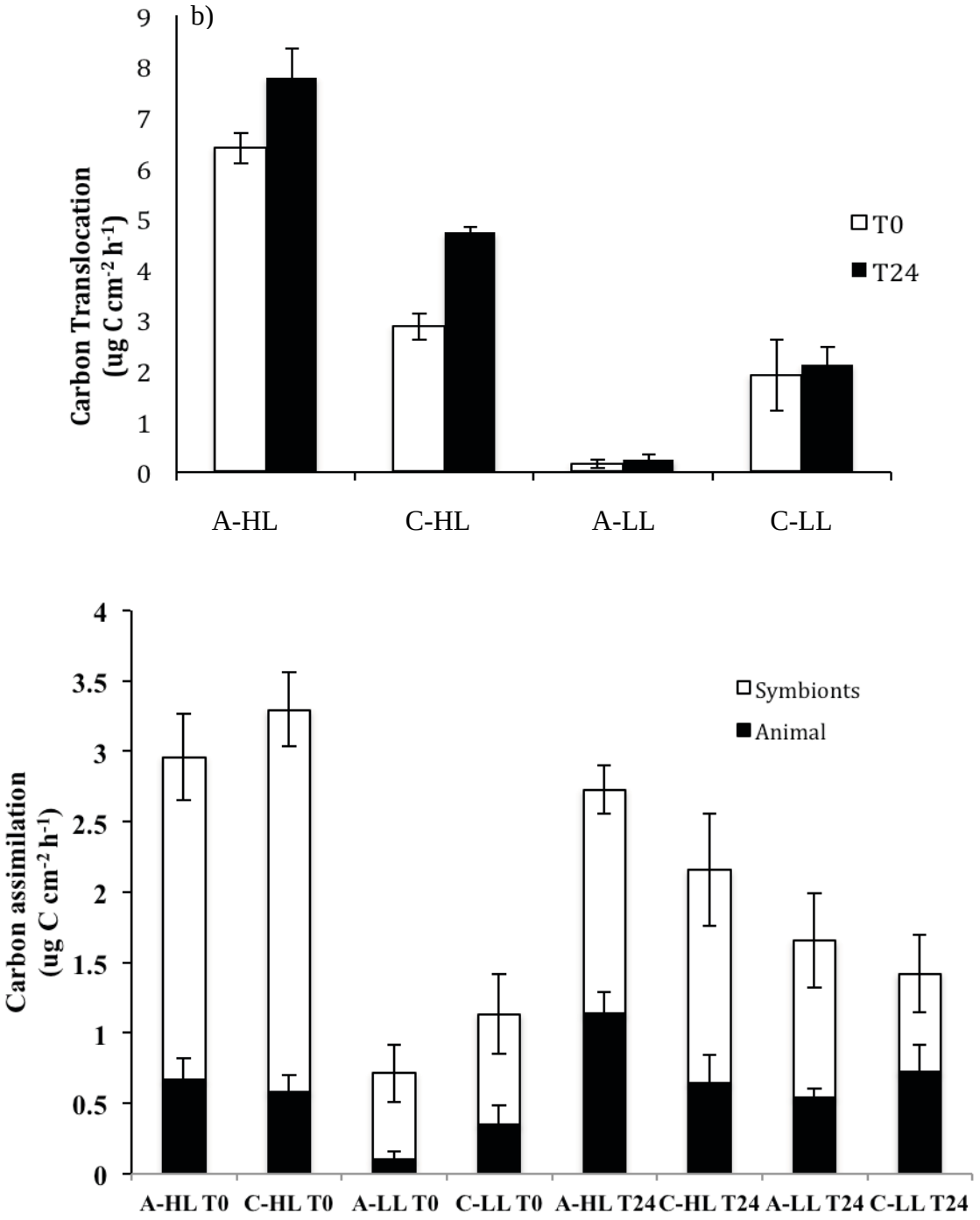


Figure 4. Carbon incorporation rates (ug C cm^{-2} h^{-1}) for both clade A and C-holobionts according to the different fractions (algal and animal tissue), light intensities (LL/HL) and timesteps (T0, T24)

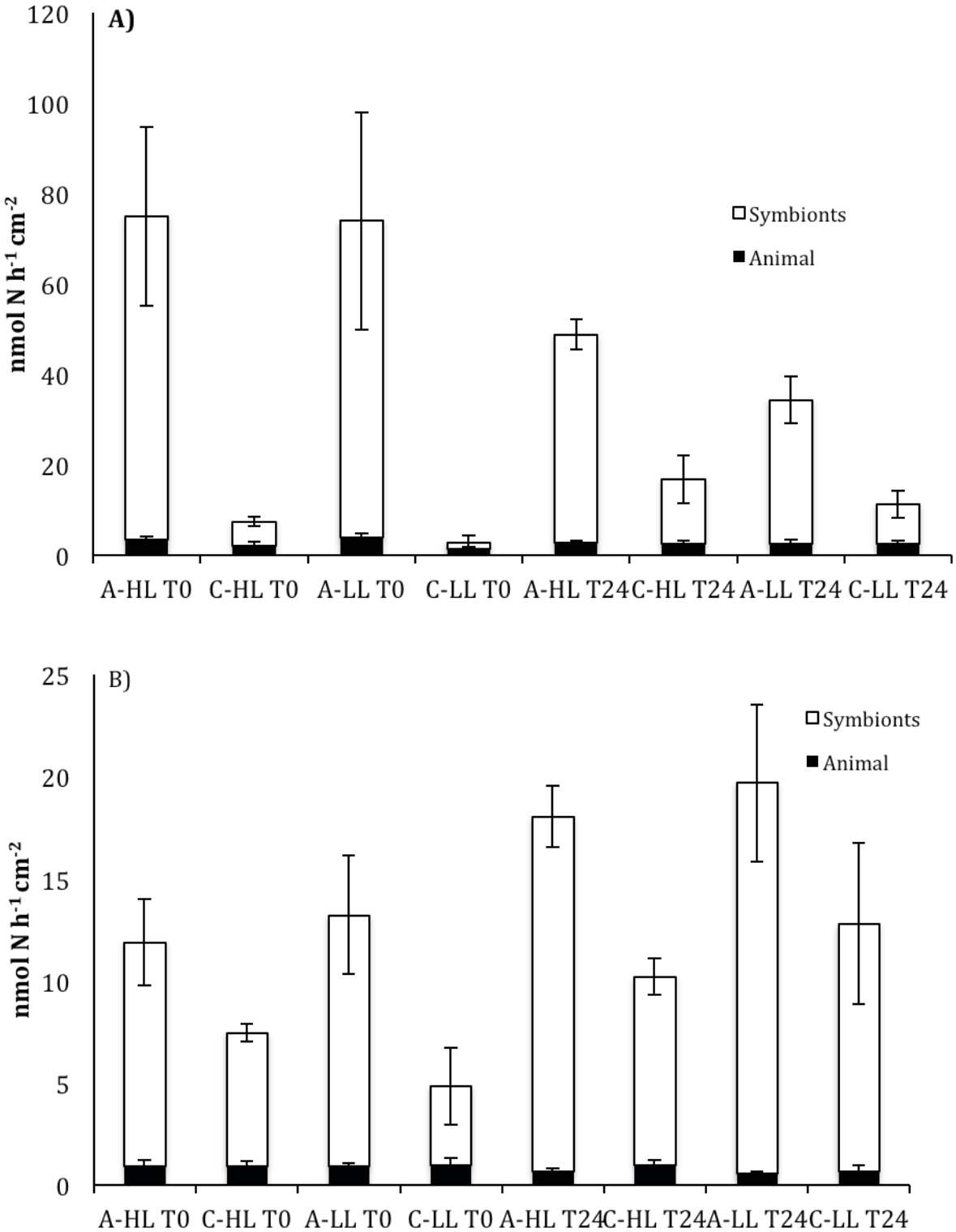


Figure 5. Rates of a) $^{15}NH_4$ and b) $^{15}NO_3$ assimilation within the symbiosis (nmol N h^{-1} cm^{-2}) according to the different fractions (algal and animal tissue), light intensities (LL/HL) and timesteps (T0, T24).

Discussion

The present study depicts the influence of habitat zonation and *Symbiodinium* genotypic diversity on the trophic strategies of the Red Sea coral *S. pistillata*. In the Red Sea, this coral species is indeed always associated with *Symbiodinium* clade A in shallow waters and with *Symbiodinium* clade C in deep environments (Mass et al. 2007; Winters et al. 2003) forming two different holosymbionts (Iglesias-Prieto and Trench 1997) or holobionts if microorganisms are included in the association (Rohwer et al. 2002). These two associations are stable, as shown in other coral species (LaJeunesse et al. 2008). Furthermore, the results obtained show that *S. pistillata* associated with *Symbiodinium* clade C exhibit a reduced metabolism that leads to lower tissue growth and reserves for clade C-holobionts. These latter had indeed a competitive advantage in low irradiance habitats compared to clade A-holobionts for the acquisition of autotrophic carbon. However, this advantage comes at a metabolic cost, with a lower capacity to acquire inorganic nitrogen dissolved in seawater. Although feeding rates increased with decreasing nitrogen uptake, the carbon and nitrogen contents of clade C-holobionts, were significantly lower than clade A-holobionts, suggesting that the heterotrophic and autotrophic inputs were not sufficient to sustain a maximal tissue growth. Our study also highlights a strong relationship between the amount of carbon photosynthesized and translocated, with no dependency on the symbiont type, as well as a relationship between heterotrophic feeding and inorganic nitrogen acquisition. Overall, our results suggest that the shift in symbiont type allows the scleractinian species *S. pistillata* to colonize deep environments in the Red Sea, and to maintain a vertical connectivity between shallow and deep coral reef communities; however, such shift incurs a great metabolic cost.

Acquisition of inorganic nitrogen

The acquisition of nitrogen by two holobionts of *S. pistillata* is investigated here for the first time. Results show that clade A and C-holobionts had a distinct pattern of NH_4 and NO_3 acquisition and allocation within the symbiosis. The first difference between the two holobionts relies in the total amount of nitrogen assimilated, with a 6 and 1.5-3 fold higher assimilation of ammonium and nitrate by clade A-holobionts, respectively, for similar nutrient concentrations in seawater and irradiance level during the incubations.

As inorganic nutrient levels in situ, during the sampling period, were equivalent between 5 m and 50 m depth because of the oligotrophic nature of the Gulf of Eilat (http://www.meteo-tech.co.il/EilatYam_data/ey_data.asp), differences in the inorganic nutrient history of the two holobionts cannot explain the difference observed in assimilation rates. The light history was however different, clade A-holobionts having received 10 to 30 times more light prior to the incubations. A light-enhancement of nitrogen assimilation rate is known to occur in cnidarians, phytoplankton and plants in general (Grover et al. 2003; MacIsaac and Dugdale 1972; Miller and Yellowlees 1989; Wilkerson and Trench 1986) (Bertheloot et al. 2008; Lillo 2008) because nitrogen assimilation requires energy and ATP, which is provided both by photosynthesis in the light and carbon respiration in the dark (Amory et al. 1991; Huppe and Turpin 1994; O'Leary and Plaxton 2015; Wang and Douglas 1998). Since clade A-holobionts presented higher respiration rates than clade C-holobionts, independently of the light level received, as well as higher carbon fixation under the high light environment from where they came, they might have had more energy for nitrogen assimilation. A similar relationship between respiration and nitrogen assimilation was observed in the green algae *Selenastrum minutum* (Turpin and Bruce 1990; Weger and Turpin 1989). In addition, the enhancement of ammonium assimilation by clade C-holobionts under high light tends to confirm the importance of light and derived processes (higher photosynthesis and respiration) for nutrient assimilation. Also, the lower nitrate assimilation of clade C-holobionts compared to clade A might have been due to a lack of energy to cover the costs of the nitrate reduction into ammonium by the enzymes nitrate and nitrite reductases (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013).

Additionally, symbionts with clades A and C may present different capacities in nitrogen assimilation. A unique previous study investigating nitrogen and carbon acquisition by symbionts of *Acropora tenuis* found that clade C was more efficient in acquiring nitrate than clade D under normal thermal conditions, while the contrary was observed during thermal stress (Cunning and Baker 2013). These distinct physiological adaptations of *Symbiodinium* may confer ecological advantages to the coral holobionts (Cooper et al. 2011b; Cooper et al. 2011c) and broaden their ecological niche (Cooper et al. 2011a). For example, in the above-cited study, clade D, which tends to be stress tolerant (Stat and Gates 2010) and maintain nitrogen assimilation during thermal stress, may confer advantages to their host during abnormally warm summers.

In the case of *S. pistillata* studied here, the higher assimilation of inorganic nitrogen by clade A-holobionts, which thrive in shallow waters, may compensate the lack of zooplankton, which is known to be more abundant in deep environments (Lesser et al. 2009; Schmidt 1973). Conversely clade C-holobionts, which thrive in deep waters, may acquire nitrogen either through heterotrophy (Crandall et al. 2016) or through dinitrogen fixation (Lesser et al. 2007). This is confirmed by their higher grazing rates compared to shallow holobionts when food is provided in abundance under laboratory conditions and by the inverse relationship between heterotrophy and inorganic nitrogen acquisition. It has been shown that decreased autotrophy under low light fosters heterotrophy in *S. pistillata* (Ferrier-Pagès and Gattuso 1998; Houlbreque and Ferrier–Pagès 2009; Tremblay et al. 2015) as well as in other coral species which present a high heterotrophic plasticity (Lesser et al. 2010; Palardy et al. 2008). It has however to be acknowledged that the carbon and nitrogen content, as well as the C:N ratio of clade C-holobionts, support the view that, despite their heterotrophic plasticity, they were nitrogen limited compared to the shallow ones. These results suggest that heterotrophy or dinitrogen fixation were not sufficient to fulfil the nitrogen requirements of the deep *S. pistillata*, at least at the season when they were collected (end of autumn). A lack of compensatory heterotrophy with depth is in agreement with previous observations made on Red Sea corals, which presented decreasing protein content with depth (Ziegler et al. 2015) or a lack of δ^{15}N signature enrichment (Alamaru et al. 2009). This is likely due to the particularly oligotrophic nature of the Red Sea (Reiss and Hottinger 2012) and offers an explanation for the decreased growth of *S. pistillata* with depth (Mass et al. 2007). Overall, the results obtained on nitrogen assimilation suggest that the association of *S. pistillata* with *Symbiodinium* clade C in deep waters does not confer this species an advantage for nitrogen acquisition, even when nitrogen is needed within the symbiotic association.

In addition to having distinct nitrogen assimilation rates, clade A and C-holobionts of *S. pistillata* had unequal allocation patterns of nitrogen within the symbiosis, likely suggesting different needs of the symbionts and animal host in nitrogen. Consistent with previous results on many cnidarian and phytoplankton species, shallow clade A-holobionts showed a clear and significant preferential uptake of ammonium compared to nitrate (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Pernice et al. 2012; Wilkerson and Trench 1986; Wilkerson and Kremer 1993), and an accumulation of nitrogen into the symbionts, which act as a sink for nitrogen within the symbiosis (Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Pernice et al. 2012; Wilkerson and Kremer 1993).

In contrast, deep clade C-holobionts exhibited similar rates of ammonium and nitrate assimilation, mostly because of low ammonium uptake rates compared to shallow holobionts. Since the ultimate end product of nitrogen assimilation is mostly protein in phytoplankton, the immediate fate of newly synthesized material should reflect the nutritional state of the cells (Glibert and McCarthy 1984). In other words, an increase in ammonium assimilation would suggest a severe nutritional stress, whereas a decrease in ammonium assimilation, as observed in the clade C-holobionts of *S. pistillata*, would rather indicate nitrogen repletion. However, according to the C:N ratio and C, N concentrations measured in these holobionts, it is unlikely that the low ammonium assimilation rates were due to nitrogen repletion of the symbionts and host tissue. All together, these results suggest that clade C was less efficient than clade A in scavenging both nitrate and ammonium from seawater.

Carbon budget

The light environment is a crucial factor, which influences the physiology, ecology and productivity of corals (Falkowski and Kolber 1990). This study confirms previous observations, which concluded that *S. pistillata* acclimates to depth through photo-adaptive mechanisms linked to the *Symbiodinium* genotype hosted at each depth distribution (Cohen and Dubinsky 2015), but is the first to establish a carbon budget for each holobiont, and estimate carbon translocation of each symbiont type. The depths at which *S. pistillata* colonies were sampled (5 and 50 m) account for extreme living conditions because holobionts were exposed either to high irradiance (> 400 µmoles photons m^{-2} s^{-1} [77]) or to less than 30 µmoles photons m^{-2} s^{-1} (Cohen and Dubinsky 2015). This wide depth distribution was possible through the association with specific *Symbiodinium* types, which presented a differential use of irradiance. When exposed to high irradiance, clade A *Symbiodinium* presented higher $rETR_{max}$, as well as a higher capacity for energy dissipation via NPQ compared to clade C *Symbiodinium*. This is indicative of an optimization of the light capture and the implementation of photoprotective mechanisms, which allow coral colonies to increase their rates of photosynthesis (Brown et al. 1999; Warner and Berry-Lowe 2006). In contrast, photoprotective mechanisms were reduced or even absent in clade C symbionts (Cooper and Ulstrup 2009; Gorbunov et al. 2001). However, these latter increased their photosynthetic efficiency (F_v/F_m) and chlorophyll content to maximize light harvesting in environments where light availability is limited (Falkowski and Dubinsky 1981; Lesser et al. 2010; Schmidt 1973; Winters et al. 2003).

As a result, clade C *Symbiodinium* was able to photosynthesize under low irradiance while clade A only respired. The rates of photosynthesis measured here for clade C are even underestimated, as it has been demonstrated that these rates increase when clade C receives a higher amount of blue light, as observed in its natural deep environment (Mass et al. 2010). Consistent with previous observations (Cohen and Dubinsky 2015; Levy et al. 2006; Mass et al. 2007; McCloskey and Muscatine 1984), low respiration rate was another adaptation of clade C-holobionts to their deep environment. This reduction in respiratory needs maintained the P:R of clade C-holobionts, measured at low light, (6.52±4.54) similar to the P:R of clade A-holobionts, measured under high light (2.27±0.36), suggesting that photosynthates were efficient enough to cover the respiratory needs of the deep water colonies. Compared to the P:R of clade A-holobionts measured at low light, which was null or negative (no photosynthesis, only respiration; 0.35±0.27), it can be concluded that clade *C*-holobionts had a competitive advantage in low-irradiance habitat. It was indeed able to maintain a positive photosynthesis under low light, which, when combined with reduced respiration rates, maintained P:R ratio above 1. All together, these observations indicate a niche specialization among symbionts of *S. pistillata*, allowing a maximal acquisition of carbon throughout the depth profile.

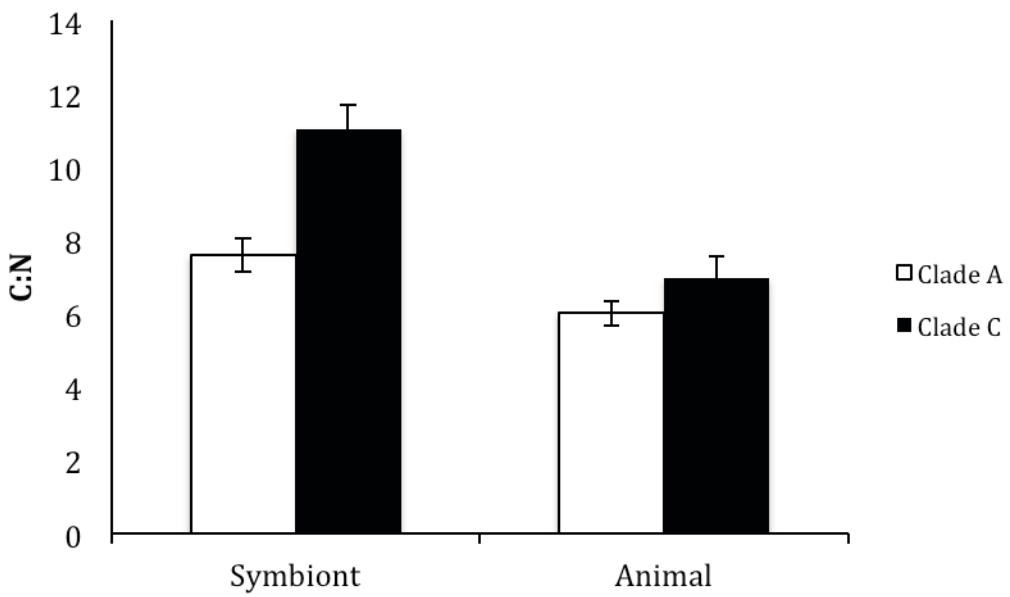


Figure 6. C:N ratio for clade A and C-holobionts according to the fractions.

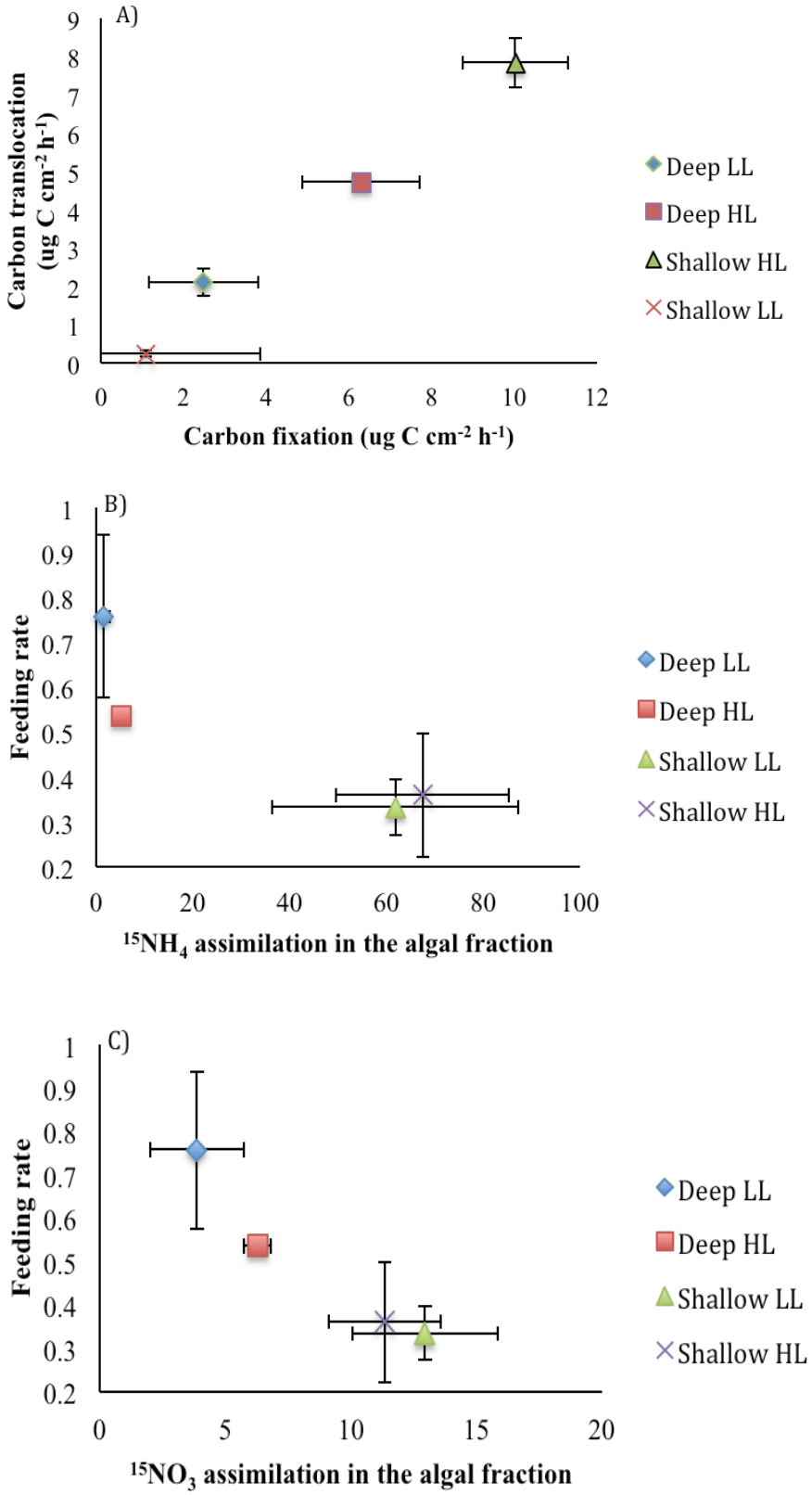


Figure 7. Relations between a) rates of carbon fixation (ug C cm^{-2} h^{-1}) and translocation (ug C cm^{-2} h^{-1}), feeding and b) ammonium or c) nitrate assimilation rates for clade A and C-holobionts according to the light intensity at T24

This study is also one of the firsts, to our knowledge, to estimate the carbon translocation of clade A and C *Symbiodinium* associated to *S. pistillata*, under their natural irradiance and its allocation within the symbiosis. Overall, carbon translocation was not directly related to the clade identity, but there was instead a positive relationship between the amount of carbon photosynthesized and the amount translocated. Therefore, the amount of carbon translocated decreased from clade A to clade C holobionts maintained under high light, whose translocation was higher than clade C-holobionts maintained under low light. Translocation was almost drawn in clade A-holobionts maintained under low light, since they hardly photosynthesized. This observation is in agreement with a previous study performed on two scleractinian corals (Tremblay et al. 2015), and challenges the hypothesis that carbon translocation is clade dependent (Leal et al. 2015). A major observation derived from the carbon budget, is that the amount of carbon allocated to symbiont growth is independent of the amount of carbon photosynthesized and translocated, but is rather constant in clade A and C symbionts, as another adaptation to their environment. Indeed, although clade C symbionts under their natural low light level photosynthesized less carbon than clade A symbionts, the same amount was retained in their cells (valeur). Clade A-holobionts however retained slightly more carbon in their tissue.

To conclude, this study shows that the genetic identity of *Symbiodinium* influences the nutritional plasticity of a cnidarian–dinoflagellate symbiosis. The colonization of Red Sea deep environments by *S. pistillata* has an important metabolic cost that may impair its growth and reproductive capacities, which in turn may impair the capacity of these mesophotic corals to repopulate shallow parts of the reef following extreme weather events(Bongaerts et al. 2010; Lesser et al. 2010; Riegl and Piller 2003; Slattery et al. 2011).

Acknowledgments

We would like to sincerly thank all the staff at the IUI in Eilat (IL). Many thanks to Pr. Denis Allemand, Director of the Centre Scientifique de Monaco for scientific support. This project was supported by the IUI, the CSM and the Institut Européen de la mer. Financial support to L.E. was provided by the Centre Scientifique de Monaco.

Please have a look at the appendix n°5 for further details on the statistical analyses and supplementary results.

Chapitre IV.
Axe 2- Effets d'une limitation ou d'un enrichissement en sels nutritifs sur la réponse physiologique des coraux tropicaux dans le contexte du réchauffement climatique

Chapitre IV
The effects of nutrient limitation or enrichments on the physiological response of tropical corals in a warming ocean

4.1 Summary of the results

The following paragraphs summarize the major outcomes of Papers 3,4 and 5, focusing on the effects of nutriment limitation and/or enrichments on the physiology of tropical reef corals. These results respond to the different aims exposed in the introduction.

Aim 1: *Do tropical corals present a different physiological response to nitrate or ammonium enrichment?*

The second aspect addressed in this work (article n° 3, 4, 5) has first focused on how each form of nitrogen (ammonium or nitrate) affects the physiology and metabolism of the coral-dinoflagellate association. For this purpose, we implemented three different nutrient treatments: i) a control condition characterized by low amounts of inorganic nutrients (N<0.5 uM and P<0.1 uM); ii) an ammonium-enriched and iii) a nitrate-enriched treatments, kept at a similar and relevant nutrient concentration (3 µM). After three weeks under these conditions, a carbon budget, coupled to other physiological measurements, was performed in order to follow the fate of carbon molecules within the symbiosis and to assess the effects of each nitrogen form on coral physiology.

Under control conditions, coral nubbins showed a reduced metabolism and first signs of nutrient limitation, through very low amount of protein as well as low rates of photosynthesis and calcification compared to ammonium-enriched corals. Despite this, control corals kept a constant and high rate of photosynthate translocation (75%) from the symbionts to the host. When nitrogen was supplied in the form of ammonium (NH_4Cl), the whole coral metabolism was enhanced compared to the control treatment. Indeed, symbiont density, chlorophyll and protein contents significantly increased, so did rates of gross photosynthesis. More, the total amounts of carbon fixed (gross photosynthesis) and translocated by the symbionts were two times higher than in the control condition.

This supplementary amount of carbon available in host tissues significantly stimulated the calcification rate, which was five times higher than in the control treatment.

Conversely, under nitrate enrichment, there was a net decrease in carbon fixation rates as well as in gross photosynthesis per symbiont cell compared to control and ammonium-enriched corals. More, nitrate induced a net drop in the amount of carbon translocated to the host compared to the ammonium-enriched nubbins (7 µg C cm^{-2} h^{-1} compared to 22 µg C cm^{-2} h^{-1}). However, corals supplied with nitrate-enriched seawater kept a constant and similar percentage of translocated carbon (70%) from the symbionts to the animal host compared to the control conditions. This reduced metabolism, through low carbon fixation rates, affected the calcification rates, since NO_3-enriched corals showed similar low values of skeletal growth rates than control corals.

Aim 2: *Is the N :P ratio of nutrients in reef waters a determinant factor for coral health under normal condition and during a thermal stress ? In other words, does the enrichment in one key element (nitrogen or phosphorus) compared to the other have a negative effect on coral physiology?*

After investigating which physiological changes were induced by a nitrate or ammonium enrichment (in presence of low P-concentrations), we tested the impact of the N:P ratio in shaping coral health and its resilience during a thermal and/or light stress (papers 1, 3, 4 and 5), to answer the following questions: i) does the nitrogen form (nitrate or ammonium), independently of the phosphorus concentration in seawater, is the only important factor for coral health? ii) or is the N:P ratio a more relevant parameter? or iii) does a minimal amount of phosphorus is needed for coral health, independently of the nitrogen form.

To answer these questions, seawater was enriched with nitrogen and phosphorus at different N:P ratios, as shown in Table 4. The major outcomes of these experiments complement the conclusions of Wiedenmann et al. (2013) and bring further insights into the understanding of the effects of nutrient enrichment and/or limitation on coral physiology. Overall, corals respond differently to the same N:P according to :

1) the minimal amount of inorganic nutrients available in the environment
2) the nitrogen chemical form (ammonium or nitrate)
3) the availability in phosphorus

4) the other environmental parameters, such as the availability of organic nutrients

1) Very low amounts of nitrogen and phosphorus (<0.5 :<0.05) induced coral starvation, since a net decrease in coral biomass (protein) was observed at 25°C compared to corals maintained under control conditions, at a N:P of 0.5:0.1. More, the coral bleaching susceptibility was higher under light and thermal stress compared to control conditions (additional results, paper n°5).

2) + 3) + 4)

i) Nitrogen enrichment combined with limited phosphorus availability

Under non-stressful conditions, a NH_4:P of 40 to 60 (or 3 µMN and 0.05 µM P) had no effect or enhanced coral metabolism, such as the rates of carbon fixation, photosynthate translocation and calcification compared to control corals. Under light or thermal stress, ammonium enrichment maintained the chlorophyll and symbiont concentrations at the same level as before the stress, whereas control corals significantly bleached (8 ug Chl(a+c_2) cm^{-2} against 4 ug Chl(a+c_2)cm^{-2} in control condition). Under combined light and thermal stress, ammonium supplementation sustained the whole coral metabolism (chlorophyll, symbionts and protein concentrations) compared to control conditions. Conversely, when nitrate was added at the same concentrations than ammonium (NO_3:P between 40 to 60 or 3 µM NO3 and 0.5 µM PO4), carbon fixation rates, carbon translocation rates and calcification rate significantly decreased under normal culture conditions. Under thermal stress, supply of nitrate further decreased the rates of gross photosynthesis.

ii) Interactive effects of nitrogen and phosphorus enrichment

When nitrogen and phosphorus concentrations were increased in the seawater, opposite results were also reported according to the nitrogen source used during the experiments (ammonium or nitrate). Interestingly, positive effects were noticed, this time, with a combined enrichment in nitrate and phosphorus (2 :0.5, paper 4). Coral nubbins maintained under nitrate and phosphorus enrichment (NO_3:PO_4=2:0.5) showed high values of chlorophyll concentration compared with control corals at 25°C and 30°C.

More, this additional supply of phosphorus (0.5 µM compared to 0.1 µM in the control condition) was beneficial to corals metabolism (photosynthesis and calcification) under thermal stress in comparison with corals experiencing a nitrate-enrichment only (2 :0.1).

Conversely, when ammonium and phosphorus were added at the same time, a significant increase in symbiont concentration was observed, compared with control un-enriched corals, which induced a shift in autotrophic carbon allocation from the host to the symbionts. Dinoflagellates thus decreased their rate of sugar-rich molecules translocation to 48% and kept a large amount of fixed carbon for their own use (40% against 14% in control). More, each symbiont-cell was 50% less efficient in carbon fixation (gross photosynthesis normalized per symbiont cells) compared with control and NH_4-enriched nubbins.

iii) Phosphorus enrichment

Phosphorus enrichment alone, i.e. NH_4:P=0.5 :2 induced a significant decrease in chlorophyll concentration. However, we measured higher rates of carbon retention in the host tissues under normal and thermal stress conditions. In this latter condition, phosphorus supplementation increased the rates of carbon translocation and rETR and maintained symbiont density and rates of photosynthesis at the highest level.

iv) Individual and interactive effects of inorganic and organic nutrient enrichments

Eutrophic coastal areas are characterised by both high inorganic and organic nutrient concentrations. Inorganic nutrients, mainly nitrate and phosphate, were shown to negatively impact coral health whereas organic nutrient enrichment is rather beneficial to corals. These two components of eutrophication seem to have opposite effects when considered independently. Until now, only two studies investigated the combined effects of eutrophication and thermal stress on the physiological response of tropical corals (Fabricius et al. 2013; Fabricius, 2005). Fabricius et al. (2013) noted a reduction in coral calcification when coral species were maintained under combined enrichements with inorganic and organic nutrients. These results suggest that synergistic effects of these two parameters would differ from their individual effect, and this both under normal growth conditions and during a thermal stress.

For this purpose, we exposed the scleractinian tropical coral species *T. reniformis* to three NO_3:P (0.5 :0.05 ; 2 :0.1 ; 2 :0.5) ratios and we supplied half corals with daily organic enrichment in the form of zooplankton (nauplii of *Artemia salina*). Under normal growth conditions, organic supply had no effect or was even beneficial to the corals' chlorophyll concentration. Under thermal stress, the combined enrichment (NO_3:P=2:0.5) increased symbiont density and calcification of the host in comparison with control conditions, whereas organic supply combined to a nitrate enrichment alone (N:P=2:0.5) had a negative impact on coral' health at high temperature, because it decreased total protein content as well as coral gross photosynthesis and calcification rate compared with control condition. Interestingly, corals exposed to dissolved inorganic nutrients (either NH or NPH) showed 50% higher capabilites in acquiring zooplankton preys than control treatment, meaning that further supply of nitrate and phosphorus or nitrate only would stimulate grazing rates at 25°C and 30°C.

Nsource	N :P (µM)	Species	Time	Experiment	Observations	State of the work
Control	0.5 : 0.05 = 10	*S. pistillata*	3 weeks	Enrichment	Reduced metabolism	(Ezzat et al., 2015)
Depleted	<0.5 :<0.05 =<10	*S. pistillata*	4 weeks	Enrichment and T°+ Light stress	Decrease of coral metabolism at 25°C (chlorophyll and protein), further decrease with T° and light stress	In prep.
NH_4	3 : 0.05 = 60	*S. pistillata*	3 weeks	Enrichment	Coral metabolism increased	(Ezzat et al., 2015)
NO_3	3 : 0.05 = 60	*S. pistillata*	3 weeks	Enrichment	Decrease in C fixation	(Ezzat et al., 2015)
NH_4	3 : 1 = 3	*S. pistillata*	3 weeks	Enrichment	Decrease in C translocation	(Ezzat et al., 2015)
NH_4	2 : 0.05 = 40	*S. pistillata*	4 weeks	Enrichment and T° + Light stress	Maintain coral metabolism under high light and T°	In prep.
NO_3	2 : 0.1 = 20	*T. reniformis*	3 weeks	Enrichment and T° stress	Decrease rate of gross photosynthesis	(Ezzat et al., 2016)
NO_3	2 : 0.5 = 4	*T. reniformis*	3 weeks	Enrichment and T° stress	Increased coral metabolism and maintainance at higher temperature	(Ezzat et al., 2016)
Total	0.5 : 2 = 0.25	*P. damicornis*	2 weeks	Enrichment and T° stress	Maintained high C translocation rates at higher temperature	Under review
NO_3	2 :0.1 = 20 + H	*T. reniformis*	3 weeks	Enrichment and T° stress	Increased coral metabolism and maintainance at higher temperature but decrease calcif.	(Ezzat et al., 2016)
NO_3	2 :0.5 = 4 + H	*T. reniformis*	3 weeks	Enrichment and T° stress	Increased coral metabolism and maintainance at higher temperature	(Ezzat et al., 2016)

Table 4 Summary and outcomes of the different experiments performed with distinct seawater nutrient enrichments

Article n°3

New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral-dinoflagellate symbiosis

Proceedings of the Royal Society London B. | Publié Juillet 2015

[1]Leïla Ezzat, [2]Jean-François Maguer, [1]Renaud Grover and [1]Christine Ferrier-Pagès

Résumé

Les pollutions marines affectent les cycles biogéochimiques des écosystèmes côtiers et sont souvent associées au déclin des récifs coralliens. Cependant, les mécanismes par lesquels les sels nutritifs, et particulièrement l'enrichissement en azote, influencent l'association symbiotique sont encore méconnus. Nous avons donc étudié la réponse physiologique de l'espèce de corail tropical *S. pistillata* lorsque maintenu sous différents rapports N:P, et soumis à des formes distinctes d'azote (ammonium ou nitrate). Les résultats montrent des différences significatives au niveau des taux de fixation et d'allocation de carbone au sein de la symbiose, et ceci en fonction de la forme d'azote et de la stochiométrie du rapport N:P. En particulier, en présence de faibles concentrations en phosphate (0.05 µM), un enrichissement de l'eau de mer en nitrate (3 µM) a conduit à une baisse significative du taux de fixation de carbone ainsi que du transfert de photosynthétats, en comparaison à la condition controle (N:P=0.5:0.05). A contrario, la présence d'ammonium (N:P=3:0.05) a stimulé ces processsus. Un enrichissement combiné en ammonium et phosphate (N:P=3:1) a induit un shift dans l'allocation du carbone vers les symbiotes, et ceci au détriment de l'hôte animal. Ces résultats mettent en lumière l'effet des enrichissements en sels nutritifs sur la physiologie des coraux scléractiniaires. De plus, ils nous permettent de mieux comprendre les conséquences des pollutions marines sur les écosystèmes coralliens, ce qui est nécessaire afin d'améliorer les stratégies de gestion des risques liés aux milieu récifaux.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.
[2]LEMAR - UMR 6539 UBO/CNRS/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral-dinoflagellate symbiosis

Proceedings of the Royal Society London B. | Published July 2015

[1]Leïla Ezzat, [2]Jean-François Maguer, [1]Renaud Grover and [1]Christine Ferrier-Pagès

Abstract

Anthropogenic nutrient enrichment affects the biogeochemical cycles and nutrient stoichiometry of coastal ecosystems and is often associated with coral reef decline. However, the mechanisms by which dissolved inorganic nutrients, and especially nitrogen forms (ammonium versus nitrate) can disturb the association between corals and their symbiotic algae are subject to controversial debate. Here, we investigated the coral response to varying N:P ratios, with nitrate or ammonium as a nitrogen source. We showed significant differences in the carbon acquisition by the symbionts and its allocation within the symbiosis according to nutrient abundance, type and stoichiometry. In particular, under low phosphate concentration (0.05 µM), a 3 µM nitrate enrichment induced a significant decrease in carbon fixation rate and low values of carbon translocation, compared to control conditions (N:P=0.5:0.05), while these processes were significantly enhanced when nitrate was replaced by ammonium. A combined enrichment in ammonium and phosphorus (N:P=3:1) induced a shift in nutrient allocation to the symbionts, at the detriment of the host. All together, these results shed light into the effect of nutrient enrichment on reef corals. More broadly they improve our understanding of the consequences of nutrient loading on reef ecosystems, which is urgently required to refine risk management strategies.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.
[2]LEMAR - UMR 6539 UBO/CNRS/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

Introduction

Mutualistic symbioses between animals and algae are common in marine habitats (Venn et al. 2008a). Prominent examples include the associations of cyanobacteria with sponges and ascidians (Simister et al. 2012), algae with ciliates (Johnson 2011), dinoflagellates with sea anemones, sponges, clams, hydra and reef corals (Muscatine and Porter 1977; Norton et al. 1992). Those associations allow the animal host to exploit otherwise unsuitable food sources by acquiring or synthesizing nutrients lacking in its diet. In particular, algal symbionts fix inorganic carbon and transfer their photosynthates to the host for its own nutritional needs (Wang and Douglas 1997). They can acquire other inorganic nutrients from the environment and recycle the host nitrogenous waste products as a substrate for the synthesis of high-value compounds, which are transferred back to the animal (Rahav et al. 1989; Wang and Douglas 1999). These symbiotic relations however rely on a fragile equilibrium, which can be disrupted by many stressors, such as ocean warming or acidification (Doney et al. 2012), pollution and eutrophication (i.e. increased nutrient and sedimentation levels) (Fabricius 2011).

The most well-known host-algal association in tropical ecosystems is formed by corals and dinoflagellates of the genus *Symbiodinium*. The ecological relevance of this mutualistic interaction is brought to light by two considerations: it structures reef food webs (Moberg and Folke 1999) and the benefits exchanged convey ecological advantages to the partners (Venn et al. 2008a; Yellowlees et al. 2008). Coral reefs indeed rank among the most productive ecosystems, although they usually thrive in oligotrophic waters with low nutrient concentrations. Their success is due to the “tight recycling of nutrients” both within the ecosystem and the coral-dinoflagellate association. Yet, the nutritional ecology of such symbiosis and in particular the role of inorganic nutrient availability on the coral performances is still poorly understood (D’Angelo and Wiedenmann 2014; Wiedenmann et al. 2013). Investigating those aspects will allow for informed conservation actions to efficiently protect coral reefs which face severe threats through climate change and human activities, including profound modifications in the seawater chemistry and nutrient concentrations (Fabricius 2011). On one hand, global climate change will likely result in higher water temperatures, stronger stratification and severe nutrient shortage in surface waters, limiting growth of all primary producers (Elser et al. 2007).

On the other hand, many inshore fringing reefs experience increased sedimentation and nutrient levels in response to fertiliser use and land clearing (Fabricius 2011). Consequently, at certain periods of the year, inorganic nitrogen and phosphorus concentrations can be much higher (Brodie et al. 2011; Govers et al. 2014; Naumann et al. 2015; Rouzé et al. 2015) than the usual levels measured on reefs (< 0.5 µM for nitrogen (Furnas et al. 1988; Lomas and Lipschultz 2006; Meeder et al. 2012), < 0.1 µM for phosphate, (Atkinson 1987; Charpy 2001; Kinsey and Davies 1979b)). Furthermore, the geomorphology and the different sources and types of pollution, will also change the abundance of nitrogen sources (nitrate versus ammonium), and the N:P ratios of coastal ecosystems (Altieri et al. 2014; Conley et al. 2009).

Although it is known that eutrophication can lead to coral overgrowth by macroalgae through the algae's fast nutrient uptake and utilization (Burkepile et al. 2013; Fabricius 2005), the impact of nutrient availability on the functioning of the coral-dinoflagellate symbiosis is still poorly understood. To our knowledge, only one study has shown a loss of symbionts under nutrient shortage (Wiedenmann et al. 2013), so that further work is needed to fully understand the minimum nutrient requirements of corals and other comparable symbiotic associations. Conversely, the physiological effects of nutrient enrichment have been more intensively investigated. It is clear now that the supply of phosphorus induces a decrease in calcification rates or skeletal density (Dunn et al. 2012; Ferrier-Pages et al. 2000; Kinsey and Davies 1979b), while results are more controversial for nitrogen addition. Nitrate reduced calcification and photosynthesis in some coral species (Ferrier-Pages et al. 2000; Schlöder and D'Croz 2004), but had no effect or a positive one on other species (Chauvin et al. 2011; Schlöder and D'Croz 2004; Tanaka et al. 2007). The same was observed with ammonium enrichment (Béraud et al. 2013; Ferrier-Pages et al. 2000). Furthermore, it has been suggested that ammonium may have a different effect than nitrate, because nitrate utilization requires an energetically costly reduction (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013; Patterson et al. 2010), potentially lowering the amount of photosynthates transferred by symbionts to the host (Shantz and Burkepile 2014). All together, these results suggest that there is a need to better understand the physiological processes and nutrient fluxes within the coral-dinoflagellate association, which will shed light on the functioning of other nutrient sharing symbioses also affected by nutrient enrichments, such as the plant-mychorrizae, or chlorella-mycobacterium associations (Johnson et al. 2003; Kim et al. 2015).

Therefore, the first aim of this study was to test the effect of nitrogen enrichment, either supplied in the form of ammonium or nitrate, on the acquisition of carbon and allocation of photosynthates in the tropical coral *Stylophora pistillata* in symbiosis with *Symbiodinium* clade A1. In addition, independently of the nitrogen source considered, a recent study has demonstrated that the response of corals to nutrient enrichment also depends on the balance between N and P availability, since a lack of phosphorus, coupled to nitrate enrichment, increased bleaching susceptibility (Wiedenmann et al. 2013). The second aim of this study was to test the effect of different ammonium-phosphorus ratios on *S. pistillata* metabolism and photosynthates translocation, to investigate the potential role of nutrient stoichiometry on coral physiology.

Materials and methods

Experimental set-up

Six colonies of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* (Esper 1797) from the Red Sea (Gulf of Aqaba, Jordan; CITES DCI/89/32) were used to generate 240 nubbins (40/colony). Nubbins were suspended on a nylon thread, equally distributed into eight 20L aquaria (5 nubbins/colony/aquaria) and maintained for six weeks under the following controlled conditions: aquaria were continuously supplied with oligotrophic seawater at a flow rate of 20 l h^{-1}, and metal halide lamps (Philips, HPIT 400W, Distrilamp, France) provided a constant irradiance of 150 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Seawater temperature was maintained constant at 25 ± 1°C using temperature controllers (Toshniwal N6100, West Instruments, Brighton, UK) and submersible resistance heaters (Aquarium Systems, France). Nubbins were kept unfed to avoid any interaction with the nutrient enrichments.

After this first period, four inorganic nutrient conditions were generated in duplicated tanks: 1) a control condition (called “C”) with 0.5 µM nitrogen (N- mainly nitrate) and 0.05 µM phosphorus (P); 2) a 0.05 µM P and 3 µM N, with addition of 2.5 µM ammonium (called “NH_4” condition); 3) a 0.05 µM P and 3 µM N, with addition of 2.5 µM nitrate (called “NO_3”); 3) a 1 µM P and 3 µM N (with addition of 2.5 µM NH4) enriched condition, called “NH_4-PO_4”. For this purpose, the control tanks received only natural seawater (N:P = 0.5:0.05 µM). For the 3 enriched conditions, tanks were continuously supplied with ammonium chloride (NH_4Cl) or sodium nitrate ($NaNO_3$) pumped from a stock solution via a peristaltic pump at a flow rate of 0.3 l h^{-1}. The NH_4-PO_4 tank was also continuously supplied with sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), delivered at the same flow rate as for nitrogen.

Nutrient concentrations were monitored twice to three times a week using an Autoanalyzer (Alliance Instrument, AMS, France). The total nitrogen concentration varied between 0.4 and 0.55 in the control tank, and between 3.1 and 3.5 in the other enriched conditions. Phosphorus levels varied from 0.03 to 0.05 in the control and nitrogen enriched tanks, and from 0.8 and 1.2 in the NH_4-PO_4 tanks. Nubbins were incubated 3 weeks under these conditions before analyses.

Measurements

To assess the acquisition and exchange of photosynthates under the different conditions, we used the model fully described in Tremblay et al. (Tremblay et al. 2012), which follows the acquisition of external ^{13}C-labelled bicarbonate and its allocation into the different compartments of the symbiotic association as well as the carbon lost as mucus (POC and DOC). Carbon fluxes were calculated using the rates of photosynthesis, of host and symbiont respiration and of calcification. Symbionts density and animal tissue growth were also evaluated to complement the model.

Physiological measurements

All measurements were performed on six nubbins per treatment (one per colony). Net photosynthesis (P_n) and respiration (R) rates were assessed at 0 and 150 µmoles photos m^{-2} s^{-1} on nubbins incubated in glass chambers filled with filtered seawater (FSW) containing the respective amount of inorganic nutrients. The water was homogenized using a stirring bar and each chamber was equipped with a Unisense optode connected to a computer with Oxy-4 software (Chanel fiber-optic oxygen meter, PreSens, Regensburg, Germany). Optodes were calibrated against nitrogen-saturated and air-saturated seawater for the 0% and 100% oxygen, respectively. P_n and R rates were estimated by regressing oxygen data against time. Gross photosynthetic (P_g) rates were calculated by adding R to P_n. After incubation, nubbins were frozen for the determination of symbiont density, total chlorophyll and protein concentrations according to Hoogenboom et al. (Hoogenboom et al. 2010a). Data were normalized to the skeletal surface area (cm^2) of each nubbin, using the wax-dipping technique (Veal et al. 2010). Oxygen fluxes were converted to carbon equivalent based on molar weights according to Anthony and Fabricius (2000).

Respiration rates of freshly isolated symbionts, as well as their concentration, were also measured according to Tremblay et al. (Tremblay et al. 2012).

Rates of calcification were determined using the buoyant weight technique (Davies 1989), and normalized to the nubbin surface area and the incubation time. Carbon allocation to calcification (Cc) was calculated with the following formula: Cc = Msk x 12/100, where Msk represents the amount (ug) of $CaCO_3$ produced and 12/100 is the ratio of molecular masses of C (12 $g.mol^{-1}$) and $CaCO_3$ (100 $g.mol^{-1}$).

$H^{13}CO_3$ labelling

Incubations were performed according to Tremblay et al. (Tremblay et al. 2012). For each condition, 18 nubbins (3 nubbins per colony) were placed in individual beakers containing 200 mL FSW with the right amount of nutrients, and enriched with 0.6 mM $NaH^{13}CO_3$ (98 atom %^{13}C, #372382, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA).

They were incubated for 5 h and then transferred into non-enriched seawater for two chase periods (0 h, 24 h). One nubbin per colony was removed after each period and directly frozen at -20°C for ^{13}C measurements in the animal tissue and symbionts. Eighteen control nubbins (3 nubbins per colony) were incubated in parallel in non ^{13}C-enriched seawater. The %^{13}C enrichment was measured using a Delta Plus Mass spectrometer coupled to a C/N analyser (Thermofisher Scientific, Bremen, Germany). The equations are described in Tremblay et al. (Tremblay et al. 2012). As the results from the two chase periods (0 and 24h) were very similar, we only report the carbon budget obtained after 24h in the following results, for clarity.

Statistics

Statistical analyses were conducted with R Statistical Software version 3.2.0 (R Development Core Team 2015) by the use of the “stats” package. Normality and homoscedasticity of the data residuals were tested using Kolmogorov-Smirnov (using Lilliefors corrections) and Levene tests, and data were log-transformed when required. One-way ANOVAs were performed on all response variables with “Nutrient treatment” as factor except for the carbon incorporation rates (ρ) and percentage of fixed carbon remaining (C_r), which were tested using a two-ways ANOVA, with “Nutrient treatment” and “Coral Compartment” as factors (Compartments are symbionts and host tissue; see ESM 6). When there were significant differences between treatments, *a posteriori* test was performed (Tukey’s test). The Bonferroni correction was used to account for multiple testing in the ^{13}C labeling part of the experiment. P-values were considered significant for $p < 0.05$.

Results

Physiological measurements

Control corals contained lower concentrations of chlorophyll (Chl) and symbionts than the nutrient-enriched nubbins (Fig. 1, ESM 5, Tukey HSD, $p < 0.0001$). Symbiont density was not different between NO_3 and NH_4 conditions (Tukey HSD, $p = 0.39$), but higher in the NH_4-PO_4 one (Fig. 3b, ESM 5, Tukey HSD, $p < 0.001$). The amount of total chlorophyll content per symbiont remained equivalent in all conditions except for NO_3 nubbins, which showed a lower amount (Tukey HSD, $p < 0.001$). NH_4 corals synthesized the highest amount of total protein compared to the other conditions (Fig. 3a, ESM 5, Tukey HSD, $p < 0.02$). For the other physiological parameters, control and NO_3-conditions were different from NH_4 and NH_4-PO_4 conditions. Indeed, control and NO_3 groups presented lower calcification rates (ESM 5, Tukey HSD, $p < 0.003$), as well as lower net (P_n) and gross (P_g) photosynthesis per skeletal surface area (ESM 5, Tukey HSD, $p < 0.01$ and $p < 0.001$) than the NH_4 groups. Moreover, NO_3 corals showed significantly lower respiration rates (R) than the NH_4 nubbins (Tukey HSD, $p < 0.0001$). Mean Pn values normalized to skeletal surface area were equal to 0.35-0.41 µmol O_2 cm^{-2} h^{-1} in control and NO_3 corals versus 2 to 3 times more (0.94-1.25 µmol O_2 cm^{-2} h^{-1}) for NH_4 and NH_4-PO_4 nubbins. There was no significant difference in the above parameters between the NH_4 and NH_4-PO_4 treatments (ESM 5, ANOVA, $p > 0.05$). Pg per symbiont cell was above 1×10^{-6} µmol O_2 h^{-1} $symbiont^{-1}$ in control and NH_4-enriched corals while it was 3 times lower in NO_3 and NH_4-PO_4 corals (ESM 5, Tukey HSD, $p < 0.001$).

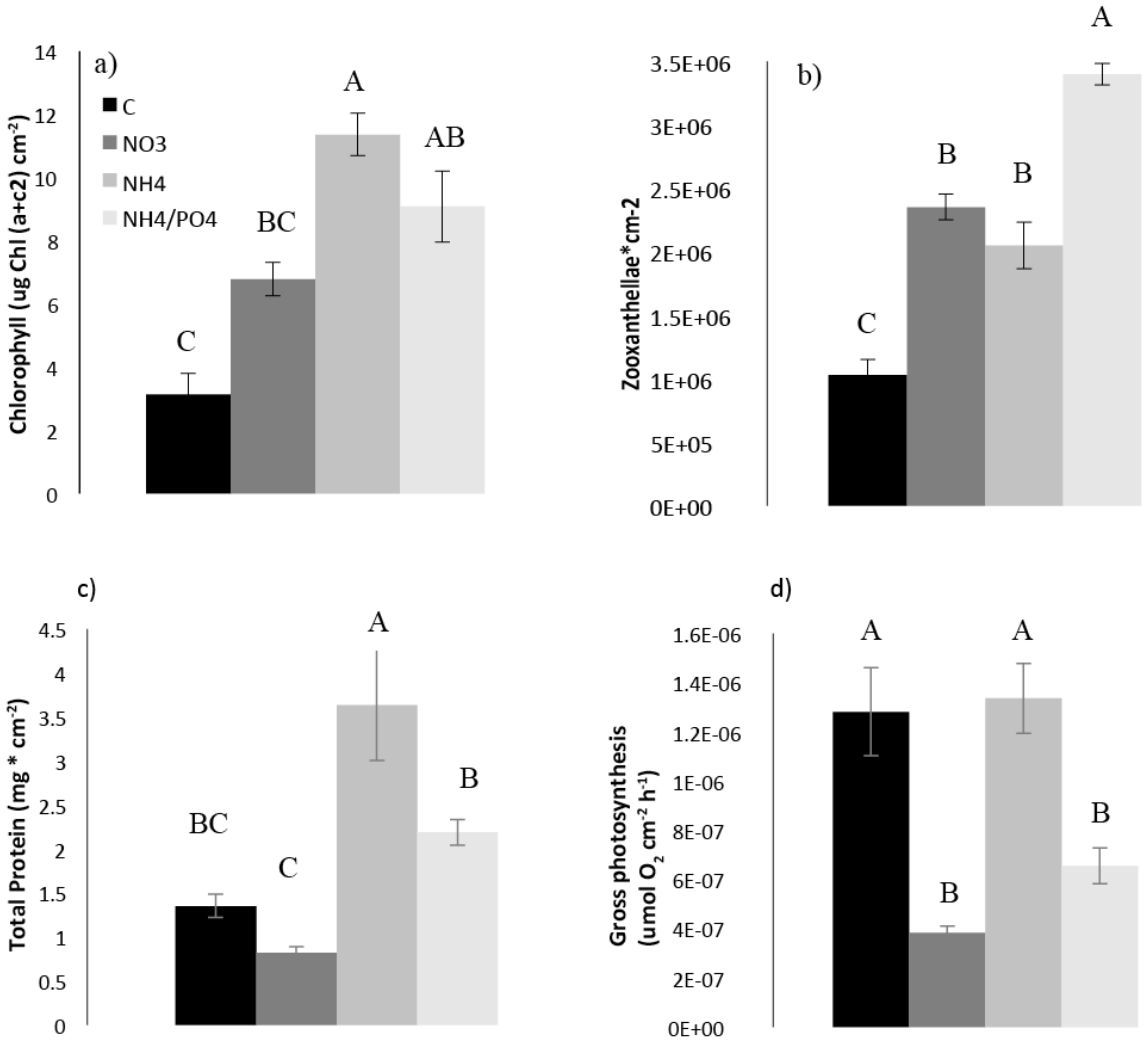


Figure 1. a) Total Chlorophyll (ug Chl ($a+c_2$) cm^{-2}), b) Symbiont (Nb Zoox cm^{-2}), c) Protein (mg cm^{-2}) contents and d) Gross photosynthesis rate (umoles O_2 h^{-1} $zoox^{-1}$) for the different treatments. Data are expressed as mean ± standard errors.

Carbon budget

The natural atom %^{13}C measured in non-enriched corals ranged between 1.128 and 1.133% in symbionts, and between 1.125 and 1.130% in coral tissue. After 5 h incubation in ^{13}C-bicarbonate, all nubbins were significantly enriched in ^{13}C compared to control corals (atom% ^{13}C between 1.157 and 1.180% in symbionts, and between 1.136% and 1.152% in host tissues). Only the final carbon budgets under the different conditions are reported in the results, intermediate calculations are shown in the ESM.

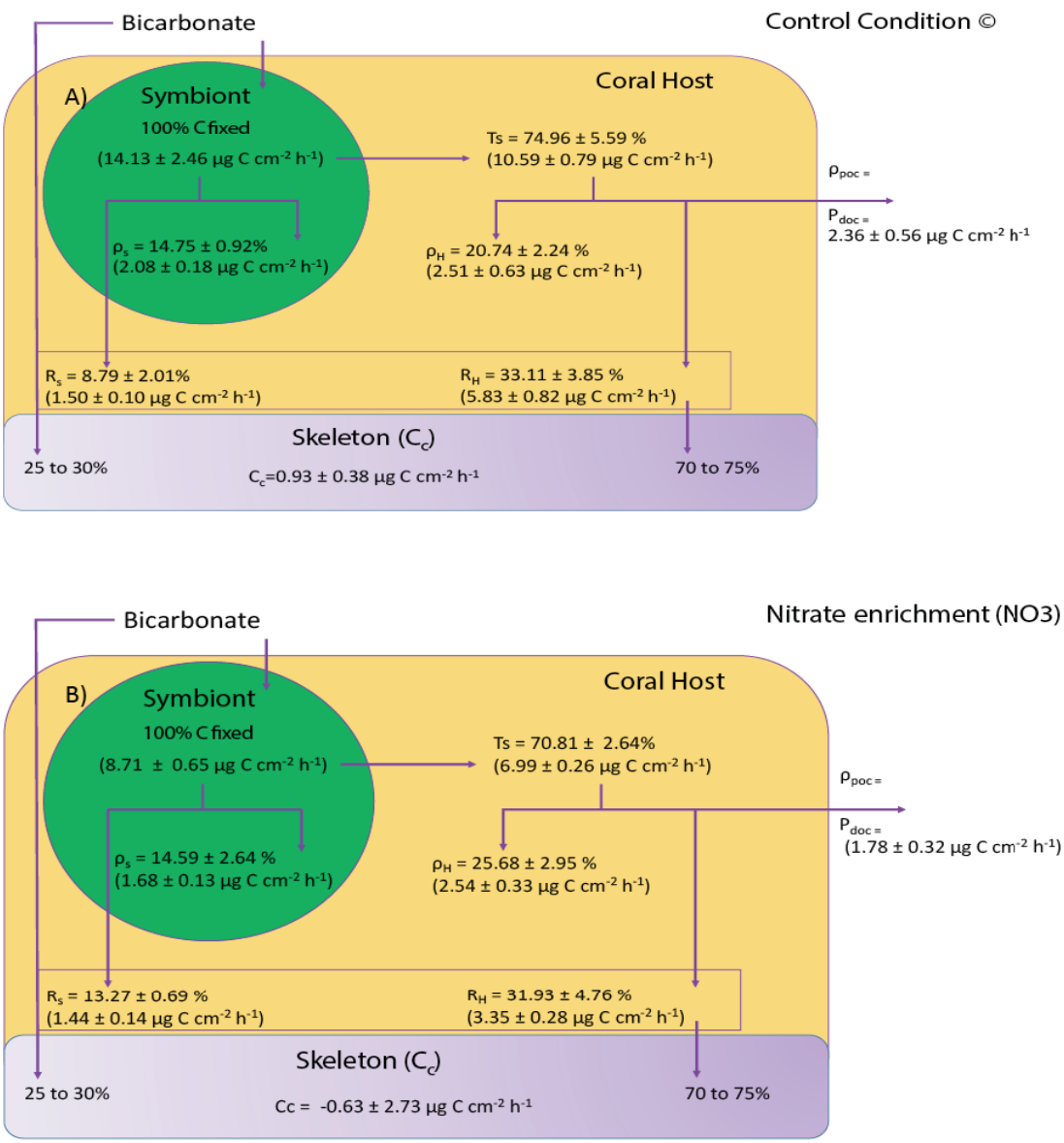
For control corals, the initial carbon fixed by symbionts (gross photosynthesis, Pg) was equal to 14.13 ± 2.46 ug C cm^{-2} h^{-1}. More than two-thirds (74.96 ± 5.59 % or 10.59 ± 0.79 µg C cm^{-2} h^{-1}) of this carbon was translocated to the host after 24 h (Fig. 2.a) and half was lost as respiration (ca. 55%) and mucus (dissolved and particulate organic carbon, ca. 23 %; Fig. 2.a). Only 20 % to 25 % remained both in the host and symbionts after 24 h. The final incorporation rates were thus equivalent in symbionts and host tissue (ANOVA, $p > 0.05$), 2.08 ± 0.18 and 2.51 ± 0.63 ug C cm^{-2} h^{-1} respectively.

Nutrient enrichment had significant effects on the fate of the autotrophically-acquired carbon, with significant differences between NH_4 or NO_3 enrichments, or when ammonium was combined with PO_4. NH_4 alone significantly increased the amount of carbon initially fixed by the symbionts (Pg = 25.71 ± 0.61 ug C cm^{-2} h^{-1}) compared to control nubbins (Tukey HSD, $p = 0.001$, Fig.3a). It also enhanced the amount of carbon translocated after 24 h (Tukey HSD, $p < 0.0001$, Fig.3a) in terms of total quantity (double amount, or 22.74 ± 0.82 µg C cm^{-2} h^{-1}) and percentage (80.38 ± 2.90 %). Eighty percent of the translocated carbon was lost after 24 h through respiration and mucus release (ca. 10.71 ± 0.73 ug C cm^{-2} h^{-1} significantly higher than in control corals, Tukey HSD, $p<0.001$, Fig.3a). However, the amount of carbon remaining in the host and symbionts (5.5 µg C cm^{-2} h^{-1}) was still significantly higher than in the control condition.

The NH_4-PO_4 enrichment again changed the carbon budget compared to control corals. The initial carbon fixation rate in symbionts was intermediate between control and NH_4 corals (Pg = 20.83 ± 1.07 µg C cm^{-2} h^{-1} Tukey HSD, p1=0.5 and p2=0.2). Carbon translocation rate was significantly lower than in control corals, since only 48.73 ± 7.03 % were translocated after 24 h (Tukey HSD, $p<0.05$), but the amount of translocated carbon stayed similar (Tukey HSD, $p > 0.05$). Half of the photosynthesized carbon was lost as respiration and “mucus” (Fig.3b).

The carbon incorporation rate in symbionts (40.69 ± 2.03 % of the total photosynthesized carbon or 7.01 ± 1.69 µg C cm^{-2} h^{-1}) was significantly higher compared to control and nitrogen-enriched corals (Tukey HSD, $p<0.002$). NO_3 nubbins presented a significant lower initial carbon fixation rate compared to control corals (Tukey HSD, $p < 0.03$; Fig.2b), with only 8.71 ± 0.65 µg C fixed cm^{-2} h^{-1}. Carbon translocation rates also tended to be lower, although not significantly. More than half of the photosynthesized carbon (52%) was lost as respiration and mucus (Fig.2b). Symbiont respiration and carbon incorporation rates were similar to control conditions (Tukey HSD, $p>0.05$). Compared to NH_4-enriched corals, initial carbon fixation rates, as well as the percentage and amount of carbon translocated were significantly lower (Tukey HSD, $p< 0.002$).

Figure 2. Carbon budgets for A) Control corals, N:P=0.5:0.05 and B) Corals maintained under N-NO3:P=3:0.05 enrichment. Data are expressed as mean ± standard errors.



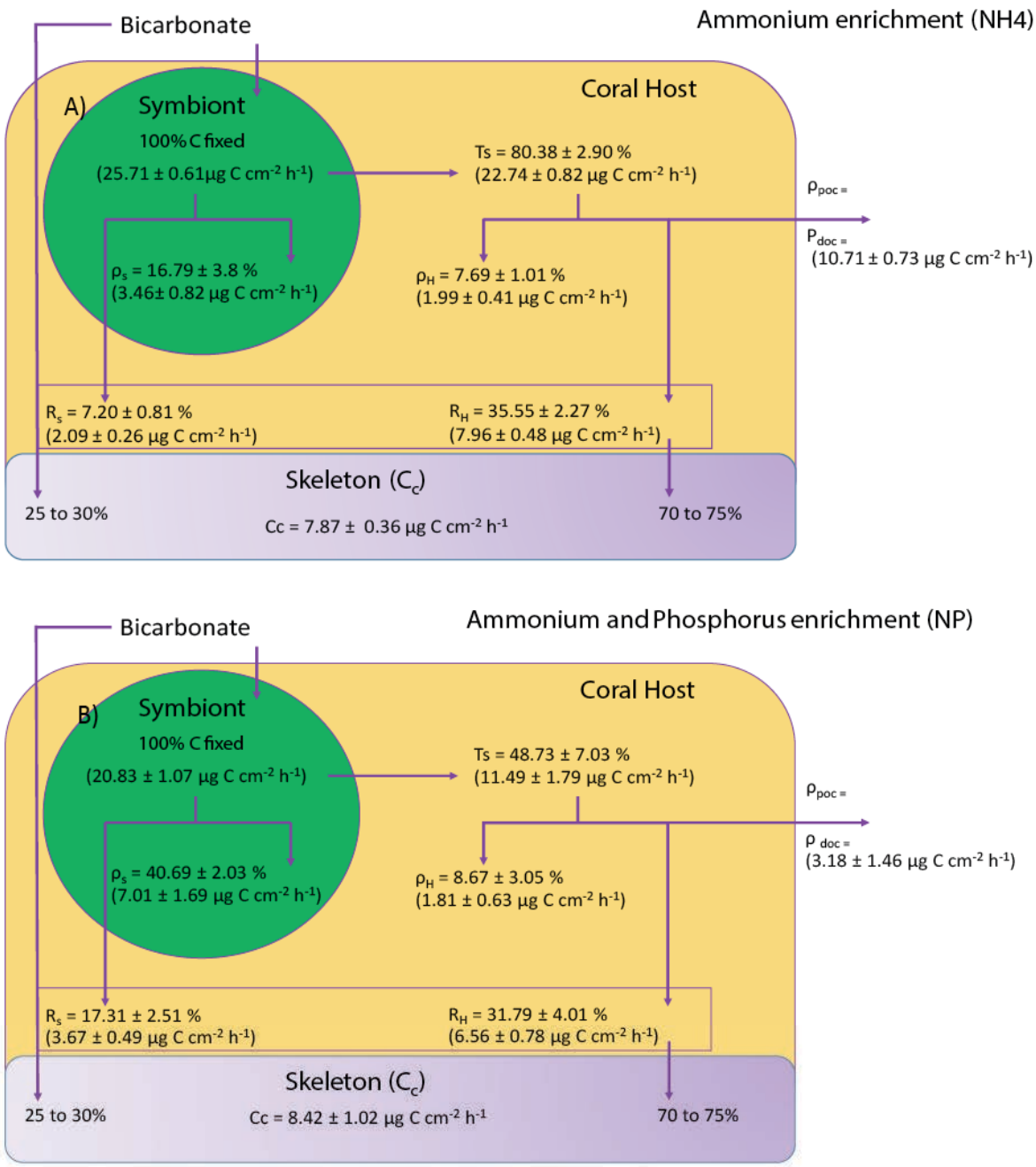


Figure 3. Carbon budgets for corals maintained under A) N-NH4:P=3:0.05 supply and B) N-NH4:P=3:1 addition. Data are expressed as mean ± standard errors.

Please have a look at the appendix n°2 for further details on the statistical analyses and supplementary results.

Discussion

Global climate change and other anthropogenic perturbations affect the biogeochemical cycles and the nutrient stoichiometry of marine ecosystems (Sterner and Elser 2002). As organisms need stable nutrient cycles to flourish in a particular environment (Arrigo 2005), any alteration leading to an imbalanced N:P stoichiometry will impact the organisms' health. Our study shows that the coral-dinoflagellate association is very responsive to changes in the nitrogen and phosphorus availability. We found evidence for significant differences in the acquisition of autotrophic carbon and its allocation within the symbiosis depending on the inorganic N:P ratio in seawater as well as the type of nitrogen source available. In addition, our results support the general view that the coral-algal symbiosis is nutrient limited when grown under the low dissolved N and P concentrations observed in oligotrophic environments.

After 3 weeks of culture at low N-P concentrations (control condition; N:P = 0.5:0.05), colonies showed a reduced metabolism and primary signs of nutrient limitation compared to NH_4-enriched corals: i.e. lower biomass (protein concentration) and calcification rates, and a reduced symbiont growth, which is comparable to what is observed in other nutrient-limited algae (Moore et al. 2013; Vanucci et al. 2012). A pronounced decrease in the symbiont density of several coral species was also previously observed under similarly low nutrient levels (Wiedenmann et al. 2013). Conversely, in the Gulf of Eilat (Israel), colonies of *S. pistillata* present 30 % more symbionts and from identical up to 3 times more areal chlorophyll content (Mass et al. 2010). Although in situ inorganic nutrient concentrations are equivalent to those supplied in this experiment, corals benefit from heterotrophic feeding, which can constitute a significant nutrient source (Houlbrèque et al. 2004b) . Interestingly, in this control poor-nutrient condition, a large amount of autotrophic carbon was still transferred to sustain the host respiratory needs. However, corals implemented a nutrient conservation strategy as little of this newly produced carbon was lost as dissolved and particulate material. These observations suggest that recovery from thermal stress-induced bleaching may be more difficult in very oligotrophic environments. Indeed, the lack of nutrient availability may limit symbiont growth and photosynthesis, and in turn the resilience of coral colonies.

The carbon budget comparison under nitrate and ammonium enrichment sheds new light into how both forms of nitrogen affect the symbiosis and helps explaining their different effects on coral metabolism.

The general belief is that nitrogen enrichment alleviates the symbiont dependency on the host for nitrogen supply, resulting in higher symbiont density, higher retention of photosynthates in symbionts for their own development, at the expense of host metabolism (Dubinsky et al. 1990; Wooldridge and Done 2009) and in a competition between symbiont photosynthesis and host calcification for inorganic carbon utilization (Marubini and Davies 1996; Stambler et al. 1991). That theory was however challenged by studies showing a positive effect of nutrient enrichment on coral growth (Béraud et al. 2013; Bongiorni et al. 2003; Langdon and Atkinson 2005) and by the fact that some corals can thrive in high-nutrient waters (Bongiorni et al. 2003; Szmant 2002). Our results highlight major differences in the carbon budget of the symbiosis between the two forms of nitrogen enrichment. Although symbiont density under both nitrogen forms doubled compared to control corals, total carbon acquisition and translocation were significantly higher in NH_4-enriched corals, inducing an enhancement in host calcification. These results are in agreement with previous studies showing that short-term ammonium enrichment in low concentration tends to enhance coral growth (Béraud et al. 2013; Bongiorni et al. 2003; Langdon and Atkinson 2005; Meyer and Schultz 1985) and suggest that inorganic carbon supply was sufficient to cover the needs for symbiont photosynthesis and host calcification. Conversely, nitrate supplementation induced a significant decrease in the amount of carbon acquired compared to control corals, due to lower rates of photosynthesis per symbiont cell. Compared to ammonium, both carbon acquisition and translocation were significantly and largely decreased. This is explained by the fact that nitrate reduction into ammonium is an energy and electron consuming process (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013). Indeed, nitrite reductase, which reduces nitrite into ammonium in the chloroplasts of photosynthetic cells, uses the reduced ferredoxin from the photosynthetic chain as an electron donor and consumes 6 electrons to catalyse the reduction. Thus, in this reaction, electrons are lost for the photosynthetic process. On the long term, or under stress, the reduced carbon fixation under nitrate enrichment may induce a nutrient shortage and may weaken the symbiosis, as observed in corals but also in other dinoflagellate-host associations (Uthicke et al. 2012). Although the detrimental effect of nitrate on photosynthesis has to be confirmed with different coral species and nitrate concentrations, excess nitrate in reef waters, which is mainly brought by industry and agriculture runoff, will likely severely affect the entire coral primary productivity.

On the contrary, ammonium is the principal form of recycled nitrogen from fish excretion (Holbrook et al. 2008; Meyer and Schultz 1985), although rain can also be a significant source in some reef environments (Altieri et al. 2014). Enhancing fish populations above reefs will likely be beneficial for corals, as already observed with resident fish schools (Meyer et al. 1983).

The last treatment (NH_4-PO_4) reveals how a change in nutrient ratio in seawater can affect the animal-algal symbiosis by shifting nutrient limitation from one partner to the other. Compared to the NH_4-treatment, in which P level was kept low, the NH_4-PO_4 enrichment induced a significant increase in symbiont density (above 3 x 10^6 cells cm^{-2}). The allocation of autotrophic nutrient thus shifted from the host to the symbionts, which decreased their photosynthate translocation down to 48% and kept a large amount of photosynthetic products for their own use. In addition, due to their high density in the host tissue, each symbiont cell was less efficient in acquiring carbon due to a self-shading and light limitation (Enríquez et al. 2005; Lesser et al. 2000), and/or due to a CO_2 limitation (Dubinsky et al. 1990). Those results suggest that differences in symbiont genotype and/or density within the host tissue may shape the response of corals to nutrient enrichment. Coral species, which host low symbiont densities and/or slow growing symbiont genotypes are likely to be more resilient than others to eutrophication stress and also to bleaching (Cunning and Baker 2013). Soft corals such as *Heteroxenia fuscescens*, which harbour rhythmic pulsating tentacles, can represent another potential resilient group. Pulsations indeed maintain an active water movement, which enhances photosynthesis via the fast removal of excess oxygen and the fast supply of inorganic carbon (Kremien et al. 2013). We therefore suggest that eutrophication may cause a shift in the coral species composition of the reefs, by favouring species, which can avoid carbon limitation of their symbionts.

Taken all together, our results suggest that both the nitrogen source and the N:P ratio in seawater modify the symbiotic relationship between host and algae, by affecting the autotrophic carbon acquisition and allocation. The relevance of seawater N:P ratio stoichiometry for coral health was already pointed out by Wiedenmann et al (2013). They observed, during thermal stress, a higher decrease in photosynthetic efficiency of the symbionts under imbalanced N(nitrate):P ratio (3:0.07) than when phosphorus was available. Our data bring another dimension to the conclusions of these authors, since in both N:P imbalanced ratios presented in this study (NH_4:PO_4 or NO_3:PO_4 ratios: 3:0.05), only the nitrate-supplied condition weakened the symbiosis after three weeks.

Additionally, we also showed that balanced N(ammonium):P ratio significantly decreased the percentage of carbon translocation in *S. pistillata* at the detriment of the coral host, compared to an imbalanced N(ammonium):P ratio, suggesting that the effect of nutrient enrichment on the coral symbiosis is more complex than previously thought. Finally, the carbon budget analysis suggests that not only the N:P but also the C:N:P ratio and the symbiont density have to be taken into account to understand the nutritional relationship between the symbionts and their host.

Conclusion

Nutrient-induced changes in host-symbiont interactions have been well-studied in terrestrial plant-fungal associations (Ryan et al. 2014), but much less is known about it in aquatic systems. There are still large gaps in our understanding on how nutrients affect marine symbioses. This study showed that nutrient concentrations and ratios differently impact the carbon acquisition and allocation within the coral-dinoflagellate symbiotic association. Future studies should further investigate nutrient combinations and ratios, as well as their synergistic effects with other stressors, such as thermal, light and acidification stresses, which all affect the acquisition and allocation of carbon between the two partners (Wiedenmann et al. 2013). More, these experiments were run with the coral holobiont *S. pistillata*, in symbiosis with clade A. Since symbionts from different clades present various thermal sensitivity in nitrogen metabolism (Baker et al. 2013), further research is required to assess the relevance and the effect of variation in N:P stoichiometry on coral health. Finally, our study sheds new light into how marine symbioses face eutrophication compared to other terrestrial and marine species, thus essential to predict the responses of communities to anthropogenic disturbances.

Acknowledgements

We thank S. Sikorski, C. Rottier and A. Labbe for laboratory assistance, D. Desgré for his great support in the experimental implementation and Pr. D. Allemand, Director of the Centre Scientifique de Monaco, for his scientific support. We are grateful to Pr. J. Wiedenmann from the University of Southampton for his valuable comments on the manuscript as well as to Dr. Jean-Olivier Irisson from the Observatoire Océanologique de Villfranche-sur-mer for statistical advices and to HK for her proof-reading. We thank two anonymous reviewers and the Associate editor for their time and effort to provide helpful suggestions and comments on the manuscript. Fundings for this project were provided by the CSM and the Institut Universitaire Européen de la Mer.

The relationship between heterotrophic feeding and inorganic nutrient availability in the scleractinian coral *Turbinaria reniformis* under a short term temperature increase

Limnology & Oceanography | Publié en ligne octobre 2015

[1*]Leïla Ezzat, [2*]Erica K. Towle, [3]Jean-Olivier Irisson, [2]Chris Langdon and [1]Christine Ferrier-Pagès

Résumé

L'augmentation de la température de surface de l'eau de mer représente un des facteurs principaux menaçant les récifs coralliens, qui peuvent être soumis à des épisodes de blanchissement. L'intensité du blanchissement peut être aggravée en milieu eutrophisé, caractérisé par de fortes concentrations en plancton et en sels nutritifs ainsi qu' à des taux de sédimentation et de turbidité élevés. Alors que la disponibilité en zooplancton (l'hétérotrophie) atténue les effets négatifs du stress thermique sur la physiologie des coraux (blanchissement), la présence de fortes concentrations en sels nutritifs décuple ce phénomène, créant ainsi un paradoxe. Notre étude expérimentale visait à distinguer les effets de ces deux composants de l'eutrophisation sur la réponse physiologique de *Turbinaria reniformis* maintenu à une température de croissance normale ou soumis à un stress de température. De plus, trois différents traitements nutritionnels ont été testés afin d'étudier l'influence du rapport N:P sur la physiologie corallienne : a) condition contrôle (SW 0.5 µM N and 0.1 µM P), b) un enrichissement en N seul (SW+2 µM N) ou c) un double enrichissement en N et P (SW +2 µM N and +0.5 µM P). Les résultats ont montré l'effet négatif d'un enrichissement en nitrate (N-2µM) seul, ou couplé avec un apport hétérotrophe, sur les processus de photosynthèse et de calcification des coraux. Au contraire, un enrichissement combiné en nitrate et phosphate a maintenu le métabolisme ainsi que les taux de calcification du corail durant le stress de température et l'ont stimulé lorsque couplé à un apport hétérotrophe. Nos résultats mettent également en lumière la relation étroite existant entre la disponibilité en sels nutritifs et les capacités hétérotrophes. De plus, ils confirment l'importance du rapport N:P comme facteur determinant la santé de l'holobionte corallien.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.

[2] The Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences, Department of Marine Biology and Fisheries, 4600 Rickenbacker Causeway, Miami, FL 33149, USA.

[3]Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV), Station Zoologique, B.P. 28, Chemin du Lazaret, 06234 Villefranche-sur-Mer Cedex, France

*Ces auteurs ont contribué de manière égale à la réalisation de ce travail

Article n°4

The relationship between heterotrophic feeding and inorganic nutrient availability in the Scleractinian coral *Turbinaria reniformis* under a short term temperature increase

Limnology & Oceanography | First published online october 2015

[1*]Leïla Ezzat, [2*]Erica K. Towle, [3]Jean-Olivier Irisson, [2]Chris Langdon and [1]Christine Ferrier-Pagès

Summary

Worldwide increase in seawater temperature represents one of the major threats affecting corals, which experience bleaching, and thereafter a significant decrease in photosynthesis and calcification. The impact of bleaching on coral physiology may be exacerbated when coupled with eutrophication, i.e. increasing plankton, inorganic nutrient concentrations, sedimentation and turbidity due to coastal urbanization. Whereas zooplankton provision (heterotrophy) may alleviate the negative consequences of thermal stress, inorganic nutrient supply may exacerbate them, which creates a paradox. Our experimental study aims to disentangle the effects of these two components of eutrophication on the physiological response of *Turbinaria reniformis* subject to normal and to a short-term temperature increase. Additionally, three different inorganic nutrient ratios were tested to assess the influence of nutrient stoichiometry on coral physiology: control (ambient SW 0.5 µM N and 0.1 µM P), N only (ambient +2 µM N) and N+P (ambient +2 µM N and +0.5 µM P). Our results show a deleterious effect of a 2 µM nitrate enrichment alone (N) on coral photosynthetic processes under thermal stress as well as on calcification rates when associated with heterotrophy. On the contrary, a coupled nitrate and phosphorus enrichment (N+P) maintained coral metabolism and calcification during thermal stress and enhanced them when combined with heterotrophy. Broadly, our results shed light on the tight relationship existing between inorganic nutrient availability and heterotrophy. Moreover, it assesses the relevance of N:P stoichiometry as a determining factor for the health of the holobiont that may be adapted to specific nutrient ratios in its surrounding environment.

[1] Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.

[2] The Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences, Department of Marine Biology and Fisheries, 4600 Rickenbacker Causeway, Miami, FL 33149, USA.

[3]Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV), Station Zoologique, B.P. 28, Chemin du Lazaret, 06234 Villefranche-sur-Mer Cedex, France

*These authors contributed equally to this work

Introduction

Rising seawater temperature and eutrophication are currently two of the most serious factors threatening coral reefs throughout the world (Fabricius 2011; Fabricius et al. 2013; Fabricius et al. 2011). Over the last 30 years, global climate change has indeed increased average oceanic temperature by approximately 0.2 °C per decade (Hansen et al. 2006). Therefore, the world's oceans are warmer now than at any point in the last 50 years and seawater temperature is expected to continue increasing. Thermal stress has detrimental effects on many marine organisms, some of which have already started to reach the limits of their capacity to persist (Visser 2008). In symbiotic corals, high temperatures induce bleaching (i.e. the loss of the dinoflagellate symbionts of the genus *Symbiodinium* sp.), thus weakening the symbiotic association (Brown 1997). *Symbiodinium*, through inorganic nutrient acquisition and photosynthesis, provide 75 to 100% of the daily metabolic requirements of their host (Grottoli et al. 2006; Tremblay et al. 2012). Therefore, bleaching induces the loss of the coral's major source of nutrition and can cause widespread mortality (Glynn 2012). In addition, human activities such as increased coastal fertilizer use, land clearing, and urbanization contribute to eutrophication (enhanced nutrients, particles and sedimentation levels) of coastal sites and have modified the nutrient stoichiometry in these ecosystems (Sterner and Elser 2002). Eutrophication alters coral health because it enhances algal growth and induces competition for space and light (Bruno et al. 2009; De'ath and Fabricius 2010; Graham et al. 2015; Norström et al. 2009). It has also been suggested that elevated inorganic nutrient levels directly impact corals by decreasing their thermal thresholds for bleaching. Nutrient addition indeed tends to enhance symbiont growth inside the coral host tissue, increasing oxidative stress during warm seasons (Nordemar et al. 2003; Vega Thurber et al. 2014; Wiedenmann et al. 2013; Wooldridge 2009; Wooldridge and Done 2009). Therefore, there is evidence to suggest that corals living in nutrient–rich environments that are also experiencing thermal stress may be particularly endangered.

However, several laboratory experiments have also shown that nutrient supplementation may increase the ability of corals to withstand climate change stress because it can offset the negative effect of a temperature increase by favoring symbiont growth and photosynthesis. Nutrients can be acquired either via heterotrophy, the capture of zooplankton prey and or particulate organic matter (POM) by the coral host, or via autotrophy, via the uptake of inorganic nutrients (e.g. nitrate, ammonium, phosphate) by the symbionts.

Aside from improving coral metabolism under non-stressful conditions (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009), several studies have indeed identified coral heterotrophy as an indicator of resilience to bleaching stress (Connolly et al. 2012; Grottoli et al. 2006; Palardy et al. 2008; Rodrigues and Grottoli 2007). In their model, Anthony et al. (2009) stated that increased heterotrophy was a good predictor of survivorship and reduced mortality risk during a bleaching event, and Tolosa et al.(2011) discovered that zooplankton feeding played an essential role in sustaining *Turbinaria reniformis* metabolism under thermal stress. Furthermore, moderate inorganic nitrogen supply has been shown to promote coral growth and metabolism (Sawall et al. 2011; Tanaka et al. 2007), especially under elevated pCO_2 (Chauvin et al. 2011; Holcomb et al. 2010; Langdon and Atkinson 2005), or thermal stress (Béraud et al. 2013). Based on these studies, there are lines of evidence to suggest that corals thriving in nutrient-rich environments may be more resilient to stress than others, if not in competition with algae.

In view of this conflicting evidence, more research is needed to understand the effects of heterotrophy and/or inorganic nutrient supplementation on coral metabolism during environmental stresses. Several hypotheses for the differing results have been put forward. In their meta-analysis of the effects of eutrophication on corals, Shantz & Burkepile (2014) assert that the physiological response of corals to eutrophication is context-dependent. Thus, when comparing studies, several parameters such as coral taxa, coral morphology, nutrient concentration and nitrogen source and type (i.e. ammonium vs. nitrate, organic vs. inorganic) have to be taken into account. More importantly, the stoichiometry of the N:P ratio needs to be close to the N:P ratio of the coral tissue), i.e. a complete lack of phosphate with nitrate enrichment may be unfavorable for the symbiosis (Wiedenmann et al. 2013).

In coastal ecosystems, eutrophication enhances both POM and inorganic nutrient concentrations. Nutrient-rich reefs tend to have higher gross production as well as higher heterotrophic consumption than oligotrophic reefs (Mioche and Cuet 1999; Szmant 2002). To date, only two studies have attempted to decipher the effect of the different components of eutrophication (POM, inorganic nutrient, sedimentation and turbidity) on coral growth and survival (Fabricius 2005; Fabricius et al. 2013). The first study by Fabricius (2005) highlighted sedimentation and turbidity as the two major factors of stress for coral growth.

Conversely, their model suggested an increase in growth with POM, and a moderate reduction in growth with dissolved inorganic nutrient enrichment. Fabricius et al. (2013) however later observed low coral growth under a coupled enrichment in dissolved inorganic nutrients (nitrate) and POM. In view of these contrasting observations on coral growth, more work is needed to improve our knowledge of the effect of eutrophication on the coral physiological response in terms of photosynthesis, calcification, and tissue growth. In this experimental study, we sought to disentangle the combined effect of POM (heterotrophy) and inorganic nutrient enrichment from their individual effects on the physiological response of the scleractinian coral *T. reniformis* maintained under ambient temperature conditions as well as during short-term thermal stress. In addition, we implemented different N:P ratios (4:1, 5:1 and 20:1) of inorganic nutrients in seawater to assess the effect of nutrient stoichiometry on coral physiology and symbiotic interactions. We hypothesize that i) heterotrophy has a different effect than inorganic nutrient supplementation on coral metabolism; ii) the inorganic N:P ratio shapes the metabolic response of *T. reniformis* under both normal and stressful conditions; nitrate enrichment being more detrimental to coral physiology than a combined enrichment in nitrate and phosphate (Wiedenmann et al. 2013); iii) the combined effect of heterotrophy and inorganic nutrient supplementation differs from their individual effects on coral physiology.

Materials and Procedures

Experimental set-up

The widely distributed scleractinian coral *Turbinaria reniformis* (Dendrophylliidae) was used in this study due to its ability to thrive in turbid and organically rich environments (Anthony 2006; Veron 2000a). Five large colonies were sampled between 5m and 10m depth in different locations of the Northern Red Sea, brought back to the laboratory, and tagged with an electronic microchip implant to account for parent colony before being used to produce a total of 456 nubbins of about the same size (4cm diameter). Nubbins were then evenly distributed into twelve independent 20 L tanks (38 nubbins per tank), maintained under the following controlled conditions: aquaria were continuously supplied with oligotrophic seawater containing a low amount of nutrients (~0.5 µM nitrate (NO_3) and ~0.1 µM phosphate, PO_4) at a flow rate of 20 L h^{-1}.

A constant seawater temperature of 25 ± 0.5°C was regulated using submersible resistance heaters (Visi-ThermH Deluxe, Aquarium Systems, France) and metal halide lamps (Philips, HPIT 400W, Distrilamp, Bossee, France) provided a constant irradiance of 200 µmol photons m^{-2} s^{-1} inside the tanks (12:12 light:dark). Submersible pumps ensured water mixing in the tanks. Nubbins were kept unfed for four weeks in order to prevent any impact of heterotrophy on the physiological responses of corals before performing the experiments described below. After the acclimation period, six different nutritional conditions were established (in duplicated tanks) as described in Table 1 and below. Tanks were cleaned weekly to avoid any algal proliferation.

Four control tanks were maintained in duplicate under low inorganic nutrient concentrations (as described above), with or without zooplankton (heterotrophy). In four other tanks, supplied with or without zooplankton, nitrate was added to reach a N:P ratio of 20:1). Finally, in the last 4 tanks, maintained with or without zooplankton, nitrate and phosphate were added in parallel to reach a N:P ratio of 4:1). Zooplankton was provided in the "heterotrophic" tanks every evening for 5 days per week, by means of ca. 2000 *Artemia salina* (in total) that were left in the tanks until they were eaten or diluted with the seawater renewal. For the nitrate and nitrate-phosphate enriched conditions, tanks were respectively supplied with a solution of sodium nitrate ($NaNO_3$) alone or in combination with sodium dihydrogenophosphate (NaH_2PO_4). Stock solutions were continuously pumped from individual batch tanks via a peristaltic pump and delivered to the experimental tanks at a final concentration of 2.0 µM for $NaNO_3$ and 0.5 µM for NaH_2PO_4.

The stock solutions were renewed every three days and added to the tanks at a constant flow rate of 0.3 L $h^{-1.}$ Inorganic nutrient concentrations in the water were monitored in each tank and in triplicate twice a week using an Autoanalyzer (Alliance Instrument, AMS, France) according to Tréguer and LeCorre (1975). After three weeks under these experimental conditions (T_0), temperature was increased from 25 ± 0.5°C to reach 30 ± 0.5°C over a 10 day-period and was kept constant for 7 days (T_1). This thermal stress was chosen according to the highest temperature observed in the northern Red Sea (Sawall et al. 2014). After 17 days under thermal stress, all tanks were brought back to 25 ± 0.5°C over 10 days for two additional weeks to assess recovery (T_2). Several measurements (described below) were performed to assess physiology and photophysiology of *T. reniformis* at the end of each temperature step (T_0, T_1 and T_2).

Measurements

Photosynthesis and respiration rates, total chlorophyll, symbiont density and protein determination

Rates of net photosynthesis (Pn) and respiration (R) were assessed at 200 and 0 µmoles photons m^{-2} s^{-1} on 6 randomly selected nubbins per treatment in 50 ml glass chambers supplied with filtered seawater (FSW). Chambers were equipped with a Unisense optode (oxygen-sensitive minisensor) connected to the Oxy-4 software (Chanel fiber-optic oxygen meter, Presens, Regensburg, Germany). The optodes were calibrated before each experiment against air-saturated and nitrogen-saturated seawater (for the 100% and 0% oxygen respectively). Stir bars were used to continuously mix the water. Light was provided by a metal halide lamp (Philips, HPIT 400W, Distrilamp, Bossee, France). Pn and R were calculated by regressing oxygen production or consumption against time. Gross photosynthesis was estimated by adding the absolute value of R to Pn. At the end of each incubation, nubbins were frozen overnight (-20°C) before the subsequent determination on the same nubbins of symbiont density, total chlorophyll and protein concentration according to Hoogenboom et al. (2010a). Briefly, tissue was removed from the skeleton of each nubbin with an air-pick, and collected in 10 mL of 0.45 µM filtered seawater. Tissue slurry was then homogenized with a potter grinder and divided into 5 mL sub-samples. The first sub-sample was used for the determination of zooxanthellae density and protein concentration. Density of symbionts was quantified (in 500 µL) using an inverted microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and the Histolab 5.2.3 image analysis software (Microvision, Every, France). Protein concentration was assessed according to Smith et al.(1985) using a BCAssay Protein Quantification Kit (Uptima, Interchim) and a Xenius® spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). The second 5 mL sub-sample was centrifuged at 8000g for 10min. Supernatant was removed and the symbionts resuspended in 5mL acetone for chlorophyll *a* and c_2 extractions. Chlorophyll concentration was then determined according to the method of Jeffrey and Humphrey (1975) with a spectrophotometer. Data were normalized to the upper side surface area (cm^2) of each nubbin, using the wax-dipping method from Veal et al. (2010).

Relative electron transport rate (rETR)

Measurements were performed on 6 nubbins per treatment as for photosynthesis. A Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometer [DIVING-PAM, Walz, Germany (Schreiber et al. 1986)] was used to measure the minimal (F_0) and maximal (F_m) chlorophyll$_a$ fluorescence after five minutes of dark adaptation by applying a weak pulse red light (max. intensity <1 mol photon m^{-2} s^{-1}, width 3µs, frequency 0.6kHz) and a saturating pulse of actinic light (max. intensity 5,000 µmol photon m^{-2} s^{-1}, pulse width 800 ms) on coral nubbins placed under a constant distance from the optical fiber. The Rapid light curve (RLC) function of the PAM assessed the relative electron transport rate (rETR) after exposing nubbins to eight light intensities (from 69 to 1500 µmoles photons s^{-1} m^{-2}) over 10 seconds.

Feeding rates

Feeding rate experiments were conducted as described in Houlbrèque et al. (2004a). Each coral nubbin was incubated in individual Plexiglas flumes of 1L, specially designed for this kind of measurement according to Levy et al. (2001), based on the procedures described by Vogel & LaBarbera (1978). Flow speed was approximately 4 cm s^{-1} as this was found to allow for maximum feeding in *T. reniformis* (Ferrier-Pagès et al. 2010), and chambers were placed in a water bath maintaining constant temperature. Measurements were run at T_0, T_1 and T_2 on fed nubbins only (Table 1, n=6 per treatment). When polyps were fully expanded, the experimental run was started by delivering 1,000 *Artemia salina* nauplii L^{-1} according to Gori et al. (2015), previously quantified using a Bogorov counting chamber. Six replicated 10 ml seawater samples were taken from the flow chamber just after the start of the experiment (0 min), then at 15 min, 30 min, 45 min, and 60 min. *A. salina* nauplii in each sample were counted and immediately replaced in the chambers to avoid any concentration decrease.Three control experiments were also conducted at each temperature step (prey only, without corals) to account for possible concentration decrease due to nauplii becoming trapped in the flume. Feeding rates were calculated as the decrease in prey concentration against time and normalized to number of polyps.

Calcification rates

Growth rates (n=10 per treatment) were monitored weekly using the buoyant weight technique (Davies 1989). Growth data are presented as percent weight increase per day, using the equation: [(F-I)/ (I * number of days)] *100, where F is the weight of each nubbin at the end of a given time step (T_0, T_1, T_2) and I is the weight at the beginning of a given time step.

Statistical analyses

Statistical analyses were processed using the program JMP Version 11.0.0. Data were checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and for homoscedasticity using Levene's test. When conditions were not fulfilled, a data transformation (natural logarithms) was used. Preliminary partly nested ANOVA tests were used to test for any possible tank effect. This effect was not significant for any of the parameters so this factor was excluded from analyses (Underwood 1997). A general linear model for parametric repeated measure analysis of variance (ANOVA) was performed on the feeding and growth rate response variables using "Temperature" as dependent variable and "Inorganic" enrichment, "Organic" feeding and the corresponding sample (zooplankton provision) as categorical predictors. The assumption of sphericity (independency of the repeated measures) was tested. When not fulfilled, the hypotheses were tested using the multivariate approach (Wilks test) for repeated measurements. A Three-Way ANOVA was then performed on all other studied variables with "Inorganic" enrichment, "Organic" feeding and "Temperature" as factors. When significant differences appeared, analyses were followed by *a posteriori* testing (Tukey's HSD test). P-values were considered significant for $p < 0.05$.

Table 1. Experimental conditions for the six different treatments : Control condition (C), Control condition + zooplankton provision (Heterotrophy) (CH), Nitrate enrichment (N), Nitrate enrichment + Heterotrophy (NH), Nitrate and phosphorus enrichment (NP), Nitrate and phosphorus enrichment + Heterotrophy (NPH). The "x" shows in which treatment zooplankton and/or inorganic enrichment was performed.

Characteristics	**Treatments**					
	C	**CH**	**N**	**NH**	**NP**	**NPH**
Natural seawater*	x	x	x	x	x	x
Supply of 2000 artemia d^{-1}		x		x		x
2 µM nitrate addition			x	x	x	x
0.5 µM phosphate addition					x	x

***(<0.05 µM N and < 0.1 µM P)**

Assessment

Evolution of the treatments during the experiment

During heat-stress, unfed control corals (C) significantly decreased their symbiont density (Table 4, Tukey HSD, p=0.007) as well as their protein content (Table 4, Tukey HSD, p=0.035). In addition, the rETR of all control corals (C and CH) was lower during thermal stress (Fig. 2, Tukey HSD, p<0.0055), while respiration rates and Pg were increased (Fig.1, Tukey HSD, p<0.0445 and p<0.0013 respectively). During the recovery period, Pg of fed corals and R of unfed corals decreased and returned to their basal level measured at 25°C (Tukey HSD, p=0.028 and p=0.0002 respectively, compared to 30°C).

During thermal stress in the nitrate-enriched treatments, rETRmax of unfed colonies (Fig.2, Tukey HSD, p<0.0001 and Tukey HSD, p=0.047 respectively) and calcification rates of fed colonies (Fig. 2, Tukey HSD, p=0.02 respectively) significantly decreased. Pg increased slightly for NH corals (Tukey HSD, p=0.0115), while no difference was observed for N nubbins compared to control conditions (Tukey HSD, p> 0.05). During the recovery period, calcification rates of fed corals remained very low, while protein content largely increased compared to 25°C and 30°C (Tukey HSD, p<0.012). Symbiont density of unfed corals significantly increased compared to 30°C (Tukey HSD, p=0.0046).

NP-enriched corals (NP and NPH) significantly changed their physiology throughout the entire study. At 30°C, Pn of all colonies, R of unfed colonies, and calcification of fed colonies significantly increased compared to respective rates at 25°C (Fig. 1, 2, Table 2 and 3, Tukey HSD, p<0.01 p<0.0001 and p=0.0061). During recovery, respiration rates in unfed corals returned to their basal values (Tukey HSD, p<0.0001) and rETR max values decreased compared to 25°C and 30°C (Tukey HSD, p<0.0065).

Comparison between treatments at each temperature step

At 25°C, NPH colonies presented a higher chlorophyll content per surface area compared to the other corals, except NP (Table 4, Tukey HSD, p<0.0112), as well as higher calcification rates compared to NH nubbins (Fig. 2, Tukey HSD, p<0.05) and higher feeding rates (Fig. 2, Tukey HSD, p<0.03). In addition, the rate of Pn was higher for NP corals than for C and CH (Fig.1, Tukey HSD, p<0.0414). Respiration rates were lower in NH and NP corals compared to CH corals (Tukey HSD, p<0.0083).

At 30°C, NP and NPH treatments maintained higher chlorophyll content than C and CH regimes (Tukey HSD, $p<0.0408$). NPH corals also showed the highest zooxanthellae density compared to NH, C and CH (Tukey HSD, $p<0.035$). During thermal stress, nitrate enriched corals (N and NH) presented the largest amount of differences compared to the other treatments. NH nubbins had significantly less protein than NPH and CH corals (Tukey HSD, $p<0.0422$). N nubbins showed lower rates of Pn (Tukey HSD, $p<0.0185$) than NP and NPH corals. N and NH nubbins showed lower rates of R than C and NP corals (Tukey HSD, $p<0.029$) and the lowest Pg compared to all other treatments (Tukey HSD, $p<0.012$). In addition, NH corals showed the lowest calcification rate compared to all other treatments (Tukey HSD, $p<0.0446$) except N nubbins, while NPH showed the highest calcification rates (Tukey HSD, $p<0.006$). Feeding rates were higher in NPH and NH nubbins compared to CH corals (Tukey HSD, $p<0.0288$).

After two weeks recovery, Pn remained higher in NP-enriched corals (NP and NPH) than in N-enriched (N and NH) and C corals (Tukey HSD, $p<0.0001$). Pg was higher in NP and CH treatment nubbins than in C, N and NH regimes (Tukey HSD, $p<0.036$). N and NH corals showed higher symbiont densities compared to control corals (C and CH) (Tukey HSD, $p<0.002$).

Figure 1. Rates of gross photosynthesis and respiration (µmoles O_2 h^{-1} cm^{-2}) for the different nutritional treatments according to the temperature steps from left to right (T_0, T_1, T_2). Data are presented as mean ± SE. Letters represent statistical differences based on *post-hoc* Tukey's HSD test ($p<0.05$). Dark color.

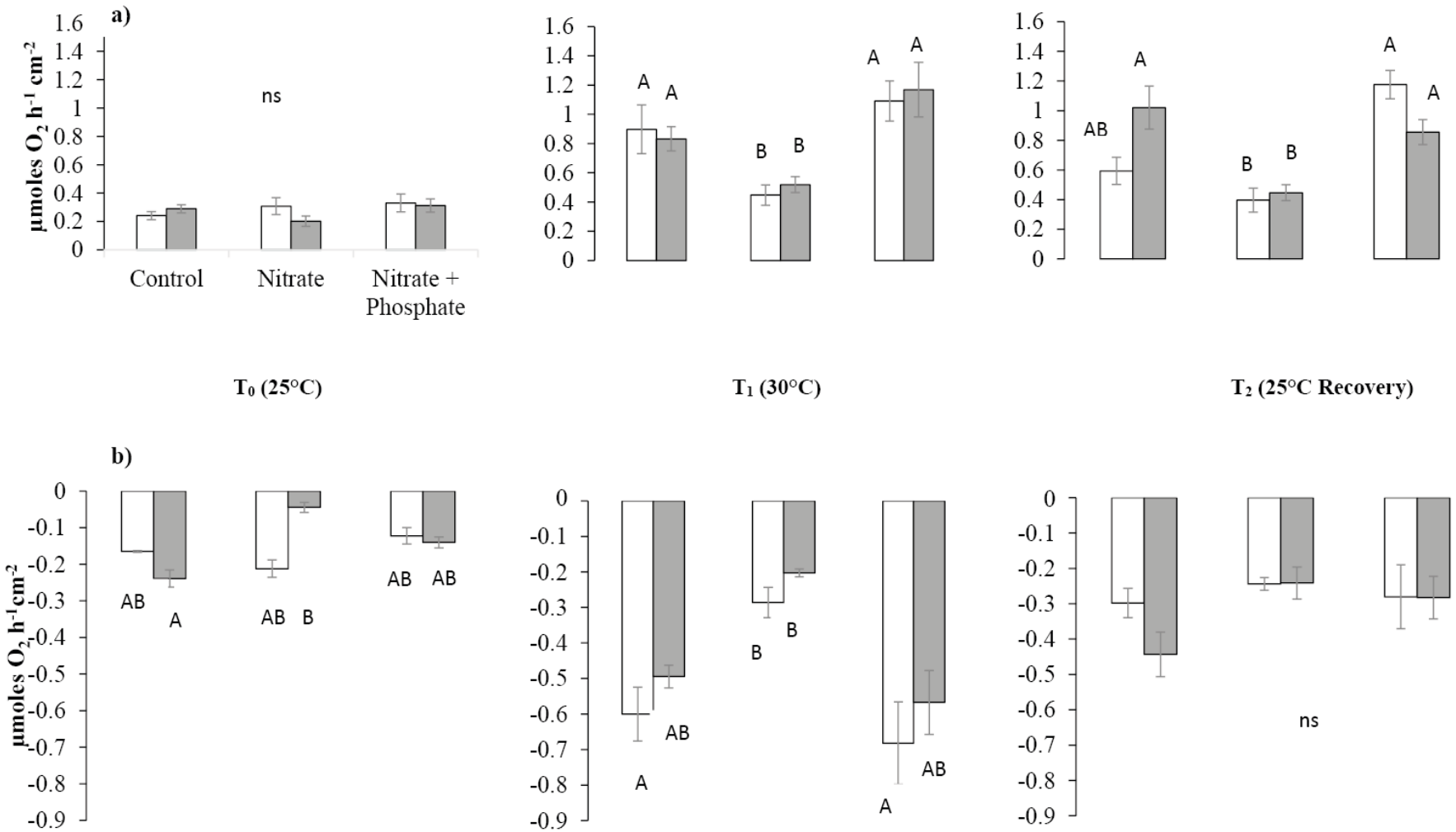


Figure 2. a) rETR max values, b) Rates of calcification (% change in growth per day) and c) feeding (Nb artemia $h^{-1}polyp^{-1}$) for the different nutritional treatments according to the temperature steps from left to right (T_0, T_1, T_2). Data are presented as mean ± SE. Letters represent statistical differences based on *post-hoc* Tukey's HSD test ($p<0.05$). Dark color represent zooplankton supply.

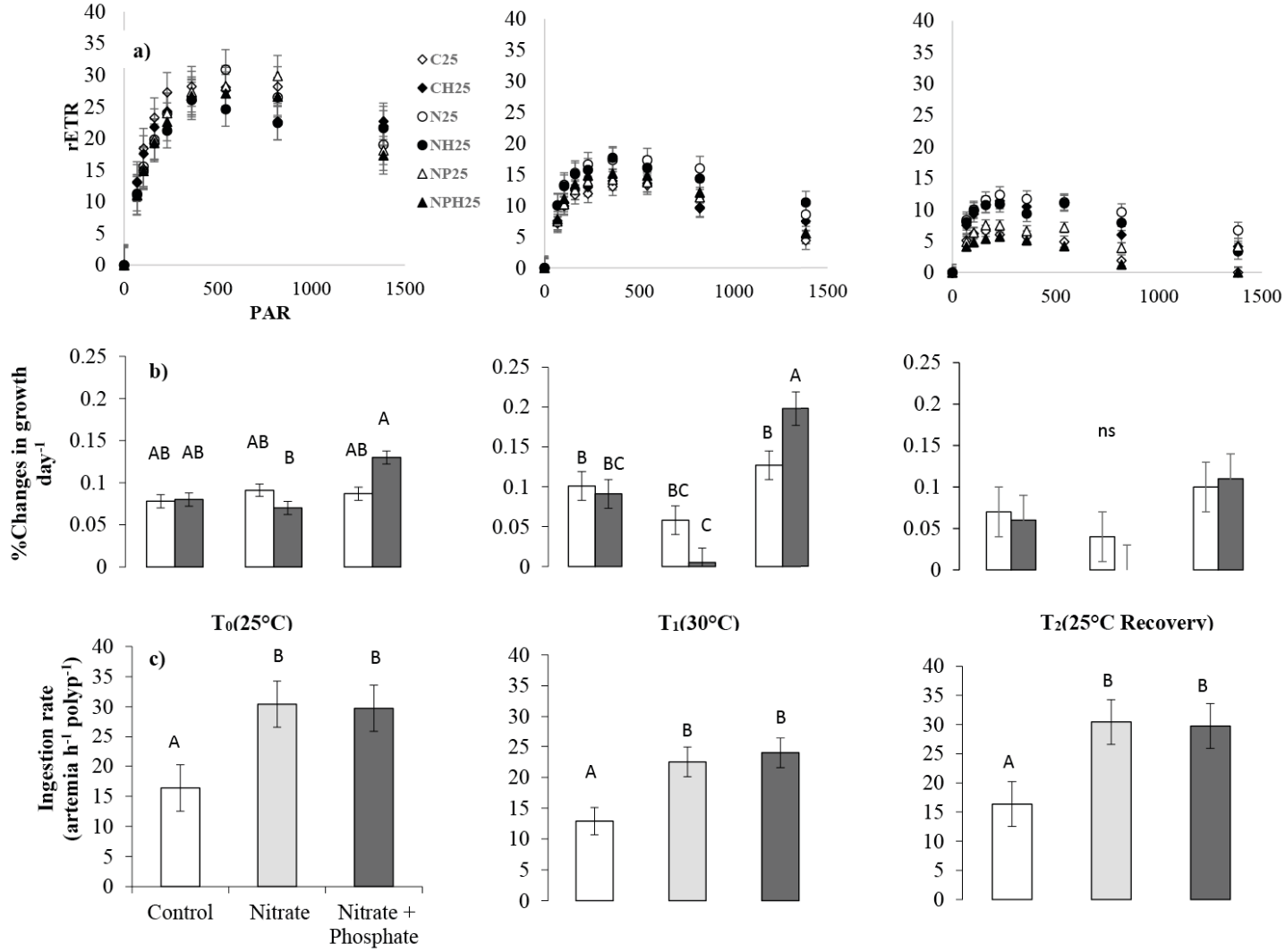


Table 2. Changes observed (in %) at and between the different time steps (25°C, 30°C and 25R) for chlorophyll, protein contents and symbiont density. Letter indicate significant differences when performing Tukey HSD post-hoc test.

Time Step	Parameter	C	CH	N	NH	NP	NPH
% Change compared to Control condition **At 25°C**	*Chlorophyll Content*	- (C)	- (C)	- (BC)	- (BC)	**+350%** (AB)	**+450%** (A)
% Change **25-30°C**	*Symbiont density*	**-52%**	-	-	-	**-47%**	-
	Protein Content	**-37%**	-	**-38%**	-	-	-
% Change compared to Control condition **At 30°C**	*Chlorophyll Content*	- (B)	- (B)	- (AB)	- (AB)	**+280%** (A)	**+311%** (A)
	Symbiont density	- (B)	- (B)	- (B)	- (B)	- (B)	**+236%** (A)
	Protein content	- (AB)	- (A)	- (AB)	**-48%** (B)	- (AB)	- (A)
% Change **30-25°C Recovery**	*Symbiont density*	-	-	**+266%**	-	-	-
	Protein Content	-	-	-	**+482%**	-	-
% Change compared to Control condition **At 25°Recovery**	*Chlorophyll Content*	- (AB)	**-371%** (C)	- (BC)	- (BC)	- (B)	**+514%** (A)
	Symbiont density	- (B)	- (B)	**+285%** (A)	- (AB)	- (AB)	- (AB)

Discussion

This study investigated the effect of two components of eutrophication, namely inorganic nutrient enrichment and zooplankton supplementation (heterotrophy), in combination or alone, on the physiology of the scleractinian coral *T. reniformis* exposed to normal or stressful temperatures. In addition, three different inorganic N:P ratios were also tested to evaluate the effect of nutrient stoichiometry on coral physiology. It is still unclear whether corals exhibit synergistic or antagonistic responses when simultaneously exposed to heat stress and eutrophication because heterotrophy may help sustain coral metabolism during stress events, whereas inorganic nutrient supply can have deleterious effects. The results observed allow identification of some of the mechanisms involved in the coral response to heat stress and nutrient availability. We showed that inorganic nutrient enrichment did not exacerbate coral bleaching susceptibility in *T. reniformis*, which regulated its symbiont population even in nutrient-enriched environments. However, inorganic nutrient stoichiometry was a key factor in explaining coral fitness during thermal stress, providing support for the hypothesis that corals and their symbionts may be adapted to specific nutrient ratios. In addition, heterotrophy and inorganic nutrient enrichment were related in *T. reniformis*, whereby zooplankton feeding rates increased under thermal stress only when inorganic nutrients were also available. Moreover, heterotrophy in the presence of a balanced inorganic nutrient stoichiometry enhanced coral growth during the thermal stress period. On the contrary, heterotrophy with an imbalanced inorganic nutrient stoichiometry exacerbated the negative effect of heat stress on coral growth.

Under non-stressful conditions, the usual consequence of inorganic nutrient supplementation on symbiotic corals is a significant increase in symbiont growth and density inside the coral tissues (Dubinsky et al. 1990; Hoegh-Guldberg and Smith 1989; Muller-Parker et al. 1994; Muscatine et al. 1989; Stambler et al. 1991) which can lead to a decrease in calcification rate, especially when nitrate is used as the nitrogen source (Fabricius 2005; Marubini and Davies 1996; Silverman et al. 2007). In our study, however, *T. reniformis* did not change its symbiont concentration with nutrient enrichment, nor decrease its rate of calcification at 25°C.

This observation suggests either: i) a carefully regulated control of symbionts by the animal host, ii) a limitation of algal density by light availability which has restricted symbionts from occupying deeper tissues in corals (Wangpraseurt et al. 2012), as observed in other corals with highly perforate skeletons (Jones and Yellowlees 1997), or iii) a re-allocation of energy to other processes, such as chlorophyll production, which was indeed significantly enhanced by inorganic nutrient enrichment. Our inorganic nutrient enrichment was also much lower than those commonly applied in previous experiments (Holcomb et al. 2010; Nordemar et al. 2003; Tanaka et al. 2014; Tanaka et al. 2007; Voss and Richardson 2006; Wiedenmann et al. 2013) and might not have been sufficient to significantly change symbiont growth.

Under thermal stress, heterotrophy and/or inorganic nutrient supplementation affected the corals' physiological response differently depending upon whether they were provided alone or in combination compared to control corals that did not receive any nutrients. Control corals significantly increased their respiration rates at 30°C, suggesting that the holobiont invested more heavily in maintenance and repair processes associated with metabolic costs incurred during heat stress (Abrego et al. 2008; Takahashi et al. 2004; Warner et al. 1996). This additional cost was afforded by increasing photosynthetic rate compared to rates at 25°C, by using energetic reserves such as proteins, which significantly decreased, and by reducing growth rate and efficiency ($rETR_{max}$) of the symbionts. Conversely to the response of control nubbins, corals that were supplemented only with zooplankton food maintained symbiont density and protein content at the same level at 30°C that they did at 25°C because they had access to a supplemental source of energy. These results confirm the positive effect of heterotrophy regarding resistance to thermal stress (Borell and Bischof 2008; Connolly et al. 2012; Ferrier-Pagès et al. 2010). The response of *T. reniformis* to an inorganic nutrient enrichment during thermal stress was different from the two other feeding conditions and complex, depending on the nutrient stoichiometry and presence or absence of zooplankton food.

It has been suggested and recently shown that corals living in inorganic nutrient enriched seawater have exacerbated bleaching responses to thermal stress (Cunning and Baker 2013; Tanaka et al. 2014) because nutrients enhance symbiont density, which in turn generate an excessive production of harmful oxygen radicals (Cunning and Baker 2013; Wooldridge 2013) in addition to decreasing photosynthetic rates per symbiont cell (Stambler et al. 1991).

As a direct consequence of the unchanged symbiont density in *T. reniformis*, inorganic nutrient addition and thermal stress did not increase the percentage of symbionts lost, suggesting that bleaching in these conditions is species- and context- dependent. Increased heterotrophic feeding under the combination of thermal stress and inorganic nutrient supply might have also avoided excessive bleaching. Our results are consistent with previously published ideas regarding greater food intake by corals in more productive waters (Wang et al. 2015a) and with literature reporting that elevated temperature can increase coral feeding rates (Ferrier-Pagès et al. 2010; Grottoli et al. 2006). The mechanisms involved in the coupling between inorganic nutrient uptake of the symbionts and heterotrophy of the coral host are still unclear; however, in agreement with our observations, symbiont carbon translocation rates and host prey ingestion were positively correlated in sea anemones (Leal et al. 2015). The explanation given was that autotrophic energy is necessary to the host to afford the metabolic demand of feeding and digestion (Leal et al. 2015). In our study, inorganic nutrient supplementation might have increased the quality and quantity of symbiont photosynthates, thereby increasing the host prey ingestion.

Under inorganic nutrient enrichment and thermal stress, a significant decrease in gross photosynthesis and calcification of *T. reniformis* was observed when nitrate addition was not combined with phosphorus. The decrease was exacerbated when nitrate enrichment was combined with heterotrophy. It is well known in food web studies that organism performance depends not only on the concentrations but also on the proportions of C, N and P in seawater (Van de Waal et al. 2009). In corals, N:P ratios of host tissue and symbionts is ca. 50:1 (Godinot et al. 2011a) and is much higher than the Redfield ratio of 16:1, suggesting a phosphorus limitation with nutrient concentrations measured on the reefs and in the control condition of this study (0.5 µM N and 0.1 µM P). It is therefore predictable that seawater enrichment in nitrogen alone will increase this phosphorus limitation. It was observed in two previous studies that an imbalanced nitrate:phosphorus ratio exacerbated phosphorus-starvation and bleaching in several coral species (Wiedenmann et al. 2013), or decreased the amount of photosynthates translocated from the symbionts to the host in *S. pistillata* (Ezzat et al. 2015). This effect is due to the fact that the reduction of nitrate into ammonium is a costly energetic process (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013; Patterson et al. 2010), diverting electrons from other metabolic pathways such as photosynthesis.

Our results are another piece of evidence supporting the two previous studies that there is a detrimental effect of an imbalanced nitrate:phosphorus ratio on the metabolism of *T. reniformis*, which can affect symbiont density, photosynthesis or calcification depending on the species and stress amplitude.

Heterotrophy exacerbated the impact of nitrate enrichment on calcification rates as there was a 94% reduction in growth compared to the control. A similar effect on calcification by a simultaneous exposure to organic-enriched sediments and nitrate was observed in the corals *M. tuberculosa* and *A. millepora* (Fabricius et al. 2013). The explanation given was that organic matter might have stimulated bacterial growth, thereby increasing disease susceptibility and reducing growth rates. As our laboratory treatments likely did not stimulate the growth of seawater bacteria, we suggest that calcification could have been impacted by the production of deleterious reactive nitrogen species (RNS) following accumulation of nitrate into the animal tissues (Lesser 2006; Roth 2014). RNS act together with reactive oxygen species (ROS) to damage cells, and this process can be exacerbated during thermal stress (Lesser 2006). Nitrate may accumulate in coral tissue when corals are fed because food is already rich in nitrogen, specifically ammonium, produced by host catabolism (Wang et al. 2015a). As ammonium is preferred to nitrate (Raven et al. 1992), it is used by symbionts instead of nitrate, which may then accumulate inside the host cells. Furthermore, heterotrophy might have increased the N:P imbalance, inducing a higher phosphate limitation. If the Growth Rate Hypothesis (Elser et al. 2000) [which proposed that P concentrations in organisms vary predictably with their investment in RNA, which in turn gives rise to variation in growth rates and other physiological processes] is applicable to corals, this might be an explanation for the decreased growth. However, more integrated work is needed to decipher which of the above hypotheses apply to corals. It is important to note that during the recovery period, corals in the N and NH treatments were still exhibiting low calcification and Pg. These data indicate that a two week recovery period from a short-term thermal stress is not long enough for corals in nitrate-enriched treatments to recover, if they can recover at all.

In contrast to nitrate-enrichment alone, a double enrichment in nitrate and phosphate concentration in the water (balanced N:P ratio), with or without heterotrophic feeding, greatly enhanced coral metabolism at 25°C and was mostly beneficial for corals at elevated temperature. We indeed observed a stimulation of symbiont growth and chlorophyll synthesis, enhancing the net O_2 production and maintaining rETR max values at 30°C.

Additionally, increased calcification rate in the NPH treatment certainly appears to have been enhanced by heterotrophic feeding, since NPH nubbins consistently fed more than control corals. This double enrichment undoubtedly demonstrates that many corals are greatly limited in phosphorus under normal conditions, and this limitation can become problematic under thermal stress and/or under nitrogen enrichment alone. Because phosphorus is a key nutrient for marine organisms (Benitez-Nelson 2000; Elser et al. 2007) it has been shown that phosphorus supplementation increased the metabolism of some corals such as *S. pistillata* (Godinot et al. 2011a), which showed an increased alkaline phosphatase activity when bleached in order to use the dissolved organic phosphorus present in seawater (Godinot et al. 2013). Although phosphorus was also suggested to decrease calcification rates in corals when present in very high concentrations in seawater (≥ 2 µM) (Ferrier-Pages et al. 2000; Kinsey and Davies 1979a; Koop et al. 2001), a minimum amount may be essential to coral metabolism. Clearly, more studies are needed to assess the minimal requirements for phosphorus in coral species, depending on their living conditions.

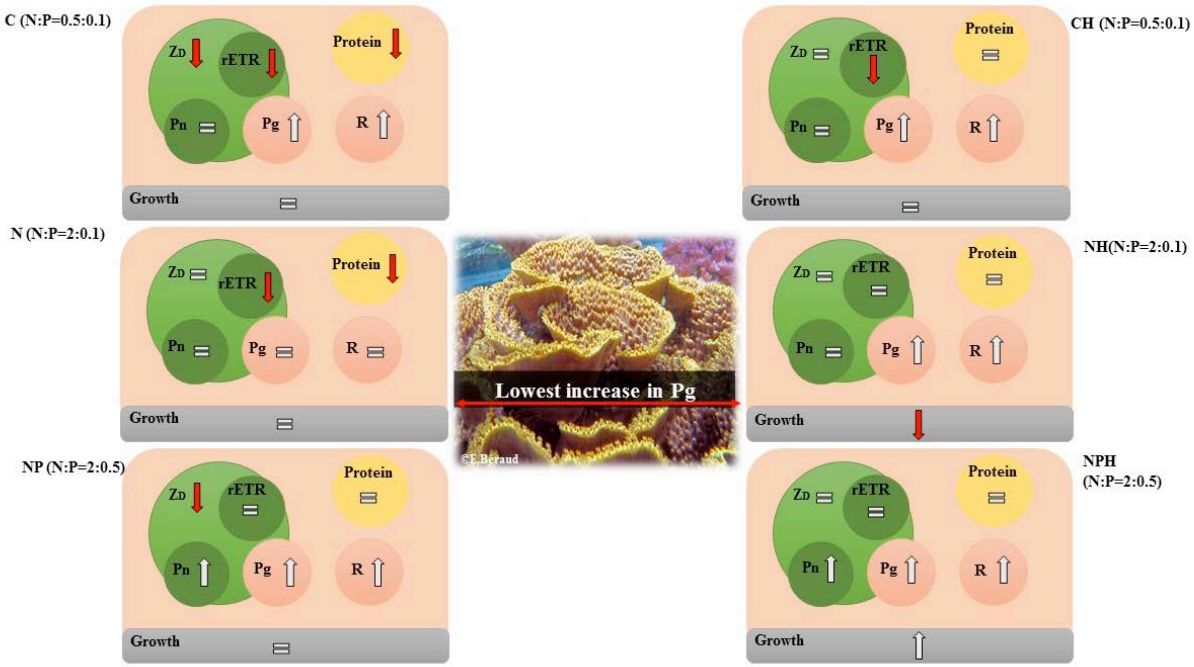


Figure 3. Budgets highlighting the major changes in the physiological parameters between 25°C and 30°C. The arrows indicate a significant increase or decrease (up or down arrows respectively), whereas the equal sign indicate no significant changes.

In conclusion, although zooplankton feeding in seawater generally enhances coral metabolism, especially under thermal stress (Houlbreque and Ferrier-Pagès 2009), it is deleterious for corals in the presence of elevated inorganic nutrient concentrations with an unbalanced N:P ratio. This scenario is unfortunately the case in many eutrophicated areas where loading of inorganic nitrogen is prevalent, such as in southwest Japan or in the Caribbean (Lapointe et al. 2005; Pastore 2014; Umezawa et al. 2002). The mechanisms involved in this combined negative effect still remain undetermined, but may be linked to a P-limitation in N-enriched corals, which prevent the construction of phospholipidic membranes (Tchernov et al. 2004; Wiedenmann et al. 2013) or the buildup of ATP reserves. On the contrary, when inorganic nutrients have a balanced N:P ratio and are maintainSwSed in relatively low concentrations (that remain undetermined) they may not affect coral metabolism under thermal stress and they may even enhance coral metabolism when combined with heterotrophy. Clearly, the different effect is due to the supply of phosphorus for coral metabolism. This deleterious effect of phosphorus limitation coupled to other stressors may particularly affect branching coral species, which often have higher metabolism and thus higher phosphorus needs (Godinot et al. 2011b), and may change the diversity and species composition of coral reefs in the future.

Acknowledgments

We would like to thank C. Rottier and A. Labbe for laboratory assistance as well as D. Desgré for his help during the experimental setup implementation. Many thanks to Pr. D. Allemand, Director of the Centre Scientifique de Monaco for scientific support and to Eric Hester from SDSU for his proof-reading assistance. We are grateful to the Associate Editor for evaluating our paper and to two anonymous reviewers for their insightful comments on the manuscript revisions. Funding for this project was provided by the CSM and the Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science in Miami. Financial supports to L. Ezzat and E. Towle were supported by the CSM and MOTE Marine Laboratories “Protect Our Reefs” Grant (#POR-2012-22) respectively.

Please have a look at the appendix n°3 for further details on the statistical analyses and supplementary results.

Article n°5

The combined effects of light and temperature on the physiological response of a tropical reef coral exposed to nutrient limitation and/or enrichment

Additional results | July 2016

[1]Leïla Ezzat, [2]Jean-François Maguer, [1]Cécile Rottier, [1]Antoine Labbe et [1]Christine Ferrier-Pagès

This 5th study provides additional results on the effects of nutrient limitation and/or enrichment on the physiological response of tropical reef corals. Only part of the results are presented in the following pages, the second part of the experiment is currently under analysis.

Most studies examining the effects of inorganic nutrient availability on the physiological response of tropical corals focused on eutrophication, i.e. high nutrient concentrations in the environment and not the opposite. However, global warming alters the chemistry of the surface waters, increasing water column stratification. This induces an important nutrient depletion in the surface layers (IPCC, 2007) in some oceanic regions and thus may affect nutrient uptake and the metabolism of autotrophic organisms such as corals. Therefore, there is a growing need to acquire more knowledge on the physiological response of corals to nutrient limitation in order to understand their fate in these environments. One recent study performed by Wiedenmann et al. (2013) and using artificial seawater, showed that a combined limitation in nitrate and phosphorus (N:P = 0.7: 0.006) induced coral bleaching after 12 weeks under normal light and thermal conditions. To further investigate the effects of nutrient limitation on coral physiology, we maintained colonies of *S. pistillata* under low nutrient concentrations (<0.5 for N and <0.05 for P) and two light levels (150 and 250 µmol photons m^{-2} s^{-1}). After three weeks under these different treatments, temperature was increased for all conditions from 25°C to 30°C in order to study the coral response to the combined temperature, light and nutrient stresses and to compare it with the response measured under control conditions (N:P=0.5:0.05).

[1]Centre Scientifique de Monaco, Marine Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.
[2]LEMAR - UMR 6539 UBO/CNRS/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

Material and methods

Experimental setup

Twelve mother colonies of the tropical scleractinian reef coral *S. pistillata* (Esper 1797), originating from the Gulf of Aquaba, (Red Sea ; Jordan) and maintained for several weeks at the Centre Scientifique of Monaco were chosen. Colonies were cut to generate a total of 420 nubbins (35 nubbins per colony) from approximately the same size : 2-4 cm. Coral fragments were then attached to nylon threads and randomly distributed into twelve independent 20 L tanks (35 nubbins per aquaria), that were maintained under controlled conditions as follows : aquaria were continously supplied, at a flow rate of 20 L h^{-1}, with oligotrophic mediterranean seawater containing very low amount of nutrients (<0.5 µM of N and <0.2 µM of P). A constant seawater temperature was maintained at 25°C ± 0.5 using submersible resistance heaters (Visi-ThermH Deluxe, Aquarium Systems, France) and proper water mixing was ensured by submersible pumps. Light conditions were adjusted by the use of metal halide lamps (Philips, HPIT 400W, Distrilamp, Bossee, France), that provided a constant irradiance of 150 µmol photons m^{-2} s^{-1} inside the tanks (12h:12h light:dark). Coral nubbins were starved for three weeks before starting the experiments in order to avoid any physiological interactions with heterotrophic feeding. Aquaria were cleaned weekly to avoid any excessive algal proliferation.After the acclimation period, six different nutritional treatments were implemented (in duplicated tanks) as described below.

Half of the tanks were maintained under low light condition (LL: 150 µmol photons m^{-2} s^{-1}) and the remaining six aquaria were exposed to high light level (HL : 300 µmol photons m^{-2} s^{-1}). Furthermore, three nutritional treatments were implemented for each light condition : 1) A control condition, respectively named CLL and CHL, characterized by low amounts of inorganic nutrients (<0.5 µM of N and <0.2 µM of P); 2) An ammonium-enriched condition, in which coral nubbins were exposed to a 2 µM NH_4Cl seawater enrichment (N:P=2:0.05) and respectively named ELL and EHL; 3) In the last nutritionnal treatment, coral nubbins were maintained under nutrient limitation by the use of a fluidized filter containing biopellets (All in one), allowing a 5 and 10 times decrease in the nitrate and phosphate concentrations respecitvely (DHL, DLL).

For the NH_4-enriched tanks, stock solutions were continuously pumped from individual batch tanks via a peristaltic pump and delivered to the aquaria at a final concentration of 2 µM NH_4Cl and at a constant flow rate of 0.3 L h^{-1}. Stock solutions were renewed every three days. Ammonium concentration in each tank was monitored in triplicate twice a week using an Autoanalyzer (Alliance Instrument, AMS, France) according to the method of Tréguer and LeCorre (1975). After three weeks under these conditions (T_0), seawater temperature was raised from 25 ± 0.5 °C to 30 ± 0.5 °C on a 10 day-period (0.5°C per day) and maintained constant for 10 days (T_1). Physiological measurements and sampling were performed at the end of each temperature step (T_0 and T_1) as described below.

Determination of photosynthesis and respiration rates, chlorophyll, protein contents and symbiont density

Rates of net oxygen production (P_n) and consumption (R) by *S.pistillata* were assessed on six randomly selected nubbins per treatment at T_0 and T_1 under the following light intensities : 0, 150 and 250 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Coral nubbins were individually placed in 50 mL glass chambers supplied with filtered seawater (FSW) maintained at the corresponding temperature. Stirring bars were used to ensure a proper homogenization of the seawater. Glass chambers were equipped with an Unisense optode (oxygen-sensitive minisensor) and connected to the Oxy-4 software (Chanel fiber-optic oxygen meter, Presens, Regensburg, Germany). The optode calibration was performed before each incubation against nitrogen-saturated and air-saturated seawater (for the 0% and 100% oxygen respectively). Pn and R were determined by regressing oxygen values against time. At the end of each incubation, nubbins were frozen at -20°C for the subsequent determination of chlorophyll and protein contents as well as symbiont density according to Hoogenboom et al. (2010b). For this purpose, coral tissue was removed from its skeleton with an air-pick and resuspended in 10 mL of 0.45 uM FSW. The slurry was homogenized with a potter grinder and divided into two 5 mL sub-samples. The first 5 mL were centrifuged at 8000 g for 10 mn at 4°C. After removing the supernatant, symbionts were resuspended into 5 mL acetone and placed at 4°C overnight. Chlorophyll a and c_2 concentrations were determined following the method of Jeffrey and Humphrey (1975) by the use of a spectrophotometer (Safas, Monaco). The second 5 mL subsample was used to assess the symbiont density and the protein contents of coral nubbins.

Symbiont density was measured with a coulter counter (Beckman coulter, France) and protein content was assessed according to Smith et al. (1985) by the use of a BCAssay Protein Quantification Kit (Uptima, Interchim) and a Xenius® spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). Data were normalized to the nubbin surface area (cm^2) according to Veal et al. (2010)

Grazing rate

Grazing rates were determined on 5 randomly selected coral nubbins per treatment at T0 and T1 (same nubbins were kept for T0 and T1) following Houlbreque et al., (2004a). Coral fragments were individually incubated in 1 L plexiglas flumes especially designed for this purpose according to Levy et al. (2001) and adapted from Vogel & LaBarbera (1978). Flumes were first disposed in a water bath to maintain a constant temperature and a propeler ensured a flow speed of approximately 4 cm s^{-1}. After the full expansion of coral polyps, the experiment started by delivering 1000 *Artemia salina* nauplii L^{-1} according to Gori et al. (2015), and were previously quantified using a Bogorov counting chamber. Three replicates per sampling were taken from the flume right after the start of the experiment (0 mn), then after 15 mn, 30 mn, 45 mn and 60 mn. *Artemia salina* nauplii were counted in each sample and then directly replaced in the flume. Three additional flumes were disposed with no coral nubbin to account for possible concentration decrease due to the natural nauplii mortality. Feeding rates were assessed as the decrease in preys observed against time and normalized to the nubbin surface area.

Calcification rate

Rates of coral calcification were assessed weekly on 6 coral nubbins per treatment according to the buoyant weight technique (Davies, 1989). Growth data are presented as percent weight increase per day, using the following equation: $[(F-I)/ (I *D)] *100$, where F is the weight of each nubbin at the end of a given time step (T_0, T_1), I is the weight at the beginning of a given time step, and D is the number of days between each time step.

Statistics

Statistics were performed using Statistica 10 (Statsoft, Paris, France). Data were checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and for Homoscedasticity using Levene's test. Data were log-transformed if necessary. Two-way ANOVAs were used to test i) the effects of light intensity (LL and HL) and temperature (25°C and 30°C) on the chlorophyll, protein contents as well as on the symbiont density and the holobiont respiration rates. The effects of temperature, light history (LL or HL) and light level (light intensity of the measurements) on the rates of net and gross photosynthesis were performed with a three-way ANOVA. A general linear model for parametric repeated measure analysis of variance (ANOVA) was performed on the calcification and grazing rates using the different time points (T_0 and T_1) as dependent variables and light categorical predictors. The independency of repeated measures (assumption of sphericity) was tested. If not fulfilled, the hypotheses were tested using the multivariate approach (Wilks test) for repeated measurements. In case significant differences were observed between treatments, analyses were followed by a posteriori test (Tukey's test). Differences were considered significant when $p<0.05$.

Results

Changes observed following thermal stress

Under thermal stress, control corals exposed to low light (CLL) lost significant amounts of chlorophyll and protein compared to 25°C (Tukey HSD, $p<0.05$). Their rates of net and gross photosynthesis (Figure 2a) also significantly decreased both at 150 and 250 µmol photons m^{-2} s^{-1} (Tukey HSD, $p<0.01$). Control corals maintained under high light (CHL) seemed to decrease their rates of net and gross photosynthesis at 150 µmoles photons m^{-2} s^{-1}, while results were not significant.

Depleted corals bleached (symbionts and chlorophyll) under low light (Figure 1a),b); Tukey HSD, $p<0.05$), and decreased their protein content under high light (Tukey HSD, $p<0.05$). They however did not show any significant variation in their oxygen production or consuption (Tukey HSD, $p>0.05$).

Enriched nubbins maintained under low light (ELL) decreased their net photosynthesis at 150 µmoles photons m^{-2} s^{-1} (Figure 2, Tukey HSD, $p=0.03$). No other changes were observed.

Overall, for all treatments, grazing rates remained unchanged between 25°C and 30°C (Tukey HSD, $p>0.05$).

Comparison between treatments at each temperature

At 25°C and under high light condition, control corals had lower chlorophyll and symbiont concentrations compared with low light corals (Tukey HSD, $p<0.035$). Enriched nubbins maintained under high light (EHL) presented higher chlorophyll contents, but lower protein concentration compared with CHL and DHL corals (Tukey HSD, $p<0.001$ and $p<0.05$ respectively). Overall, increasing the light from 150 to 250 µmol photons m^{-2} s^{-1} enhanced the rates of net photosynthesis in all corals (Tukey HSD $p<0.04$), but DLL and CLL (Tukey HSD, $p>0.05$). Corals exposed to high light intensities and enriched and/or depleted conditions exhibited the lowest values of gross photosynthesis when exposed to low light levels (Figure 2b); Tukey HSD, $p<0.05$). Grazing rates were lower for ELL nubbins compared with CLL corals (Tukey HSD, $p<0.01$).

Under thermal stress, corals in EHL conditions maintained high values of symbiont density and protein concentration compared with CHL and DHL treatments (Tukey HDS, $p<0.01$).

More, ELL and EHL showed the highest values of chlorophyll concentration at 30°C compared with all other treatments (Tukey HSD, $p<0.001$), with CHL, DLL and DHL exhibiting the lowest values. Protein contents were significantly lower in depleted nubbins (DLL and DHL) compared with all other treatments (Tukey HSD, $p<0.02$). Grazing rates were significantly lower in EHL compared with CHL and DHL (Tukey HSD, $p<0.03$). Rates of net and gross photosynthesis increased when increasing the light levels during the measurements for all treatments (Tukey HSD, $p<0.001$). Control corals under high light conditions (CHL) showed the lowest rates of net photosynthesis, when exposed to low light levels, in comparison with EHL and DHL (Tukey HSD, $p<0.01$).

Figure 1. a) Symbiont density (nb cell per cm^{-2}), b) Chlorophyll (µg (Chl(a+c_2)) cm^{-2})) and c) protein (µg prot cm^{-2}) concentrations acccording to the different light treatments (LL and HL) and temperature steps (25°C and 30°C). Data are represented as mean ± standard deviation.

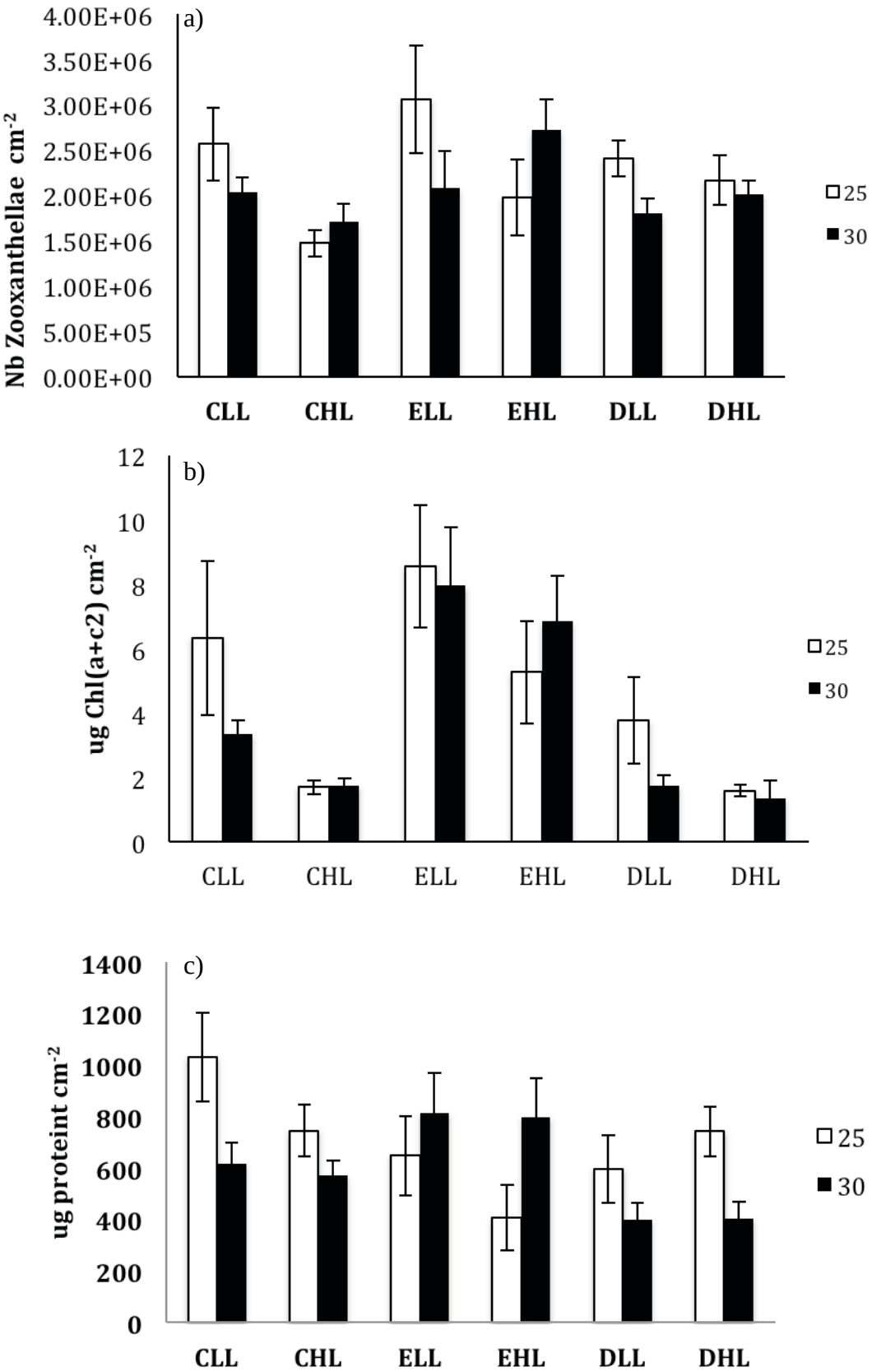


Figure 2. a) Rates of net and b) gross photosynthesis (umol O_2 cm^{-2} h^{-1}) performed at 150 and 300 umol photons cm^{-2} s^{-1} according to the different light treatments and temperature steps. White bars represent the data measured at 25°C and black at 30°C.

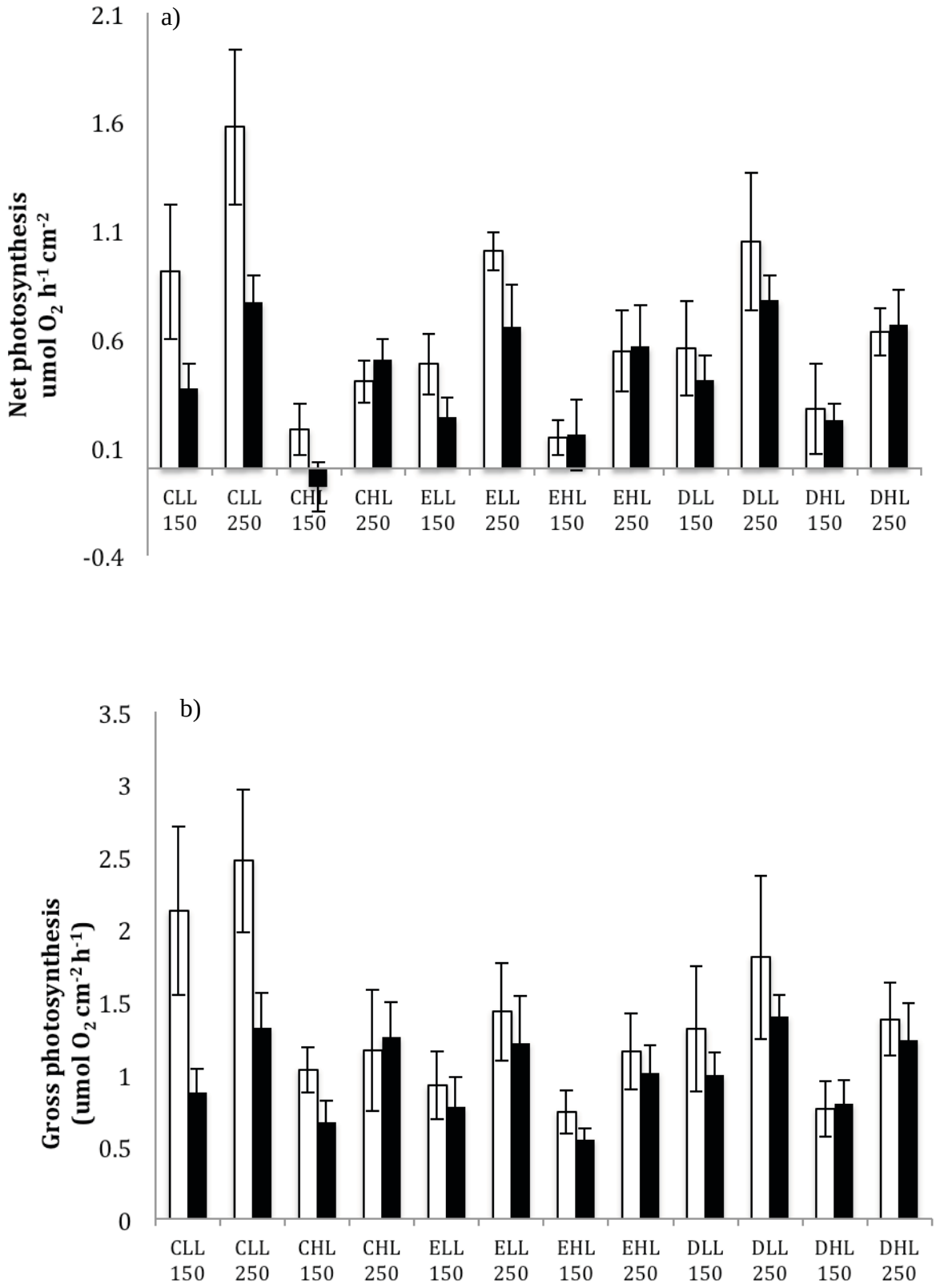
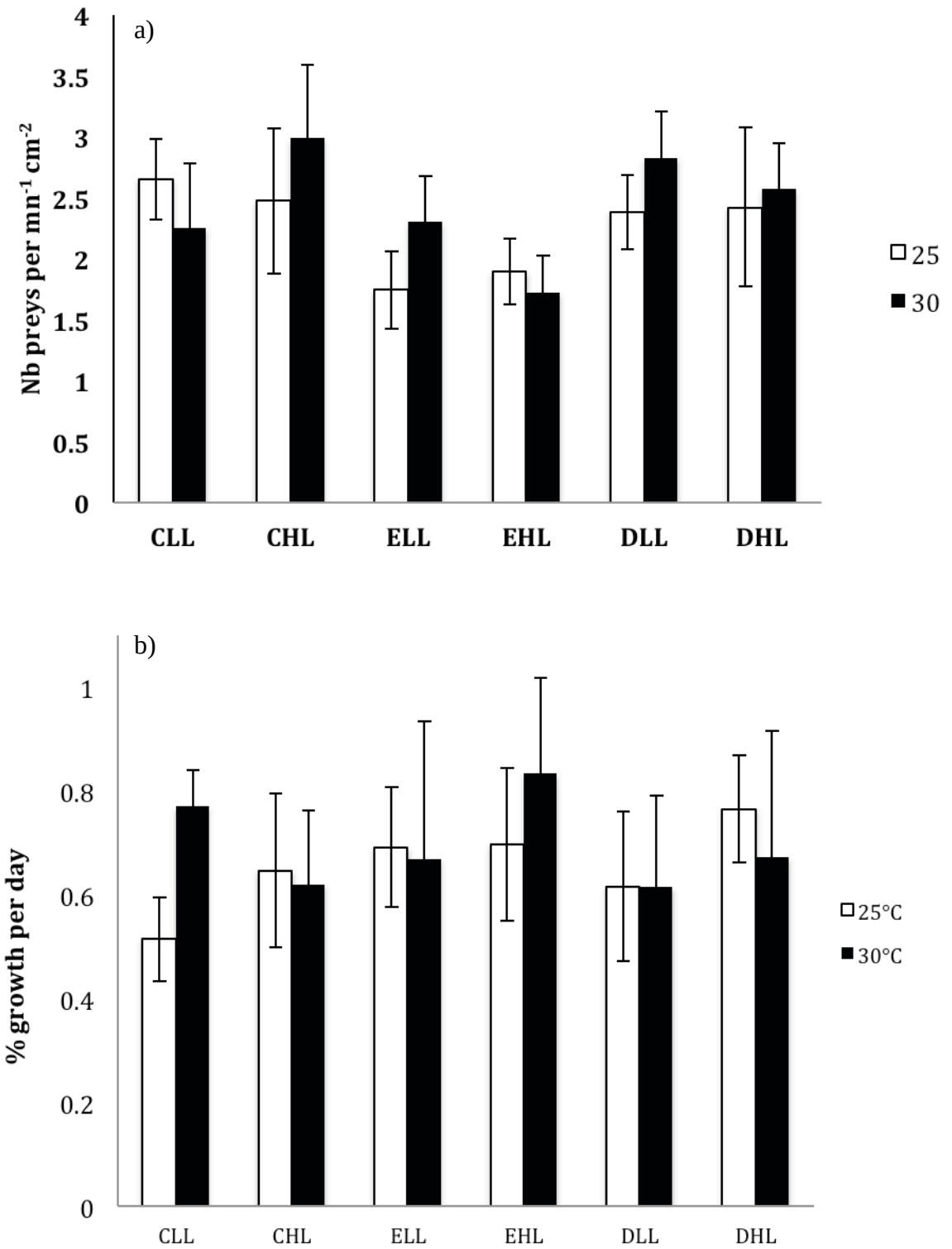


Figure 3. a) Grazing (nb preys per mn and cm^{-2}) and calcification rates



Chapitre V.
Discussion

Seychelles, Avril 2016.
Photo Chris Bird

Chapitre V
Discussion

Deux axes principaux ont été développés dans ce travail de thèse. Le 1er axe visait à évaluer les capacités des coraux tropicaux à acquérir des nutriments inorganiques dissous (carbone, azote, phosphore) dans des conditions de croissance optimale et lors d'un stress de température. Le 2ème axe avait pour but d'étudier les effets d'une limitation et/ou d'un enrichissement en sels nutritifs sur la réponse physiologique de la symbiose corail-dinoflagellé dans le contexte du réchauffement climatique. Les résultats obtenus à l'issue de cette thèse ont permis d'affiner nos connaissances sur i) l'importance des sels nutritifs azotés et phosphorés pour le maintien de la symbiose durant des périodes de stress, ii) le rôle de la diversité génétique des symbiotes sur l'acquisition de nutriments inorganiques et organiques, iii) la relation étroite existant entre les conditions biogéochimiques (N:P) caractérisant le milieu récifal et la réponse physiologique des coraux tropicaux à cet environnement, iv) les bénéfices issus des apports combinés de l'auto- et de l'hétérotrophie chez les organismes symbiotiques.

Axe I: Acquisition des sels nutritifs chez les coraux tropicaux scléractiniaires dans le contexte du réchauffement climatique

Notre premier objectif visait à i) comparer les capacités de différents holobiontes coralliens (association corail-symbiote) à acquérir les sels nutritifs (ammonium, nitrate et phosphore) et ii) à définir si cette absorption était sous le contrôle du symbiote, de l'animal hôte ou si d'autres paramètres (environnementaux) pouvaient influencer la réponse de l'holobionte. Bien que de nombreuses études aient mesuré les taux d'absorption de sels nutritifs pour un holobionte en particulier, seules deux travaux ont comparé les capacités d'acquisition et d'assimilation d'azote et de carbone par des clades de *Symbiodinium* distincts (C1 et D1) associés à un même hôte (Baker et al. 2013; Pernice et al. 2015). Ces travaux ont montré que l'assimilation d'azote et de carbone était clade-dépendant. Nos résultats mettent également en évidence les bénéfices que peut conférer à l'animal la diversité génotypique en Symbiodinium (Cooper et al. 2011a).

Afin de répondre à cette problématique, nous avons réalisé deux expériences distinctes, l'une en condition expérimentale et la seconde sur le terrain. La première expérience (article n°1) a consisté à mesurer les taux d'absorption d'azote et de phosphore inorganique par un même clade de symbiote (clade C1) associé à différents hôtes coralliens. La deuxième expérience (article n°2) s'est attachée à mesurer les taux d'assimilation de carbone et d'azote par un même hôte corallien associé à deux clades de symbiote (clade A1 et C). Les deux expériences ont permis de mettre en évidence l'effet combiné du symbiote, et de l'hôte, sur l'absorption des sels nutritifs.

1.1 Le rôle de l'hôte

L'expérience décrite dans l'article n°1 montre que l'hôte joue un rôle déterminant dans l'absorption des sels nutritifs, puisque, pour un même clade de *Symbiodinium* (clade C1), les taux d'acquisition d'azote varient d'une espèce corallienne à une autre. On a pu ainsi observer que *G. fascicularis* présentait des taux d'absorption d'azote plus importants que *P. cactus*, même si les deux espèces étaient toutes associées au clade C1. De même, *P. damicornis* montrait des taux d'acquisition de nitrate plus importants que *G. fascicularis*, pour le même clade C1. De plus, au cours de cette étude, nous avons observé un effet positif des pulsations de l'espèce *H. fuscescens* sur l'absorption d'ammonium et de nitrate. Cet avantage métabolique avait préalablement été reporté chez la méduse *Cassiopea sp.* par Jantzen et al. (2010). Les pulsations favorisent non seulement l'absorption d'azote, mais également l'absorption et l'assimilation de carbone inorganique dissous (Kremien et al. 2013; Wild and Naumann 2013), en diminuant l'épaisseur de la couche limite de diffusion au voisinage de l'animal, ce qui a pour effet d'augmenter les capacités de diffusion des gaz et de transport des sels nutritifs à travers les membranes cellulaires. **Ces observations supposent que les holobiontes n'ont pas les mêmes capacités à acquérir l'azote inorganique ou les mêmes besoins. Ceci suggère des fonctionnements métaboliques distincts et/ou des fluctuations dans l'allocation des sels nutritifs**. Enfin, nos résultats sont en accord avec des expériences précédentes soulignant l'importance et le rôle prépondérant de l'hôte animal dans la réponse physiologique des cnidaires et particulièrement des coraux soumis à des variations de leur environnement (Baird et al. 2009; Dunn et al. 2002; Falkowski et al. 1993; Gates et al. 1995; Hoadley et al. 2015; Wooldridge 2014).

1.2 Le rôle des symbiotes

L'animal hôte n'est pas le seul à réguler l'absorption de sels nutritifs, puisque l'étude réalisée sur *Stylophora pistillata*, originaire du Golfe d'Eilat (Mer rouge), en symbiose avec le clade A de *Symbiodinium* en surface et le clade C en profondeur, a montré que chaque clade présentait des capacités différentes à utiliser l'éclairement reçu et à assimiler le carbone inorganique (article n°2). En effet, sous faible éclairement, seul le clade C était capable d'assimiler le carbone inorganique et de présenter un taux de photosynthèse nette positif. Ces résultats confirment donc les travaux préliminaires de Baker et al. (2013) et Pernice et al. (2015) qui ont démontré que le clade de *Symbiodinium* influençait les capacités d'assimilation des sels nutritifs de l'holobionte et que **la diversité génotypique en symbiotes pouvait conférer des avantages physiologiques aux holobiontes** (Cooper et al. 2011a,b), leur permettant d'étendre leur niche écologique ou de subsister lors de période de stress. Ces résultats concordent avec des travaux antérieurs qui mettent en évidence le rôle des symbiotes dans la réponse physiologique des coraux face à des fluctuations de leur environnement (Baker et al. 2013; Berkelmans and Van Oppen 2006; Cooper et al. 2011b; Cooper et al. 2011c; DeSalvo et al. 2010; Little et al. 2004; Littman et al. 2010; Loram et al. 2007; Starzak et al. 2014). Plus particulièrement et récemment, Leal et al. (2015) ont suggéré que la diversité en symbiotes influençait les stratégies trophiques de l'anémone de mer *Aiptasia pallida*, puisque ces auteurs ont mis en évidence une corrélation positive entre le taux de translocation de carbone autotrophe et les taux d'ingestion de proies planctoniques pour des holobiontes en association avec le même clade de Symbiodinium.

1.3 Le rôle des paramètres environnementaux : l'intensité lumineuse

Cette même étude réalisée avec *S. pistillata*, originaire du Golfe d'Eilat, a également mis en évidence l'importance de la combinaison holobionte-paramètres environnementaux sur les taux d'absorption d'azote. Nous avons constaté, en effet, que l'holobionte associé au clade A présentait des taux d'acquisition d'ammonium et de nitrate beaucoup plus élevés que l'association avec le clade C, pour des éclairements similaires.

Outre le clade, cette différence d'assimilation pourrait s'expliquer par le fait que 1) les concentrations en zooplancton étant bien plus faibles en surface qu'en profondeur (Lesser et al. 2009; Schmidt 1973), les coraux de surface arborant le clade A compensent leur déficit nutritionnel en augmentant leur capacité à acquérir les nutriments ; 2) ces mêmes coraux de surface, recevant moins d'azote atmosphérique que les coraux de profondeur (N2) (Lesser et al. 2007; Rädecker et al. 2015), compensent leur déficit azoté par une absorption accrue d'azote inorganique ; 3) le clade A associé aux coraux de surface, ayant reçu plus de lumière, et donc plus d'énergie, les jours précédant l'expérience, présente un taux d'absorption d'azote supérieure au clade C. En effet, il est bien connu que l'intensité lumineuse peut modifier les taux d'acquisition d'azote chez le phytoplancton et également chez les cnidaires puisque ce processus requiert de l'énergie et de l'ATP fournis par la photosynthèse en phase claire et par la respiration à l'obscurité (Amory et al. 1991; O'Leary and Plaxton 2015). Ces résultats sont en adéquation avec une précédente étude réalisée par Kopp et al. (2013) au moyen du NanoSIMS. Ces auteurs ont montré que *P. damicornis* présentait un taux d'assimilation d'ammonium plus important (notamment dans la fraction algale) lorsqu'il était exposé à un cycle normal jour/nuit en comparaison avec des mesures réalisées à l'obscurité totale, avec une pré-acclimatation de 24h (taux similaires entre symbiotes et hôtes; Kopp et al. (2013).

La réponse physiologique du corail dépendrait non seulement du clade de symbiote, de l'hôte animal mais également des intéractions entre l'holobionte et des facteurs abiotiques charactérisant son environnement. Cette interdépendance montre la nécessité d'une approche pluridisciplinaire afin de mettre en évidence les effets individuels et/ou combinés de tous les facteurs impliqués.

2. Relation entre acquisition d'azote et métabolisme au sein de la symbiose

Dans un deuxième temps, nous avons donc cherché à déterminer quels étaient les paramètres physiologiques clés, soit de l'animal, soit du symbiote, pouvant influencer les taux d'absorption d'azote au sein de la symbiose. Pour cela, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) représentée sur la Figure 25, illustrant les données obtenues à l'issue de de l'expérience n°1 (article n°1) : concentration en chlorophylle, densité en symbiotes, taux de photosynthèse nette et de respiration, taux d'absorption d'ammonium, de nitrate et de phosphore (voir Table 5). L'axe 1, qui explique **39.75%** de la variance observée, montre que l'absorption du nitrate semble être corrélée avec celle du phosphore et la concentration en chlorophylle. L'axe 2, expliquant **26.79%** de la variance, indique que les taux d'absorption d'ammonium évoluent conjointement avec les taux de photosynthèse nette. Enfin la troisième composante (non représentée sur la figure), représentant uniquement **14.71%** de la variance totale, est dépendante de la respiration de l'holobionte.

Ces observations suggèrent que les taux d'absorption d'ammonium et de nitrate ne sont pas corrélés avec les mêmes paramètres physiologiques et suggèrent une utilisation différente de ces deux sources d'azote par la symbiose. Le couplage observé et démontré sur la Figure 23 entre les taux d'absorption d'ammonium et de photosynthèse nette peut résulter d'une dépendance plus ou moins directe de ces paramètres à la lumière, comme souvent observé chez les plantes et les cnidaires (Canvin and Atkins 1974; Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Wilkerson and Trench 1986). En effet, chez les plantes supérieures, la photosynthèse produit de l'ATP et du NADPH qui stimulent non seulement la régénération de l'enzyme responsable de la fixation de CO_2 (la ribulose-1.5.-biphosphate (RuBP)) (Guo et al. 2007), mais également l'assimilation de l'ammonium (Amory et al. 1991; Huppe and Turpin 1994; O'Leary and Plaxton 2015; Wang and Douglas 1998). Celle-ci serait ainsi stimulée sous forte intensité lumineuse. De manière intéressante, les taux de photosynthèse nette n'étaient cependant pas corrélés avec l'absorption de nitrates pour les différentes espèces coralliennes étudiées, la corrélation était même négative ($t=-0.20$, $p=0.84$, $\rho=-0.05$). Ceci pourrait résulter du coût énergétique important généré par la réduction du NO_3^- en ammonium, entrant en compétition avec le processus de photosynthèse, en consommant une partie des électrons (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013).

En effet, Champigny et al. (1991) ont montré une relation linéaire inverse entre le taux de synthèse de sucrose et l'absorption ainsi que l'assimilation de nitrate chez les feuilles de blé.

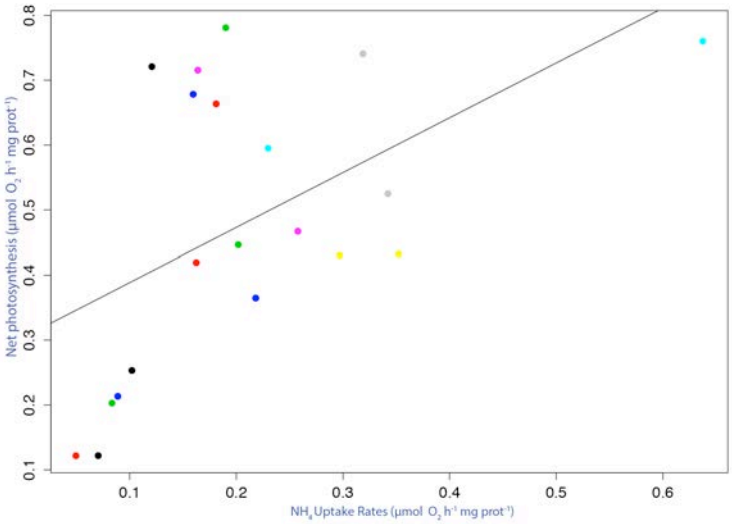


Figure 23 Corrélation de Pearson mettant en évidence la relation existant entre le taux d'absorption d'ammonium et de photosynthèse nette (t=2.57, p=0.019 and ρ=0.52). Les points colorés représentent les différentes espèces.

Alors qu'une précédente étude réalisée par Godinot et al. (2011b) ont montré une relation existant entre l'absorption d'ammonium et la présence de phosphates dans l'eau; nos résultats mettent en évidence une corrélation positive entre l'absorption de nitrate et de phosphates (Figure 24). Cependant, aucune explication ne met en lien ces deux paramètres.

Figure 24 Corrélation de Pearson mettant en évidence la relation existant entre l'absorption de nitrates et de phosphates (t=2.87, p=0.01, ρ =0.56). Les points colorés représentent les différentes espèces.

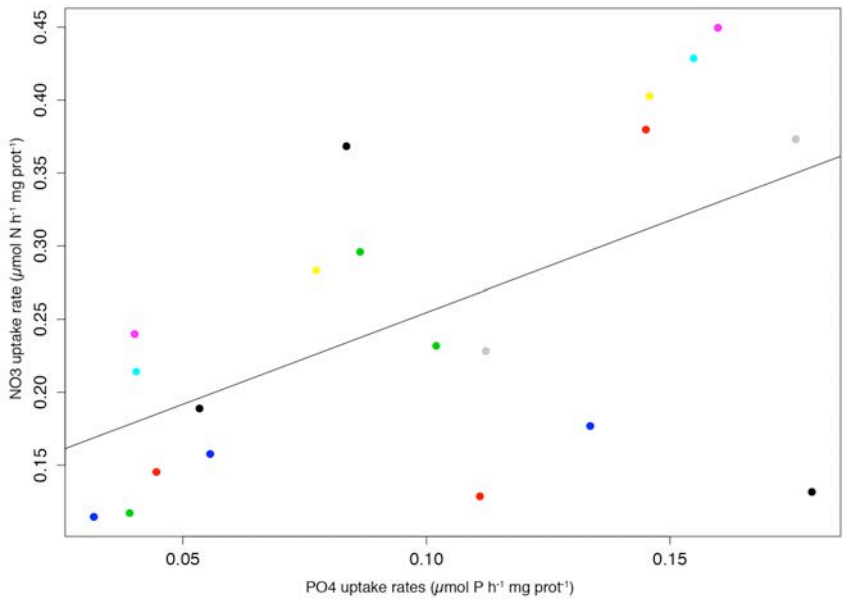


Table 5 Analyse en composante principale (ACP) effectuée sur les paramètres physiologiques mesurés dans le cadre de l'article n°1 à 25°C. Les cosinus directeurs et le pourcentage de variance expliquée sont exprimés pour chaque composante.

Variable	CP1	CP2	CP3
Photosynthèse nette (NPS; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	0.125	**0.893**	0.275
Respiration (R; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	0.374	-0.374	**0.816**
Acquisition d'ammonium (NH_4; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	0.510	**0.665**	-0.292
Acquisition de nitrate (NO_3; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	**0.890**	-0.171	0.096
Acquisition de phosphore (PO_4; µmol P (mg prot)$^{-1}$)	**0.744**	-0.229	-0.312
Concentration en chlorophylle (Chloro; µg (a+c_2) cm^{-2})	**0.796**	0.406	0.156
Densité de symbiotes (nb Zoox cm^{-2})	-0.623	0.500	0.270
Pourcentage de variance expliquée	**39.75%**	**26.79%**	**14.71%**

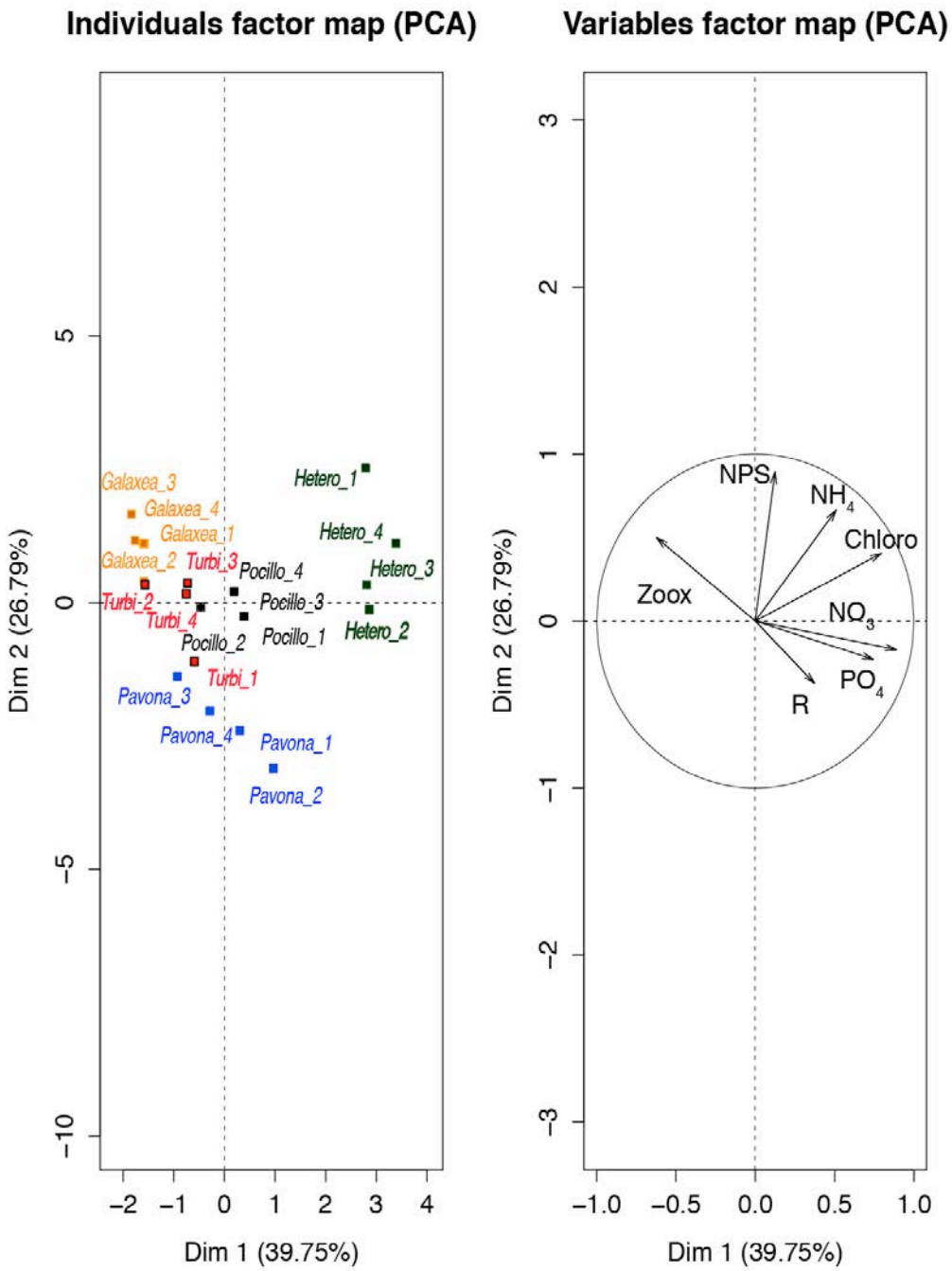


Figure 25. Analyse en composante principale décrivant les relations existant entre l'absorption d'azote, de phosphore et les paramètres physiologiques clés étudiés dans le cadre de l'article n°1 à 25°C

3. Influence d'un stress de température sur les taux d'acquisition d'azote inorganique

Les résultats de l'article n°1 ont montré que lors d'un stress de température induisant le blanchissement des colonies coralliennes, trois holobiontes sur cinq étudiés ont diminué leurs taux d'absorption d'azote. Ces résultats sont en adéquation avec une précédente étude réalisée sur l'espèce *S. pistillata* (Godinot et al. 2011c), où l'holobionte associé au clade A1 cessait d'absorber l'ammonium et le nitrate à 33°C. **Ces observations suggèrent que la diminution du taux d'acquisition d'azote est une réponse générale des espèces coralliennes au stress de température.** Il reste cependant à déterminer si cette réponse découle i) d'un phénomène de contrôle physiologique de l'hôte, ii) est une conséquence du blanchissement des symbiotes (perte de chlorophylle ou de symbiotes) ou iii) correspond à un impact direct de la température sur les enzymes responsables de l'assimilation de l'azote. La première hypothèse suggère que l'hôte est capable de réguler son assimilation d'azote afin d'éviter un stress oxydant trop important. En effet, de précédents travaux ont suggéré qu'un enrichissement de l'eau de mer en azote pourrait favoriser la croissance excessive des symbiotes (Wooldridge 2013), entrainant une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'une diminution de la quantité de photosynthétats transférés vers l'hôte animal (Muscatine et al. 1989). Ce phénomène favoriserait la rupture de la symbiose en conditions de stress thermique (Wiedenmann et al. 2013; Wooldridge 2013). La diminution de l'absorption observée pourrait également être expliquée par une réplétion de l'holobionte en azote durant la période de stress, due à une réallocation des molécules azotées au sein de la symbiose (Miller and Yellowlees 1989). La seconde hypothèse est en adéquation avec des travaux préalables affirmant que l'acquisition de nutriments inorganiques dépend principalement de l'activité des symbiotes (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Wang and Douglas 1998; Yellowlees et al. 2008). Si la densité de symbiotes diminue, les sites d'absorption d'azote se verront également réduits. Dans ce cas, la diminution du taux d'acquisition d'azote pourrait entraver la réparation de certaines protéines (Falkowski et al. 1993) et/ou la fixation du carbone comme observé chez les feuilles de mûriers (Chaitanya et al. 2001). Enfin, la dernière hypothèse est en accord avec des études démontrant que la variation de la température peut altérer l'efficacité des enzymes responsables de l'assimilation de l'azote chez les plantes ainsi que chez le phytoplancton (Cui et al. 2006; Gao et al. 2000; Lomas and Glibert 1999).

Les résultats de l'ACP réalisée sur les données récoltées à 30°C (Figure 27) penchent en faveur des deux dernières hypothèses. En effet, la première composante, qui explique **44%** de la variance, relie la photosynthèse nette, la concentration en symbiotes et en chlorophylle avec le taux d'absorption d'ammonium. L'axe 2, qui explique **21%** de la variance, est dépendant de l'absorption de phosphore. Enfin, l'axe 3 (**17.4%** de la variance), est attribuable à la respiration animale. Les conclusions de l'ACP permettent donc de mettre en lumière les corrélations existant entre le blanchissement (symbiotes et chlorophylle), l'acquisition d'ammonium et le taux de photosynthèse. Elles suggèrent que l'impact de la température sur l'acquisition de NH_4^+ dépend directement des capacités photosynthétiques de l'holobionte et non d'un contrôle physiologique de l'hôte, comme proposé dans la première hypothèse. Godinot et al. (2011c) ont dénoté une excrétion d'ammonium à 33°C chez *S. pistillata* tout comme Rahav et al. (1989), qui ont relevé le phénomène similaire en bloquant la chaîne de transport d'électrons au moyen de l'inhibiteur DCMU.

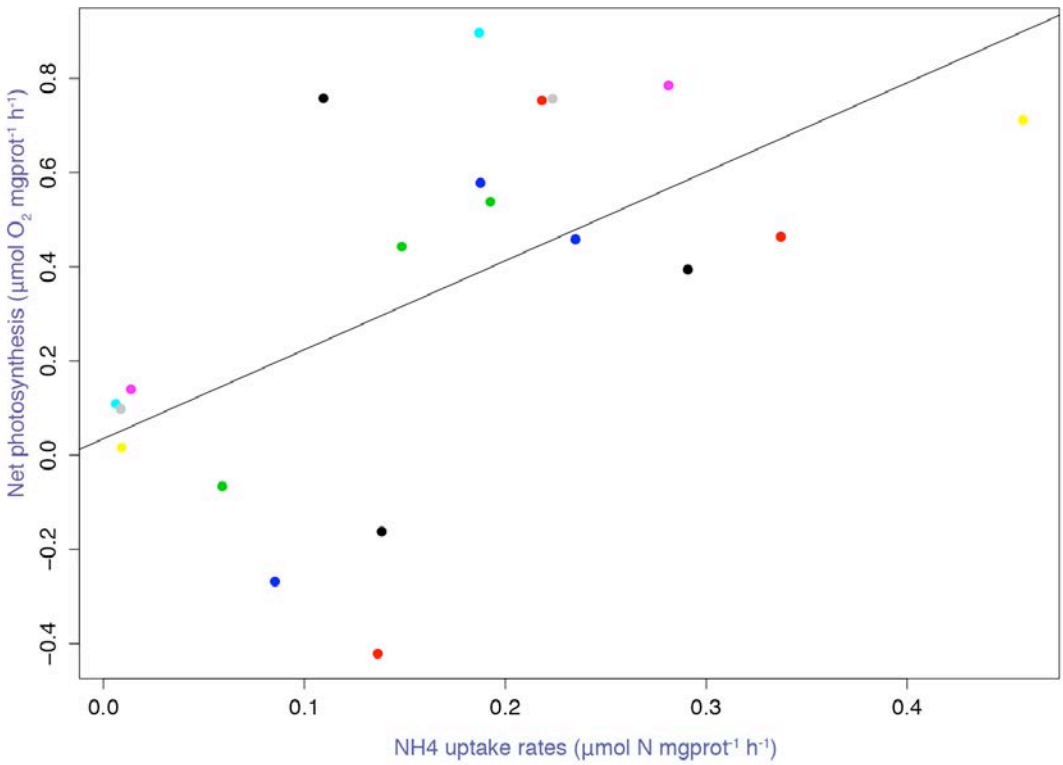


Figure 26 Corrélation de Pearson mettant en évidence la relation existant entre l'absorption d'ammonium et les taux de photosynthèse nette (t=3.029, p=0.007, ρ=0.58)

Dans cette même dernière étude, Rahav et al. (1989) ont également observé une excrétion d'ammonium lorsque l'activité de l'enzyme GOGAT était inhibée. Conjointement, ces observations suggèrent ainsi que l'absorption d'ammonium est étroitement liée à l'activité photosynthétique des symbiotes. Cependant, aucune conclusion ne peut être déduite en ce qui concerne l'absorption de nitrate, qui ne se voit plus corrélée à celle du phosphate et indépendante du processus photosynthétique (corrélation nitrate et phosphate; t=1.018, p=0.32, ρ=0.23).

L'ACP met également en lumière la capacité d' *H. fuscescens* en symbiose avec le clade D1, à maintenir son métabolisme durat un stress de température. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer sa résistance au choc thermique : a) son association avec le clade D1 de *Symbiodinium*, décrit comme une des souches les plus thermotolérantes (Jones et al. 2008), pourrait lui conférer un avantage physiologique, lui permettant de maintenir son métabolisme par rapport aux espèces coralliennes associées au clade C1, b) le processus de pulsation, n'ayant pas été affecté à 30°C, lui permettrait de maintenir un taux élevé d'absorption d'azote, favorisant la croissance de ses symbiotes, stimulant ses capacités autotrophes et sa survie, c) les deux facteurs (le clade et la physiologie de l'animal) agissent de manière combinée pour maintenir le métabolisme de l'holobionte à 30°C.

Table 6 Analyse en composante principale (ACP) effectuée sur les paramètres physiologiques mesurés lors de l'article n°1 à 25°C. Les cosinus directeurs et le pourcentage de variance expliquée sont donnés pour chaque composante

Variable	CP1	CP2	CP3
Photosynthèse nette (NPS; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	**0.906**	0.109	0.071
Respiration (R; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	-0.565	-0.223	**0.695**
Absorption d'ammonium (NH_4; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	**0.793**	-0.433	-0.310
Absorption de nitrate (NO_3; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	0.253	0.592	0.599
Absorption du phosphore (PO_4; µmol P (mg prot)$^{-1}$)	0.001	**0.880**	-0.312
Concentration en chlorophylle (Chloro; µg ($a+c_2$) cm^{-2})	**0.748**	0.212	0.127
Densité en symbiotes (nb Zoox cm^{-2})	**0.817**	-0.232	0.402
Pourcentage de la variance expliquée	**43.7%**	**21.04%**	**17.4%**

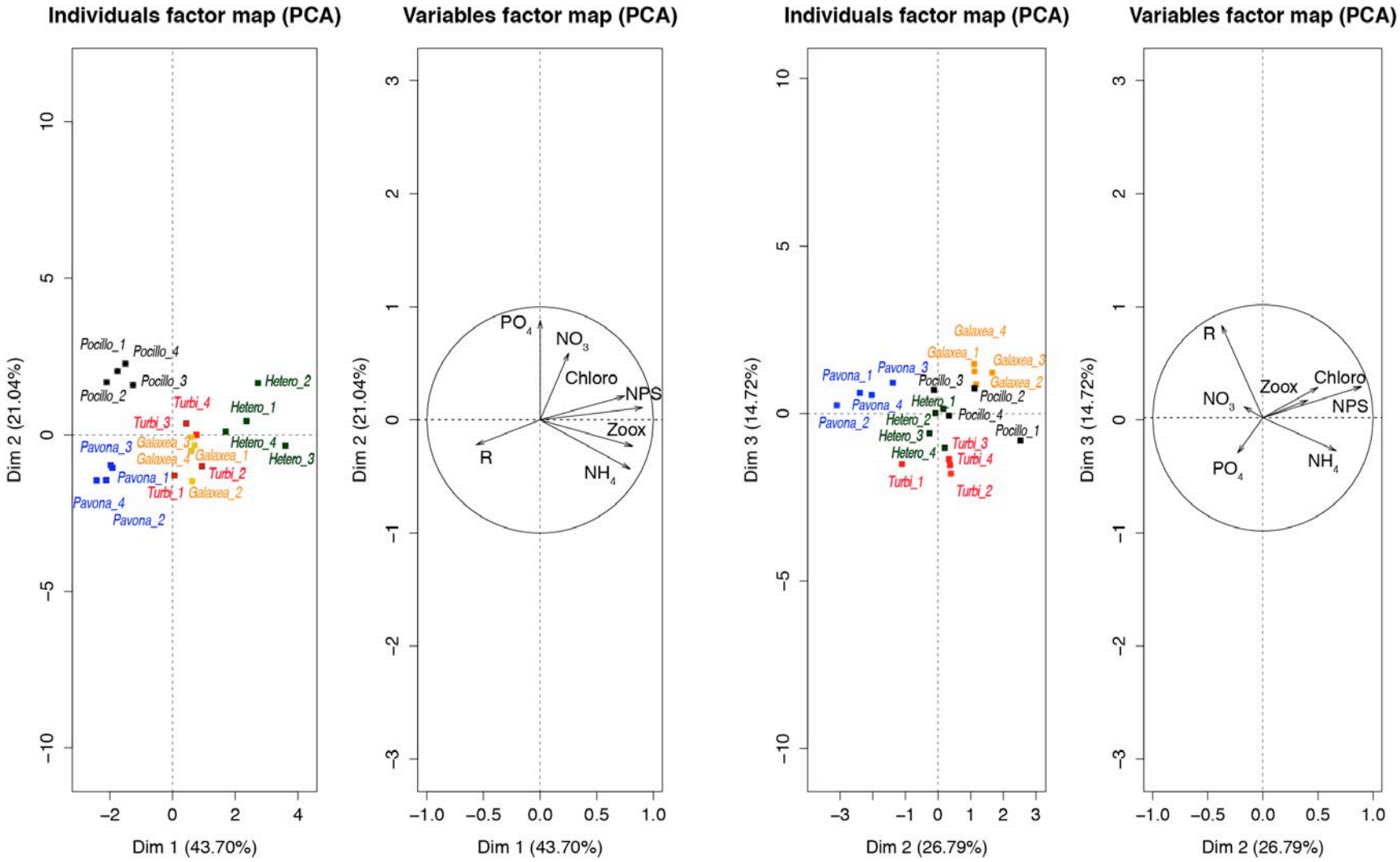


Figure 27. Analyse en composante principale réalisée pour complémenter l'article n°1 avec les données obtenues à 30°C

4. Les capacités des espèces de coraux tropicaux à acquérir le phosphore et leurs besoins

Contrairement aux résultats obtenus sur l'azote, où les taux d'absorption différaient d'un holobionte à un autre, les taux d'acquisition de phosphore étaient comparables chez toutes les espèces arborant le même clade de *Symbiodinium* (C1). Cependant, l'espèce *H. fuscescens*, associée au clade D1 et présentant des pulsations rythmiques, montrait des taux d'absorption de phosphore supérieurs à certaines espèces. A ce stade, il est encore difficile de conclure à une influence de l'hôte ou des symbiotes sur l'absorption de phosphore, même si les symbiotes représentent un des principaux sites d'assimilation de P inorganique au sein de la symbiose (Godinot et al. 2011a).

Durant la période de stress thermique, le taux d'absorption de phosphore a augmenté pour la majorité des espèces coralliennes étudiées. Or, l'augmentation du taux d'acquisition de P en fonction de la température avait déjà été reportée pour *S. pistillata* associée au clade A1 à 33°C (Godinot et al. 2011c). **Ces observations suggèrent que l'augmentation du taux d'acquisition ou de la demande en phosphore est une réponse générale des coraux face à un stress de température, et cela indépendamment du clade de symbiotes présent au sein des cellules hôtes**. Bien que cette réponse physiologique puisse résulter d'une dépendance des transporteurs de P à la température (D'Elia 1977), les résultats de notre étude, ainsi que l'ACP (Figure 27), mettent en lumière l'importance du phosphore pour la symbiose lors d'un stress thermique, et attestent de la capacité des coraux à contrôler ce mécanisme, comme préalablement observé chez les plantes (Amtmann and Blatt 2009).

Il a récemment été suggéré qu'une limitation en phosphore de l'holobionte pouvait induire une modification de la composition chimique des membranes cellulaires des symbiotes, dans lesquelles les phospholipides étaient remplacées par des sulpholipides (Wiedenmann et al. 2013). Alors que les phospholipides confèrent une résistance au stress de température (Tchernov et al. 2004), une diminution de la concentration en phosphore dans le milieu augmenterait la susceptibilité des colonies coralliennes au blanchissement (Wiedenmann et al. 2013)

En outre, étant donné que le phosphore est présent aussi bien dans la composition de molécules structurelles (acides nucléiques, lipides) que dans des composés générateurs d'énergie (ATP) (Beardall et al. 2009), une concentration minimum en P est alors requise afin de maintenir le métabolisme des espèces coralliennes en période de stress à un niveau suffisant.

Cette action positive du P a été mise en évidence lors de l'expérience d'augmentation de température (30°C) où l'ajout de phosphate (2 µM) a permis de maintenir la densité de symbiotes et de stimuler le taux de transfert de photosynthétats (65% à 80% avec P) par rapport aux conditions contrôles, ainsi que d'augmenter la rétention du carbone dans la fraction hôte, favorisant ainsi la "régénération cellulaire" animale.

5. Conclusions Axe I et perspectives

Les observations réalisées au cours de cette thèse viennent compléter les connaissances actuelles sur les capacités des espèces coralliennes à acquérir des sels nutritifs essentiels à leur développement et leur résilience. Les expériences réalisées ont montré que les holobiontes présentaient différentes aptitudes à acquérir les sels nutritifs en condition de culture optimale et lors d'un stress de température, suggérant des différences fonctionnelles et métaboliques. L'étude de terrain vient confirmer les hypothèses soulevées par Baker et al (2013), Pernice et al. (2015) et Cooper et al. (2011), mettant en évidence le rôle et l'importance du clade de symbiotes pour l'acquisition d'azote (et de carbone) au sein de la symbiose. Cependant, nos résultats montrent également que les taux d'absorption des sels nutritifs et de l'azote notamment n'est pas seulement dépendante du clade de symbiotes mais que l'holobionte doit être considéré dans sa globalité. Dans le contexte du réchauffement climatique, l'augmentation de la température de l'eau de mer aura non seulement une répercussion sur les performances photosynthétiques des symbiotes mais également sur leurs capacités à acquérir des nutriments essentiels pour leur survie. Les résultats suggèrent qu'à la fois l'azote et le phosphore sont importants pour maintenir les fonctions métaboliques des coraux pendant une période de stress de température, à condition qu'une certaine stoichiométrie, qui reste encore à définir, soit respectée. Nos résultats suggèrent également que certaines espèces, telle que *H. fuscescens*, présenteraient des capacités de résilience plus importantes que d'autres organismes coralliens, dû au fait : 1) qu'elle n'a pas de squelette calcaire, 2) que ses pulsations rythmiques augmentent les taux d'acquisition de nutriments inorganiques (carbone, azote et phosphore), 3) qu'une association avec le clade D lui confère (surement) un avantage physiologique lors de période de stress.

En ce qui concerne les perspectives de cet axe, il pourrait être envisagé d'étudier la régulation biotique et abiotique des gènes impliqués dans le transport de l'ammonium, des nitrates et des phosphates ou des enzymes prenant part aux processus d'assimlation de l'azote telles que la GS, GDH ou encore la nitrate et nitrite réductase. Il sera également primordial de comprendre si la diminution de l'absorption d'azote en période de stress thermique résulte de la perte des symbiotes ou d'une régulation réalisée par l'hôte. Afin de répondre à cette problématique, il faudrait élaborer un budget complet d'azote (qui prendrait en compte l'azote provenant de la fixation atmosphérique, de l'hétérotrophie, de l'azote organique et inorganique dissous) afin de vérifier si l'assocation symbiotique est réellement limitée en azote ou non. On pourrait également réaliser des mesures de C:N dans les différents compartiments de la symbiose en fonctions des conditions environnementales.

Ensuite, des expériences complémentaires devraient également être réalisées avec l'espèce *H. fuscescens* afin de définir si sa résistanace au stress thermique est dûe à la présence du clade D dans nos échantillons ou aux pulsations. Pour ce faire, il faudrait infecter cette espèces par différents clades de symbiotes et mesurer certains paramètres physiologiques clés tels que les taux de photosythèse, de transfert de photosynthétats.

Axe II: Effets d'un enrichissement ou d'une déplétion en sels nutritifs sur la réponse physiologique des coraux tropicaux dans le contexte du réchauffement climatique

Alors que l'augmentation des concentrations en sels nutritifs dans l'eau a souvent été associée au déclin des récifs coralliens côtiers, la réponse physiologique des coraux à un enrichissement en sels nutritifs est très variable, et souvent contradictoire, comme en attestent les observations reportées dans la Table 3. Des hypothèses ont été avancées pour expliquer les résultats divergents :

1) **Shantz and Burkepile (2014)** ont mis en évidence, à travers une méta-analyse d'études antérieures, que la réponse physiologique du corail à la disponibilité en sels nutritifs dépendait fortement du contexte environnemental, mais également de l'espèce de corail étudiée, ainsi que sur la nature et/ou l'origine des nutriments azotés (ammonium versus nitrate).

2) **Wiedenmann et al. (2013)** ont également suggéré que le rapport N:P des sels nutritifs dans l'eau de mer serait un facteur primordial pour la maintenance de la symbiose corail-dinoflagellé, notamment durant une période de stress (i.e. : température, lumière). Ces auteurs ont effectivement montré qu'une limitation de la symbiose en phosphore, en présence d'une importante concentration en nitrate (3:0.07) créait un déséquilibre "nutritionnel" au sein de l'holobionte et modifiait la composition des membranes lipidiques des symbiotes, favorisant le blanchissement en période de stress.

Les expériences réalisées dans le cadre de cet axe d'étude se sont donc fondées sur ces deux hypothèses, et montrent que la réponse des coraux à leur milieu nutritionnel est plus complexe que ce qui a été préalablement supposé. Elle dépendrait:

1) de la quantité minimale de sels nutritifs disponibles dans le milieu
2) de la forme azotée (nitrate ou ammonium) avec laquelle a été réalisé l'enrichissement
3) de la disponibilité en phosphore
4) de la disponibilité en nutriments organiques
5) de l'état physiologique du corail
6) du temps d'exposition

En résumé, les coraux vont répondre différemment à un même rapport N:P, selon que l'azote soit disponible sous la forme d'ammonium ou de nitrates, selon les concentrations en azote et phosphore (un même rapport N:P de 2 peut être obtenu avec des concentrations 2:1, 4:2, 0.5 : 0.25, etc..), et selon que le corail se trouve en condition de stress (augmentation de température par exemple) ou non. Les concentrations choisies

1. Quantité en sels nutritifs minimale requise pour une bonne santé des coraux

Les résultats obtenus dans les articles 3 et 5 ont montré que de très faibles concentrations en azote (≤ 0.5 µM) et en phosphore (≤ 0.05 µM) ne permettent pas à elles seules de maintenir une densité en symbiotes, ainsi que des taux de photosynthèse et de calcification optimaux chez *S. pistillata* par rapport à des colonies cultivées en présence de > 0.5-1 µM N et 0.1-0.2 µM P à 25°C. Cependant, malgré sa croissance dans un milieu appauvri en nutriments, *S. pistillata* a maintenu des taux de transfert de photosynthétats élevés (70-75%), suggérant un échange nutritionnel normal au sein de la symbiose. Enfin, les colonies limitées en nutriments ont sécrété très peu de carbone (TOC), laissant supposer que ce dernier élément est retenu dans les tissus coralliens. Ces résultats sont en accord avec toutes les observations récentes montrant un besoin minimal des coraux en azote et phosphore. En effet, Wiedenmann et al (2013) avaient également noté une réduction significative de la concentration en symbiotes en présence de faibles concentrations en sels nutritifs (0.7 :0.006). De même, Titlyanov et al. (2001) ont montré qu'une limitation en nutriments induisait une diminution de la concentration en symbiotes, du taux de division cellulaire et de la concentration en pigments chlorophylliens pour des espèces coralliennes soumises à de faibles intensités lumineuses par rapport à des coraux nourris avec du zooplancton. Rosset et al. (2015) ont observé une réduction de la biomasse des polypes et de la concentration en protéines et en symbiotes lorsque les coraux étaient limités en nutriments. Ces mêmes symbiotes présentaient des poches de stockage d'énergie beaucoup plus larges comparé aux dinoflagellés en symbiose avec des coraux nourris (Rosset et al. 2015), ainsi qu'une accumulation de molécules lipidiques et de granules d'amidon, suggérant un découplage entre la quantité de carbone fixée et la faible demande énergétique des cellules limitées en nutriments.

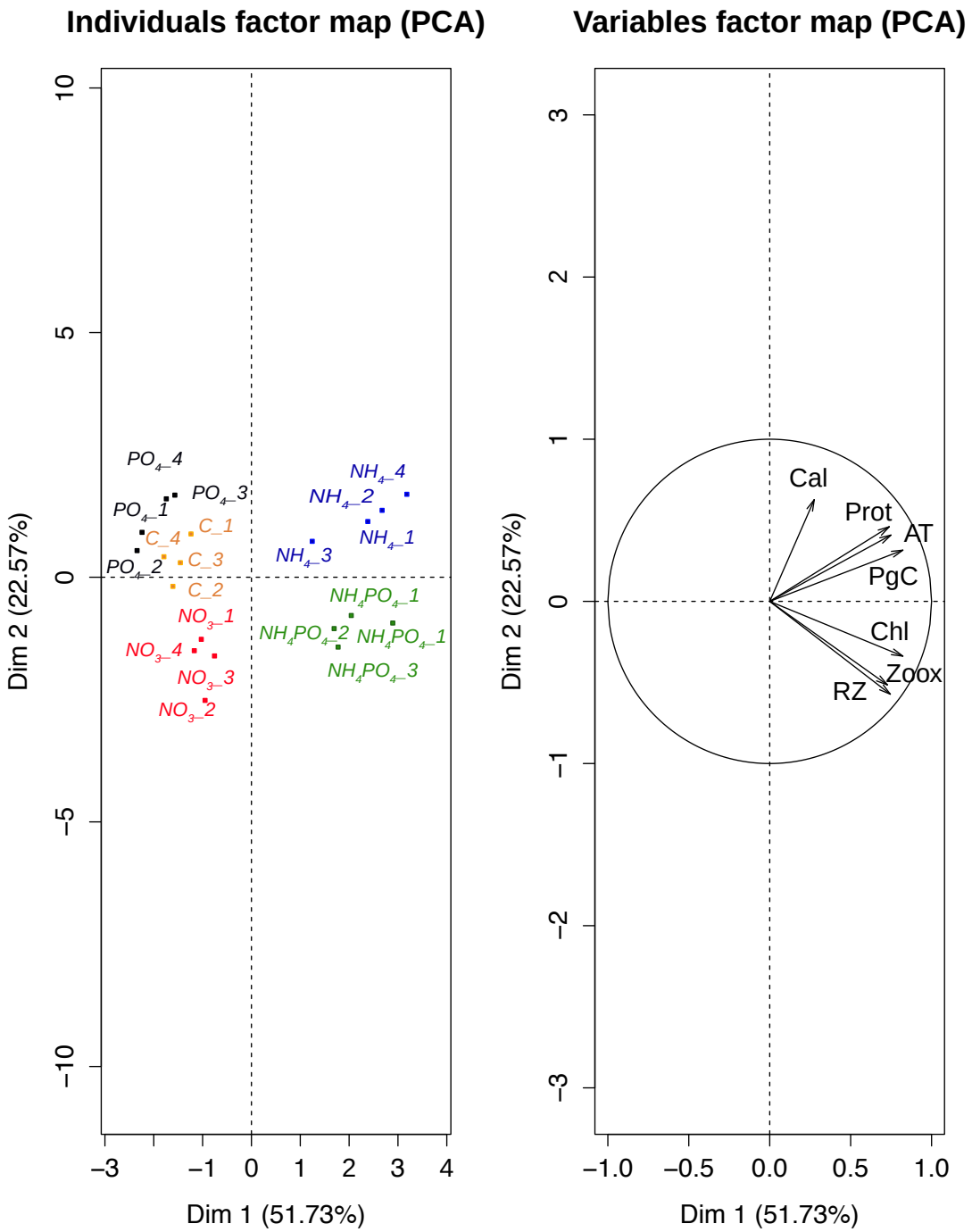
Récemment, Jacobson et al. (2016) ont démontré qu'une limitation en nutriments inorganiques et organiques chez l'espèce de corail *Porites spp.* pouvait provoquer une dépression métabolique, se traduisant par une réduction de 37% du taux de respiration, de 64% de la biomasse, sans conséquence sur la production de son squelette calcaire. La dépression métabolique est un mécanisme qui permet aux organismes d'ajuster leur métabolisme aux faibles possibilités de synthèse d'ATP (Gilles and Anctil 2006). Cette stratégie pourrait bénéficier à certaines espèces de coraux durant des périodes de limitation chronique en nutriments (Jacobson et al. 2016; Rogers 1979) et expliquerait les variations de mortalité observées entre les différentes espèces

Prises conjointement, ces observations suggèrent qu'une quantité minimale de sels nutritifs est requise pour un développement optimal des coraux scléractiniaires, ce qui paraît logique puisque ces éléments sont des constituants clés de la biomasse coralienne. In situ, dans un milieu très oligotrophe tel qu'en Mer Rouge, les faibles concentrations en sels nutritifs sembleraient être compensées par une plus grande disponibilité en zooplancton (hétérotrophie), qui permettrait de maintenir des concentrations en chlorophylle et symbiotes bien plus élevées, telles que celle mesurées chez *S. pistillata* (Mass et al. 2010).

Table 7 Analyse en composante principale (ACP) effectuée sur les paramètres physiologiques mesurés pour les différentes espèces de Pocilloporidae illustrant les effets des enrichissements en sels nutritifs sur la physiologie. Les cosinus directeurs et le pourcentage de variance expliquée sont donnés pour chaque composante

Variable	CP1	CP2
Photosynthèse brute (PG_C; µg C cm^{-2} h^{-1})	**0.823**	0.316
Quantité de photosynthétats transférés (AMT; µg C cm^{-2} h^{-1})	**0.749**	0.409
Concentration en chlorophylle (Chl; µg ($a+c_2$) cm^{-2})	**0.823**	-0.338
Densité de symbiotes (nb Zoox cm^{-2})	**0.745**	-0.573
Calcification (%d^{-1})	0.275	**0.627**
Concentration en protéines (mg prot cm^{-2})	**0.739**	0.460
Respiration (nb Zoox cm^{-2})	**0.727**	-0.515
Pourcentage de la variance expliquée	**51.73%**	**21.04%**

Figure 28. Analyse en composante principale regroupant les différentes études réalisées sur la famille des Pocilloporidae et illustrant les effets des enrichissements en nutriments inorganiques sur la réponse physiologique du corail à 25°C



2. Effet d'un enrichissement en azote seul (en présence de faibles concentrations de phosphore (P<0.5))

Les concentrations d'azote choisies dans le cadre de nos expériences sont en adéquation avec les mesures effectuées sur le terrain. Nos expériences avaient pour but de simuler une charge importante et soudaine de nutriments, telles qu'observées lors d'un orage. Dans les Florida Keys par exemple, Lapointe & Matzie (1996) ont relevé une concentration de 3 µM d'ammonium, tout comme Tomascik & Sander (1995) (2.7 µM). De fortes concentrations en nitrate ont également été mesurées près de Bahia au Brésil (1,7 à 8 uM) et également à Moorea en Polynésie française, 31 µM (Rouzé et al. 2015) !

Les résultats obtenus ont mis en évidence un effet distinct d'un enrichissement seul en ammonium ou en nitrate sur la physiologie des coraux (voir ACP Figure 28). En effet, l'ammonium, qui provient principalement du recyclage de la matière organique ou de l'excrétion des organismes vivants au voisinage des coraux (Meyer and Schultz, 1985 ; Uthicke et al. 2012 ; Holbrook et al. 2008), a un effet neutre ou positif sur la physiologie des coraux en présence d'une faible quantité de phosphore (P<0.5 µM). Dans des conditions de croissance optimale (aucun stress), il augmente les taux de photosynthèse et calcification (Figure 28) ainsi que la densité de symbiotes et la concentration en chlorophylle, sans toutefois rompre la symbiose puisque les budgets de carbone réalisés dans cette thèse montrent qu'un apport d'ammonium à une concentration de 3 µM augmente la quantité de carbone fixée et transférée à l'animal hôte pour son propre métabolisme. Ces résultats sont en accord avec les observations de plusieurs études démontrant les effets positifs d'un enrichissement en ammonium seul sur la croissance des coraux (Meyer et al. 1983 ; Meyer and Schultz, 1985 ; Bongiorni et al. 2003 ; Béraud et al. 2013). **En conditions de stress (température et/ou lumière), nos résultats (étude n°5) ainsi que les expériences réalisées par (Béraud et al. 2013) ont montré qu'un enrichissement seul en ammonium permettait de contrebalancer le blanchissement et de préserver les capacités photosynthétiques de l'holobionte.** L'ammonium pourrait, entre autre, contribuer au maintien de la synthèse des protéines ou de l'enzyme principale du cycle de Calvin, la RuBisCO, qui catalyse la réaction entrainant la production de carbone organique à partir de CO_2 (Korbee et al. 2010).

Au contraire de l'ammonium, un enrichissement en nitrate, en présence d'une faible concentration en phosphore (N :P= 3 :0.05 ou 2 :0.1) est délétère pour la santé des coraux, notamment pour les processus de photosynthèse et de calcification (ACP Figure 28). Cet effet négatif peut s'expliquer par le coût énergétique résultant de la réduction des nitrates en ammonium via les enzymes nitrate et nitrite réductases. La réduction du nitrite en ammonium consomme 6 électrons provenant de la chaine photosynthétique afin de catalyser la réaction (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013).

Ces électrons ne peuvent plus être utilisés pour la photosynthèse, réduisant ainsi la fixation du carbone et par la suite, la calcification de l'animal. Des travaux précédents réalisés sur des plantes (du blé) proposent que la biosynthèse de sucrose et d'acides aminés entrent en compétition pour l'accès au carbone (Champigny and Foyer 1992). De plus, Champigny and Foyer (1992) ont montré que l'addition de nitrate induisant la biosynthèse d'acides aminés organiques réduisait la synthèse de sucrose et l'activité de l'enzyme sucrose ou saccharose-phosphate synthase sur des pousses de blé. En outre, les taux de photosynthèse et de calcification auraient pu être impactés par la production excessive d'espèces réactives de l'azote, suite à une accumulation du nitrate dans les tissus animaux (Lesser 2006; Roth 2014). Les espèces réactives de l'azote agissent coinjointement avec les ROS pour endommager les cellules; ce phénomène pourrait accentué en fonction des conditions environnementales (Lesser 2006).

Nos résultats viennent confirmer les travaux de Wiedenmann et al. (2013), qui ont suggéré un dysfonctionnement de la symbiose lorsque les coraux étaient exposés à un enrichissement en nitrate, en présence de faibles concentrations en phosphore (N :P=3 :0.07). De même, plusieurs études réalisées en présence ou non d'un stress thermique viennent appuyer cette hypothèse (Marubini and Davies, 1996 ; Ferrier-Pagès et al. 2001 ; Nordemar et al. 2003). Cependant, il a été montré que l'ajout de nitrates pouvait aussi pallier les effets négatifs de l'augmentation de la pCO_2 sur la calcification des coraux adultes et des stades larvaires (Holcomb et al. 2010; Tanaka et al. 2007). Ces observations suggèrent que les effets du nitrate sur les coraux sont complexes puisque il semble affecter différemment la physiologie des coraux selon son interaction avec les autres facteurs abiotiques.

3. Effets combinés d'un enrichissement en azote et phosphore (P≥ 0.5)

Nos observations (article 3 et 4) combinées à des études précédentes (Muscatine et al. 1989; Sawall et al. 2011; Steven and Broadbent 1997; Tanaka et al. 2007; Wiedenmann et al. 2013; Wooldridge 2013) montrent qu'un double enrichissement en azote et phosphore profite aux symbiotes plus qu'à l'animal, avec une augmentation des concentrations en chlorophylle et/ou en symbiotes.

Notre étude (article n°3) montre également une diminution du pourcentage et de la quantité de photosynthétats transférés à l'hôte lorsque les symbiotes sont exposés à un enrichissement combiné en ammonium et phosphore (N:P=3:1). Ainsi les symbiotes retiennent le carbone autotrophe pour satisfaire leurs propres besoins métaboliques, puisqu'ils peuvent le combiner à l'azote et au phosphore pour synthétiser des molécules d'intérêts (protéines, phospholipides, etc…). Nous pouvons donc en conclure que la croissance des symbiotes se fait au détriment de la croissance animale, ce qui peut avoir des conséquences néfastes pour la santé du corail sur le long terme. En effet, il a été montré qu'une densité trop forte en symbiotes entrainent un stress oxydant important lorsque la température de l'eau de mer augmente, influençant le blanchissement des colonies (Cunning and Baker 2013).

Comme suggéré par Shantz et Burkepile (2014), les effets d'un double enrichissement peuvent donc varier d'une espèce de corail à une autre en fonction de la densité et de la diversité génétique en symbiotes. En effet, des espèces coralliennes caractérisées par de faibles densités algales ou un génotype de dinoflagellé se distinguant par une croissance lente seraient plus résilientes aux stress anthropiques et au blanchissement (Cunning and Baker 2013). C'est ce qui est observé dans notre étude n°4 avec l'espèce de corail scléractiniaire *T. reniformis*, lors d'un stress de température induisant le blanchissement. Un enrichissement en nitrate et phosphore (2:0.5) a permis de favoriser la croissance des symbiotes durant une période de stress thermique, et de maintenir une concentration équilibrée en symbiotes (non excessive) au sein de l'association symbiotique. De ce fait, le double enrichissement a permis de maintenir des taux de photosynthèse et de calcification élevés par rapport à des coraux non enrichis. Cette observation suggère qu'en cas de stress thermique induisant un blanchissement, un apport modéré et combiné de nitrate et phosphore peut favoriser le maintien de l'association symbiotique.

Plus généralement, l'eutrophisation des eaux pourrait alors induire des modifications dans la répartition et la composition des espèces au sein d'un récif, en favorisant celles qui peuvent éviter la limitation en CO_2 de leurs symbiotes.

4. Effets d'un enrichissement seul en phosphore

De fortes concentrations en phosphates peuvent être relevées en milieu naturel suite à une décharges importantes de nutriments. Par exemple, au Brésil, près de Bahia ainsi qu'à Kaneohe Bay Costa et al. (2000) (HI, USA) des pics de 1.42 µM et 0.8 µM ont été respectivement mesurés (Costa et al. 2000 ; (Smith 1982). Un excès de phosphore dans l'eau de mer par rapport à l'azote (NH_4:P=0.5:2), a stimulé l'assimilation/rétention de carbone au sein des tissus animaux, et a donc permis une croissance plus rapide de l'animal, et/ou un stockage plus important de réserves dans ses tissus (article n°1). De plus, lors d'un stress de température la disponibilité en P a permis de maintenir le métabolisme de l'holobionte, en favorisant le transfert de photosynthétats ainsi que le taux de transfert d'électrons (rETR) par rapport à la condition contrôle ne recevant par de P. Ces observations montrent donc que le phosphore est un élément essentiel pour le développement et la survie des organismes vivants puisqu'il entre dans la composition des acides nucléiques dont l'ADN, joue un rôle déterminant dans les processus cellulaires à forte demande énergétique comme les réactions enzymatiques et la production d'ATP. Il se révèle être également un des composants principaux des phospholipides présents dans les membranes des dinoflagellés, favorisant leur résistance aux stress (Tchernov et al. 2004).

Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Godinot et al. (2011a), qui ont montré qu'un enrichissement modéré en P (0.5 ou 2.5 µM), durant 4 à 7 semaines, favorisait principalement les symbiotes en augmentant leur croissance spécifique, l'efficacité photosynthétique des PSII ainsi que le taux de photosynthèse. Une part du phosphore se retrouvait également allouée à la croissance du squelette. Cependant, Koop et al. (2001) ainsi que Dunn et al. (2012) ont mis en évidence les effets délétères d'une forte concentration en P (2.4-5.2 µM et 0.5 mg/L) sur la densité du squelette corallien.

Dans nos conditions expérimentales, un enrichissement en phosphore de 2 µM durant deux semaines, n'a eu aucun effet sur la croissance du squelette et a favorisé l'association symbiotique durant une période de stress thermique, suggérant un rôle essentiel de ce nutriment. Wiedenmann et al. (2013) ont montré qu'en période de stress, lorsque le phosphore devient limitant dans le milieu, la quantité de phospholipides présents dans les

membranes des cellules végétales diminue en faveur des sulpholipides, fragilisant la symbiose. On pourrait ainsi suggérer que l'apport supplémentaire de phosphore aurait maintenu une concentration élevée en phospholipides dans les membranes algales, favorisant le maintien de l'association symbiotique.

5. Effets combinés d'un enrichissement en sels nutritifs et d'un apport en matière organique

Au cours de cette thèse, nous avons également montré que de fortes concentrations en matière organique particulaire (sous forme de zooplancton), combinées à un enrichissement en nitrate étaient néfastes pour la santé du corail *T. reniformis*, notamment lors d'un stress thermique. En effet, sous cette condition, la croissance du squelette, et la biomasse tissulaire (protéines), ont significativement chuté par rapport aux coraux contrôles. Un effet similaire avait été observé par Fabricius et al. (2013) sur les espèces *A. millepora* et *M. tuberculosa*. Fabricius et al. (2013) avaient supposé que l'apport de matière organique favorisait le développement des bactéries, augmentant ainsi la réduction de croissance et la sensibilité des espèces coralliennes aux maladies. Cette hypothèse n'est pas vraiment valable dans le cas de notre expérience, réalisée en aquarium, et pour laquelle la nourriture a été fournie sporadiquement et ne s'est pas accumulée dans les aquariums. Il est donc peu probable que la nourriture ait induit un développement des bactéries de la colonne d'eau, à moins qu'elle ait modifié la composition de la communauté bactérienne directement associée aux coraux. Nous suggérons donc que la réduction du taux de calcification a pu aussi être impactée par la production d'espèces réactives de l'azote, suite à l'accumulation du nitrate dans les tissus animaux (Lesser 2006; Roth 2014). Le nitrate aurait pu s'accumuler dans les tissus des colonies nourries puisque la nourriture contient déjà une grande part d'azote, et génère spécifiquement de l'ammonium produit par le catabolisme de l'animal (Wang et al. 2015). Etant donné que l'ammonium est généralement préféré au nitrate (Raven et al. 1992), son utilisation est favorisée par rapport au NO_3^-, qui s'accumulerait. L'apport de proies planctoniques aurait aussi renforcé la limitation en phosphore de la symbiose, en créant un déséquilibre au sein du rapport N:P. Il est intéressant de noter que les coraux exposés à un enrichissement en nitrate et un apport hétérotrophe n'ont pas pu récupérer leurs capacités photosynthétiques après le stress de température, suggérant que cette période de récupération était trop courte et/ou que le stress était trop important pour permettre la résilience des colonies.

Enfin, nos résultats ont montré une corrélation positive entre le taux de prédation et la concentration en éléments inorganiques dissous dans le milieu (articles 4 et 5) à 25°C et 30°C. Ces résultats sont en adéquation avec une étude précédente démontrant un taux de consommation de proies plus important en milieu turbide (Wang et al. 2015). Les mécanismes sous-jacents expliquant le couplage entre la disponibilité en sels nutritifs et le broutage sont encore très peu compris, cependant on pourrait suggérer que l'apport de sels nutritifs auraient modifié la quantité et la qualités des photosynthétats transférés à l'animal, découplant l'énergie disponible à l'ingestion et la digestion des proies, comme proposé par Leal et al. (2015) avec l'anémone *Aiptasia pallida*.

6. Effets du temps d'exposition

Durant nos expériences, nous avons exposés les boutures de coraux à un temps d'exposition n'excédant pas 4 semaines. Le but était de simuler un apport soudain de nutriments dans le milieu récifal. Cependant, les effets de l'enrichissement en nutriment pourraient changer en fonction du temps d'exposition. Les effets négatifs du nitrate sur la physiologie du corail n'en seraient que plus négatifs sur un temps d'exposition plus long. Cependant, qu'en serait-il de l'effet d'un enrichissement combiné en ammonium et phosphore ? Des expériences supplémentaires, établies sur un plus long terme (mois), et simulant un enrichissement chronique en nutriments devraient ainsi être réalisés.

7. Conclusions de l'axe 2 et perspectives futures

Les écosystèmes coralliens, berceaux incontestables de la biodiversité marine, font partie des biotopes les plus menacés de notre planète. En plus de subir les conséquences du réchauffement global, ils sont également impactés par les pollutions marines de tout type; urbaines, industrielles et agricoles. Les effets d'un apport excessif en sels nutritifs sur les communautés coralliennes font l'objet de nombreuses controverses au sein de la communauté scientifique. Cette thèse s'est donc attachée à étudier, de manière expérimentale, l'impact des enrichissements en ammonium, nitrate et/ou phosphore sur la physiologie des coraux scléractiniaires tropicaux. Ce travail a permis de mettre en évidence : a) les effets contrastés des enrichissements en ammonium et nitrate sur les performances photosynthétiques et sur la croissance des coraux. Alors que l'enrichissement en ammonium avec ou sans ajout de phosphore est particulièrement bénéfique pour la photosynthèse et la calcification des coraux, le nitrate doit être couplé à un enrichissement en phosphore pour influencer positivement le métabolisme corallien, b) l'importance de la disponibilité en phosphore dans le milieu environnemental pour le maintien de l'équilibre au sein de

l'association symbiotique, c) les interactions existant entre plusieurs composants de l'eutrophisation (sels nutritifs et matière organique).

Cependant, de nombreuses études doivent encore être réalisées afin de compléter cette première approche. Tout d'abord, il serait important de connaître les concentrations seuil minimales et maximales en azote et phosphore pour lesquelles la rupture de la symbiose a lieu afin de mettre en place des stratégies de gestion des zones marines. Pour ce faire, il faudrait établir un plan expérimental très précis et tester plusieurs concentrations d'azote et de phosphore et combiner ces conditions avec l'étude de paramètres abiotiques telle que la température ou l'acidification des océans.

De nombreuses incertitudes planent sur les mécanismes sous-jacents expliquant les effets contrastés de l'ammonium et du nitrate sur la physiologie du corail. Des mesures de stress oxydant (espèces réactives de l'azote, NO^-) nous permettraient de comprendre, de manière plus précise l'impact d'un enrichissement azoté sur le métabolisme corallien. De même l'utilisation d'isotopes de l'azote, $^{15}N\text{-}NH_4$ ou $^{15}N\text{-}NO_3$, couplée à de l'imagerie isotopique, telle que le nanoSIMS[3] nous permettrait également de voir s'il existe une assimilation et une allocation différente de l'azote en fonction de sa forme. Enfin, cette thèse s'est uniquement intéressée aux espèces coralliennes tropicales, vivant dans un milieu pauvre en sels nutritifs. Il serait intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus sur des coraux tempérés, qui ont tendance à vivre dans des milieux beaucoup plus riches en sels nutritifs. En effet, par exemple, l'espèce *Cladocora caespitosa* en Mer Méditerranée est particulièrement abondante dans des milieux côtiers très eutrophisés, ce qui suggère qu'elle possède des adaptations à de tels milieux et une réponse physiologique différente à une enrichissement en sels nutritifs. Comparer les effets des pollutions marines sur plusieurs espèces tropicales, tempérées voir même profondes, permettrait d'obtenir une vue globale des conséquences des pollutions marines. De même, il serait tout aussi intéressant de venir compléter certains travaux portant sur l'effet des sels nutritifs sur les différents stades de croissance du corail.

Enfin, il serait déterminant de replacer nos différentes expériences dans leur contexte écologique et de prendre en considération d'autres facteurs biotiques et abiotiques afin d'expliquer la réponse des organismes coralliens aux pollutions marines. Les coraux et les algues (seaweed) représentent les plus importants producteurs primaires benthiques.

[3] High resolution ion microprobe for itopic and trace elements analysis

Cependant, ils sont en concurrence pour l'accessibilité à la lumière, aux nutriments et à un lieu propice au développement.

L'augmentation des apports en sels nutritifs combiné à la surpêche (herbivores) qui diminue la biomasse des herbivores et la pression de broutage sur les algues, induirait une croissance excessive du phytoplancton (bloom), venant rompre l'équilibre de l'écosystème et impacter la productivité primaire des coraux.

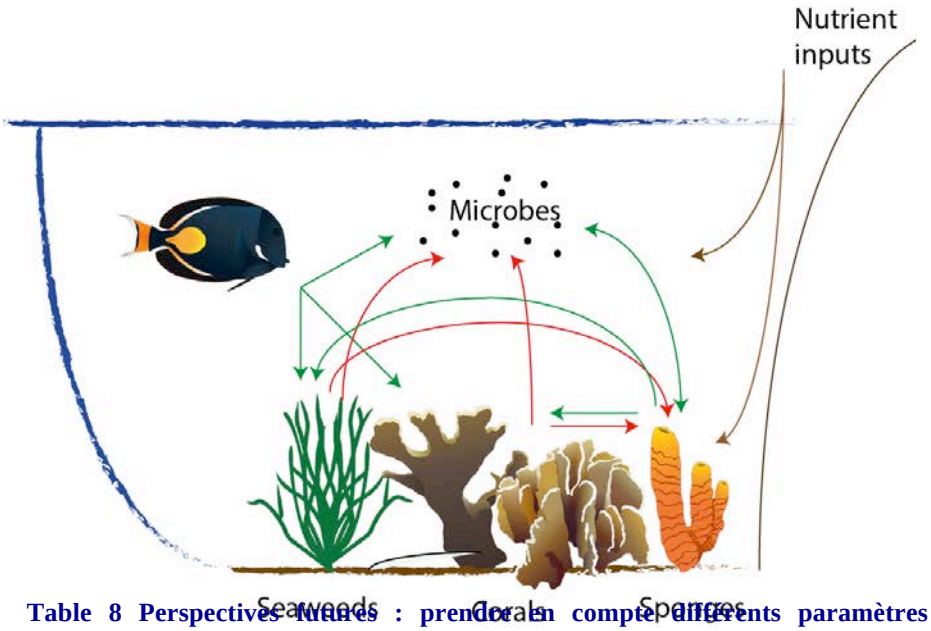


Table 8 Perspectives futures : prendre en compte différents paramètres biotiques et abiotiques charactérisant le récif

La présence excessive d'algues pourrait altérer l'environnement biogéochimique des colonies coralliennes, en réduisant la disponibilité en azote, phosphore (Wiedenmann et al. 2014), fer et l'oxygène ainsi que favoriser les dépôts importants de matières organiques détritiques, pouvant stimuler le risque d'infections bactériennes et fongiques (Guzman et al. 1990; Smith, 1975). A terme, ces facteurs affectent la croissance ainsi que le recrutement des espèces coralliennes (Burkepile et al. 2013).

En amont, la température agit également en synergie avec la croissance des macroalgues et vient perturber l'équilibre de l'association créée entre le corail animal et ses microorganismes symbiotiques (microbiotes). Les nombreux travaux de recherche réalisés en microbiologie corallienne ont montré que le microbiome des coraux était sensible à de multiples stress, tels que la compétition existant avec les algues ainsi que le stress de température (Zaneveld et al. 2016).

L'impact du microbiome sur le corail a pour support théorique la DDAM (Dissolved organic carbon-Disease-Algae-and-Microbes) hypothesis, qui repose sur l'idée que les macroalgues sécréteraient du carbone organique dissous (DOC en anglais), qui augmenterait la croissance et la consommation d'O_2 par les bactéries avec un effet négatif sur la santé des coraux (Rohwer et al. 2010 (coral reefs in the microbial seas); Haas et al. 2011; Gregg et al. 2013; Barott et al. 2009; Pawlik et al. 2016). Les interactions reportées ci-dessus mettent en lumière les phénomènes complexes intervenants dans l'écosystème récifal.

Des études complémentaires sont nécessaires afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle et de l'impact des différents acteurs du milieu récifal. Suite à l'importance émergeante du paramètre "DOC" pour la survie des coraux, la gestion des milieux récifaux devrait ainsi être étroitement reliée à celle des écosystèmes terrestres. Par exemple, le défrichement des forêts ainsi que le développement agricole aux abords du fleuve Amazone devrait particulièrement influencer la quantité de carbone organique dissous atteignant la zone des Caraïbes (Mora, 2008).

Ainsi, les programmes de protection et de restauration des millieux récifaux devraient exiger que des efforts soient réalisés non seulement à l'échelle locale mais que les nations elles-même s'engagent à agir à une échelle internationale.

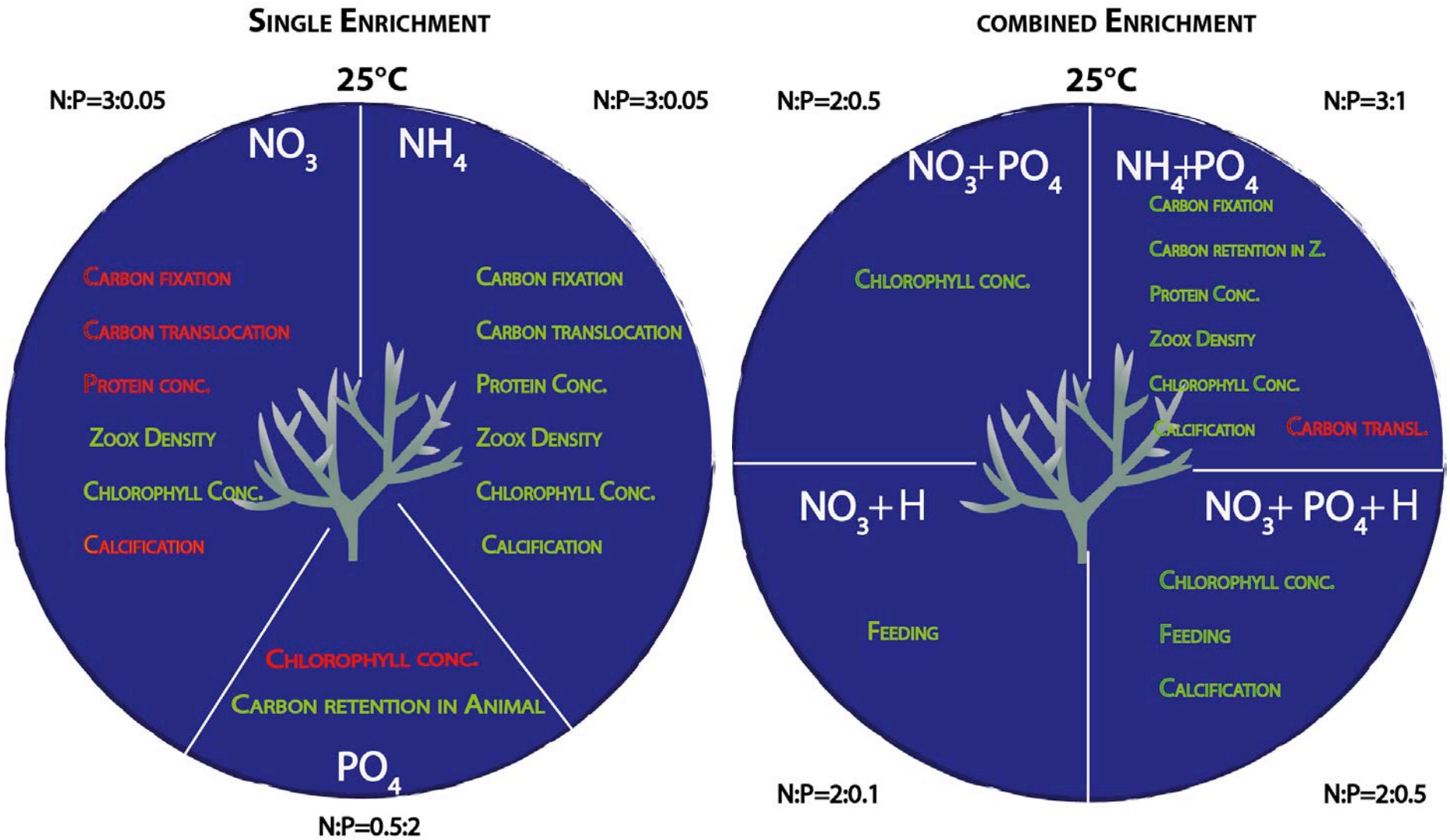


Table 9 Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors des différentes expériences basées sur l'effet des enrichissements en sels nutritifs. La couleur rouge correspond à une diminution des paramètres physiologiques alors que la couleur verte correspond à une augmentation. "H" correspond à un apport hétérotrophe.

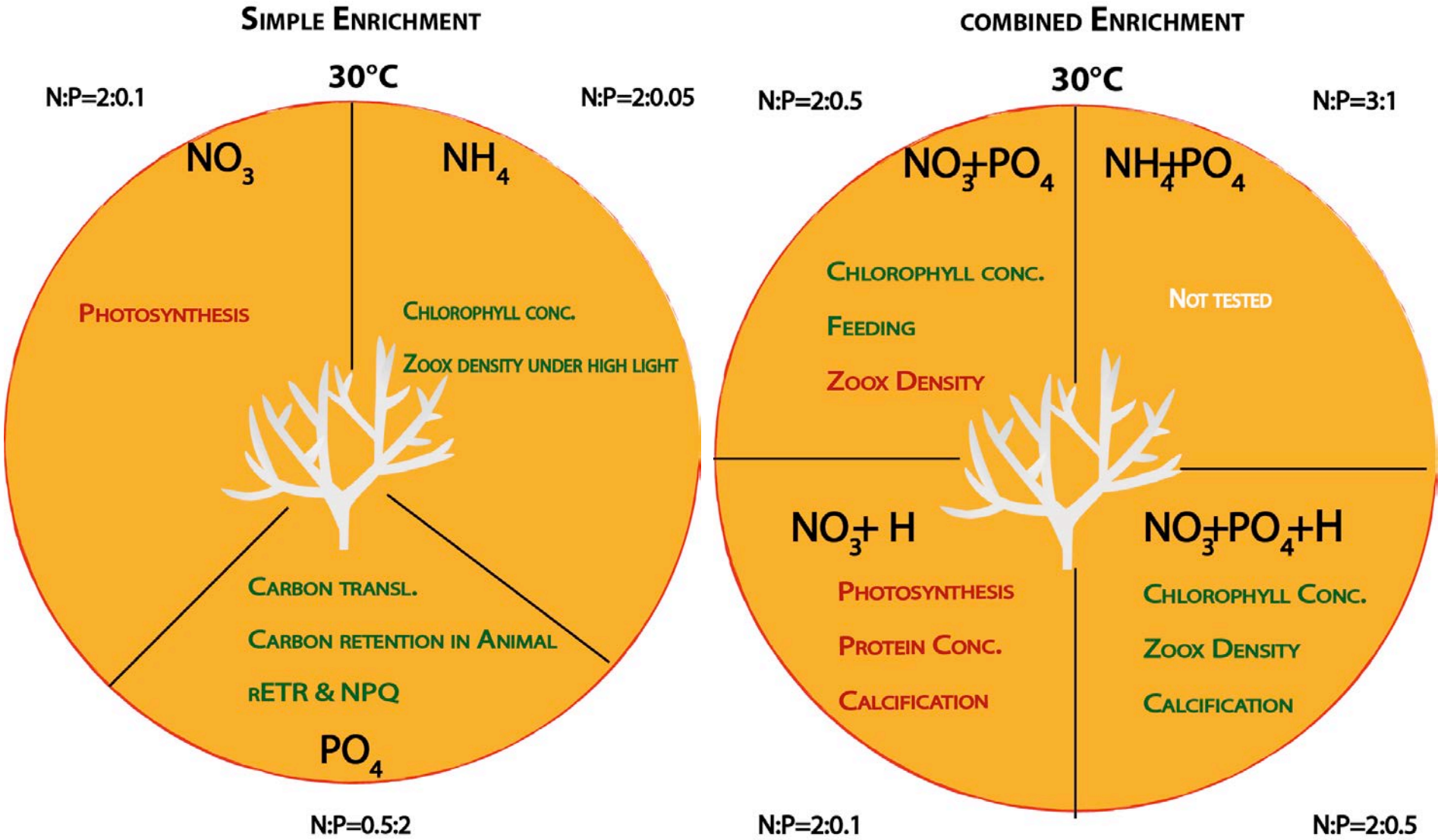


Table 10 Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors des différentes expériences basées sur l'effet des enrichissements en sels nutritifs sur la physiologie du corail à 30°C. La couleur rouge correspond à une diminution des paramètres physiologiques alors que la couleur verte correspond à une augmentation. La couleur rouge correspond à une diminution des paramètres physiologiques alors que la couleur verte correspond à une augmentation. "H" correspond

Chapitre VI
Addentum : General discussion

Chapter VI : Addentum

Two major axis were investigated through this thesis. The first one aimed to assess the capacities of tropical corals to take up dissolved inorganic nutrients (carbon, nitrogen and phosphorus) under normal growth conditions and while exposed under high temperature. The second axis attempted to study the effects of nutrient limitation and/or enrichment on the physiological response of the coral-dinoflagellate symbiosis. The outcomes of this thesis allowed to refine our knowledge on : i) the importance of inorganic nutrients such as nitrogen and phosphorus for the maintenance of the symbiosis during periods of stress, ii) the role and relevance of Symbiodinium genotypic diversity when studying the uptake rates of inorganic and organic nutrients, iii) the tight relationship existing between the biogeochemical conditions (N:P) characterizing the reef environment and the physiological responses of tropical corals, iv) the benefits from the combined contributions of auto- and heterotrophy in symbiotic organisms.

Axis I: Uptake rates of inorganic nutrients by tropical corals in a warming ocean

Our first objective aimed to i) compare the abilities of different coral holobionts (in this case : the association between the coral host and the symbionts) to take up inorganic nutrients (ammonium, nitrate and phosphorus) and ii) to specify whether this uptake depends on the symbionts, the animal host or if other parameters (environmental) could finluence the response of the holobiont. Although numerous studies measured the uptake rates of inorganic nutrients for a certain holobiont, only two compared the capacities of acquisition and assimilation of carbon and nitrogen by different clades of Symbiodinium (C and D) in association with a similar coral host (Baker et al. 2013; Pernice et al. 2015). These studies showed that carbon and nitrogen assimilation were dependent on the clade of Symbiodinium. It confirmed that genotypic diversity in Symbiodinium could confere ecological advantages to the animal host (Cooper et al. 2011b)

In order to address this issue, we implemented two distinct experiments, one was performed under controlled conditions and the second in the field.

The first experiment (article n°1) aimed to measure the uptake rates of inorganic nitrogen and phosphorus by the same clade of Symbiodinium (clade C1) in association with distinct coral hosts. The second experiment (article n°2) assessed the rates of carbon and nitrogen uptakes by the same coral holobiont hosting different clades of Symbiodinium (A1 and C). Together, these studies shed a light on the combined effects of symbionts and coral host on the uptake rates and absorption of dissolved inorganic nutrients.

1.1 The role of the host

The experiment related to the first article showed that the animal host plays a central role in the uptake rates of inorganic nutrients. Indeed, for the same clade of Symbiodinium (clade C1), the uptake rates of nitrogen varied from one coral species to another. We thus observed that *G. fascicularis* took up more nitrogen than *P. cactus*, although the two species were associated with clade C1 of Symbiodinium. *P. damicornis* showed higher uptake rates of nitrate compared with *G. fascicularis*, while they all hosted the same clade C1. More, we observed a positive effect of the rythmic pulsations of the soft coral species *H. fuscescens* on the uptake rates of ammonium and nitrate. This metabolic advantage has been already reported in the jellyfish *Cassiopea sp.* by Jantzen et al. (2010). The rythmic pulsations not only favour the uptake of inorganic nitrogen but the absorption and assimilation of dissolved inorganic carbon (Kremien et al. 2013; Wild and Naumann 2013), by enhancing mixing accross the coral-water boundary layer and by preventing refiltration of water by neighboring polypes. These observations suggest that coral holobionts do not present the same abilities in inorganic nitrogen acquisition or the same requirements. It further advises that coral holobionts may harbour distinct metabolic behaviours or present fluctuations in the allocations of inorganic nutrients. Finally, our results are in agreement with previous experiments reporting the importance and the role of the host in the physiological response of cnidarian and especially coral species to environmental conditions (Baird et al. 2009; Dunn et al. 2002; Falkowski et al. 1993; Gates et al. 1995; Hoadley et al. 2015; Wooldridge 2014)

1.2 The role of the symbionts

The animal host is not the only one which can regulate the absorption of inogranic nutrients within the symbiosis, since the second study performed in the Gulf of Eilat (Red Sea) with the tropical coral *S. pistillata* in association with clade A in surface waters and clade C in deeper environments, showed that each holobiont presented different capacities in coping with light variations and in assimilating inorganic carbon (article n°2). Indeed, under low light conditions, only *S. pistillata* associated with clade C was able to assimilate inorganic carbon and thus to show a positive rate of net photosynthesis.

These results confirm the previous conclusions made by Baker et al. (2013) and Pernice et al. (2015), who demonstrated that the clade of Symbiodinium influences the abilities of coral species to assimilate inorganic nutrients. Furthermore, these outcomes showed that genotypic diversity in Symbiodinium may confer physiological advantages to the holobionts (Cooper et al. 2011a; Cooper et al. 2011b). This latter allows coral species to extend their ecological niche or to subsist during period of stress. These results are thus in agreement with numerous studies which highlighted the role of the symbionts in the physiological response of corals to changes in their environment (Baker et al. 2013; Berkelmans and Van Oppen 2006; Cooper et al. 2011b; Cooper et al. 2011c; DeSalvo et al. 2010; Little et al. 2004; Littman et al. 2010; Loram et al. 2007; Pernice et al. 2015; Starzak et al. 2014). More particularly and recently, Leal et al. (2015) suggested that symbiont type can modify the trophic plasticity in the sea anemone *Aiptasia pallida*, since these authors showed a positive correlation between the rates of carbon translocated from the symbionts to the animal host and the prey capture rates among holobionts harbouring the same strain of Symbiodinium.

1.3 The effects of environmental parameters : the light intensity

The same study performed with the Red Sea coral *S. pistillata* underlined as well the importance of the interactions existing between coral holobionts and environmental parameters on the uptake rates of inorganic nitrogen. We thus observed that the holobiont associated with clade A showed higher ammonium and nitrate acquisition rates, for similar light intensities, compared with the association characterized by the clade C.

Furthermore, the differences in nitrogen assimilation could result from 1) lower concentrations of zooplankton monitored in surface waters (Lesser et al. 2009; Schmidt 1973); corals harbouring clade A would compensate their nutritional deficiency by increasing their nutrient uptake rates ; 2) corals from surface waters, which received less N_2 than colonies from deeper environments (Lesser et al. 2007; Rädecker et al. 2015) compensate their nitrogen deficiency by increasing their inorganic nitrogen uptake ; 3) clade A associated to surface waters corals, which was acclimated to high light intensities, and thus received more energy the days prior the experiment, showed higher rates of nitrogen uptake compared with clade C. Indeed, it is well accepted now that light intensity can influence the nitrogen uptake rates in phytoplankton and in cnidarians, because this process requires a certain amount of energy and ATP supplied by the light-dependent reactions (or light reactions) of photosynthesis and by respiration in dark phase (Amory et al. 1991; O'Leary and Plaxton 2015). These results are in agreement with a previous sutdy performed by Kopp et al. (2013) with the nanoSIMS. In this study, *P. damicornis* was more efficient in absorbing ammonium (especially in the algal fraction) when it was exposed to a light/dark cycle in comparison with measurements that have been assessed in complete darkness, with a 24h pre-acclimation (Kopp et al. 2013).

Coral's response would not only depend on the clade of Symbiodinium, on the animal host but on the interactions existing between the holobiont and abiotic factors characterising its environment. This interdependance shows the necessity of a pluridisciplinary approach in order to highlight the individual and combined effects of the different factors.

2. Interactions between nitrogen acquisition rates and physiological parameters

In a second phase, the aim was to determine which key physiological parameters, either related to the animal or the symbionts, could influence the nitrogen uptake rates. For this, we performed a principal component analysis (PCA) illustrated on Figure 3 with the data obtained from our first experiment (article n°1) : chlorophyll, symbiont concentrations, rates of net photosynthesis and respiration, ammonium, nitrate and phosphorus assimilation rates (see Table 1). The first component, which explains **39.75%** of the variance, shows that nitrate absorption seems to be correlated with phosphorus uptake and chlorophyll concentration.

The second component, which explains **26.79%** of the variance, indicates that ammonium uptake was correlated with the rates of net photosynthesis. Finally, the third component (not shown), explaining **14.71%** only is related to the holobiont respiration rate. These observations underline the fact that ammonium and nitrate uptake rates were not correlated with the same physiological parameters, suggesting a different use of these nitrogen sources by the symbiotic association. The observed coupling represented on Figure 1 between ammonium uptake and the rate of net photosynthesis may result from a light dependency of these parameters, as often reported in plants and cnidarians (Canvin and Atkins 1974; Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Wilkerson and Trench 1986). In higher plants, photosynthesis produces ATP and NADPH which not only stimulate the regeneration of RuBisCO (ribulose-1.5-biphosphate (RuBP)) (Guo et al. 2007), but the assimilation of ammonium (Amory et al. 1991; Huppe and Turpin 1994; O'Leary and Plaxton 2015; Wang and Douglas 1998).

Interestingly, net photosynthesis was not related to nitrate uptake rates for the different coral species, the correlation was even negative (t=-0.2; p=0.84; roh=-0.05). This could result from the high energy cost generated by the reduction of nitrate into ammonium, which enters in competition with photosynthesis, by consumming part of the electrons from the electron transport chain (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013). More, Champigny et al. (1991) showed an inverse linear relationship between the synthesis of sucrose and the absorption and assimilation of nitrate in wheat.

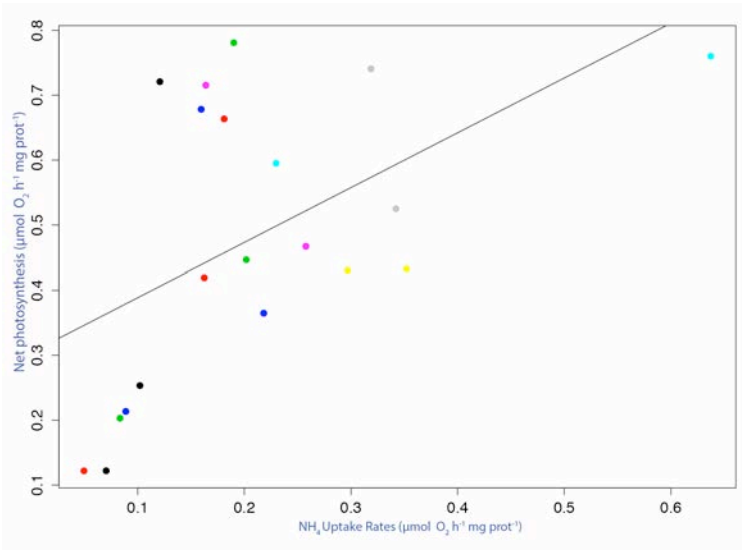


Figure 29 Pearson correlation highlighting the relationship between ammonium uptake rates and net photosynthesis (t=2.57, p=0.019 and ρ=0.52). Coloured dots represent the different species.

While a precedent study performed by Godinot et al. (2011b) showed a correlation between the absorption of ammonium and the presence of phosphorus in the coral environement, our results highlight a positive correlation between nitrate and phosphorus uptake rates (Figure 2). However, at this time, there is no clear explanation that links these two parameters.

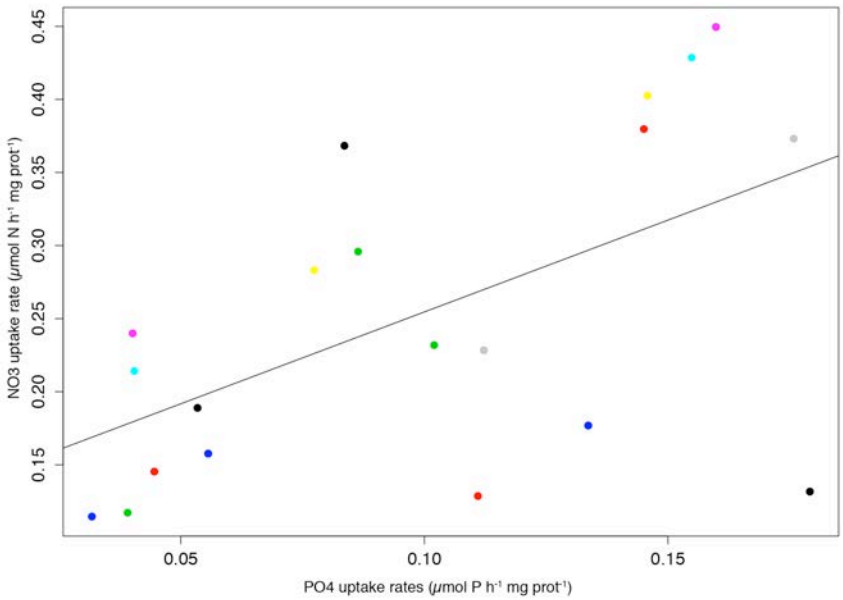


Figure 30 Pearson correlation highlighting the relationship between nitrate and phosphorus uptake rates (t=2.87, p=0.01, ρ =0.56).

Variable	CP1	CP2	CP3
Net Photosynthesis (NPS; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	0.125	**0.893**	0.275
Respiration (R; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	0.374	-0.374	**0.816**
Ammonium uptake rate (NH_4; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	0.510	**0.665**	-0.292
Nitrate uptake rate (NO_3; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	**0.890**	-0.171	0.096
Phosphorus uptake rate (PO_4; µmol P (mg prot)$^{-1}$)	**0.744**	-0.229	-0.312
Chlorophyll concentration (Chloro; µg (a+c_2) cm^{-2})	**0.796**	0.406	0.156
Symbiont density (nb Zoox cm^{-2})	-0.623	0.500	0.270
Percent of variance explained	**39.75%**	**26.79%**	**14.71%**

Table 1 Principal component analysis performed on the physiological parameters measured in article n°1 at 25°C.

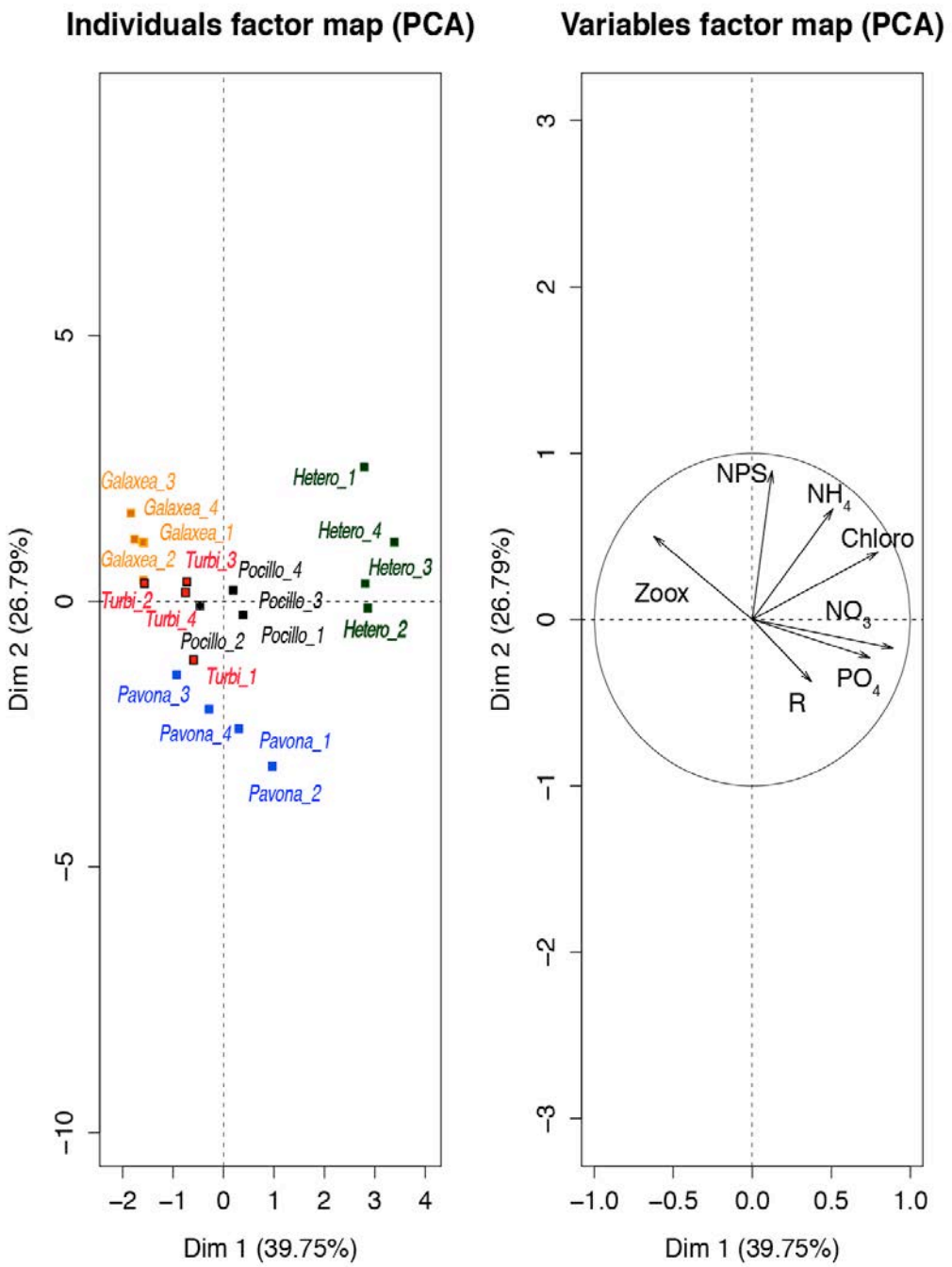


Figure 31 Principal component analysis describing the relationship between nitrogen, phosphorus uptake rates and the physiological parameters that were studied in article n°1 at 25°C

3. The effects of thermal stress on nitrogen uptake rates

Results from article n°1 showed that during a thermal stress inducing bleaching, three holobionts out of the five decreased their nitrogen uptake rates. This is in agreement with a previous study performed with *S. pistillata* (Godinot et al. 2011c), in which the holobiont associated with clade A stopped its ammonium and nitrate acquisitions at 33°C. **These observations suggest that the decrease in nitrogen uptake is a general response of corals to thermal stress.** However, it remains to be determined if this response is related to i) a physiological control of the host, ii) is a consequence of bleaching or iii) corresponds to the impact of temperature on the enzymes involved in nitrogen assimilation. The first hypothesis suggests that the host is able to regulate its nitrogen assimilation in order to avoid excessive oxidative stress conditions. Previous studies suggested that nitrogen enrichments of the seawater may promote an excessive growth of symbionts (Wooldridge 2013), inducing a high production of ROS and a reduction of the amount of photosynthates transferred back to the host (Muscatine et al. 1989). This process may lead to the breakdown of the coral-dinoflagellate symbiosis during a period of stress (Wiedenmann et al. 2013; Wooldridge 2013). The reduction in nitrogen uptake rates could be explained by the repletion of the host in nitrogen when maintained under high temperature, caused by a reallocation of the nitrogen-rich molecules within the symbiosis (Miller and Yellowlees 1989). The second hypothesis is in adequation with numerous studies attesting that nitrogen uptake is mostly driven by the symbionts (Grover et al. 2003; Grover et al. 2002; Kopp et al. 2013; Wang and Douglas 1998; Yellowlees et al. 2008). If the symbiont density drops, the site of nitrogen absorption will be reduced as well. In that case, the reduction of nitrogen uptake may prevent protein repair (Falkowski et al. 1993) and/or reduce carbon fixation, as already shown in mulberry leafs (Chaitanya et al. 2001). Finally, the last hypothesis suggested that temperature could alter the efficiency of the enzymes involved in nitrogen assimilation, as previously demonstrated in plants and phytoplancton (Cui et al. 2006; Gao et al. 2000; Lomas and Glibert 1999).

The results of the PCA performed on the data collected at 30°C (Figure 5) lean toward the last two hypothesis. The first component, explaining 44% of the variance, links the rate of net photosynthesis with the symbiont density, chlorophyll concentration and ammonium uptake rate. The second axis, which explains 21% of the variance, is related to the phosphorus uptake.

The third axis (17.4%) is related to the holobiont respiration. Results from the PCA highlight the correlation existing between bleaching, the rate of net photosynthesis and the uptake of ammonium. It suggests that the effects of thermal stress on ammonium uptake is highly dependent on the photosynthetic capacities of the holobiont and not related to a physiological control of the host, as previously proposed. Godinot et al. (2011c) even noted an excretion of ammonium under high temperature (33°C) in *S. pistillata*, as did Rahav et al. (1989), who observed as similar phenomena after having blocked the electron transport chain by the use of the DCMU inhibitor.

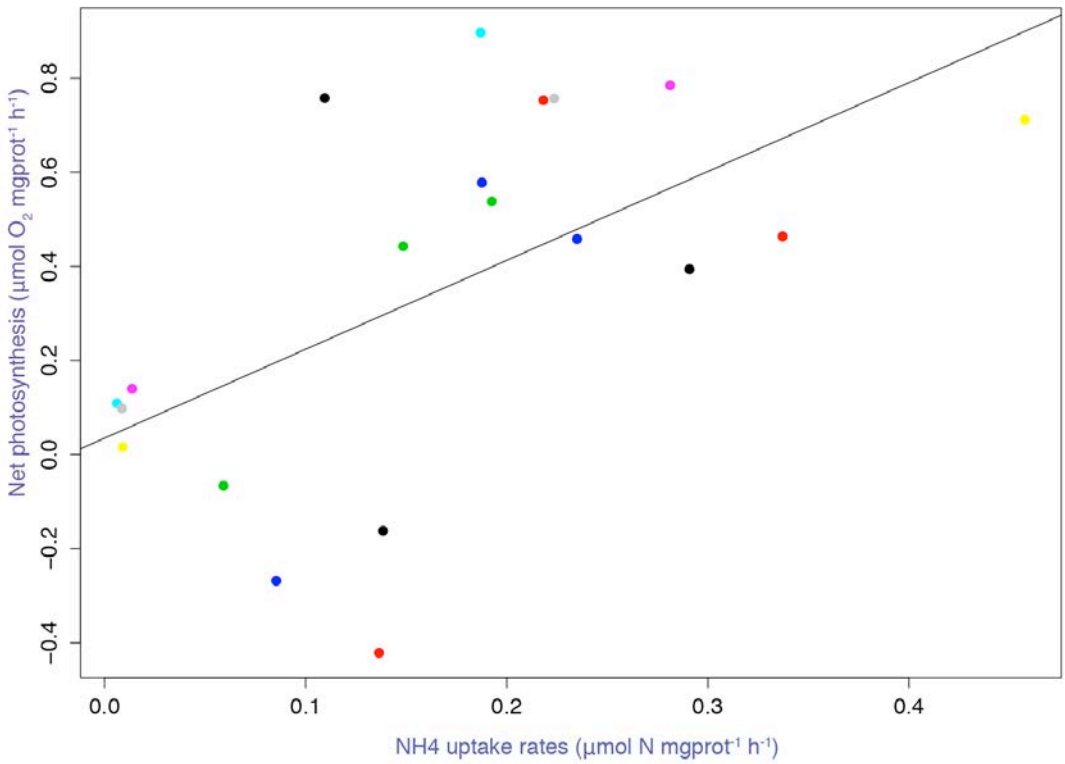


Figure 32 Pearson correlation highlighting the relationship between ammonium uptake and net photosynthesis (t=3.029, p=0.007, ρ=0.58) at elevated temperature

In this last study, Rahav et al. (1989) equally observed an ammonium excretion when GOGAT was inhibited. All together, these observations suggest that ammonium uptake is tightly related to the photosynthetic activity of the symbionts. However, no conclusions can be drawns regarding the uptake of nitrate, which is no longer correlated with the uptake of phosphorus at 30°C (t=1.018, p=0.32, roh=0.23).

Results of the PCA highlights as well the abilities of *H. fuscescens* in symbiosis with clade D1 to maintain its metabolism during thermal stress. Several hypotheses can be raised : a) its association with clade D1, which has been reported as one of the most thermotolerant strain (Jones et al. 2008), could confer physiological advantages during periods of stress, in comparison with clade C1, b) the pulsations rate did not vary between 25°C and 30°C, allowing *H. fuscescens* to keep high nitrogen uptake, promoting symbiont growth and stimulating autotrophic carbon acquisition, c) the combination of the two act synergically to maintain the holobiont metabolism under high temperature.

Table 2 Principal component performed on the physiological parameters measured in article n°1 at 30°C.

Variable	CP1	CP2	CP3
Net photosynthesis (NPS; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	**0.906**	0.109	0.071
Respiration (R; µmol O_2 cm^{-2} h^{-1})	-0.565	-0.223	**0.695**
Ammonium uptake rate (NH_4; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	**0.793**	-0.433	-0.310
Nitrate uptake rate (NO_3; µmol N (mg prot)$^{-1}$)	0.253	0.592	0.599
Phosphorus uptake rate (PO_4; µmol P (mg prot)$^{-1}$)	0.001	**0.880**	-0.312
Chlorophyll concentration (Chloro; µg (a+c_2) cm^{-2})	**0.748**	0.212	0.127
Symbiont density (nb Zoox cm^{-2})	**0.817**	-0.232	0.402
Percent of variance explained	**43.7%**	**21.04%**	**17.4%**

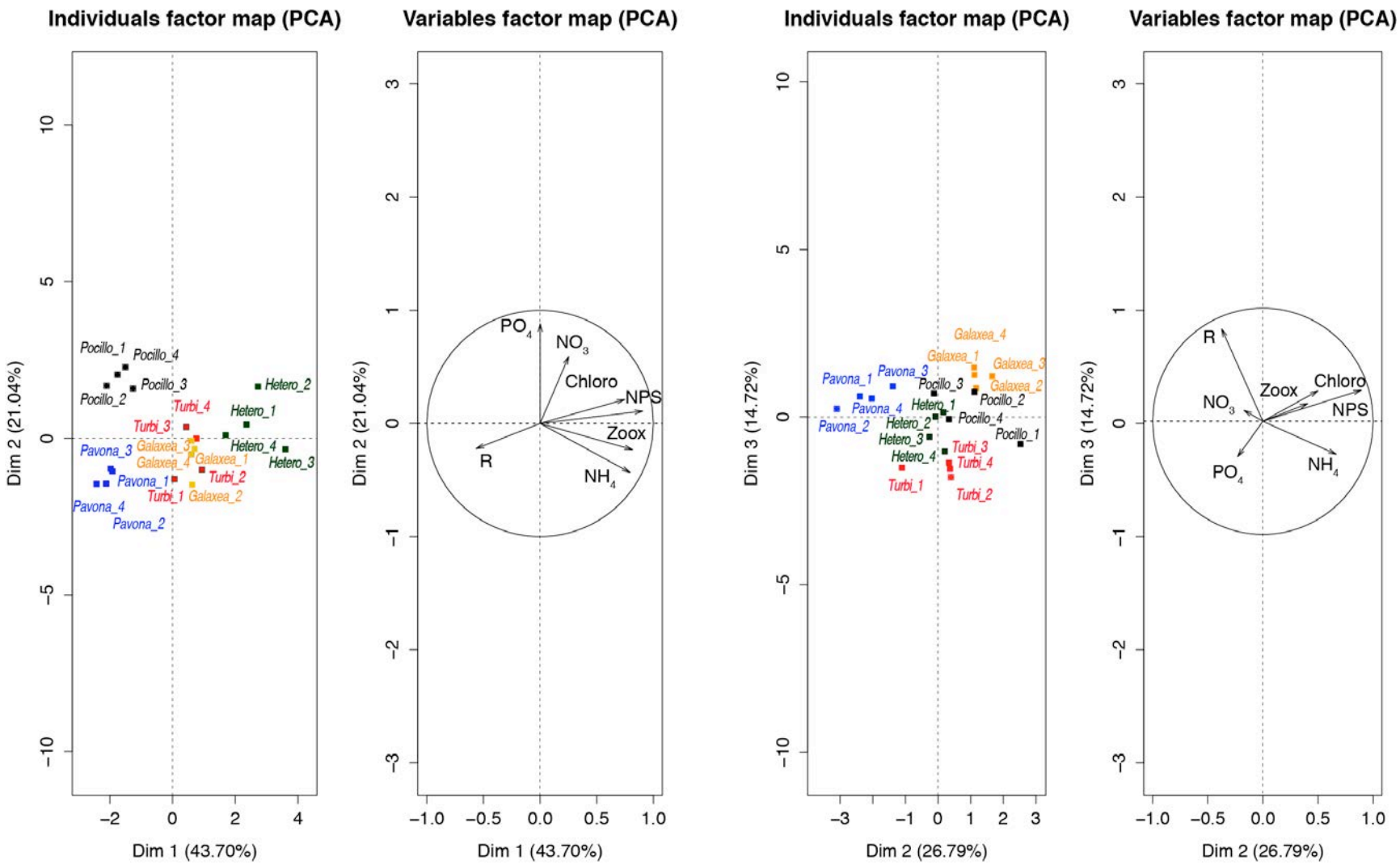


Figure 5. Principal component analysis performed to complete article n°1 at 30°C

4. The capacities of tropical corals to take up inorganic phosphorus and their needs

Conversely to the results obtained for nitrogen, where uptake rates differed from one species to another, phosphorus uptake rates were similar for all species in association with the same clade of Symbiodinium (C1). However, *H. fuscescens*, in symbiosis with clade D1 and presenting rythmic pulsations of its polyps, showed higher phosphorus uptake rates compared with certain species. At this point, it is still difficult to conclude if the host or the symbiont influence the phosphorus uptake, even if the algal fraction represents one of the main site of inorganic phosphorus assimilation within the symbiosis (Godinot et al. 2011a).

During thermal stress, rates of phosphorus uptake increased in most species. This is in agreement with the previous study performed by Godinot et al. (2011c), where *S. pistillata* in association with clade A1, increased its rate of P uptake at 33°C. **These observations suggest that the increase in P uptake is a general response of corals under thermal stress, and this independently of the clade of Symbiodinium.** Althought this physiological response may result from a dependance of P transporters to temperature (D'elia and Webb 1977), the results of our study as well as the PCA illustrated on the Figure 5 highlight the importance of phosphorus for the symbiosis during a period of stress, and attest the ability of corals to control this mecanism, as already observed in plants (Amtmann and Blatt 2009).

It has recently been suggested that phosphorus limitation could induce a shift in the composition of the symbiont membranes, from phospho- to sulophlipids (Wiedenmann et al. 2013). While phospholipids can confer a resistance to thermal stress (Tchernov et al. 2004), a decrease in phosphorus concentration in the environment could increase the susceptibility of coral bleaching (Wiedenmann et al. 2013).

Furthermore, as phosphorus enters the composition of key molecules (nucleic acids and lipids) and takes part in metabolic pathways and ATP, a minimum amount of phosphorus is thus required in order to maintain coral species metabolism during a period of stress.

The beneficial effect of P on the coral-dinoflagellate symbiosis has been highlighted in the P-enrichment (2µM) experiment (article n°1, part 2).

Indeed, at 30°C, increasing P concentration maintained the metabolism of the symbiosis, through sustaining symbiont density and by stimulating the transfer of photosynthates (65% to 80% with P) in comparison with the control condition. It further increased the retention of carbon in the host fraction, promoting the cell regeneration.

5. Conclusion of axis I and perspectives

The outcomes of this first axis bring further insights into the capacities of tropical corals to take up essential inorganic nutrients. The experiments highlighted the diverse abilities of holobionts to acquire inorganic nutrients during normal growth conditions and when exposed to stress, suggesting functional variations in their metabolism. The field experiment confirms the hypotheses raised by Baker et al. (2013), Pernice et al. (2015) and Cooper et al. (2011), who underscored the role and importance of the clade for nitrogen (and carbon) acquisition within the symbiosis. However, our results show that the uptake rates of nitrogen do not only rely on the clade but on the whole holobiont. In the context of climate change, the increase in seawater temperature will not only affect the photosynthetic performances of the symbionts but their abilities to take up essential inorganic nutrients. Results suggest that nitrogen and phosphorus are essential in order to maintain the metabolic functions of the symbiosis during thermal stress, when considering a certain stoichiometry, which needs to be further investigated. Then, we propose that certain coral species, such as *H. fuscescens*, would harbour higher level of resilience capacity than other coral organisms, mainly due to the fact that : 1) *H. fuscescens* does not possess any calcareous skeleton, 2) its rythmic pulsations stimulate the uptake of inorganic nutrients, 3) its association with the clade D confers physiological advantages during periods of stress.

Regarding the perspectives of this axis, it would be interesting to further study the biotic and abiotic regulation of the genes involved in the transport of ammonium, nitrate and phosphorus or the enzymes which take part in the assimilation mechanisms of nitrogen, such as GS, GDH or nitrate and nitrite reductase. It further remains to understand why do corals reduce their nitrogen uptake rates under thermal stress ? Is it due to the bleaching, or due to the host regulation ? In order to answer this question, we need to assess a nitrogen budget (which takes into account the N_2 fixation, the heterotrophic and inorganic contributions) to verify if the symbiotic association is nitrogen deficient or not. One could as well perform C:N measurements at 25°C and 30°C in the coral fractions (algal and animal) according to the different environmental conditions.

Further experiments should be carried out with the soft coral species *H. fuscescens* to specify if its resistance to thermal stress is due to its association with the clade D or to the rythmic pulsations. For this, we need to infect this species with several clades of Symbiodinium and to complement this experiment by studying physiological key parameters, such as rates of photosynthesis and of photosynthates transfer.

Axis II: The effects of nutrient availability (limitation and/or enrichment) on the physiological response of tropical corals in a warming ocean

While the increase in inorganic nutrient concentrations in seawater has often been associated with coral reefs decline, the physiological response of corals to nutrient enrichments varies widely and is often contradictory. Hypotheses have been raised to explain these results :

1) **Shantz and Burkepile (2014)** highlighted, through a meta-analysis including previous studies, that physiological responses of corals to nutrient availability would be related to the environmental conditions, but would also be species-specific, and may depend on the form and source of inorganic nitrogen (ammonium versus nitrate).

2) **Wiedenmann et al. (2013)** suggested that the N:P of the nutrients characterising the reef environment would be a crucial factor for the maintenance of the symbiosis, especially during a period of stress. These authors demonstrated that a phosphorus limitation of the symbiosis would create a nutritional imbalance within the holobiont and favour a shift in the composition of the symbiont membranes, enhancing bleaching susceptibility.

Experiments performed for articles 1,3,4 and 5 relied on these two hypotheses, and show that coral's response is well more complex that what has been previously suggested. It may depends on:

1) a minimal amount of inorganic nutrients available in the reef environment

2) the nitrogen form (nitrate or ammonium)

3) the availability in inorganic phosphorus

4) the availability in organic nutrients

5) the physiological state of the corals

6) the exposition time

To summarize, corals will present different responses to a similar N:P, depending on the nitrogen form available in the environment (ammonium or nitrate), the nitrogen and phosphorus concentrations (a similar N:P=2 can be obtained with 2:1, 4:2, 0.5:0.25, etc..), and according to the physiological state of the corals (stress or not).

1. Minimal amount of inorganic nutrients is required for coral health

Results obtained in articles 3 and 5 demonstrated that low inorganic nitrogen (≤ 5 uM) and phosphorus (≤ 0.05 µM) concentrations were not sufficient to sustain symbiont density as well as rates of net photosynthesis and calcification in *S. pistillata* in comparison with colonies maintained under >0.5-1 uM N and 0.05-0.1 µM P at 25°C. However, despite its growth in a nutrient-poor environment, *S. pistillata* maintained high values of photosynthates translocation (70-75%), suggesting a "regular" nutritional exchange within the symbiosis. Finally, coral colonies that were nutrient limited excreted a very low amount of carbon (TOC), assuming that this element was retained in tissues. These observations are in agreement with diverses studies attesting that corals do need a minimal amount of nutrients to sustain and flourish in nutrient-poor tropical waters. Wiedenmann et al. (2013) noted a significant reduction in symbiont density when corals were maintained under low nutrient concentrations (0.7:0.006). More, Titlyanov et al. (2001) showed that nutrient limitation decreased symbiont and chlorophyll concentrations, cell division rate for certain coral species which were exposed to low light intensities in comparison with fed colonies (organic feeding) maintained under similar light conditions. Rosset et al. (2015) observed a reduction in the polyp biomass as well as in protein and symbiont concentrations when corals were nutrient limited. These symbionts harboured larger accumulation storage bodies in comparison with dinoflagellates in symbiosis with fed corals (Rosset et al. 2015), as well as an accumulation of lipid bodies and starch granules. This further suggests an uncoupling between carbon fixation and the low energetic demand by nutrient limited cells (Rosset et al. 2015). Recently, Jacobson et al. (2016) demonstrated that inorganic nutrient limitation in the tropical coral species *Porites spp*. could create a metabolic depression, via a 37% reduction of its respiration, 64% of its biomass, without any consequence on the secretion of its calcareous skeleton. The metabolic depression allows organisms to adjust their metabolism to the low abilities in synthetizing ATP (Gilles and Anctil 2006). This strategy could benefit certain species during period of chronic nutriment limitation (Jacobson et al. 2016; Rogers 1979) and may explain the observed variations in mortality among coral species.

Together, these observations suggest that a minimal amount of nutrients is required for an optimal developpement of scleractinian corals. In situ, in an oligotrophic environment, such as the Red Sea, low concentrations in inorganic nutrients may be compensated by increasing zooplankton availability, which could potentially maintain chlorophyll and symbiont concentrations, as measured in *S. pistillata* (Mass et al. 2010).

Table 3 Principal component analysis performed on the physiological parameters measured for the different species of Pocilloporidae that illustrats the effects of nutrient enrichments on coral physiology.

Variable	CP1	CP2
Gross photosynthesis (PG_C; µg C cm^{-2} h^{-1})	**0.823**	0.316
Amount of photosynthate transferred (AMT; µg C cm^{-2} h^{-1})	**0.749**	0.409
Chlorophyll concentration (Chl; µg ($a+c_2$) cm^{-2})	**0.823**	-0.338
Symbiont density (nb Zoox cm^{-2})	**0.745**	-0.573
Calcification (%d^{-1})	0.275	**0.627**
Protein concentration (mg prot cm^{-2})	**0.739**	0.460
Respiration (nb Zoox cm^{-2})	**0.727**	-0.515
Percent of variance explained	**51.73%**	**21.04%**

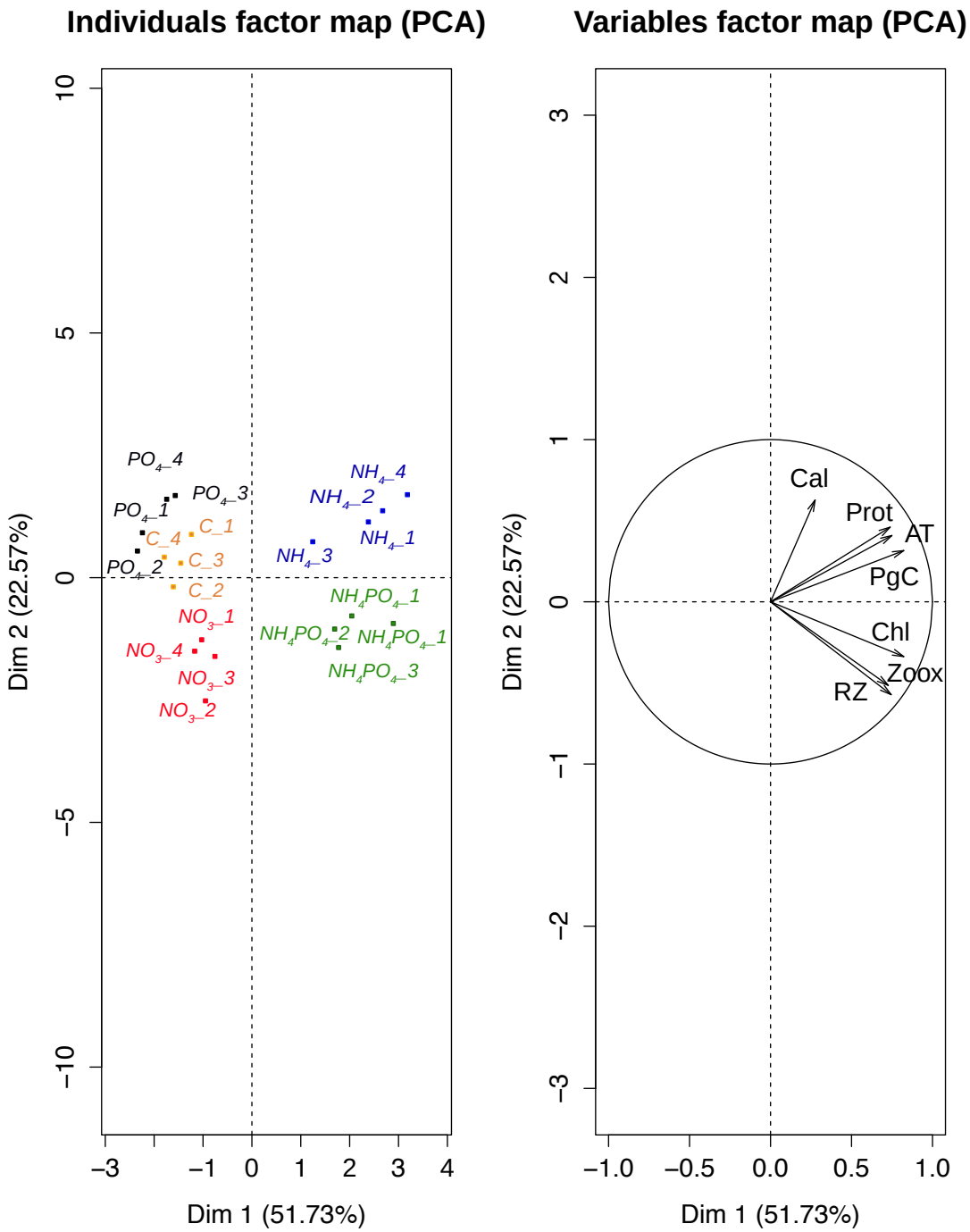


Figure 33 Principal component analysis performed on the physiological parameters measured for the different species of Pocilloporidae that illustrats the effects of nutrient enrichments on coral physiology.

2. Effects of nitrogen enrichment on coral physiology (with low amounts of phosphorus (P<0.5))

For these studies, we wanted to mimic a nutrient discharge by using similar concentrations to the ones observed in natural environment, in the field. For example, Lapointe & Matzie (1996) monitored a peak of 3 µM of ammonium at Pine channel in the Florida keys as well as Tomascik & Sander (1995) in Barbados (2.7 µM). Regarding nitrate, high concentrations were monitored near Bahia (Brazil) (1.7 – 8 µM) and in Moorea, French Polynesia (31 µM) (Rouzé et al, 2015).

Results highlighted distinct effects of nitrogen enrichments, either with ammonium or nitrate on coral physiology (see PCA Figure 6). Ammonium supply, which mainly comes from the recycling of organic matter or from the excretion of living organisms in the vincinity of corals (Holbrook et al. 2008; Meyer and Schultz 1985; Uthicke et al. 2012) has neutral or positive effects on coral physiology when phosphorus concentration is low (P<0.5 µM). Under optimal growth conditions (no stress), ammonium enrichment increases rates of photosynthesis and calcification as well as symbiont density and chlorophyll concentration, without disrupting the symbiosis. Indeed, the carbon budgets assessed in this thesis showed that 3 uM ammonium supply enhanced the amounts of carbon fixed and tranferred back to the host. These results are in agreement with previous studies showing positive effects of ammonium enrichment only on coral growth (Béraud et al. 2013; Bongiorni et al. 2003; Meyer and Schultz 1985; Meyer et al. 1983). Under stress condition (temperature/light), our results (article n°5) as well as previous experiments performed by Beraud et al. 2013 showed that ammonium enrichment may balance the effects of bleaching and maintain the holobionts photosynthetic capacities. Ammonium may, in turn, contribute to the maintenance of protein synthesis or to the RuBisCO, the enzyme which catalyzes the reaction of organic carbon fixation from CO_2 (Korbee et al. 2010).

In contrast, nitrate enrichment, in presence of low inorganic phosphorus (N:P=3:0.05 or 2:0.1) has deleterious effect on coral physiology, especially for photosynthesis and calcification processes (PCA Figure 6). These negative effects could result from the significant energetic cost resulting from the reduction of nitrate into ammonium by the enzymes nitrate and nitrite reductase (Dagenais-Bellefeuille and Morse 2013). These electrons cannot be used for photosynthesis, lowering carbon fixation and thereafter, the rates of calcification.

Previous studies carried out on plants proposed that sucrose and amino acids synthesis compete for carbon access (Champigny and Foyer 1992). More Champigny and Foyer (1992) showed that nitrate addition induced amino acids biosynthesis, decreasing sucrose synthesis in wheat plants.

Moreover, rates of photosynthesis and calcification would have been impacted by an excessive production of reactive nitrogen species, following nitrate accumulation in animal tissues (Lesser 2006; Roth 2014). Reactive nitrogen species act together with reactive oxygen species to damage cells; this later process can be exhacerbated by diverse environmental conditions (Lesser 2006).

Our results confirm the previous conclusions of Wiedenmann et al. (2013), who showed a dysfunctionning of the symbiosis when corals were exposed to nitrate enrichment, in presence of low inorganic phosphorus (N:P=3:0.07). Moreover, several studies carried in the presence or absence of stress are in agreement with this hypothesis (Ferrier-Pagès et al. 2001; Marubini and Davies 1996; Nordemar et al. 2003). However, it has been demonstrated that nitrate addition may alleviate the negative effect increases in pCO_2 on calcification processes in adult and larvae (Holcomb et al. 2010; Tanaka et al. 2007). These observations suggest that the effects of nitrate enrichments on corals are complex, since they seem to differently affect coral physiology according to diverse abiotic and biotic parameters.

3. Combined effects of nitrogen and phosphorus enrichment

Our observations (article n°3 and 4) combined with previous studies (Muscatine et al. 1989; Sawall et al. 2011; Steven and Broadbent 1997; Tanaka et al. 2007; Wiedenmann et al. 2013; Wooldridge 2013) showed that a combined enrichment in nitrogen and phosphorus benefited the symbionts more than the animal host, with an increase in chlorophyll content and/or symbiont density. Our study (article n°3) equally highlighted a decrease in photosynthate transfer when symbionts were exposed to ammonium and phosphorus enrichment (N:P=3:1). Thus, symbionts retained autotrophic carbon for their own metabolic needs, since they can combine it with nitrogen and phosphorus to synthesize molecules of interest (proteins, phospholipids, etc...). We can conclude that symbiont growth is independent of the animal growth, which can lead to the breakdown of the symbiosis on the long term.

Indeed, it has been demonstrated that an excessive symbiont growth (or density) can induce high levels of oxidative stress when seawater temperature increases, further enhancing bleaching susceptibility (Cunning and Baker 2013).

As already suggested by Shantz and Burkepile (2014), the effects of a combined enrichment can vary from one coral species to another according to the genetic diversity in Symbiodinium. Coral species characterized by low algal density or by slow-growing symbiont genotypes can be more resilient to anthropogenic stressors and to bleaching susceptibility (Cunning and Baker 2013). That is exactly what has been observed in our fourth experiment (article n°4) performed with *T. reniformis*, during a thermal stress inducing bleaching. A combined enrichment in nitrate and phosphorus (N:P=2:0.5) allowed to promote symbiont growth during thermal stress, and to maintain a balance concentration in symbionts within the symbiosis. Thereby, the combined enrichment allowed to maintain high rates of photosynthesis and calcification in comparison with non-enriched corals. This observation suggests that during thermal stress inducing bleaching, a moderate supply in nitrate and phosphorus can favour the maintenance of the symbiosis.

Broadly, increasing nutrient concentrations in the water could induce shifts in species repartition and composition within reefs, by promoting those which can avoid CO_2 limitation of their symbionts.

4. The effects of phosphorus enrichment

Again, for our experiments, we wanted to mimic a discharge of phosphorus, by using similar concentrations to the ones observed in natural environment. High concentrations of phosphate were monitored near Bahia (Brazil) (Costa et al. 2000) and in Kaneohe Bay (HI, USA) (Smith 1982), 1.42 and 0.8 µM respectively.

Excessive phosphorus concentrations in the seawater in comparison with nitrogen (NH4:P=0.5:2) stimulated carbon retention within the animal fraction, which could further allow a faster animal growth, and/or a higher protein storage (article n°1). More, during a thermal stress, phosphorus availability allowed to maintain the holobiont metaoblism, in promoting the transfer of photosynthates as well as the relative electron transport rate (rETR) in comparison with control condition. These observations show that phosphorus is a crucial element for the developpment and the survival of living organisms, since it enters the composition of nucleic acids such as DNA, plays a predominant role in the cell process which require high levels of energy, as enzymatic reactions and ATP synthesis.

It represents as well the main constitutant of phospholipids, which characterize symbiont membranes and enhance their resistance to thermal stress (Tchernov et al. 2004).

These results are in agreement with the previous study performed by Godinot et al. (2011a), who showed that a moderate enrichment in P (0.5 µM or 2.5 µM), for 4 to 7 weeks, benefited the symbionts by increasing their specific growth, the photosynthetic efficiency of PSII as well as rate of photosynthesis. A fraction of P was allocated to skeletal growth. In contrast, Koop et al. (2001) as well as Dunn et al. (2012) highlighted the deleterious effects of high phosphorus concentrations (2.4-5.2 µM and 0.5 mg/L) on skeletal density.

In our experimental conditions, a 2 µM phosphorus enrichment did not have any effect on skeletal growth and was even beneficial to the symbiotic association under thermal stress, suggesting an essential role of this nutrient. Wiedenmann et al. (2013) showed that during a period of stress (imbalance nutrient ratio), when phosphorus became limiting in the water environment, there was a shift in the composition of algal cell membranes, from phospho to sulpholipids, weakening the symbiosis. We can thus suggest that a supplemental amount of phosphorus would have maintained a balance phospholipid concentration in cell membranes, promoting the maintenance of the symbiotic association.

5. The combined effects of inorganic nutrients and organic feeding

Throughout this thesis, we demonstrated that high particulate organic matter concentrations (zooplankton), combined to nitrate enrichment had negative effects on *T. reniformis* health, especially during a thermal stress. Under high temperature, skeletal growth and tissue biomass drastically dropped in comparison with control condition. A similar effect was noted by Fabricius et al. (2013) on coral species *A. millepora* and *M. tuberculosa*. Fabricius et al. (2013) supposed that organic matter supply would have promoted bacterial growth, increasing the susceptibility of coral diseases. It is unlikely that this phenomenon actually happened in our aquaria since the food was sporadically provided and did not accumulated at the bottom of the aquaria, unless it could have modified the bacterial diversity associated to corals. We thus proposed that reduced calcification rates were impacted by an excessive production of reactive nitrogen species, following nitrate accumulation in the holobiont tissue (Lesser 2006; Roth 2014).

A large amount of nitrate could accumulate in tissue of fed corals since food already contains a large part of nitrogen and specifically generates ammonium produced by the animal catabolism (Wang et al. 2015b).

Given that ammonium is preferred to nitrate (Raven et al. 1992), its use and assimilation would be favoured in comparison to NO_3^-, which would accumulate. Supply of organic preys would have strenghtened the phosphorus limitation within the symbiosis, by inducing an imbalance in the N:P ratio.

Interestingly, corals that were exposed to nitrate enrichment and heterotrophic supply were not able to recover their photosynthetic capacities following thermal stress, suggesting that this period of recovery was too short or that the stress was too important to allow the resilience of the colonies.

Finally our results showed a positive correlation between the feeding rates and the concentration in inorganic nutrients (article n°4 and 5) at 25°C and 30°C. These results are in agreement with a previous study, wich demonstrated that feeding rates were higher in turbid environments (Wang et al. 2015b). The underlying mechanisms that explain the coupling between the availability in inorganic nutrients and feeding rates are still poorly understood. However, one could suggest that supply of inorganic nutrients would have modified the amount and quality of photosynthates translocated back to the animal, increasing the energy available for the ingestion and digestion of the preys, as proposed by Leal et al. (2015) with the sea anemone *Aiptasia pallida*.

6. Duration of the exposure

For the different experiments we maintained coral nubbins during a maximum of 4 weeks under the nutrient treatments. The purpose was to simulate a sudden nutrient discharge (caused by a stormwater per example). Following this time exposure, we already observed changes in coral physiology. However, we do not know what could be the effects of extending the exposure time of the enrichment on coral physiology. For sure, the negative and observed effects of nitrate addition on coral physiology would not change or would be worst. However, per exemple, what would be the effects of extending the exposure time of corals maintained under NH_4 :P=3 :1 ? Longer experiments should be undertaken to mimic for example a chronic nutrient enrichment over months on coral physiology.

7. Conclusions of Axis II and perspectives

Coral reefs ecosystems are one of the most threatened biotopes on earth. In addition to climate change, reefs are equally impacted by diverse types of marine pollutions; urban, industrial and agricultural.

The effects of excessive nutrient supplies on coral communities are the subject of much controversy within the scientific community. This thesis aimed to experimentally study the impact of ammonium, nitrate and/or phosphorus on tropical scleractinian coral physiology. It especially highlighted : a) the contrasting effects of ammonium and nitrate enrichments on photosynthetic performances and coral growth. While ammonium enrichment with or without phosphorus mainly benefited coral photosynthesis and calcification rates, nitrate had to be combined with phosphorus enrichment in order to positively influence coral metabolism, b) the importance of phosphorus availability in the reef environment, to maintain the nutritional balance within the symbiosis, c) the interactions existing between components of eutrophication (inorganic nutrients and zooplankton).

However, numerous studies have to be performed to complete this first approach. First of all, it would be interesting to find the minimal and maximal nutrient thresholds for which the breakdown of the symbiosis takes place, in order to refine risk management strategies. For this, one needs to impelement an experimental setup with numerous and varied N:P and to combine these conditions with abiotic parameters such as increases in seawater temperature and/or pCO_2.

There are still numerous uncertainties regarding the contrasted effects of ammonium and nitrate of coral health. Oxidative stress measurements would allow to better understand, and in a more precise manner, the impact of nitrogen enrichments on coral metabolism. Morevoer, the use of stable isotopes such as $^{15}N\text{-}NH_4$ and/or $^{15}N\text{-}NO3$, in combination with isotopic imaging, such as nanoSIMS, would allow us to note if there is a difference in the assimilation and allocation of nitrogen according to its form (ammonium versus nitrate). Then, this thesis only focused on tropical coral species, which thrive in oligotrophic seawaters. It would thus be interesting to compare these results with those obtained from temperate species, which are used to live in eutrophicated coastal areas. For example, the mediterranean coral species *Cladocora caespitosa* is particularly abundant in eutrophic environments, suggesting that it may develop different physiological responses compared with coral species thriving in nutrient-poor waters.

Making a comparison of the effects of anthropogenic nutrient enrichments on different tropical, temperate, as well as cold coral species would allow to take a global view of the consequences of marine pollutions all around the different marine ecosystems. It would also be interesting to complement this research program by studying diverse coral stages exposed to nutrient loadings. Finally, it would be primordial to broaden our field of study, by taking into account other biotic and abiotic parameters, in order to better explain the responses of coral organisms to marine pollutions.

Corals and algae are the most imporant benthic primary producers in coral reefs. However, they compete for light, nutriments and space. Overfishing and nutrient pollution decrease herbivory biomass and grazing pressure on algae, inducing an excessive growth of phytoplankton (bloom), which disrupts the equilibrium within the ecosystem and directly impacts coral primary productivity. Algal blooms may alter the biogeochemical environment of coral colonies, by decreasing the availability in nitrogen and phosphorus (D'Angelo and Wiedenmann 2014), iron and oxygen and would promote large deposits of detrital organic matter, which could stimulate bacterial and fungal coral diseases (Guzmán et al. 1990; Smith 1975). In the future, these factors might affect the growth as well as coral recruitment (Burkepile et al. 2013).

Beside, temperature acts in synergy with macroalgal growth to disrupt the balance existing between the coral host and its symbiotic microorganisms (microbiotes). Numerous studies showed that the coral microbiome was sensitive to multiple stressors, such as the competition with algae, increases in seawater temperature and diseases (Zaneveld et al. 2016). Several models were proposed for the effects of temperature and/or algal competition on the coral microbiome. The DDAM hypothesis (Dissolved organic carbon-Disease-Algae-and-Microbes) suggests that macroalgae and turf algae secrete dissolved organic carbon (DOC), which increases the growth and consumption of O_2 by bacteria, inducing a negative effect on coral health (Barott et al. 2009; Gregg et al. 2013; Haas et al. 2011; Pawlik et al. 2016; Rohwer et al. 2010). The previous reported interactions shed a light on the complex interactions describing the reef ecosystem. Further studies need to be performed to get a better understanding of the role and the impact of different drivers of the reef environment.

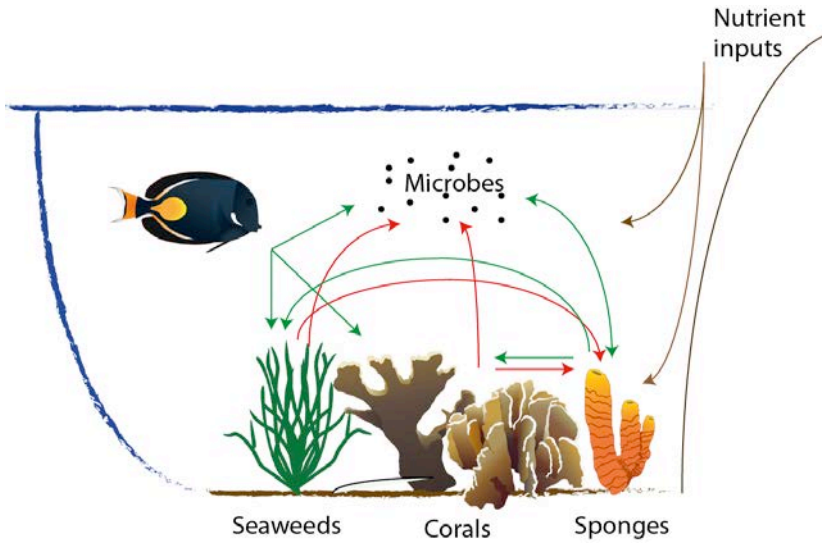


Figure 34 Future challenges : taking into account several drivers of the reef ecosystem dynamics

Following the emergent importance of the "DOC" parameter for coral health, management of reef ecosystems should be closely related to those of the terrestrial ecosystems. For example, land clearing and urban development around the Amazone should particularly impact the amount of dissolved organic carbon reaching the Carribean (Mora 2008).

Thereby, the restauration reef programs should further require that efforts should be assessed not only at a local scale but that the nations would act at a larger scale, at an international scale.

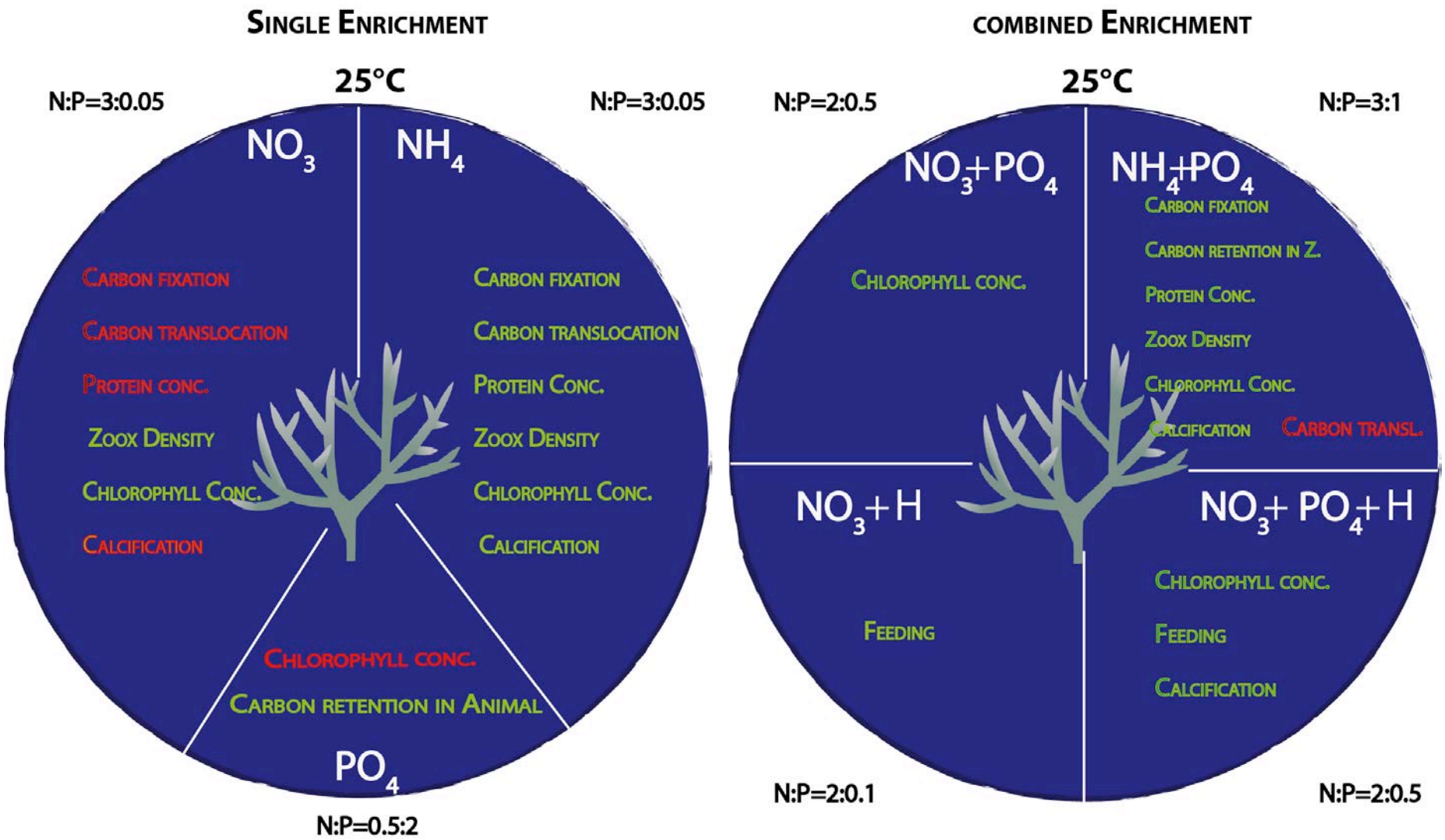


Figure 35 Summary of the effects of nutrient enrichment on coral physiology at 25°C. Green color indicates a increase in the parameter, while red color indicates a decrease in the parameter.

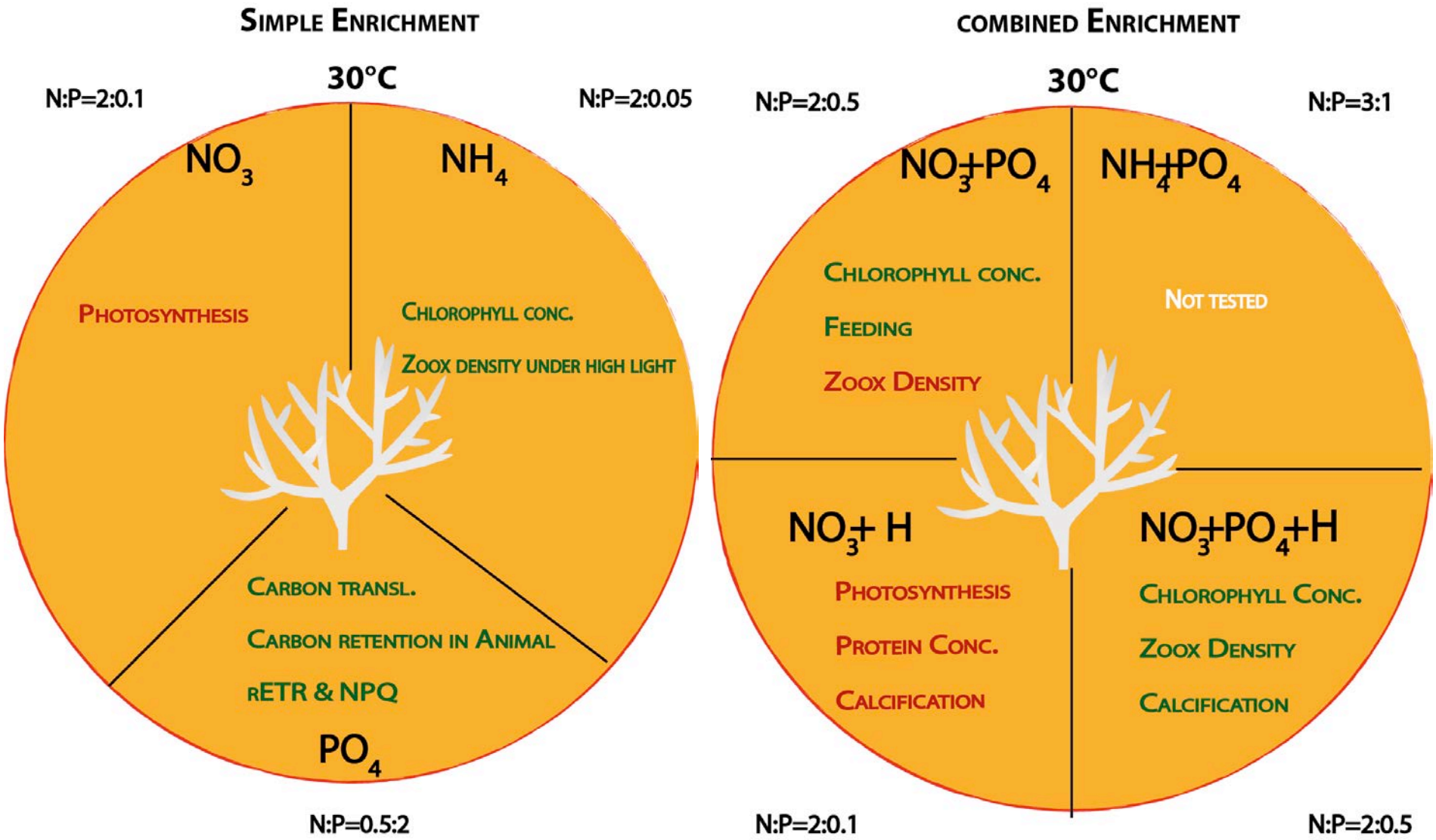
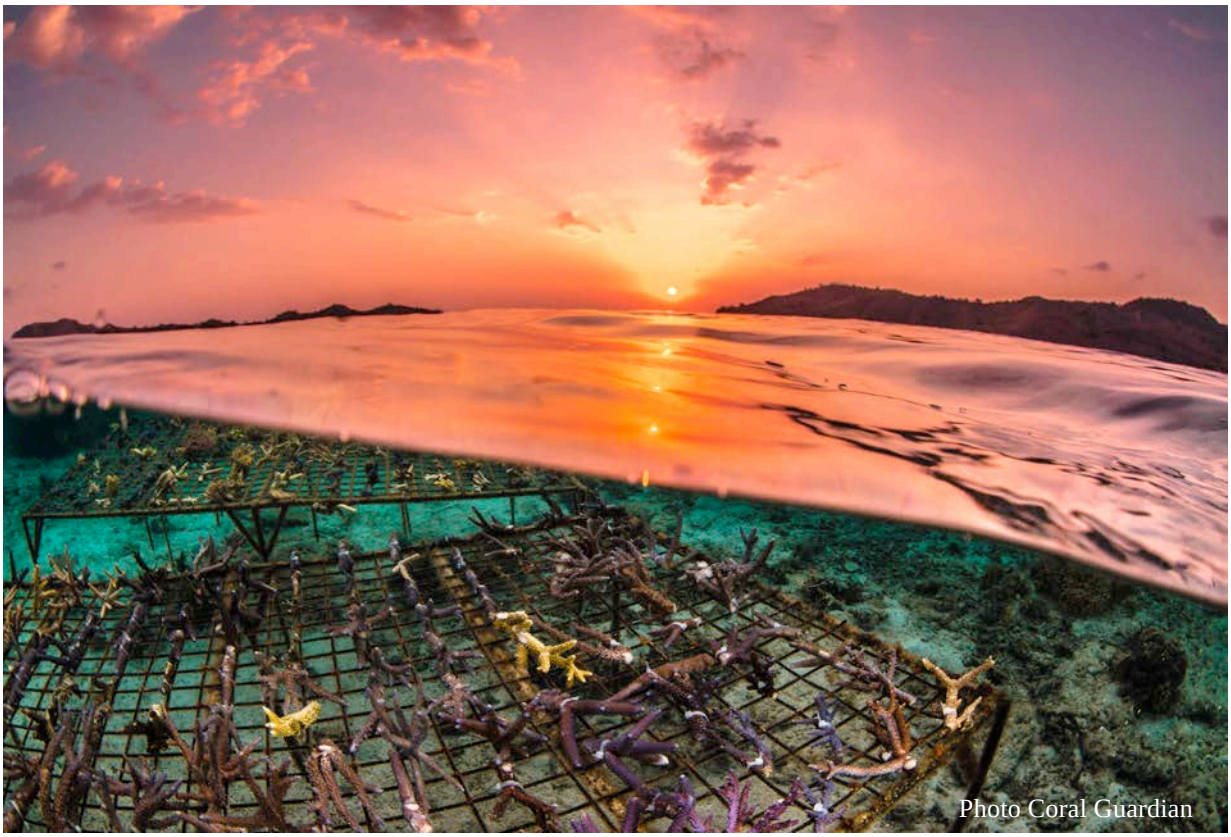


Figure 36 Summary of the effects of nutrient enrichment on coral physiology at 30°C. Green color indicates a increase in the parameter, while red color indicates a decrease in the parameter.

Annexes



Annexes

Annexe 1: Article in co-autorship

Nitrogen fixation in the mucus of Red Sea corals

The Journal of Experimental Biology | Accepted Sept. 2014

[1*]Renaud Grover, [1*]Christine Ferrier-Pagès, [2]Jean-François Maguer, [1]Leïla Ezzat and [3]Maoz Fine

Summary

Scleractinian corals are essential constituents of tropical reef ecological diversity. They live in close association with diazotrophs [dinitrogen (N_2)-fixing microbes], which can fix high rates of N_2. Whether corals benefit from this extrinsic nitrogen source is still under debate. Until now, N_2 fixation rates have been indirectly estimated using the acetylene reduction assay, which does not permit assessment of the amount of nitrogen incorporated into the different compartments of the coral holobiont. In the present study, the $^{15}N_2$ technique was applied for the first time on three Red Sea coral species. Significant ^{15}N enrichment was measured in particles released by corals to the surrounding seawater. N_2 fixation rates were species specific and as high as 1.6–2 ng N day^{-1} l^{-1}. However, no significant enrichment was measured in the symbiotic dinoflagellates or the coral host tissues, suggesting that corals do not benefit from diazotrophic N_2 fixation.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Avenue Saint-Martin, MC-98000, Monaco.
[2]Laboratoire de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, UBO/CNRS/IRD/ IFREMER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, F- 29280 Plouzané, France.
[3]The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel. 4The Interuniversity Institute for Marine Science, 88000 Eilat, Israel.

*These authors contributed equally to this work

© 2014. Published by The Company of Biologists Ltd | The Journal of Experimental Biology (2014) 217, 3962-3963 doi:10.1242/jeb.111591

SHORT COMMUNICATION

Nitrogen fixation in the mucus of Red Sea corals

Renaud Grover[1,*,‡], Christine Ferrier-Pagès[1,*], Jean-François Maguer[2], Leila Ezzat[1] and Maoz Fine[3,4]

ABSTRACT

Scleractinian corals are essential constituents of tropical reef ecological diversity. They live in close association with diazotrophs [dinitrogen (N_2)-fixing microbes], which can fix high rates of N_2. Whether corals benefit from this extrinsic nitrogen source is still under debate. Until now, N_2 fixation rates have been indirectly estimated using the acetylene reduction assay, which does not permit assessment of the amount of nitrogen incorporated into the different compartments of the coral holobiont. In the present study, the $^{15}N_2$ technique was applied for the first time on three Red Sea coral species. Significant ^{15}N enrichment was measured in particles released by corals to the surrounding seawater. N_2 fixation rates were species specific and as high as 1.6–2 ng N day^{-1} l^{-1}. However, no significant enrichment was measured in the symbiotic dinoflagellates or the coral host tissues, suggesting that corals do not benefit from diazotrophic N_2 fixation.

KEY WORDS: Scleractinia, Diazotrophy, Stable isotopes, Symbiosis

INTRODUCTION

Coral reef waters are oligotrophic with respect to nitrogen (D'Elia and Wiebe, 1990), thus N_2 fixation by free-living benthic or pelagic cyanobacteria and bacteria (diazotrophs) is an important source of new nitrogen in these waters (Charpy et al., 2012). Additionally, several members of the reef community, such as sponges and ascidians, have developed mutualistic associations with diazotrophs (Wilkinson et al., 1999). Scleractinian corals have also adapted to conserve nitrogen. They live in symbiosis with dinoflagellates that take up and retain dissolved inorganic nitrogen from their surrounding environment and recycle host waste metabolites (Grover et al., 2002). Scleractinian corals also live in close association with a diverse array of microbes including diazotrophs, which inhabit the skeleton, host tissue and mucus layer of corals (Olson et al., 2009; Lema et al., 2012). Coral-associated diazotrophs are capable of N_2 fixation and transformation (Shashar et al., 1994; Lesser et al., 2007), but whether corals benefit from this new nitrogen is still debated. Indeed, N_2 fixation rates in coral holobionts (the coral host and its associated dinoflagellates and microorganisms) have been estimated using the acetylene reduction assay (ARA), which consists of injecting acetylene in seawater, which is then transformed to ethylene by nitrogenase activity. While relatively easy to perform, this method does not allow spatial analysis of the amount of nitrogen incorporated into the different holobiont compartments. Furthermore, it lacks accuracy, as a theoretical conversion factor is used to transform rates of ethylene production into rates of N_2 fixation. The present study aimed to use, for the first time in coral studies, the $^{15}N_2$ gas tracer method, which measures net fixation rates in addition to net incorporation of new nitrogen into the different coral compartments as well as in seawater particles issued from the coral external layer. Our study species were *Stylophora pistillata* Esper 1797 (from deep and surface water), *Cladopsammia gracilis* (Milne Edwards and Haime 1848) and *Porites* sp.

[1]Centre Scientifique de Monaco, Avenue Saint-Martin, MC-98000, Monaco. [2]Laboratoire de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, UBO/CNRS/IRD/IFREMER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané, France. [3]The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel. [4]The Interuniversity Institute for Marine Science, 88000 Eilat, Israel.
*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (rgrover@centrescientifique.mc)

Received 24 July 2014; Accepted 22 September 2014

RESULTS AND DISCUSSION

^{15}N enrichment in seawater suspended particles, collected from control bottles without corals or with corals but without ^{15}N addition, was insignificantly different from the natural levels (ANOVA, P=0.098). Following 24 h of incubation, particles collected from ^{15}N-enriched bottles, containing coral nubbins, were significantly enriched with ^{15}N (ANOVA, P=0.001). ^{15}N enrichment ranged from 0.006% to 0.0241% depending on the coral species incubated (Fig. 1A). These values correspond to 1.6–22 ng N l^{-1} day^{-1} (i.e. 0.12–1.6 nmol N l^{-1} day^{-1}) or to 0.08–0.32 ng N cm^{-2} day^{-1} when normalized to the surface area of the coral nubbins (Fig. 1B). As seawater was filtered at the beginning of the incubation, and coral nubbins had a very small fraction of apparent skeleton, this result suggests that microorganisms contained in the freshly released mucus are able to fix N_2. Our measurements are in the same range as N_2 fixation rates measured for other oligotrophic waters (from 0.1 to 4 nmol N l^{-1} day^{-1}) (reviewed in Ridame et al., 2013), suggesting that there is significant N_2 fixation, and that the enrichment technique used in this study allows an accurate measurement of this N_2 fixation. The %^{15}N atom excess values were significantly higher in particles released by *S. pistillata* from deep water and *C. gracilis* than in samples containing *S. pistillata* from surface waters and *Porites* sp. (ANOVA, P<0.01). This could be due to species-specific populations of microbes, which remain to be further studied in a larger experiment including determination of the microbial communities involved. The main finding of this study is the lack of significant nitrogen enrichment in the coral compartments, despite high rates of N_2 fixation in the incubation medium. Indeed, the %^{15}N atom excess in the coral tissue and in the symbionts was very low (between 0.0002% and 0.0015% in both compartments, Fig. 1A) and in the same range as the standard deviation of the natural samples (0.0010%). Thus, no reliable uptake could be established for corals. This observation suggests that, in our experiment, corals did not benefit from the nitrogen fixed by diazotrophs contained in their mucus layer and released into the surrounding medium, at least within 24 h. Indeed, colonies of *S. pistillata*, maintained for 3 days in $^{15}N_2$-enriched medium, presented a ^{15}N excess enrichment as high as 5% (data not shown). However, such a long incubation in a closed system may entail the death of bacterial particles and the release of ammonium and/or dissolved organic nitrogen, and abnormal release of mucus and bacteria by corals, which precludes any reliable estimations on the processes occurring on natural reefs. This study contradicts that by Lesser et al. (Lesser et al., 2007), who found some evidence that dinoflagellates in

SHORT COMMUNICATION

The Journal of Experimental Biology (2014) doi:10.1242/jeb.111591

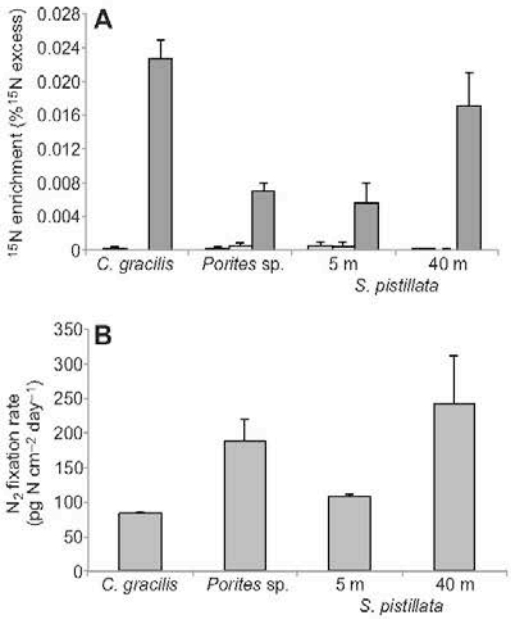


Fig. 1. ^{15}N enrichment and N_2 fixation rates in Red Sea corals. (A) ^{15}N enrichment in coral tissue [light grey bars (left)], in symbionts [white bars (middle)] and in seawater particles [dark grey bars (right)] of the three coral species: *Cladopsammia gracilis*, *Porites* sp. and *Stylophora pistillata* [collected at 5 m depth (shallow) and 40 m depth (deep)]. Values were multiplied by 100 for clarity. (B) N_2 fixation rates by seawater particles.

symbiosis with the coral *Montastrea cavernosa* were able to acquire nitrogen from N_2 fixation by diazotroph symbionts. The nature and location of these symbionts within the coral is, however, subject to debate (Oswald et al., 2007). Interpretations/conclusions from ARA experiments should be taken with care, because ARA measures total N_2 fixation without tracing the fate of the new nitrogen into the organic matter. Nutrients can sometimes be acquired from skeletal endoliths (Fine and Loya, 2002). Taken together, these observations suggest that the microbial community in coral tissues and mucus is highly dynamic and can change rapidly (Lema et al., 2012), which in turn may alter its capacity to transfer nutrients to the host.

The use of $^{15}N_2$ tracer for the first time with corals has clearly revealed that diazotrophs released with the mucus of scleractinian tropical corals can present high rates of N_2 fixation. These rates are equivalent to those previously measured in other oligotrophic environments. This study, however, clearly demonstrates the lack of rapid uptake of new nitrogen by the coral host and its symbionts, although N_2 fixation occurs in their immediate surroundings. This observation thus contradicts previous interpretation from ARA experiments on corals.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed with three species (three large nubbins per species) of the corals *S. pistillata*, *C. gracilis* and *Porites* sp., collected at 5 m depth from the reef of Eilat (Gulf of Aqaba, Red Sea), at a temperature of 25°C. Three nubbins of *S. pistillata* were also collected at 40 m depth, at a temperature of 24.7°C. Care was taken to avoid having a large surface of apparent skeleton, which might have contained diazotrophs. Rates of N_2 fixation were measured using $^{15}N_2$ gas (98%, Eurisotop) as outlined elsewhere (Montoya et al., 1996). Sealed 500 ml glass bottles, equipped with a Vacutainer syringe valve, were completely filled with 0.45 μm filtered oligotrophic seawater, prior to the introduction of the coral colonies. The water contained nanomolar concentrations of nitrate, ammonium and phosphate, as measured monthly by the National Monitoring Program of the Gulf of Aqaba (NMP), Eilat. The $^{15}N_2$ gas was then injected through the tap with a syringe, after removing the same seawater volume, for a final enrichment of ca. 80 atom% excess. Bottles were incubated in an outdoor seawater flow-through system for 24 h, at the seawater temperature and under natural irradiance, shaded to the level received by the corals at 5 or 40 m depth. Controls were also performed with only seawater enriched with $^{15}N_2$ or with corals without ^{15}N enrichment. At the end of the incubations, seawater was filtered through GF/F filters, pre-combusted for 5 h at 450°C, and filters were freeze-dried. Corals were rinsed for 15 min with filtered and unenriched seawater. Coral tissue was completely removed from the skeleton with an air brush and homogenized with a Potter tissue grinder. Homogenates were separated into animal and algal fractions according to Grover et al. (Grover et al., 2002), and each fraction was freeze-dried. Organic nitrogen content (PON) and ^{15}N enrichment in the particulate matter were quantified with a mass spectrometer (Delta Plus, ThermoFisher Scientific, Germany) coupled via a type III interface with a C/N analyser (Flash EA, ThermoFisher Scientific). The enrichment of the samples with ^{15}N was recorded as atom % excess. Nitrogen uptake rates were calculated according to Grover et al. (Grover et al., 2002) and considered significant when ^{15}N excess enrichment in the PON was greater than three times the standard deviation obtained with natural samples.

Acknowledgements

We thank D. Allemand, Director of the CSM, for scientific support. We also thank Philippe Ganot and one anonymous reviewer for valuable comments.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

All authors performed the experiments. R.G. and C.F.-P. developed the concepts, J.-F.M. and L.E. performed the analytical measurements and analyzed the data, and R.G. and C.F.-P. prepared and edited the manuscript.

Funding

Funding for this project was provided by the Centre Scientifique de Monaco, the Institut Universitaire Européen de la Mer and the Interuniversity Institute for Marine Science (IUI) in Eilat.

References

Charpy, L., Palinska, K. A., Abed, R. M., Langlade, M. J. and Golubic, S. (2012). Factors influencing microbial mat composition, distribution and dinitrogen fixation in three western Indian Ocean coral reefs. *Eur. J. Phycol.* **47**, 51-66.

Fine, M. and Loya, Y. (2002). Endolithic algae: an alternative source of photoassimilates during coral bleaching. *Biological Sciences* **269**, 1205-1210.

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

Lema, K. A., Willis, B. L. and Bourne, D. G. (2012). Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3136-3144.

Lesser, M. P., Falcón, L. I., Rodriguez-Román, A., Enriquez, S., Hoegh-Guldberg, O. and Iglesias-Prieto, R. (2007). Nitrogen fixation by symbiotic cyanobacteria provides a source of nitrogen for the scleractinian coral *Montastraea cavernosa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **346**, 143-152.

Montoya, J. P., Voss, M., Kahler, P. and Capone, D. G. (1996). A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N_2 fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 986-993.

Olson, N. D., Ainsworth, T. D., Gates, R. D. and Takabayashi, M. (2009). Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian Montipora corals: diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **371**, 140-146.

Oswald, F., Schmitt, F., Leutenegger, A., Ivanchenko, S., D'Angelo, C., Salih, A., Maslakova, S., Bulina, M., Schirmbeck, R., Nienhaus, G. U. et al. (2007). Contributions of host and symbiont pigments to the coloration of reef corals. *FEBS J.* **274**, 1102-1122.

Ridame, C., Guieu, C. and L'Helguen, S. (2013). Strong stimulation of N_2 fixation in oligotrophic Mediterranean Sea: results from dust addition in large in situ mesocosms. *Biogeosciences* **10**, 7333-7346.

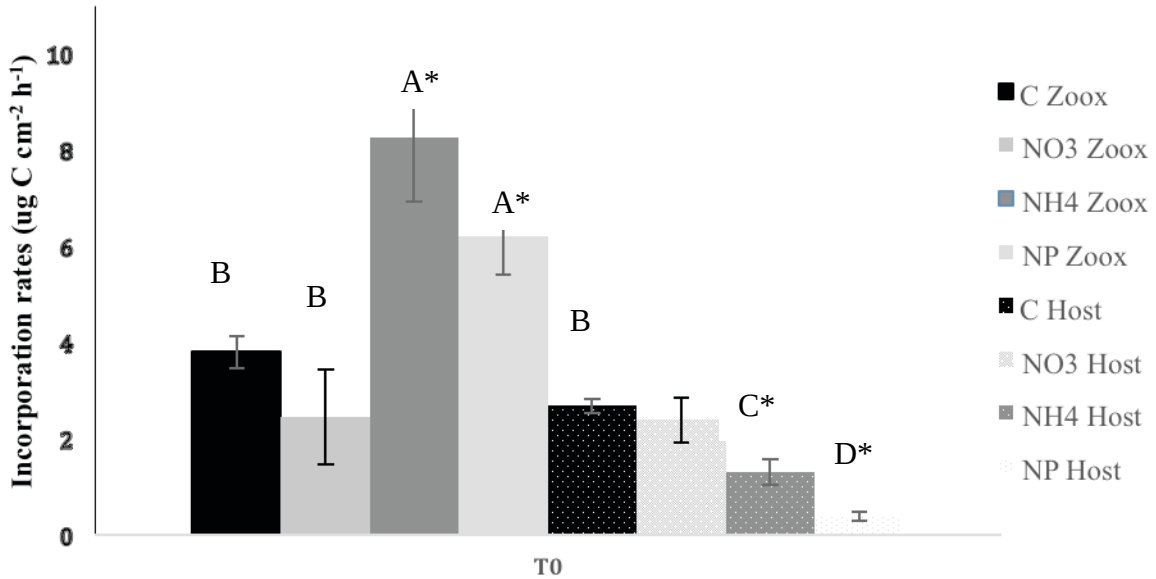
Shashar, N., Cohen, Y., Loya, Y. and Sar, N. (1994). Nitrogen fixation (acetylene reduction) in stony corals: evidence for coral-bacteria interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111**, 259-264.

Wilkinson, C. R., Summons, R. and Evans, E. (1999). Nitrogen fixation in symbiotic marine sponges: ecological significance and difficulties in detection. *Memoirs of the Queensland Museum* **44**, 667-673.

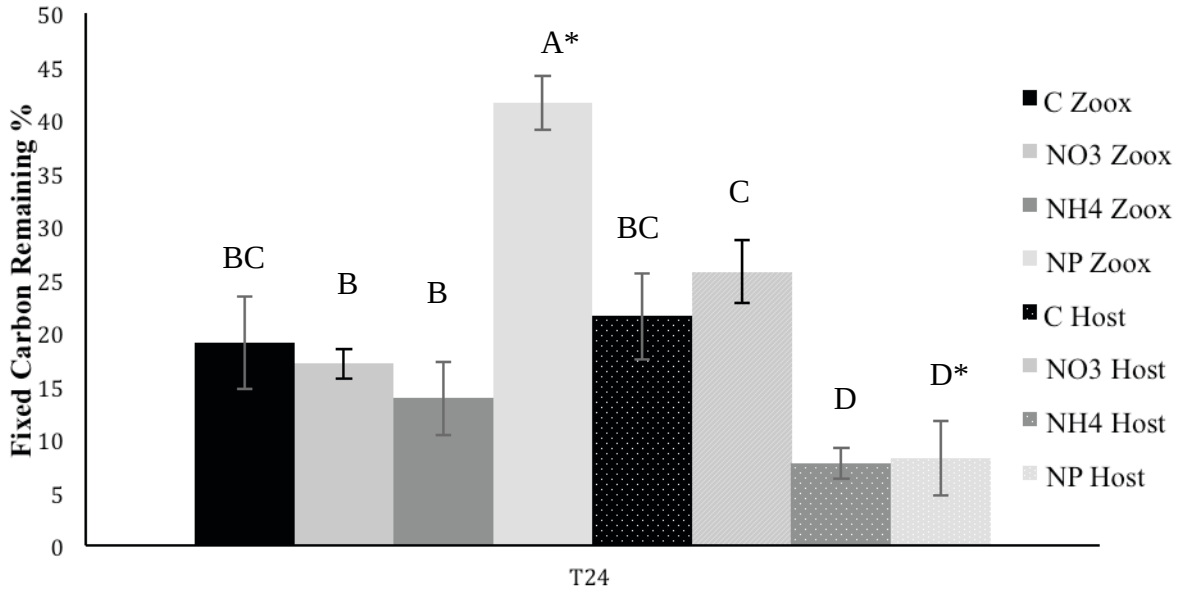
The Journal of Experimental Biology

Annexe 2

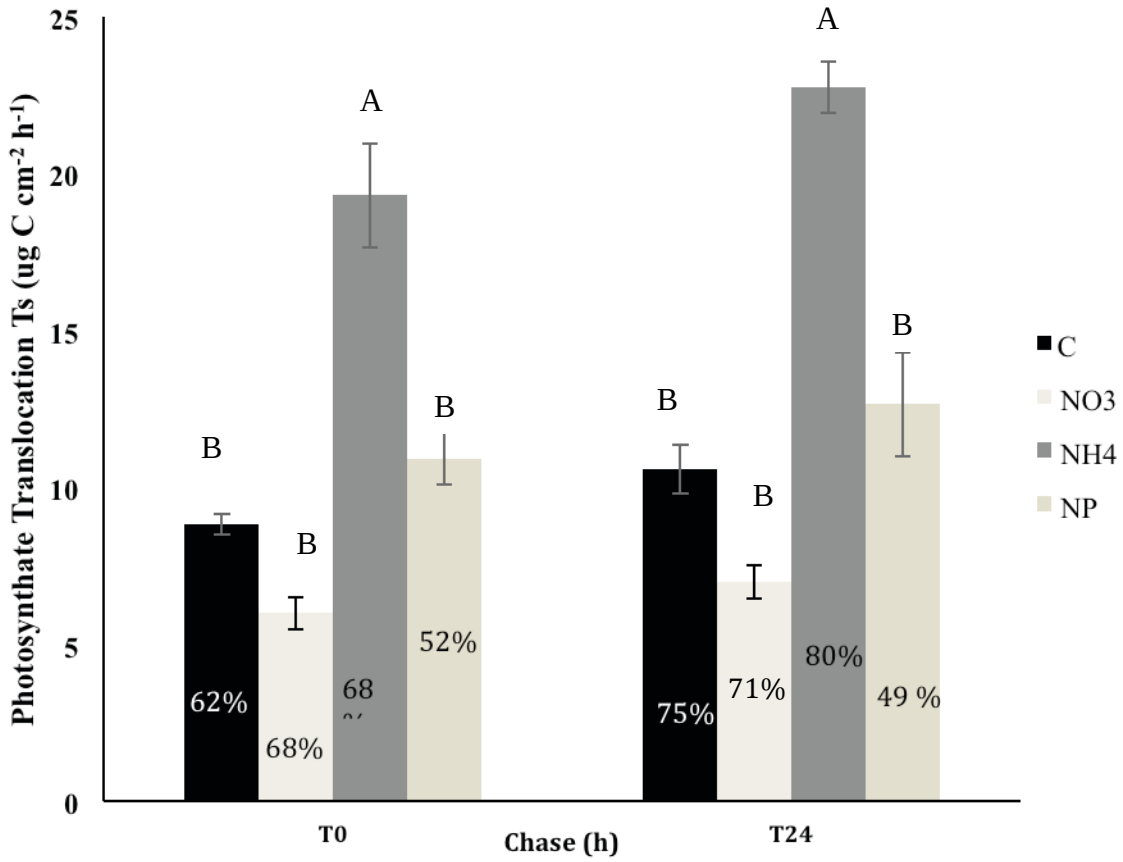
Supplementary Material Article n°1



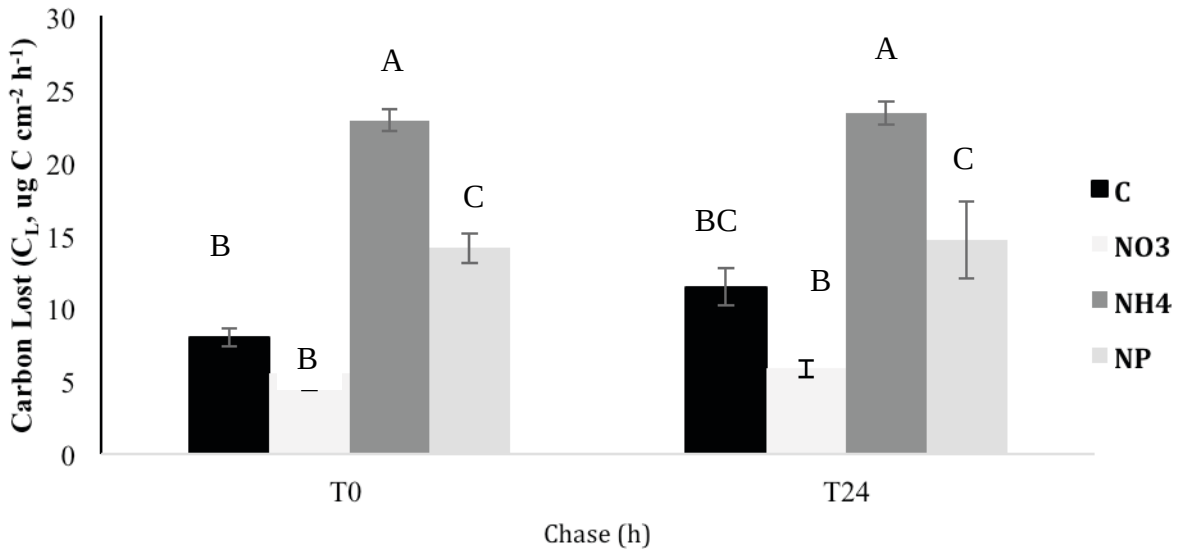
ESM 1. Significant interaction was observed between Feeding and Fraction for the carbon incorporation rates at T0 and T24 (ANOVA, $p<0.0001$). At T0 incorporation rates for the control and NO_3-enriched corals were similar between symbiont and host tissues (ESM 1; Tukey-HSD, $p>0.05$). Incorporation rates in symbionts for the NH_4 nubbins were significantly higher than in control and NO_3-enriched corals (Tukey-HSD, $p<0.0048$). Incoporation rate was higher in symbionts than in host (Tukey-HSD, $p<0.00018$) for NH4 treatment. Carbon incorporation rates in NP-enriched nubbins were significantly higher in symbionts than in the host at the initial and final timesteps (Tukey-HSD, $p<0.02$), suggesting a very slow transfer of photosynthates. After 24h, NP treatment presented the highest symbiont incorporation rates, ca. 7.01 ug C cm^{-2} h^{-1} (Tukey HSD, $p<0.0004$), while no significant differences were observed between host and symbionts for the three other treatments (Tukey-HSD, $p>0.05$). Stars indicate significant differences between incorporation rates in symbionts and host. Data are presented as mean ± SE.



ESM 2. Significant interaction was reported in both host and symbiont for the percentage of fixed carbon remaining after 24h (ANOVA, $p<0.001$).After 24h, NP-enriched nubbins fixed a higher percentage of carbon in symbiont tissues than in the other treatments (Tukey HSD, $p<0.025$). Percentages of fixed carbon remaining in host tissues presented a higher fixation in NO3-enriched corals than in the ammonium-enriched nubbins (Tukey HSD, $p<0.01$). Data are presented as mean ± SE.



ESM 3. Photosynthate translocation in control corals did not vary throughout the experiment (ANOVA, p=0.087). Values were above 8.9 and 10.5 ug C cm^{-2} h^{-1} respectively. NO3-enriched corals presented a similar amount of translocation thant the control corals (Tukey HSD, p=0.3), but different than the ammonium enriched nubbins (Tukey HSD, p<0.03), ca. 7 ug C cm^{-2} h^{-1}. However, NH4 enrichment greatly increased the amount of photosynthates transferred to the host, at T0 and T24 compaired to the other treatments, ca. 19 and 22 ug C cm^{-2} h^{-1} (Tukey HSD, p<0.0006). Finally, NP-enriched nubbins showed middle values of photosynthates translocation at T0 and T24, between those of the control and the NH4-enriched treatments. At T0, percentage values of photosynthates translocation did not vary between the treatments, between 52 and 68% (ANOVA, p>0.05). However, after 24h, NP condition presented a lower percentage of translocation than the other treatments, which maintain similar values, between 71 and 80%, against 49% in NP treatment (Tukey HSD, p<0.02). Data are presented as mean ± SE.



ESM 4. At t0, the amount of carbon lost in the control and NO3 corals group were similar, between 5.5 and 8 ug C cm^{-2} h^{-1} (ANOVA, p=0.3). NH4-enriched nubbins presented the highest amount of carbon lost than the other treatments (Tukey HSD, p<0.0001), ca. 22.8 ug C cm^{-2} h^{-1} . NH4-PO4 treatment showed middle values of C_L, ca. 14.7 ug C cm^{-2} h^{-1}. After 24h, the same trend was observed, with the NH4-enriched nubbins exhibiting the highest C_L, ca. 23.3 ug C cm^{-2} h^{-1} than the other treatments (Tukey HSD, p<0.01). No significant differences were observed for the percentages of carbon lost within the treatments (ANOVA, p>0.05). Data are presented as mean ± SE.

ESM 5. Results of the analysis of variance (ANOVA) for carbon incorporation rates (ρ) and the percentage of fixed carbon remaining (C_r) after T0 and T24h, followed by ANOVA performed on the different physiological parameters according to the Nutrient treatment after T0 and T24h

Factor	**Df**	**Beginning (T0) p-value**	**F-value**	**End (T24) p-value**	**F-value**
Incorporation rate (ρ)					
Nutrient Treatment	3	**0.04**	6.8	**<0.0001**	28.35
Fraction	1	**<0.0001**	51.97	**0.003**	15.3
Nutrient Treatment * Coral Compartment	3	**<0.0001**	15.65	**<0.0001**	35.55
Fixed carbon remaining (C_R)					
Nutrient Treatment	3	0.081	2.58	**0.005**	6.83
Fraction	1	**<0.0001**	29.62	**0.009**	9.15
Nutrient Treatment * Coral Compartment	3	0.073	2.68	**<0.0001**	13.49
Amount of carbon lost (C_L in ug C cm^{-2})					
Nutrient Treatment	3	**<0.000001**	73.48	**0.0003**	22.49
Percent of carbon lost (C_L in %)					
Nutrient Treatment	3	0.476	0.886	0.272	1.562
Amount of photosynthate translocated (Ts in ug C)					
Nutrient Treatment	3	**<0.00001**	28.85	**<0.00001**	40.42
Percent of photosynthate translocated (Ts in %)					
Nutrient Treatment	3	0.136	2.285	**0.0028**	9.5

Factor	**Df**	**P-value**	**F-value**
Symbionts density (zoox cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**<0.0000001**	44.29
Chlorophyll content (µg Chl(a+c$_2$) cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**<0.000001**	17.39
Protein concentration (mg cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**<0.0001**	14.15
Calcification rate (µg C cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**0.0167**	5.543
Gross photosynthesis PgC (µg C cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**<0.0001**	22.06
Holobiont respiration (Rc) (µg C cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**<0.0001**	16.08
Symbiont respiration (Rs)(µg C cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	**<0.00001**	24.52
Host respiration (Rh)(µg C cm^{-2})			
Nutrient Treatment	3	0.081	33.49

Annexe 3

Supplementary Material Article n°2

Table 3.Summary of ANOVAs testing the effect of the different time steps (T) (25°, 30°, and 25R °C), Inorganic nutrient enrichment (I) and Organic feeding (zooplankton provision) (O) on *T. reniformis* main physiological parameters. Bold face numbers indicates p<0.05.

Source of variation	df	Sum of squares	F	p
Zoox. Density *(Nb Zoox cm^{-2})*				
T	2	6044006007	11.1932	**<.0001**
I	2	2624173771	4.8598	**0.0103**
T x I	4	5169596097	4.7869	**0.0017**
O	1	170779219	0.6325	0.4288
T x O	2	454644507	0.8420	0.4347
I x O	2	1220422046	2.2602	0.1111
T x I x O	4	1115478181	1.0329	0.3957
Chlorophyll *(μg Chl(a+c$_2$)) cm^{-2}*				
T	2	0.0416158	0.4891	0.6150
I	2	1.5730277	18.4890	**<.0001**
T x I	4	0.0015235	0.0358	0.8504
O	1	0.1646167	0.9674	0.4302
T x O	2	0.0070177	0.0825	0.9209
I x O	2	0.0610869	0.7180	0.4909
T x I x O	4	0.1435669	0.8437	0.5017
Protein *(μg cm^{-2})*				
T	2	283468.76	20.2754	**<.0001**
I	2	621.99	0.0445	0.9565
T x I	4	35659.37	1.2753	0.2869
O	1	152.34	0.0218	0.8830
T x O	2	8686.62	0.6213	0.5399
I x O	2	2773.42	0.1984	0.8205
T x I x O	4	72202.5	2.5822	**0.0435**

Table 4.Summary of ANOVAs testing the effect of the different time steps (T) (25°, 30°, and 25R °C), Inorganic nutrient enrichment (I) and Organic feeding (zooplankton provision) (O) on *T. reniformis* main physiological photosynthetic parameters. Bold face numbers indicates p<0.05.

Source of variation	df	Sum of squares	F	p
ETR				
T	2	5097.8614	215.5329	**<.0001**
I	2	73.4705	3.1063	0.0518
T x I	4	152.2962	3.2195	**0.0182**
O	1	13.0689	1.1051	0.2972
T x O	2	54.2981	2.2957	0.1092
I x O	2	78.6251	3.3242	**0.0425**
T x I x O	4	74.5125	1.5752	0.1921
Net Photosynthesis *(μmoles O_2 h^{-1} cm^{-2})*				
T	2	1.6928	23.6108	**<.0001**
I	2	1.5857	22.1175	**<.0001**
T x I	4	0.4132	2.8818	**0.0270**
O	1	0.0405	1.1296	0.2907
T x O	2	0.0637	0.8883	0.4150
I x O	2	0.0203	0.2830	0.7542
T x I x O	4	0.0385	0.2687	0.8974
Respiration *(μmoles O_2 h^{-1} cm^{-2})*				
T	2	3.2974	46.3595	**<.0001**
I	2	0.2742	3.8546	**0.0248**
T x I	4	0.5638	3.9634	**0.0052**
O	1	0.0097	0.2736	0.6022
T x O	2	0.0595	0.8365	0.4366
I x O	2	0.0578	0.8126	0.4469
T x I x O	4	0.1905	1.3390	0.2617
Gross Photosynthesis *(μmoles O_2 h^{-1} cm^{-2})*				
T	2	12.4146	53.0252	**<.0001**
I	2	6.0940	26.0290	**<.0001**
T x I	4	1.1381	2.4306	0.0586
O	1	0.0194	0.1658	0.6854
T x O	2	0.1367	0.5841	0.5611
I x O	2	0.5286	2.2581	0.1143
T x I x O	4	1.2939	2.7634	**0.0366**

Table 5. Summary of repeated-measured analysis of variance (ANOVA) testing the effect of Inorganic nutrient enrichment (I) and Organic feeding (zooplankton provision) (O) according to the different time steps (T) on Growth and Feeding rates*. Bold face numbers indicates $p<0.05$

*the feeding rate parameter was tested with Inorganic nutrient enrichment (I) through the different timesteps (T).

Source of variation	**df**	**F**	**p**
Growth *(% change d^{-1})*			
T	2	6.1830	**0.0039**
I	2	15.5391	**<.0001**
T x I	4	9.1835	**<0.0001**
O	1	0.0182	0.8933
T x O	2	1.3379	0.2713
I x O	2	3.6217	**0.0336**
T x I x O	4	3.4939	0.0102
Feeding *(Nb Artemia h^{-1} $polyp^{-1}$)*			
T	2	8.0095	**0.0071**
I	2	7.6711	**0.0071**
T x I	4	1.2618	0.3148

Annexe 4

Supplementary Material Article n°3

Supplementary Table S1. Determination of Symbiodinium clade via BLASTn

Chloroplast Partial 23S rRNA gene	Host organism	Identity (%)	Site (bp)	E value
Symbiodinium Clade C1	*P.cactus*	100	623	0.0
	T.reniformis	99	599	0.0
	P.damicornis	99	623	0.0
	G.fascicularis	99	621	0.0
Symbiodinium Clade D1	*H.fuscescens*	99	718	0.0

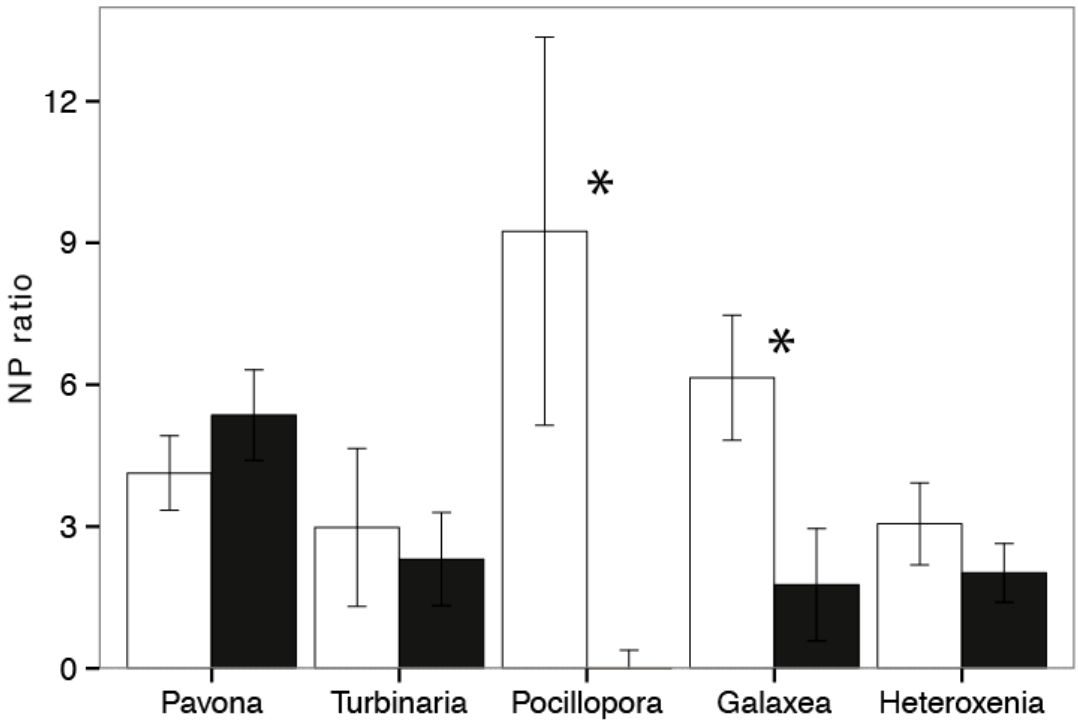
Supplementary Table S2. Nutrient uptakes normalized by zooxanthellae density

The uptake of nutrients (NH_4, NO_3 and PO_4; µmol of Nutrient (Nb Zoox)$^{-1}$ h^{-1}) normalized by the density of zooxanthellae according to the different coral species and the temperature steps (25°C and 30°C). Significant differences due to temperature were highlighted by an asterisk(*)

Species	Temperature	NH_4 uptake	STDEV	NO_3 uptake	STDEV	PO_4 uptake	STDEV
P.cactus	T25	2.84E-08	1.58E-08	*2.23E-07	8.53E-08	7.1E-08	3.54E-08
	T30	5.19E-08	1.68E-08	1.04E-07	2.07E-08	4.93E-08	1.56E-08
H.fuscescens	T25	4.45E-08	1.77E-08	1.24E-07	1.76E-07	*2.9E-08	5.72E-09
	T30	1.21E-07	5.06E-08	1.22E-07	4.48E-08	1.32E-07	7.57E-08
T.reniformis	T25	8.99E-08	4.88E-08	3.04E-07	1.93E-07	*1.01E-08	5.02E-09
	T30	8.72E-08	2.44E-08	9.01E-08	3.36E-08	7.1E-08	1.85E-08
P.damicornis	T25	1.09E-07	3.04E-08	9.66E-08	2.25E-08	*3.65E-08	9.39E-09
	T30	1.05E-07	3.69E-08	1.52E-07	7.12E-08	1.84E-09	1.29E-09
G.fascicularis	T25	3.92E-08	2.75E-08	1.45E-07	4.84E-08	*2.01E-08	6.54E-09
	T30	4.25E-08	2.22E-08	9.71E-08	1.51E-08	4.11E-08	6.54E-09

Supplementary Figure S3. N-uptake: P-uptake

Ratio of total nitrogen (NH_4+NO_3) uptake on phosphorus uptake that have been previously normalized by µmol of N (mg prot)$^{-1}$ h^{-1}, according to the different coral species and the temperature steps. Significant effects of temperature were highlighted by an asterisk (*). Temperature steps (T25°C and T30°C) are represented by white and black bars, respectively.

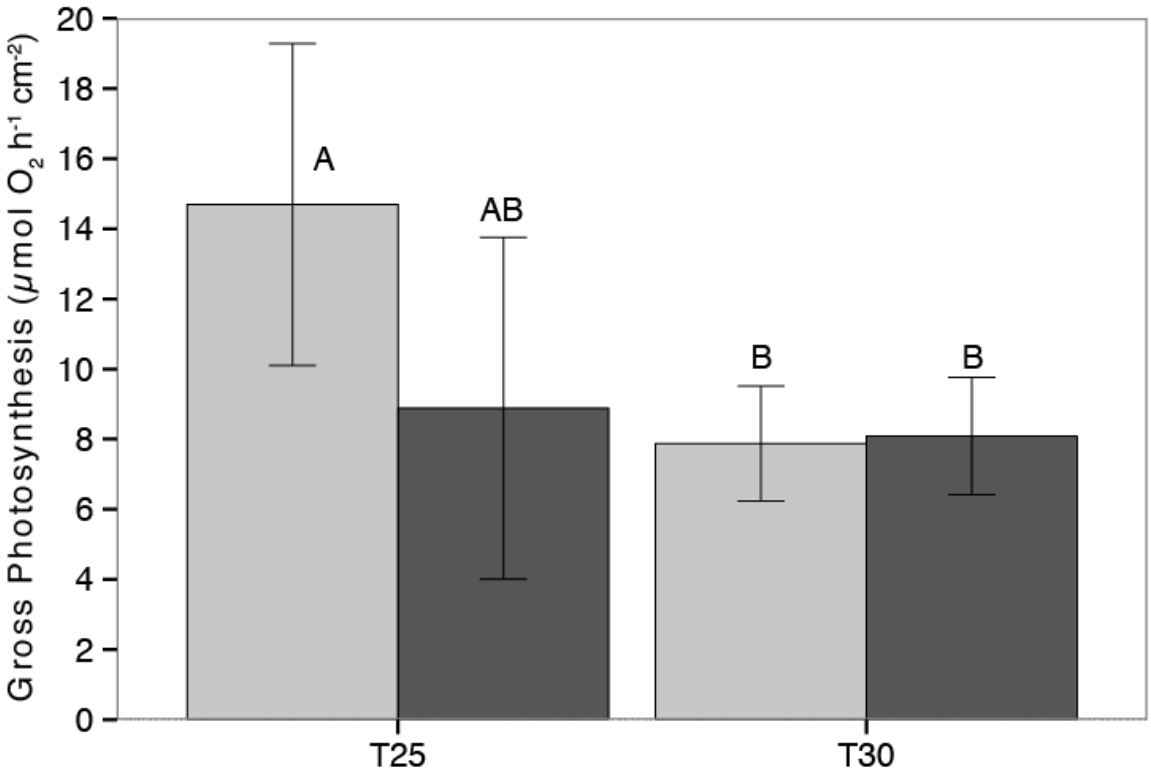


Supplementary Table S4. Uptake of inorganic nutrients by *H.fuscescens*

Uptake of inorganic nutrients (NH_4, NO_3, PO_4)

in umol of nutrients (mg prot)-1mn-1. Significant effects of clove oil solution in decreasing polyp pulsation were highlighted by an asterisk (*).

Treatment	Mean	STDEV
NH4	0.023383	0.006532
NH4 EO	0.010009*	0.001504
NO3	0.010998	0.00374
NO3 EO	0.005465*	0.001504
PO4	0.000471	0.000104
PO4 EO	0.0003	8.96E-05

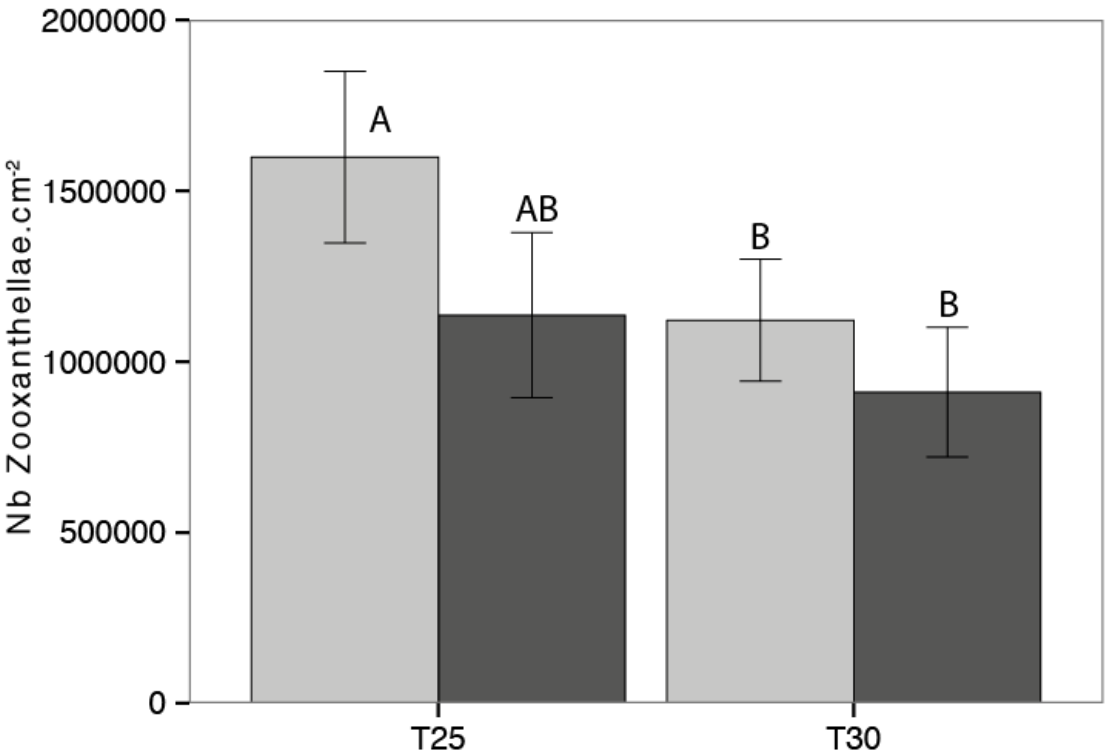


Supplementary Figure S5. Gross photosynthesis of *P.damicornis*

Rates of gross photosynthesis (µg C cm^{-2} h^{-1}) of *P.damicornis* according to the nutrient treatment and the temperature steps (25°C and 30°C) relative to the second experiment. Control and P-enriched treatments are represented by grey and dark grey bars, respectively.

Supplementary Figure S6. Zooxanthellae density of *P.damicornis*

Density of zooxanthellae (Nb. Zooxanthellae cm^{-2}) of *P.damicornis* according to the different nutrient treatment and the temperature steps (25°C and 30°C), relative to the second experiment. Control and P-enriched treatments are represented by grey and dark grey bars, respectively.



Supplementary Table 7. Summary of ANOVAs testing the effect of temperature (25°C, 30°C) and species or treatment (only) on the main physiological parameters.
P values are considered significant for $p<0.05$.

Source of variation	Df	F	p
	Protein content (hard corals) **(mg prot cm^{-2})**		
Species	3	19.29	**< 0.0001**
Temperature	1	0.11	0.746
Species x Temperature	3	3.13	**0.04**
	Chlorophyll content **(µg Chl(a+c$_2$)*(mg prot)$^{-1}$)**		
Species	4	45.8	**< 0.0001**
Temperature	1	116.2	**< 0.0001**
Species x Temperature	4	2.1	**0.0106**
	Zooxanthellae density **(Nb zooxanthellae mg prot)$^{-1}$)**		
Species	4	10.76	**0.003**
Temperature	1	17.51	**< 0.0001**
Species x Temperature	4	4.29	**0.008**
	Net Photosynthesis **(µmol O$_2$ (mg prot)$^{-1}$)**		
Species	4	54.94	**< 0.0001**
Temperature	1	10.6	**0.003**
Species x Temperature	4	8.95	**< 0.0001**
	Respiration **(µmol O$_2$ (mg prot)$^{-1}$)**		
Species	4	34.88	**< 0.0001**
Temperature	1	1.71	0.201
Species x Temperature	4	4.54	**0.005**
	Gross Photosynthesis **(µmol O$_2$ (mg prot)$^{-1}$)**		
Species	4	30.86	**< 0.0001**
Temperature	1	5.44	**0.026**
Species x Temperature	4	10.99	**< 0.0001**

Supplementary Table 8. Summary of ANOVAs testing the effect of temperature (25°C, 30°C) and species or treatment (only) on the main physiological parameters.

P values are considered significant for p<0.05.

Source of variation	Df	F	p
Ammonium uptake rate (μmol NH_4 h^{-1} mg $prot^{-1}$)			
Species	4	12.22	**<0.0001**
Temperature	1	0.91	0.347
Species x Temperature	4	4.24	**0.008**
Nitrate uptake rate (μmol NH_4 h^{-1} mg $prot^{-1}$)			
Species	4	7.46	**<0.0001**
Temperature	1	15.9	**<0.0001**
Species x Temperature	4	10.32	**<0.0001**
Phosphorus uptake rate (μmol PO_4 h^{-1} mg $prot^{-1}$)			
Species	4	22.46	**<0.0001**
Temperature	1	51.38	**<0.0001**
Species x Temperature	4	20.07	**<0.0001**
Ammonium uptake rate (μmol NH_4 h^{-1} Nb $Zoox^{-1}$)			
Species	4	8.109	**<0.0001**
Temperature	1	4.201	0.05
Species x Temperature	4	2.270	0.083
Nitrate uptake rate (μmol NO_3 h^{-1} Nb $Zoox^{-1}$)			
Species	4	1.011	0.419
Temperature	1	4.702	**0.039**
Species x Temperature	4	2.552	0.062
Phosphorus uptake rate (μmol PO_4 h^{-1} Nb $Zoox^{-1}$)			
Species	4	5.387	**0.002**
Temperature	1	7.44	**0.011**
Species x Temperature	4	7.489	**<0.0001**
NP ratio			
Species	4	3.9	**0.013**
Temperature	1	32.31	**0.0001**
Species x Temperature	4	12.16	**0.0001**
Ammonium uptake rate at 25°C (H.fuscescens) (μmol NH_4 mn^{-1} mg $prot^{-1}$)			
Treatment	1	14.36	**0.009**
Nitrate uptake rate at 25°C (H.fuscescens) (μmol NO_3 mn^{-1} mg $prot^{-1}$)			
Treatment	1	7.538	**0.033**
Phosphorus uptake rate at 25°C (H.fuscescens) (μmol PO_4 mn^{-1} mg $prot^{-1}$)			
Treatment	1	2.214	0.197

Supplementary Table 9. Summary of ANOVAs testing the effect of temperature (25°C, 30°C) and nutritional treatment on the different physiological parameters for the second experiment. P values are considered significant for $p<0.05$.

Source of variation	Df	F	p
Gross photosynthesis (µg C h^{-1} cm^{-2})			
Temperature	1	6.845	**0.019**
Treatment	1	1.451	0.247
Temperature x Treatment	1	1.804	0.199
Zooxanthellae density (Nb Zoox cm^{-2})			
Temperature	1	6.701	**0.018**
Treatment	1	1.721	0.204
Temperature x Treatment	1	6.676	**0.018**
Symbiont respiration rate, R_s (µg C cm^{-2} h^{-1})			
Temperature	1	0.51	0.484
Treatment	1	31.7	**<0.0001**
Temperature x Treatment	1	1.23	0.282
Host Respiration rate, R_H (%)			
Temperature	1	4.15	0.057
Treatment	1	13.68	**0.002**
Temperature x Treatment	1	0.18	0.673
Calcification rate, Cc (µg C cm^{-2} h^{-1})			
Temperature	1	0.005	0.943
Treatment	1	1.238	0.292
Temperature x Treatment	1	<0.000	0.984
rETRmax			
Temperature	1	0.58	0.468
Treatment	1	9.051	0.017
Temperature x Treatment	1	5.589	**0.046**
NPQmax			
Temperature	1	26	**0.001**
Treatment	1	13.68	**0.002**
Temperature x Treatment	1	0.74	0.416

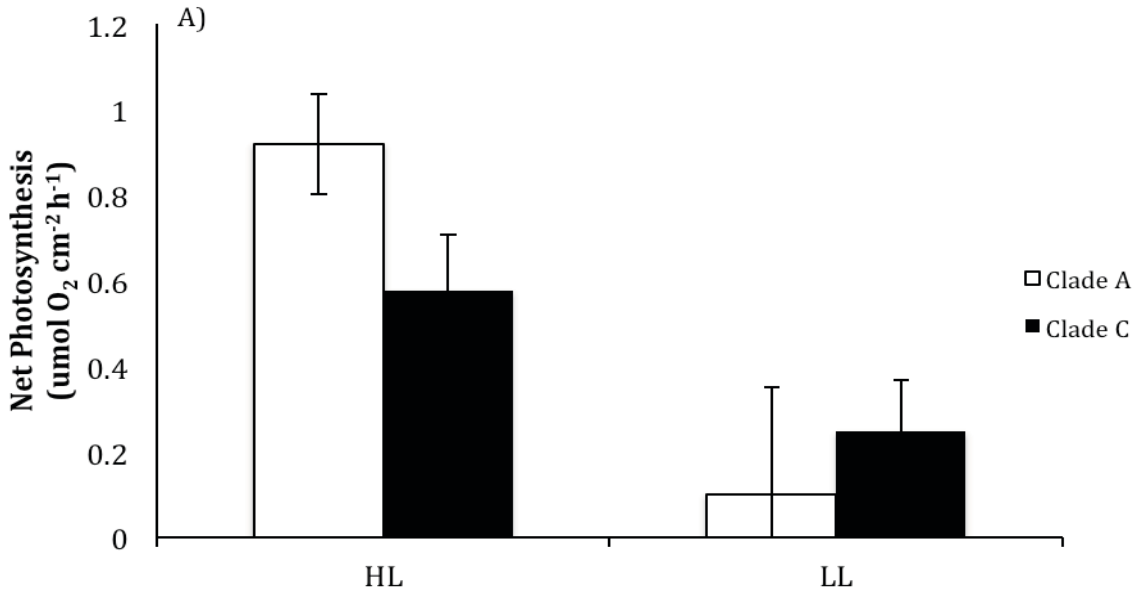
Supplementary Table S10. Summary of factorial ANOVAs testing the effect of temperature (25°C, 30°C), nutritional treatment as well as the symbiotic compartment on the rates of carbon assimilation and transfer

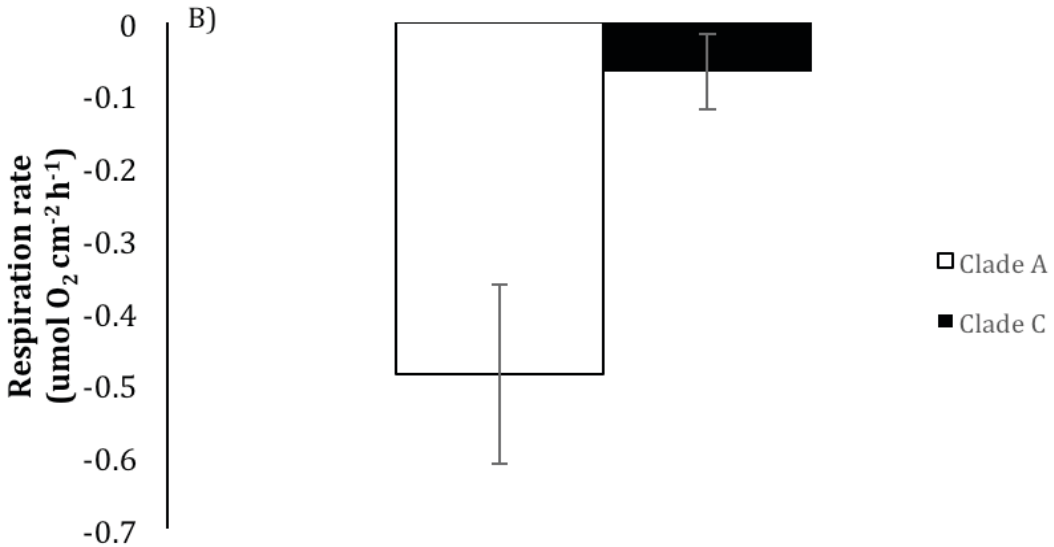
Carbon assimilated after 24h ($\mu g\ C\ h^{-1} cm^{-2}$)			
Compartment	1	43.79	**<0.0001**
Temperature	1	11.24	**0.002**
Treatment	1	1.62	0.212
Compartment x Temperature	1	2.18	0.15
Compartment x Treatment	1	27.16	**<0.0001**
Temperature x Treatment	1	1.6	0.216
Compartment x Temperature x Treatment	1	3.29	0.08
Carbon remaining within the symbiosis after 24h (%)			
Compartment	1	51.18	**<0.0001**
Temperature	1	0.88	0.357
Treatment	1	1.12	0.3
Compartment x Temperature	1	25.43	**<0.0001**
Compartment x Treatment	1	1.42	0.243
Temperature x Treatment	1	0.37	0.548
Compartment x Temperature x Treatment	1	2.37	0.135
Rate of photosynthates transferred after 24h ($\mu g\ C\ h^{-1} cm^{-2}$)			
Temperature	1	26.5	**<0.0001**
Treatment	1	2.88	0.109
Temperature x Treatment	1	21.58	**<0.0001**
Rate of photosynthates transferred after 24h (%)			
Temperature	1	1.604	0.225
Treatment	1	9.648	**0.007**
Compartment x Treatment	1	3.24	0.092

Annexe 5

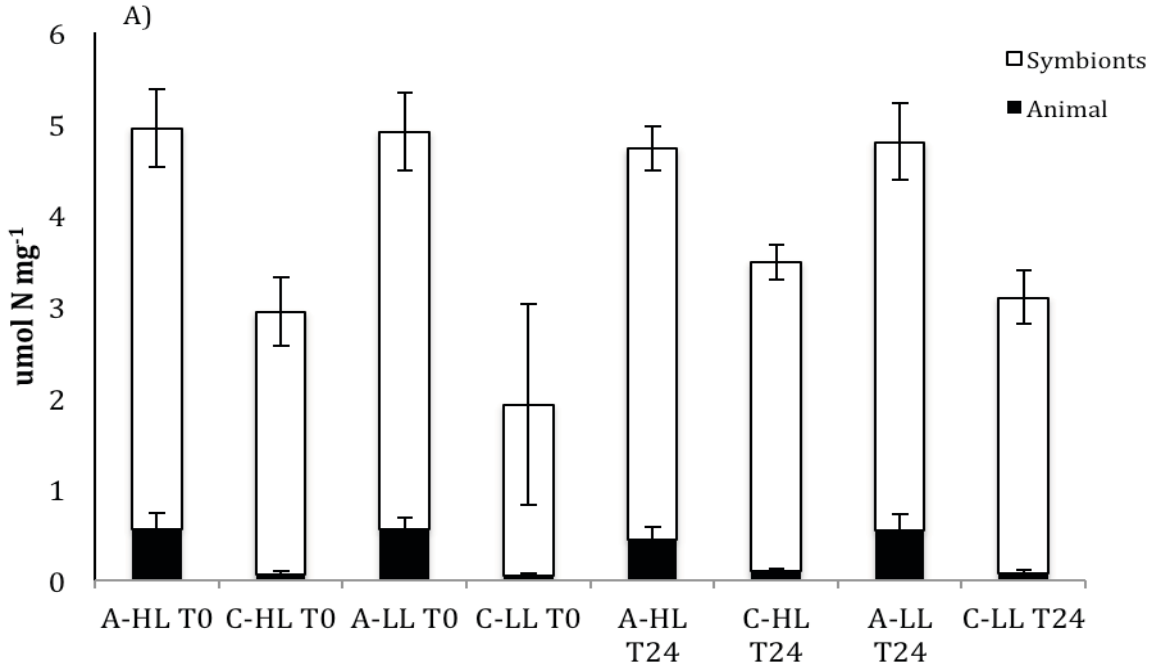
Supplementary Material Article n°4

Figure 1. Rates of A) net photosynthesis and B) respiration according to the different clades and/or light intensity





Ammonium



Nitrate

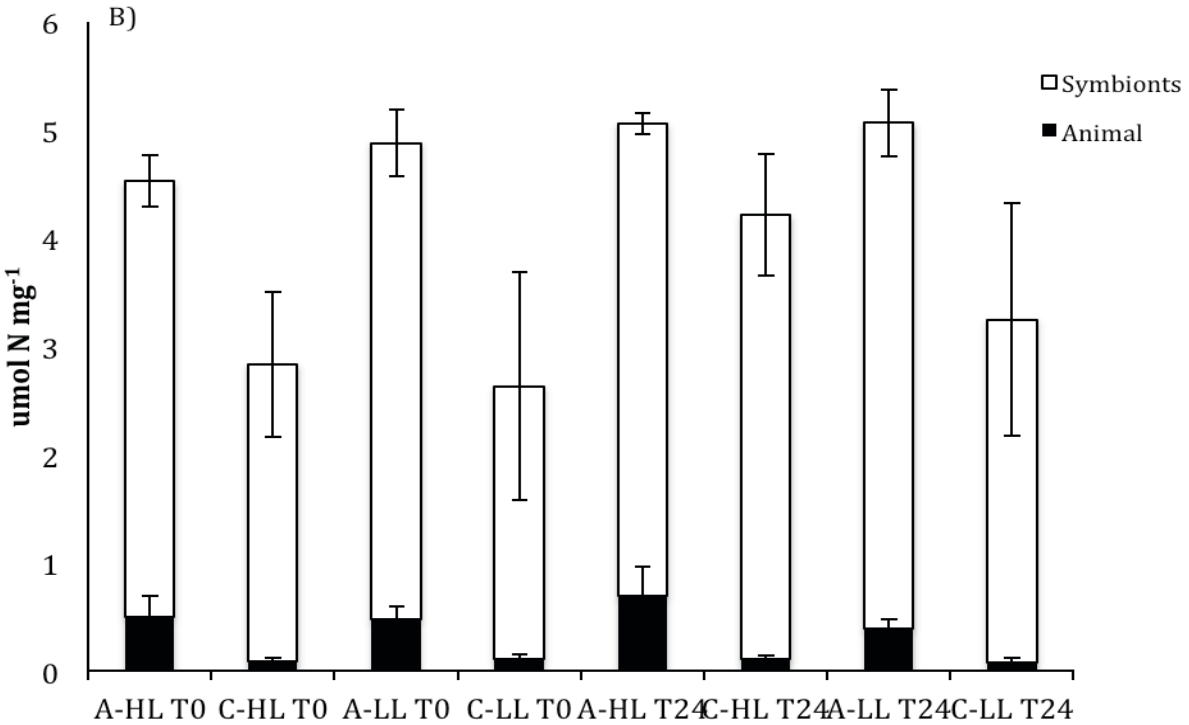


Figure 2. Nitrogen A) Ammonium and B) Nitrate contents within the two different symbiotic associations.

Table 1. Summary of ANOVA for the physiological measurements

Parameters	Df	F value	P value
Chlorophyll content (µg Chl (a+c$_2$) cm^{-2})			
Clade	1	7.515	**0.0208**
Net photosynthesis (µmol O$_2$ cm^{-2} h^{-1})			
Clade	1	39.34	1.11e-05
Light	1	113.11	1.16e-08
*Clade * Light*	1	28.68	6.44e-05
Respiration rate (µmol O$_2$ cm^{-2} h^{-1})			
Clade	1	56.4	2.04e-05
rETRmax			
Clade	1	6.086	**0.0389**
NPQmax			
Clade	1	21.03	**0.000626**
Fv/Fm			
Clade	1	22.49	**0.000478**
Grazing rate (Nb of prey mn^{-1} cm^{-2})			
Clade	1	27.61	**<0.0001**
Light	1	1.35	0.268
*Clade * Light*	1	2.38	0.149

Table 2. Summary of Repeated measures ANOVA for Carbon fixation, assimilation, translocation according to the different clades, light intensities and fraction (animal vs algal)

Parameters	Df	F-value	P-value
***Gross Photosynthesis* (*µg* C cm^{-2} h^{-1})**			
Clade	1	5.69	**0.03**
Light	1	84.25	**<0.0001**
*Clade*Light*	1	12.40	**0.0021**
***Carbon Assimilation* (*µg* C cm^{-2} h^{-1})**			
Fraction	**1**	261.2	**<0.0001**
Clade	**1**	0.1	0.802
Light	**1**	234.9	**<0.0001**
*Fraction*Clade*	**1**	0.3	0.617
*Fraction*Light*	**1**	72.6	**<0.0001**
*Clade*Light*	**1**	0.7	0.408
*Fraction*Clade*Light*	**1**	15.4	**0.001**
Time	**1**	0.1	0.913
*Time*Fraction*	**1**	34.7	**<0.0001**
*Time*Clade*	**1**	10.5	**0.003**
*Time*Light*	**1**	28.3	**<0.0001**
*Time*Fraction*Clade*	**1**	1.8	0.188
*Time*Fraction*Light*	**1**	18.8	**<0.0001**
*Time*Clade*Light*	1	0.2	0.677
*Time*Fraction*Clade*Light*	1	0.8	0.379
Carbon Translocation (µg C cm^{-2} h^{-1})			
Clade	1	104.3	**<0.0001**
Light	1	812.7	**<0.0001**
*Light*Clade*	1	17.6	**<0.0001**
Time	1	4	0.079
*Time*Clade*	1	7.1	**0.028**
*Time*Light*	1	8.7	**0.019**
*Time*Clade*Light*	1	3	0.122
Carbon Translocation (%)			
Clade	**1**	39.3538	**0.000041**
Light	**1**	94.4803	**<0.0001**
*Light*Clade*	**1**	68.0452	**<0.0001**
Time	**1**	11.2610	**0.005719**
*Time*Clade*	**1**	0.4111	0.533465
*Time*Light*	**1**	3.6697	0.079539
*Time*Clade*Light*	**1**	0.1713	0.686218
P :R			
Clade	**1**	48.79	**<0.0001**
Light	**1**	20.07	**<0.001**
*Clade*Light*	**1**	3.93	0.07

Table 3. Summary of Repeated measures ANOVA for the nitrogen assimilation (either ammonium or nitrate) according to the different clades, light intensities and fractions (animal vs algal)

Paramètres	Df	F	P
Ammonium assimilation (nmol N h^{-1} cm^{-2})			
Fraction	**1**	295.9	**<0.0001**
Clade	**1**	167.6	**<0.0001**
Light	**1**	14.9	**0.001**
*Fraction*Clade*	**1**	76.6	**<0.0001**
*Fraction*Light*	**1**	5.5	**0.03**
*Clade*Light*	**1**	6.1	**0.02**
*Fraction*Clade*Light*	**1**	1.7	0.21
Time	**1**	11.3	**0.003**
*Time*Fraction*	**1**	8.6	**0.01**
*Time*Clade*	**1**	65.9	**<0.0001**
*Time*Light*	**1**	2.6	0.12
*Time*Fraction*Clade*	**1**	16.1	**<0.001**
*Time*Fraction*Light*	**1**	1.0	0.34
*Time*Clade*Light*	**1**	7.8	**0.01**
*Time*Fraction*Clade*Light*	**1**	1.7	0.20
Nitrate assimilation (nmol N h^{-1} cm^{-2})			
Fraction	**1**	1719.0	**<0.0001**
Clade	**1**	22.0	**<0.0001**
Light	**1**	2.0	0.16
*Fraction*Clade*	**1**	45	**<0.0001**
*Fraction*Light*	**1**	1.0	0.47
*Clade*Light*	**1**	3.0	0.09
*Fraction*Clade*Light*	**1**	1.0	0.56
Time	**1**	4.0	0.05
*Time*Fraction*	**1**	30.0	**<0.0001**
*Time*Clade*	**1**	2.0	0.15
*Time*Light*	**1**	1.0	0.84
*Time*Fraction*Clade*	**1**	1.0	0.61
*Time*Fraction*Light*	**1**	5.0	**0.04**
*Time*Clade*Light*	**1**	1.0	0.29
*Time*Fraction*Clade*Light*	**1**	2.0	0.15
C :N			
Fraction	**1**	553.21	**<0.0001**
Clade	**1**	307.31	**<0.0001**
*Fraction*Clade*	**1**	61.08	**<0.0001**

Table 4. Summary of Repeated measures ANOVA for the nitrogen assimilation (either ammonium or nitrate) according to the different clades, light intensities and fractions (animal vs algal)

Paramètres	Df	F	P
	^{13}C (umol C mg^{-1})		
Fraction	**1**	3792,966	**<0.0001**
Clade	**1**	314.429	**<0.0001**
Light	**1**	0.154	0.697
*Fraction*Clade*	**1**	296.703	**<0.0001**
*Fraction*Light*	**1**	0.129	0.722
*Clade*Light*	**1**	2.38	0.132
*Fraction*Clade*Light*	**1**	0.147	0.703
Time	**1**	1.703	0.201
*Time*Fraction*	**1**	0.227	0.637
*Time*Clade*	**1**	11.85	**0.0016**
*Time*Light*	**1**	0.027	0.87
*Time*Fraction*Clade*	**1**	1.133	0.295
*Time*Fraction*Light*	**1**	0.029	0.866
*Time*Clade*Light*	**1**	0.246	0.622
*Time*Fraction*Clade*Light*	**1**	3.017	0.092
	$^{15}N0_3$ (umol N mg^{-1})		
Fraction	**1**	1737.504	**<0.0001**
Clade	**1**	189.019	**<0.0001**
Light	**1**	0.781	0.3832
*Fraction*Clade*	**1**	66.826	**<0.0001**
*Fraction*Light*	**1**	0.015	0.904
*Clade*Light*	**1**	1.796	0.189
*Fraction*Clade*Light*	**1**	0.623	0.435
Time	**1**	0.363	0.551
*Time*Fraction*	**1**	6.138	**0.018**
*Time*Clade*	**1**	2.215	0.146
*Time*Light*	**1**	1.179	0.19
*Time*Fraction*Clade*	**1**	0.24	0.627
*Time*Fraction*Light*	**1**	0.308	0.5829
*Time*Clade*Light*	**1**	1.435	0.239
*Time*Fraction*Clade*Light*	**1**	0.355	0.55
	$^{15}NH_4$ (umol N mg^{-1})		
Fraction	**1**	827.07	**<0.0001**
Clade	**1**	171.39	**<0.0001**
Light	**1**	1.971	0.169
*Fraction*Clade*	**1**	52.96	**<0.0001**
*Fraction*Light*	**1**	1.396	0.246
*Clade*Light*	**1**	3.576	0.067
*Fraction*Clade*Light*	**1**	0.368	0.548
Time	**1**	3.748	0.06
*Time*Fraction*	**1**	0.423	0.52
*Time*Clade*	**1**	7.017	**0.012**
*Time*Light*	**1**	0.657	0.423
*Time*Fraction*Clade*	**1**	0.027	0.871
*Time*Fraction*Light*	**1**	1.13	0.295
*Time*Clade*Light*	**1**	0.1858	0.669
*Time*Fraction*Clade*Light*	**1**	2.113	0.156

Bibliographie

Abrego, D., K. E. Ulstrup, B. L. Willis, and M. J. van Oppen. 2008. Species–specific interactions between algal endosymbionts and coral hosts define their bleaching response to heat and light stress. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **275:** 2273-2282.

Alamaru, A., Y. Loya, E. Brokovich, R. Yam, and A. Shemesh. 2009. Carbon and nitrogen utilization in two species of Red Sea corals along a depth gradient: Insights from stable isotope analysis of total organic material and lipids. Geochimica et Cosmochimica Acta **73:** 5333-5342.

Allemand, D. and others 2004. Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. Comptes Rendus Palevol **3:** 453-467.

Allemand, D., É. Tambutté, D. Zoccola, and S. Tambutté. 2011. Coral calcification, cells to reefs, p. 119-150. Coral reefs: an ecosystem in transition. Springer.

Altieri, K., M. Hastings, A. Peters, S. Oleynik, and D. Sigman. 2014. Isotopic evidence for a marine ammonium source in rainwater at Bermuda. Global Biogeochemical Cycles **28:** 1066-1080.

Amory, A. M., G. C. Vanlerberghe, and D. H. Turpin. 1991. Demonstration of both a photosynthetic and a nonphotosynthetic CO2 requirement for NH4+ assimilation in the green alga Selenastrum minutum. Plant physiology **95:** 192-196.

Amtmann, A., and M. R. Blatt. 2009. Regulation of macronutrient transport. New Phytologist **181:** 35-52.

Anthony, K. 2006. Enhanced energy status of corals on coastal, high-turbidity reefs. Marine Ecology Progress Series **319:** 111-116.

Anthony, K., M. O. Hoogenboom, J. A. Maynard, A. G. Grottoli, and R. Middlebrook. 2009. Energetics approach to predicting mortality risk from environmental stress: a case study of coral bleaching. Functional ecology **23:** 539-550.

Anthony, K. and others 2015. Operationalizing resilience for adaptive coral reef management under global environmental change. Global change biology **21:** 48-61.

Anthony, K. R., and K. E. Fabricius. 2000. Shifting roles of heterotrophy and autotrophy in coral energetics under varying turbidity. Journal of experimental marine biology and ecology **252:** 221-253.

Arrigo, K. R. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. Nature **437:** 349-355.

Atkinson, M. 1987. Low phosphorus sediments in a hypersaline marine bay. Estuarine, Coastal and Shelf Science **24:** 335-347.

Atkinson, M., B. Carlson, and G. 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.

Baird, A. H., R. Bhagooli, P. J. Ralph, and S. Takahashi. 2009. Coral bleaching: the role of the host. Trends in Ecology & Evolution **24:** 16-20.

Bak, R. P., and E. H. Meesters. 1998. Coral population structure: the hidden information of colony size-frequency distributions. Marine Ecology Progress Series **162:** 301-306.

Baker, A. C. 2001. Ecosystems: reef corals bleach to survive change. Nature **411:** 765-766.

---. 2003. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of Symbiodinium. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **34:** 661-689.

Baker, D. M., J. P. Andras, A. G. Jordán-Garza, and M. L. Fogel. 2013. Nitrate competition in a coral symbiosis varies with temperature among Symbiodinium clades. The ISME journal **7:** 1248-1251.

Barnes, D. D., and B. B. Chalker. 1990. Calcification and photosynthesis in reef-building corals and algae. Coral Reefs. Ecosystems of the World. **25:** 109-131.

Barott, K., J. Smith, E. Dinsdale, M. Hatay, S. Sandin, and F. Rohwer. 2009. Hyperspectral and physiological analyses of coral-algal interactions. PloS one **4:** e8043.

Barott, K. L. and others 2012. Natural history of coral-algae competition across a gradient of human activity in the Line Islands. Marine Ecology-Progress Series **460:** 1-12.

Bary, A. 1866. Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten. W. Engelmann.

Bassim, K., and P. Sammarco. 2003. Effects of temperature and ammonium on larval development and survivorship in a scleractinian coral (Diploria strigosa). Marine Biology **142:** 241-252.

Baturin, G. 2003. Phosphorus cycle in the ocean. Lithology and Mineral Resources **38:** 101-119.

Baums, I. and others 2013. Genotypic variation influences reproductive success and thermal stress tolerance in the reef building coral, Acropora palmata. Coral Reefs **32:** 703-717.

Beardall, J., C. Sobrino, and S. Stojkovic. 2009. Interactions between the impacts of ultraviolet radiation, elevated CO2, and nutrient limitation on marine primary producers. Photochemical & Photobiological Sciences **8:** 1257-1265.

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

Béraud, E., F. Gevaert, C. Rottier, and C. Ferrier-Pagès. 2013. The response of the scleractinian coral Turbinaria reniformis to thermal stress depends on the nitrogen status of the coral holobiont. Journal of Experimental Biology **216:** 2665-2674.

Berkelmans, R., and M. J. Van Oppen. 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 of London B: Biological Sciences **273:** 2305-2312.

Bertheloot, J., P. Martre, and B. Andrieu. 2008. Dynamics of light and nitrogen distribution during grain filling within wheat canopy. Plant Physiology **148:** 1707-1720.

Björkman, K., and D. Karl. 1994. Bioavailability of inorganic and organic phosphorus compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaiian coastal waters. Marine ecology progress series. Oldendorf **111:** 265-273.

Björkman, O., and B. Demmig. 1987. Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. Planta **170:** 489-504.

Boisson, F., C. Richard, and C. Ferrier-Pages. 2004. Zinc uptake and behaviour in the scleractinian coral Stylophora pistillata. International Conference on Isotopes in Environmental Studies – Aquatic Forum 2004.

Bongaerts, P., T. Ridgway, E. Sampayo, and O. Hoegh-Guldberg. 2010. Assessing the 'deep reef refugia'hypothesis: focus on Caribbean reefs. Coral Reefs **29:** 309-327.

Bongiorni, L., S. Shafir, and B. Rinkevich. 2003. Effects of particulate matter released by a fish farm (Eilat, Red Sea) on survival and growth of Stylophora pistillata coral nubbins. Marine Pollution Bulletin **46:** 1120-1124.

Borell, E. M., and K. Bischof. 2008. Feeding sustains photosynthetic quantum yield of a scleractinian coral during thermal stress. Oecologia **157:** 593-601.

Boyer, S., J. White, A. Stier, and C. Osenberg. 2009. Effects of the fish anesthetic, clove oil (eugenol), on coral health and growth. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **369:** 53-57.

Brodie, J., M. Devlin, D. Haynes, and J. Waterhouse. 2011. Assessment of the eutrophication status of the Great Barrier Reef lagoon (Australia). Biogeochemistry **106:** 281-302.

Bronstein, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. Trends in Ecology & Evolution **9:** 214-217.

---. 2001. The costs of mutualism. American Zoologist **41:** 825-839.

Brown, B. 1997. Coral bleaching: causes and consequences. Coral reefs **16:** S129-S138.

Brown, B. and others 1999. Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. Coral Reefs **18:** 99-105.

Brucker, R. M., and S. R. Bordenstein. 2012. Speciation by symbiosis. Trends in ecology & evolution **27:** 443-451.

Bruno, J. F., L. E. Petes, C. Drew Harvell, and A. Hettinger. 2003. Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. Ecology letters **6:** 1056-1061.

Bruno, J. F., H. Sweatman, W. F. Precht, E. R. Selig, and V. G. Schutte. 2009. Assessing evidence of phase shifts from coral to macroalgal dominance on coral reefs. Ecology **90:** 1478-1484.

Burkepile, D. E. and others 2013. Nutrient supply from fishes facilitates macroalgae and suppresses corals in a Caribbean coral reef ecosystem. Scientific Reports **3**.

Burkepile, D. E., and M. E. Hay. 2006. Herbivore vs. nutrient control of marine primary producers: context-dependent effects. Ecology **87:** 3128-3139.

Burriesci, M. S., T. K. Raab, and J. R. Pringle. 2012. Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate–cnidarian symbiosis. Journal of Experimental Biology **215:** 3467-3477.

Byler, K. A., M. Carmi-Veal, M. Fine, and T. L. Goulet. 2013. Multiple symbiont acquisition strategies as an adaptive mechanism in the coral Stylophora pistillata. PloS one **8:** e59596.

Bythell, J. C. 1990. Nutrient Uptake in the Reef-building Coral Acropora Palmata at Natural Environmental Concentrations Mar. Ecol. Prog. Ser **68:** 65-69.

Canvin, D. T., and C. A. Atkins. 1974. Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: Effect of light, carbon dioxide and oxygen. Planta **116:** 207-224.

Capone, D. G., D. A. Bronk, M. R. Mulholland, and E. J. Carpenter. 2008. Nitrogen in the marine environment. Academic Press.

Carpenter, S. R., N. F. Caraco, D. L. Correll, R. W. Howarth, A. N. Sharpley, and V. H. Smith. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Ecological applications **8:** 559-568.

Chaitanya, K., D. Sundar, and A. R. Reddy. 2001. Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. Biologia Plantarum **44:** 379-384.

Champigny, M.-L., and C. Foyer. 1992. Nitrate Activation of Cytosolic Protein Kinases Diverts Photosynthetic Carbon from Sucrose to Amino Acid Biosynthesis Basis for a New Concept. Plant Physiology **100:** 7-12.

Champigny, M.-L., Q. Le Van, M.-H. Valadier, and A. Moyse. 1991. Effet immédiat des nitrates sur la photoassimilation du CO2 et la synthèse de saccharose dans les feuilles de Blé. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie **312:** 469-476.

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

Chauvin, A., V. Denis, and P. Cuet. 2011. Is the response of coral calcification to seawater acidification related to nutrient loading? Coral Reefs **30:** 911-923.

Cheal, A. and others 2010. Coral–macroalgal phase shifts or reef resilience: links with diversity and functional roles of herbivorous fishes on the Great Barrier Reef. Coral reefs **29:** 1005-1015.

Church, J. A. and others 2013. Sea level change. PM Cambridge University Press.
Coffroth, M. A., and S. R. Santos. 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus Symbiodinium. Protist **156:** 19-34.
Cohen, I., and Z. Dubinsky. 2015. Long term photoacclimation responses of the coral Stylophora pistillata to reciprocal deep to shallow transplantation: photosynthesis and calcification. Frontiers in Marine Science **2:** 45.
Coles, S., and P. Jokiel. 1977. Effects of temperature on photosynthesis and respiration in hermatypic corals. Marine biology **43:** 209-216.
Conley, D. J. and others 2009. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. Science **323:** 1014-1015.
Connolly, S., M. Lopez-Yglesias, and K. Anthony. 2012. Food availability promotes rapid recovery from thermal stress in a scleractinian coral. Coral Reefs **31:** 951-960.
Cooper, T. F. and others 2011a. Environmental factors controlling the distribution of Symbiodinium harboured by the coral Acropora millepora on the Great Barrier Reef. PLoS One **6:** e25536.
Cooper, T. F. and others 2011b. Symbiodinium genotypic and environmental controls on lipids in reef building corals. PLoS One **6:** e20434.
Cooper, T. F., and K. E. Ulstrup. 2009. Mesoscale variation in the photophysiology of the reef building coral Pocillopora damicornis along an environmental gradient. Estuarine, Coastal and Shelf Science **83:** 186-196.
Cooper, T. F. and others 2011c. Niche specialization of reef-building corals in the mesophotic zone: metabolic trade-offs between divergent Symbiodinium types. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **278:** 1840-1850.
Costa Jr, O., Z. Leao, M. Nimmo, and M. Attrill. 2000. Nutrification impacts on coral reefs from northern Bahia, Brazil, p. 307-315. Island, Ocean and Deep-Sea Biology. Springer.
Crandall, J., M. Teece, B. Estes, C. Manfrino, and J. Ciesla. 2016. Nutrient acquisition strategies in mesophotic hard corals using compound specific stable isotope analysis of sterols. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **474:** 133-141.
Crawford, N. M. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. The plant cell **7:** 859.
Crossland, C., and D. Barnes. 1974. The role of metabolic nitrogen in coral calcification. Marine Biology **28:** 325-332.
---. 1977. Nitrate assimilation enzymes from two hard corals, Acropora acuminata and Goniastrea australensis. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **57:** 151-157.
---. 1983. Dissolved nutrients and organic particulates in water flowing over coral reefs at Lizard Island. Marine and Freshwater Research **34:** 835-844.
Cui, L., R. Cao, J. Li, L. Zhang, and J. Wang. 2006. High temperature effects on ammonium assimilation in leaves of two Festuca arundinacea cultivars with different heat susceptibility. Plant growth regulation **49:** 127-136.
Cunning, R., and A. C. Baker. 2013. Excess algal symbionts increase the susceptibility of reef corals to bleaching. Nature Climate Change **3:** 259-262.
D'Elia, C., S. Domotor, and K. Webb. 1983. Nutrient uptake kinetics of freshly isolated zooxanthellae. Marine Biology **75:** 157-167.
D'elia, C., and K. Webb. 1977. The dissolved nitrogen flux of reef corals, p. 325-336. Proc.(3rd) Int. Coral Reef Symp.(Miami).
D'Elia, C. F., and W. J. Wiebe. 1990. Biogeochemical nutrient cycles in coral-reef ecosystems. Ecosystems of the world **25:** 49-74.

D'Angelo, C., and J. Wiedenmann. 2014. Impacts of nutrient enrichment on coral reefs: new perspectives and implications for coastal management and reef survival. Current Opinion in Environmental Sustainability **7:** 82-93.

D'Elia, C. F. 1977. The uptake and release of dissolved phosphorus by reef coralsl'2. Limnology and Oceanography **22:** 301-315.

---. 1988. The cycling of essential elements in coral reefs, p. 195-230. Concepts of ecosystem ecology. Springer.

Dagenais-Bellefeuille, S., and D. Morse. 2013. Putting the N in dinoflagellates. Frontiers in Microbiology **4:** 369.

Davies, P. S. 1989. Short-term growth measurements of corals using an accurate buoyant weighing technique. Marine biology **101:** 389-395.

---. 1991. Effect of daylight variations on the energy budgets of shallow-water corals. Marine Biology **108:** 137-144.

Davy, S. K., and C. B. Cook. 2001. The influence of 'host release factor'on carbon release by zooxanthellae isolated from fed and starved Aiptasia pallida (Verrill). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **129:** 487-494.

De'ath, G., and K. Fabricius. 2010. Water quality as a regional driver of coral biodiversity and macroalgae on the Great Barrier Reef. Ecological Applications **20:** 840-850.

Denton, G., L. P. Concepcion, H. Wood, and R. J. Morrison. 2005. Trace metals in sediments of four harbours in Guam. Marine pollution bulletin **50:** 1133-1141.

DeSalvo, M. K., S. Sunagawa, P. L. Fisher, C. R. Voolstra, R. Iglesias-Prieto, and M. Medina. 2010. Coral host transcriptomic states are correlated with Symbiodinium genotypes. Molecular ecology **19:** 1174-1186.

Devlin, M., and J. Brodie. 2005. Terrestrial discharge into the Great Barrier Reef Lagoon: nutrient behavior in coastal waters. Marine Pollution Bulletin **51:** 9-22.

Devol, A. H. 2003. Nitrogen cycle: solution to a marine mystery. Nature **422:** 575-576.

Díaz-Almeyda, E., P. Thomé, M. El Hafidi, and R. Iglesias-Prieto. 2011. Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in Symbiodinium. Coral Reefs **30:** 217-225.

Domotor, S., and C. D'Elia. 1984. Nutrient uptake kinetics and growth of zooxanthellae maintained in laboratory culture. Marine Biology **80:** 93-101.

Doney, S. C. and others 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. Marine Science **4:** 11-37.

Douglas, S., and P. Willatts. 1994. The relationship between musical ability and literacy skills. Journal of Research in reading **17:** 99-107.

Dubinsky, Z., and P. L. Jokiel. 1994. Ratio of energy and nutrient fluxes regulates symbiosis between zooxanthellae and corals. Pacific Science **48:** 313-324.

Dubinsky, Z., N. Stambler, M. Ben-Zion, L. McCloskey, L. Muscatine, and P. Falkowski. 1990. The effect of external nutrient resources on the optical properties and photosynthetic efficiency of Stylophora pistillata. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **239:** 231-246.

Dugdale, R., and F. Wilkerson. 1986. The use of 15N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans; experimental considerations. Limnology and Oceanography **31:** 673-689.

Dunn, J. G., P. W. Sammarco, and G. LaFleur. 2012. Effects of phosphate on growth and skeletal density in the scleractinian coral Acropora muricata: A controlled experimental approach. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **411:** 34-44.

Dunn, S. R., J. C. Bythell, M. D. Le Tissier, W. J. Burnett, and J. C. Thomason. 2002. Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone Aiptasia sp. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **272:** 29-53.

Durack, P. J., S. E. Wijffels, and R. J. Matear. 2012. Ocean salinities reveal strong global water cycle intensification during 1950 to 2000. science **336:** 455-458.

Einbinder, S., T. Mass, E. Brokovich, Z. Dubinsky, J. Erez, and D. Tchernov. 2009. Changes in morphology and diet of the coral Stylophora pistillata along a depth gradient. Mar Ecol Prog Ser **381:** 167-174.

Elser, J. J. 2012. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? Current opinion in biotechnology **23:** 833-838.

Elser, J. J. and others 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. Ecology letters **10:** 1135-1142.

Elser, J. J. and others 2000. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. Nature **408:** 578-580.

Enríquez, S., E. R. Méndez, and R. I. Prieto. 2005. Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. Limnology and Oceanography **50:** 1025-1032.

Erez, J. 1978. Vital effect on stable-isotope composition seen in foraminifera and coral skeletons. Nature **273:** 199-202.

Evenhuis, C., A. Lenton, N. Cantin, and J. Lough. 2015. Modelling coral calcification accounting for the impacts of coral bleaching and ocean acidification. Biogeosciences **12:** 2607-2630.

Ezzat, L., J.-F. Maguer, R. Grover, and C. Ferrier-Pagès. 2015. New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral–dinoflagellate symbiosis under NH4+ and NO3− supply. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **282**.

Fabricius, K., G. De'ath, L. McCook, E. Turak, and D. M. Williams. 2005. Changes in algal, coral and fish assemblages along water quality gradients on the inshore Great Barrier Reef. Marine pollution bulletin **51:** 384-398.

Fabricius, K. E. 2005. Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. Marine pollution bulletin **50:** 125-146.

---. 2011. Factors determining the resilience of coral reefs to eutrophication: a review and conceptual model, p. 493-505. Coral Reefs: An ecosystem in transition. Springer.

Fabricius, K. E., S. Cséke, C. Humphrey, and G. De'ath. 2013. Does trophic status enhance or reduce the thermal tolerance of scleractinian corals? A review, experiment and conceptual framework. PloS one **8:** e54399.

Fabricius, K. E. and others 2011. Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. Nature Climate Change **1:** 165-169.

Falkowski, P. G., and Z. Dubinsky. 1981. Light-shade adaptation of Stylophora pistillata, a hermatypic coral from the Gulf of Eilat. Nature **289:** 172-174.

Falkowski, P. G., Z. Dubinsky, L. Muscatine, and L. McCloskey. 1993. Population control in symbiotic corals. Bioscience **43:** 606-611.

Falkowski, P. G., Z. Dubinsky, L. Muscatine, and J. W. Porter. 1984. Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. Bioscience **34:** 705-709.

Falkowski, P. G., and Z. Kolber. 1990. Phytoplankton photosynthesis in the Atlantic Ocean as measured from a submersible pump and probe fluorometer in situ, p. 3717-3720. Current research in photosynthesis. Springer.

Faxneld, S., T. L. Jörgensen, and M. Tedengren. 2010. Effects of elevated water temperature, reduced salinity and nutrient enrichment on the metabolism of the coral Turbinaria mesenterina. Estuarine, Coastal and Shelf Science **88:** 482-487.

Ferrier-Pagès, C., and J.-P. Gattuso. 1998. Biomass, production and grazing rates of pico-and nanoplankton in coral reef waters (Miyako Island, Japan). Microbial Ecology **35:** 46-57.

Ferrier-Pages, C., J.-P. Gattuso, S. Dallot, and J. Jaubert. 2000. Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral Stylophora pistillata. Coral Reefs **19:** 103-113.

Ferrier-Pagès, C., C. Rottier, E. Beraud, and O. Levy. 2010. Experimental assessment of the feeding effort of three scleractinian coral species during a thermal stress: Effect on the rates of photosynthesis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **390:** 118-124.

Ferrier-Pagès, C., V. Schoelzke, J. Jaubert, L. Muscatine, and O. Hoegh-Guldberg. 2001. Response of a scleractinian coral, Stylophora pistillata, to iron and nitrate enrichment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **259:** 249-261.

Ferrier-Pages, C., J. Witting, E. Tambutté, and K. Sebens. 2003. Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral Stylophora pistillata. Coral Reefs **22:** 229-240.

Ferrier-Pagès, C., C. Godinot, C. D'Angelo, J. Wiedenmann, and R. Grover. 2016. Phosphorus metabolism of reef organisms with algal symbionts. Ecological Monographs.

Finney, J. C., D. T. Pettay, E. M. Sampayo, M. E. Warner, H. A. Oxenford, and T. C. LaJeunesse. 2010. The relative significance of host–habitat, depth, and geography on the ecology, endemism, and speciation of coral endosymbionts in the genus Symbiodinium. Microbial Ecology **60:** 250-263.

Fitt, W., F. McFarland, M. Warner, and G. Chilcoat. 2000. Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. Limnology and oceanography **45:** 677-685.

Francis, C. A., J. M. Beman, and M. M. Kuypers. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. The ISME journal **1:** 19-27.

Franzisket, L. 1974. Nitrate uptake by reef corals. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie **59:** 1-7.

Freudenthal, H. D. 1962. Symbiodinium gen. nov. and Symbiodinium microadriaticum sp. nov., a Zooxanthella: Taxonomy, Life Cycle, and Morphology. The Journal of Protozoology **9:** 45-52.

Frisch, A. J., K. E. Ulstrup, and J.-P. A. Hobbs. 2007. The effects of clove oil on coral: an experimental evaluation using Pocillopora damicornis (Linnaeus). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **345:** 101-109.

Furla, P., I. Galgani, I. Durand, and D. Allemand. 2000. Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. Journal of Experimental Biology **203:** 3445-3457.

Furla, P., S. Richier, and D. Allemand. 2011. Physiological adaptation to symbiosis in cnidarians, p. 187-195. Coral Reefs: an Ecosystem in Transition. Springer.

Furnas, M., A. Mitchell, M. Skuza, and J. Brodie. 2005. In the other 90%: phytoplankton responses to enhanced nutrient availability in the Great Barrier Reef Lagoon. Marine pollution bulletin **51:** 253-265.

Furnas, M., A. W. Mitchell, J. Wellington, and B. Brady. 1988. Dissolved and particulate nutrients in waters of the Whitsunday Island Group. Report prepared for the Great Barrier Reef Marine Park Authority, Townsville.

Furnas, M. M. 1991. The nutrient status of Great Barrier Reef waters, p. 162-179. Land use patterns and nutrient loading of the Great Barrier Reef region. Proceedings of the workshop held at James Cook Univeristy of North Queensland, 17-18 November.

Furnas, M. M., and A. A. Mitchell. 1988. Shelf-scale estimates of phytoplankton primary production in the Great Barrier Reef, p. 557-562. Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium, Townsville, Australia 8-12 August

Gao, Y., G. J. Smith, and R. S. Alberte. 2000. Temperature dependence of nitrate reductase activity in marine phytoplankton: biochemical analysis and ecological implications. Journal of phycology **36:** 304-313.

Garren, M. 2016. Microbial ecology: Algae feed a shift on coral reefs. Nature Microbiology **1:** 16061.

Garrison, V. H. and others 2003. African and Asian dust: from desert soils to coral reefs. BioScience **53:** 469-480.

Gates, R. D., O. Hoegh-Guldberg, M. J. McFall-Ngai, K. Y. Bil, and L. Muscatine. 1995. Free amino acids exhibit anthozoan" host factor" activity: They induce the release of photosynthate from symbiotic dinoflagellates in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences **92:** 7430-7434.

Gattuso, J.-P. and others 2015. Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO2 emissions scenarios. Science **349:** aac4722.

Genin, A., B. Lazar, and S. Brenner. 1995. Vertical mixing and coral death in the Red Sea following the eruption of Mount Pinatubo. Nature **377:** 507-510.

Genty, B., J.-M. Briantais, and N. R. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **990:** 87-92.

Gil, M. A., B. Renfro, B. Figueroa-Zavala, I. Penié, and K. H. Dunton. 2015. Rapid tourism growth and declining coral reefs in Akumal, Mexico. Marine Biology **162:** 2225-2233.

Gilles, R., and M. Anctil. 2006. Physiologie animale. De Boeck Supérieur.

Glibert, P. M., and J. J. McCarthy. 1984. Uptake and assimilation of ammonium and nitrate by phytoplankton: indices of nutritional status for natural assemblages. Journal of plankton research **6:** 677-697.

Glynn, P. 1993. Coral reef bleaching: ecological perspectives. Coral reefs **12:** 1-17.

Glynn, P. W. 2012. Global warming and widespread coral mortality: evidence of first coral reef extinctions, p. 103-119. Saving a Million Species. Springer.

Godinot, C. 2012. Absorption et devenir du phosphore au sein de la symbiose corallienne. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

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

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

Godinot, C., C. Ferrier-Pagès, S. Sikorski, and R. Grover. 2013. Alkaline phosphatase activity of reef-building corals. Limnology and Oceanography **58:** 227-234.

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

Godinot, C., F. Houlbrèque, R. Grover, and C. Ferrier-Pagès. 2011c. Coral uptake of inorganic phosphorus and nitrogen negatively affected by simultaneous changes in temperature and pH. PLoS One **6:** e25024.

Godinot, C., A. Tribollet, R. Grover, and C. Ferrier-Pages. 2012. Bioerosion by euendoliths decreases in phosphate-enriched skeletons of living corals. Biogeosciences Discussions **9:** 2425-2444.

Goff, L. J. 1982. Symbiosis and parasitism: another viewpoint. BioScience **32:** 255-256.

Goldberg, W. M. 2013. The biology of reefs and reef organisms. University of Chicago Press.

Gorbunov, M. Y., Z. S. Kolber, M. P. Lesser, and P. G. Falkowski. 2001. Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. Limnology and Oceanography **46:** 75-85.

Goreau, T. F., N. I. Goreau, and C. Yonge. 1971. Reef corals: autotrophs or heterotrophs? The Biological Bulletin **141:** 247-260.

Gori, A., S. Reynaud, C. Orejas, and C. Ferrier-Pagès. 2015. The influence of flow velocity and temperature on zooplankton capture rates by the cold-water coral Dendrophyllia cornigera. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **466:** 92-97.

Govers, L. L., L. P. Lamers, T. J. Bouma, J. H. de Brouwer, and M. M. van Katwijk. 2014. Eutrophication threatens Caribbean seagrasses–An example from Curaçao and Bonaire. Marine pollution bulletin **89:** 481-486.

Graham, N. A. J., S. Jennings, M. A. MacNeil, D. Mouillot, and S. K. Wilson. 2015. Predicting climate-driven regime shifts versus rebound potential in coral reefs. Nature **518:** 94-97.

Grassé, P. 1987. Cnidaires-Anthozoaires. Traité de Zoologie (Anatomie, Systématique, Biologie). Masson, Paris**:** 859.

Gregg, A. and others 2013. Biological oxygen demand optode analysis of coral reef-associated microbial communities exposed to algal exudates. PeerJ **1:** e107.

Grottoli, A. G. 2002. Effect of light and brine shrimp on skeletal δ 13 C in the Hawaiian coral Porites compressa: a tank experiment. Geochimica et Cosmochimica Acta **66:** 1955-1967.

Grottoli, A. G., L. J. Rodrigues, and J. E. Palardy. 2006. Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. Nature **440:** 1186-1189.

Grover, R., J.-F. Maguer, D. Allemand, and C. Ferrier-Pages. 2003. Nitrate uptake in the scleractinian coral Stylophora pistillata. Limnology and oceanography **48:** 2266-2274.

Grover, R., J.-F. Maguer, D. Allemand, and C. Ferrier-Pagès. 2006. Urea uptake by the scleractinian coral Stylophora pistillata. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **332:** 216-225.

---. 2008. Uptake of dissolved free amino acids by the scleractinian coral Stylophora pistillata. Journal of Experimental Biology **211:** 860-865.

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

Guerrero, M. G., J. M. Vega, and M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annual Review of Plant Physiology **32:** 169-204.

Guo, S., Y. Zhou, Q. Shen, and F. Zhang. 2007. Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants-growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. Plant Biology **9:** 21-29.

Guzmán, H., J. Cortés, P. Glynn, and R. Richmond. 1990. Coral mortality associated with dinoflagellate blooms in the eastern Pacific(Costa Rica and Panama). Marine ecology progress series. Oldendorf **60:** 299-303.

Haas, A. F., M. S. Naumann, U. Struck, C. Mayr, M. el-Zibdah, and C. Wild. 2010. Organic matter release by coral reef associated benthic algae in the Northern Red Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **389:** 53-60.

Haas, A. F. and others 2011. Effects of coral reef benthic primary producers on dissolved organic carbon and microbial activity. PloS one **6:** e27973.

Hansen, J., M. Sato, R. Ruedy, K. Lo, D. W. Lea, and M. Medina-Elizade. 2006. Global temperature change. Proceedings of the National Academy of Sciences **103:** 14288-14293.

Harrison, P., and S. Ward. 2001. Elevated levels of nitrogen and phosphorus reduce fertilisation success of gametes from scleractinian reef corals. Marine Biology **139:** 1057-1068.

Hinderstein, L. and others 2010. Theme section on "Mesophotic coral ecosystems: characterization, ecology, and management". Coral Reefs **29:** 247-251.

Hoadley, K. D. and others 2015. Physiological response to elevated temperature and pCO2 varies across four Pacific coral species: Understanding the unique host+symbiont response. Scientific Reports **5:** 18371.

Hoegh-Guldberg, O. 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. Marine and freshwater research **50:** 839-866.

---. 2014. Coral reef sustainability through adaptation: glimmer of hope or persistent mirage? Current Opinion in Environmental Sustainability **7:** 127-133.

Hoegh-Guldberg, O. and others 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. science **318:** 1737-1742.

Hoegh-Guldberg, O., and G. J. Smith. 1989. The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals Stylophora pistillata Esper and Seriatopora hystrix Dana. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **129:** 279-303.

Holbrook, S. J., A. J. Brooks, R. J. Schmitt, and H. L. Stewart. 2008. Effects of sheltering fish on growth of their host corals. Marine Biology **155:** 521-530.

Holcomb, M., D. C. McCorkle, and A. L. Cohen. 2010. Long-term effects of nutrient and CO 2 enrichment on the temperate coral Astrangia poculata (Ellis and Solander, 1786). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **386:** 27-33.

Holmes, R. M., A. Aminot, R. Kérouel, B. A. Hooker, and B. J. Peterson. 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **56:** 1801-1808.

Hönisch, B., N. G. Hemming, D. Archer, M. Siddall, and J. F. McManus. 2009. Atmospheric carbon dioxide concentration across the mid-Pleistocene transition. Science **324:** 1551-1554.

Hoogenboom, M., E. Beraud, and C. Ferrier-Pagès. 2010a. Relationship between symbiont density and photosynthetic carbon acquisition in the temperate coral Cladocora caespitosa. Coral Reefs **29:** 21-29.

Hoogenboom, M., R. Rodolfo-Metalpa, and C. Ferrier-Pagès. 2010b. Co-variation between autotrophy and heterotrophy in the Mediterranean coral Cladocora caespitosa. The Journal of experimental biology **213:** 2399-2409.

Houlbreque, F., and C. Ferrier-Pagès. 2009. Heterotrophy in tropical scleractinian corals. Biological Reviews **84:** 1-17.

Houlbrèque, F., E. Tambutté, D. Allemand, and C. Ferrier-Pagès. 2004a. Interactions between zooplankton feeding, photosynthesis and skeletal growth in the scleractinian coral Stylophora pistillata. Journal of Experimental Biology **207:** 1461-1469.

Houlbrèque, F., E. Tambutté, C. Richard, and C. Ferrier-Pagès. 2004b. Importance of a micro-diet for scleractinian corals. Marine Ecology Progress Series **282:** 151-160.

Howarth, R. W. and others 1996. Regional nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences, p. 75-139. Nitrogen cycling in the North Atlantic Ocean and its watersheds. Springer.

Howells, E., V. Beltran, N. Larsen, L. Bay, B. Willis, and M. Van Oppen. 2012. Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. Nature Climate Change **2:** 116-120.

Hughes, T. P. and others 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. science **301:** 929-933.

Hume, B. C. and others 2016. Ancestral genetic diversity associated with the rapid spread of stress-tolerant coral symbionts in response to Holocene climate change. Proceedings of the National Academy of Sciences **113:** 4416-4421.

Huppe, H., and D. Turpin. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. Annual review of plant biology **45:** 577-607.

Iglesias-Prieto, R., and R. Trench. 1997. Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses, p. 1319-1324. Proc 8th int coral Reef Symp.

Imbs, A., and I. Yakovleva. 2012. Dynamics of lipid and fatty acid composition of shallow-water corals under thermal stress: an experimental approach. Coral Reefs **31:** 41-53.

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

Jacobson, L. M., P. J. Edmunds, E. B. Muller, and R. M. Nisbet. 2016. The implications of reduced metabolic rate in a resource-limited coral. Journal of Experimental Biology**:** jeb. 136044.

Jantzen, C., C. Wild, M. Rasheed, M. El-Zibdah, and C. Richter. 2010. Enhanced pore-water nutrient fluxes by the upside-down jellyfish Cassiopea sp. in a Red Sea coral reef. Marine Ecology Progress Series **411:** 117-125.

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

Johnson, A., and M. Harrison. 2015. The increasing problem of nutrient runoff on the coast. American Scientist **103:** 98.

Johnson, M. D. 2011. Acquired phototrophy in ciliates: a review of cellular interactions and structural adaptations1. Journal of Eukaryotic Microbiology **58:** 185-195.

Johnson, N. C., D. L. Rowland, L. Corkidi, L. M. Egerton-Warburton, and E. B. Allen. 2003. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. Ecology **84:** 1895-1908.

Jones, A., and R. Berkelmans. 2010. Potential costs of acclimatization to a warmer climate: growth of a reef coral with heat tolerant vs. sensitive symbiont types. PLoS One **5:** e10437.

Jones, A. M., R. Berkelmans, M. J. van Oppen, J. C. Mieog, and W. Sinclair. 2008. A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **275:** 1359-1365.

Jones, R., O. Hoegh-Guldberg, A. Larkum, and U. Schreiber. 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO2 fixation mechanism in zooxanthellae. Plant, Cell & Environment **21:** 1219-1230.

Jones, R. J., and D. Yellowlees. 1997. Regulation and control of intracellular algae (= zooxanthellae) in hard corals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **352:** 457-468.

Kahng, S. and others 2010. Community ecology of mesophotic coral reef ecosystems. Coral Reefs **29:** 255-275.

Karako-Lampert, S., D. Katcoff, Y. Achituv, Z. Dubinsky, and N. Stambler. 2004. Do clades of symbiotic dinoflagellates in scleractinian corals of the Gulf of Eilat (Red Sea) differ from those of other coral reefs? Journal of experimental marine biology and ecology **311:** 301-314.

Kim, H.-J. and others 2015. Growth promotion of Chlorella vulgaris by modification of nitrogen source composition with symbiotic bacteria, Microbacterium sp. HJ1. biomass and bioenergy **74:** 213-219.

Kinsey, D., and P. Davies. 1979a. Carbon turnover, calcification and growth in coral reefs. Biogeochemical cycling of mineral forming elements. Elsevier, Amsterdam**:** 131-162.

Kinsey, D. W., and P. J. Davies. 1979b. Effects of elevated nitrogen and phosphorus on coral reef growth. Limnology and Oceanography **24**.

Kleypas, J. A., and C. Langdon. 2006. Coral reefs and changing seawater carbonate chemistry. Coral reefs and climate change: science and management**:** 73-110.

Kleypas, J. A., J. W. McManus, and L. A. Meñez. 1999. Environmental limits to coral reef development: where do we draw the line? American Zoologist **39:** 146-159.

Knowlton, N., R. E. Brainard, R. Fisher, M. Moews, L. Plaisance, and M. J. Caley. 2010. Coral reef biodiversity. Life in the World's Oceans: Diversity Distribution and Abundance**:** 65-74.

Koop, K. and others 2001. ENCORE: the effect of nutrient enrichment on coral reefs. Synthesis of results and conclusions. Marine pollution bulletin **42:** 91-120.

Kopp, C. and others 2013. Highly dynamic cellular-level response of symbiotic coral to a sudden increase in environmental nitrogen. MBio **4:** e00052-00013.

Korbee, N., M. Teresa Mata, and F. L. Figueroa. 2010. Photoprotection mechanisms against ultraviolet radiation in Heterocapsa sp.(Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability: Mycosporine-like amino acids vs. xanthophyll cycle. Limnology and Oceanography **55:** 899-908.

Kremien, M., U. Shavit, T. Mass, and A. Genin. 2013. Benefit of pulsation in soft corals. Proceedings of the National Academy of Sciences **110:** 8978-8983.

Kroeker, K. J. and others 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. Global change biology **19:** 1884-1896.

LaJeunesse, T. and others 2004. Closely related Symbiodinium spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. Marine Ecology Progress Series **284:** 147-161.

LaJeunesse, T., H. R. Bonilla, M. Warner, M. Wills, G. Schmidt, and W. Fitt. 2008. Specificity and stability in high latitude eastern Pacific coral-algal symbioses. Limnology and Oceanography **53:** 719-727.

LaJeunesse, T. C. 2001. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus Symbiodinium using the ITS region: in search of a "species" level marker. Journal of Phycology **37:** 866-880.

LaJeunesse, T. C. and others 2010. Host–symbiont recombination versus natural selection in the response of coral–dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **277:** 2925-2934.

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.

Langdon, C., and M. Atkinson. 2005. Effect of elevated pCO2 on photosynthesis and calcification of corals and interactions with seasonal change in temperature/irradiance and nutrient enrichment. Journal of Geophysical Research: Oceans **110**.

Lapointe, B. E. 1997. Nutrient thresholds for bottom-up control of macroalgal blooms and coral reefs. Limnol. Oceanogr **44:** 1586-1592.

Lapointe, B. E., P. J. Barile, M. M. Littler, and D. S. Littler. 2005. Macroalgal blooms on southeast Florida coral reefs: II. Cross-shelf discrimination of nitrogen sources indicates widespread assimilation of sewage nitrogen. Harmful Algae **4:** 1106-1122.

Lapointe, B. E., P. J. Barile, and W. R. Matzie. 2004. Anthropogenic nutrient enrichment of seagrass and coral reef communities in the Lower Florida Keys: discrimination of local versus regional nitrogen sources. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **308:** 23-58.

Lapointe, B. E., and W. R. Matzie. 1996. Effects of stormwater nutrient discharges on eutrophication processes in nearshore waters of the Florida Keys. Estuaries **19:** 422-435.

Larkum, A., I. Kennedy, and W. Muller. 1988. Nitrogen fixation on a coral reef. Marine Biology **98:** 143-155.

Le Corre, P., and P. Tréguer. 1978. Dosage de l'ammonium dans l'eau de mer: comparaison entre deux méthodes d'analyse automatique. Journal du Conseil **38:** 147-153.

Leal, M. C., K. Hoadley, D. T. Pettay, A. Grajales, R. Calado, and M. E. Warner. 2015. Symbiont type influences trophic plasticity of a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. The Journal of experimental biology **218:** 858-863.

Leggat, W., O. Hoegh-Guldberg, S. Dove, and D. Yellowlees. 2007. Analysis of an EST library from the dinoflagellate (Symbiodinium sp.) symbiont of reef-building corals1. Journal of Phycology **43:** 1010-1021.

Leichter, J. J., and S. J. Genovese. 2006. Intermittent upwelling and subsidized growth of the scleractinian coral Madracis mirabilis on the deep fore-reef slope of Discovery Bay, Jamaica. Marine Ecology Progress Series **316:** 95-103.

Lesser, M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Annu. Rev. Physiol. **68:** 253-278.

Lesser, M. P., L. I. Falcón, A. Rodríguez-Román, S. Enríquez, O. Hoegh-Guldberg, and R. Iglesias-Prieto. 2007. Nitrogen fixation by symbiotic cyanobacteria provides a source of nitrogen for the scleractinian coral Montastraea cavernosa. Marine Ecology Progress Series **346:** 143-152.

Lesser, M. P., and J. H. Farrell. 2004. Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. Coral reefs **23:** 367-377.

Lesser, M. P., C. Mazel, D. Phinney, and C. S. Yentsch. 2000. Light absorption and utilization by colonies of the congeneric hermatypic corals Montastraea faveolata and Montastraea cavernosa. Limnology and Oceanography **45:** 76-86.

Lesser, M. P., M. Slattery, and J. J. Leichter. 2009. Ecology of mesophotic coral reefs. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **375:** 1-8.

Lesser, M. P., M. Slattery, M. Stat, M. Ojimi, R. D. Gates, and A. Grottoli. 2010. Photoacclimatization by the coral Montastraea cavernosa in the mesophotic zone: light, food, and genetics. Ecology **91:** 990-1003.

Levy, O., Y. Achituv, Y. Yacobi, Z. Dubinsky, and N. Stambler. 2006. Dieltuning'of coral metabolism: physiological responses to light cues. Journal of experimental biology **209:** 273-283.

Levy, O., L. Mizrahi, N. Chadwick-Furman, and Y. Achituv. 2001. Factors controlling the expansion behavior of Favia favus (Cnidaria: Scleractinia): effects of light, flow, and planktonic prey. The Biological Bulletin **200:** 118-126.

Lillo, C. 2008. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. Biochemical Journal **415:** 11-19.

Lirman, D., and P. Fong. 2007. Is proximity to land-based sources of coral stressors an appropriate measure of risk to coral reefs? An example from the Florida Reef Tract. Marine Pollution Bulletin **54:** 779-791.

Little, A. F., M. J. Van Oppen, and B. L. Willis. 2004. Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. Science **304:** 1492-1494.

Littler, M. M., D. S. Littler, and B. L. Brooks. 2006. Harmful algae on tropical coral reefs: bottom-up eutrophication and top-down herbivory. Harmful algae **5:** 565-585.

Littman, R. A., D. G. Bourne, and B. L. Willis. 2010. Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with Symbiodinium type on the same coral host. Molecular Ecology **19:** 1978-1990.

Lomas, M. W., and P. M. Glibert. 1999. Temperature regulation of nitrate uptake: a novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. Limnology and Oceanography **44:** 556-572.

Lomas, M. W., and F. Lipschultz. 2006. Forming the primary nitrite maximum: Nitrifiers or phytoplankton? Limnology and Oceanography **51:** 2453-2467.

Lopez, G. R., and J. S. Levinton. 1987. Ecology of deposit-feeding animals in marine sediments. Quarterly Review of Biology **62:** 235-260.

Loram, J., H. Trapido-Rosenthal, and A. Douglas. 2007. Functional significance of genetically different symbiotic algae Symbiodinium in a coral reef symbiosis. Molecular Ecology **16:** 4849-4857.

Loya, Y., H. Lubinevsky, M. Rosenfeld, and E. Kramarsky-Winter. 2004. Nutrient enrichment caused by in situ fish farms at Eilat, Red Sea is detrimental to coral reproduction. Marine Pollution Bulletin **49:** 344-353.

Luo, Y.-J. and others 2009. Ratiometric imaging of gastrodermal lipid bodies in coral–dinoflagellate endosymbiosis. Coral Reefs **28:** 289-301.

Macdonald, A. H., E. M. Sampayo, T. Ridgway, and M. H. Schleyer. 2008. Latitudinal symbiont zonation in Stylophora pistillata from southeast Africa. Marine Biology **154:** 209-217.

MacIsaac, J., and R. Dugdale. 1972. Interactions of light and inorganic nitrogen in controlling nitrogen uptake in the sea. Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts **19:** 209-232.

Maguer, J.-F., S. L'Helguen, and M. Waeles. 2015. Effects of mixing-induced irradiance fluctuations on nitrogen uptake in size-fractionated coastal phytoplankton communities. Estuarine, Coastal and Shelf Science **154:** 1-11.

Marques, A. C., and A. G. Collins. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. Invertebrate Biology **123:** 23-42.

Marubini, F., and P. Davies. 1996. Nitrate increases zooxanthellae population density and reduces skeletogenesis in corals. Marine Biology **127:** 319-328.

Mass, T. and others 2007. Photoacclimation of Stylophora pistillata to light extremes: metabolism and calcification. Marine Ecology Progress Series **334:** 93-102.

Mass, T. and others 2010. The spectral quality of light is a key driver of photosynthesis and photoadaptation in Stylophora pistillata colonies from different depths in the Red Sea. Journal of Experimental Biology **213:** 4084-4091.

McCloskey, L., and L. Muscatine. 1984. Production and respiration in the Red Sea coral Stylophora pistillata as a function of depth. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **222:** 215-230.

McCook, L., J. Jompa, and G. Diaz-Pulido. 2001. Competition between corals and algae on coral reefs: a review of evidence and mechanisms. Coral reefs **19:** 400-417.

Meeder, E. and others 2012. Nitrite dynamics in the open ocean-clues from seasonal and diurnal variations. Marine Ecology Progress Series **453**.

Meyer, J. L., and E. T. Schultz. 1985. Migrating haemulid fishes as a source of nutrients and organic matter on coral reefs. Limnology and Oceanography **30:** 146-156.

Meyer, J. L., E. T. Schultz, and G. S. Helfman. 1983. Fish schools: an asset to corals. Science **220:** 1047-1049.

Mieog, J. C., M. J. van Oppen, N. E. Cantin, W. T. Stam, and J. L. Olsen. 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., and D. Yellowlees. 1989. Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine cnidarians: a critical review. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **237:** 109-125.

Mioche, D., and P. Cuet. 1999. Métabolisme du carbone, des carbonates et des sels nutritifs en saison chaude, sur un récif frangeant soumis à une pression anthropique (île de la Réunion, océan Indien). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIA-Earth and Planetary Science **329:** 53-59.

Moberg, F., and C. Folke. 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. Ecological economics **29:** 215-233.

Moore, C. and others 2013. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. Nature Geoscience **6:** 701-710.

Mora, C. 2008. A clear human footprint in the coral reefs of the Caribbean. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **275:** 767-773.

Muller-Parker, G., C. Cook, and C. D'Elia. 1990. Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone Aiptasia pallida. Marine ecology progress series. Oldendorf **60:** 283-290.

---. 1994. Elemental composition of the coral Pocillopora damicornis exposed to elevated seawater ammonium.

Muller-Parker, G., and C. D'Elia. 1997. Interactions between corals and their symbiotic algae. 96-113. Life and death of coral reefs. Chapman and Hall, Nueva York.

Mumby, P. J. 2009. Phase shifts and the stability of macroalgal communities on Caribbean coral reefs. Coral Reefs **28:** 761-773.

Muscatine, L. 1967. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and Tridacna and its control by the host. Science **156:** 516-519.

---. 1973. Nutrition of corals. Biology and geology of coral reefs **2:** 77-115.

Muscatine, L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. Ecosystems of the world **25:** 75-87.

Muscatine, L., and E. Cernichiari. 1969. Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. The Biological Bulletin **137:** 506-523.

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

Muscatine, L., P. Falkowski, Z. Dubinsky, P. Cook, and L. McCloskey. 1989. The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **236:** 311-324.

Muscatine, L., P. Falkowski, J. Porter, and Z. Dubinsky. 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 B: Biological Sciences **222:** 181-202.

Muscatine, L., C. Ferrier-Pages, A. Blackburn, R. Gates, G. Baghdasarian, and D. Allemand. 1998. Cell-specific density of symbiotic dinoflagellates in tropical anthozoans. Coral Reefs **17:** 329-337.

Muscatine, L., H. Masuda, and R. Burnap. 1979. Ammonium uptake by symbiotic and aposymbiotic reef corals. Bulletin of Marine Science **29:** 572-575.

Muscatine, L., L. McCloskey, and R. Marian. 1981. Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration1. Oceanography **26**.

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

Naumann, M. S., V. N. Bednarz, S. C. Ferse, W. Niggl, and C. Wild. 2015. Monitoring of coastal coral reefs near Dahab (Gulf of Aqaba, Red Sea) indicates local eutrophication as potential cause for change in benthic communities. Environmental monitoring and assessment **187:** 1-14.

Nir, O., D. Gruber, S. Einbinder, S. Kark, and D. Tchernov. 2011. Changes in scleractinian coral Seriatopora hystrix morphology and its endocellular Symbiodinium characteristics along a bathymetric gradient from shallow to mesophotic reef. Coral Reefs **30:** 1089-1100.

Nir, O., D. F. Gruber, E. Shemesh, E. Glasser, and D. Tchernov. 2014. Seasonal mesophotic coral bleaching of Stylophora pistillata in the Northern Red Sea. PloS one **9:** e84968.

Nordemar, I., M. Nyström, and R. Dizon. 2003. Effects of elevated seawater temperature and nitrate enrichment on the branching coral Porites cylindrica in the absence of particulate food. Marine Biology **142:** 669-677.

Norström, A. V., M. Nyström, J. Lokrantz, and C. Folke. 2009. Alternative states on coral reefs: beyond coral-macroalgal phase shifts. Mar Ecol Prog Ser **376:** 295-306.

Norton, J. H., M. A. Shepherd, H. M. Long, and W. K. Fitt. 1992. The zooxanthellal tubular system in the giant clam. The Biological Bulletin **183:** 503-506.

O'Leary, B., and W. Plaxton. 2015. 16 The Central Role of Glutamate and Aspartate in the Post-translational Control of Respiration and Nitrogen Assimilation in Plant Cells. *In* D. M. J.F.P [ed.], Amino acids in higher plants.

Odum, H. T., and E. P. Odum. 1955. Trophic structure and productivity of a windward coral reef community on Eniwetok Atoll. Ecological Monographs **25:** 291-320.

Palardy, J. E., A. G. Grottoli, and K. A. Matthews. 2005. Effects of upwelling, depth, morphology and polyp size on feeding in three species of Panamanian corals. Marine Ecology Progress Series **300:** 79-89.

---. 2006. Effect of naturally changing zooplankton concentrations on feeding rates of two coral species in the Eastern Pacific. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **331:** 99-107.

Palardy, J. E., L. J. Rodrigues, and A. G. Grottoli. 2008. The importance of zooplankton to the daily metabolic carbon requirements of healthy and bleached corals at two depths. Journal of experimental marine biology and ecology **367:** 180-188.

Pastore, M. 2014. The impact of nitrogen eutrophication on caribbean coral reefs: A review. Concept **37**.

Patterson, K., T. Cakmak, A. Cooper, I. Lager, A. G. Rasmusson, and M. A. Escobar. 2010. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium-and nitrate-supplied plants. Plant, cell & environment **33:** 1486-1501.

Pawlik, J. R., D. E. Burkepile, and R. V. Thurber. 2016. A Vicious Circle? Altered Carbon and Nutrient Cycling May Explain the Low Resilience of Caribbean Coral Reefs. BioScience**:** biw047.

Pernice, M. and others 2015. A nanoscale secondary ion mass spectrometry study of dinoflagellate functional diversity in reef-building corals. Environmental microbiology **17:** 3570-3580.

Pernice, M. and others 2012. A single-cell view of ammonium assimilation in coral–dinoflagellate symbiosis. The ISME journal **6:** 1314-1324.

Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. Bioscience **24:** 499-504.

R Development Core Team. 2015. R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rädecker, N., C. Pogoreutz, C. R. Voolstra, J. Wiedenmann, and C. Wild. 2015. Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning? Trends in microbiology **23:** 490-497.

Rahav, O., Z. Dubinsky, Y. Achituv, and P. Falkowski. 1989. Ammonium metabolism in the zooxanthellate coral, Stylophora pistillata. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **236:** 325-337.

Ralph, P. J., and R. Gademann. 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. Aquatic botany **82:** 222-237.

Raven, J. A., B. Wollenweber, and L. L. Handley. 1992. A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. New Phytologist **121:** 19-32.

Rees, T. 1991. Are symbiotic algae nutrient deficient? Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **243:** 227-233.

Reiss, Z., and L. Hottinger. 2012. The Gulf of Aqaba: ecological micropaleontology. Springer Science & Business Media.

Renegar, D. A., and B. M. Riegl. 2005. Effect of nutrient enrichment and elevated CO2 partial pressure on growth rate of Atlantic scleractinian coral Acropora cervicornis. Mar Ecol Prog Ser **293:** 69-76.

Rhein, M. a. and others 2013. Observations: ocean. Climate change**:** 255-315.

Richmond, R. H., and C. L. Hunter. 1990. Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the Tropical Pacific, and the Red Sea. Marine ecology progress series. Oldendorf **60:** 185-203.

Riegl, B., and W. E. Piller. 2003. Possible refugia for reefs in times of environmental stress. International Journal of Earth Sciences **92:** 520-531.

Roberts, J., P. Davies, L. Fixter, and T. Preston. 1999. Primary site and initial products of ammonium assimilation in the symbiotic sea anemone Anemonia viridis. Marine Biology **135:** 223-236.

Rodolfo-Metalpa, R., C. Richard, D. Allemand, C. N. Bianchi, C. Morri, and C. Ferrier-Pages. 2006. Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals Cladocora caespitosa and Oculina patagonica to elevated temperatures. Marine Biology **150:** 45-55.

Rodrigues, L. J., and A. G. Grottoli. 2007. Energy reserves and metabolism as indicators of coral recovery from bleaching. Limnology and oceanography **52:** 1874-1882.

Rogers, C. S. 1979. The effect of shading on coral reef structure and function. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **41:** 269-288.

Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam, and N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Marine Ecology Progress Series **243:** 1-10.

Rohwer, F., M. Youle, and D. Vosten. 2010. Coral reefs in the microbial seas. Plaid Press United States.

Rosset, S., C. D'Angelo, and J. Wiedenmann. 2015. Ultrastructural Biomarkers in Symbiotic Algae Reflect the Availability of Dissolved Inorganic Nutrients and Particulate Food to the Reef Coral Holobiont. Frontiers in Marine Science **2:** 103.

Roth, M. S. 2014. The engine of the reef: photobiology of the coral–algal symbiosis. Frontiers in microbiology **5**.

Roth, M. S., R. Goericke, and D. D. Deheyn. 2012. Cold induces acute stress but heat is ultimately more deleterious for the reef-building coral Acropora yongei. Scientific Reports **2:** 240.

Rouzé, H., G. Lecellier, M.-J. Langlade, S. Planes, and V. Berteaux-Lecellier. 2015. Fringing reefs exposed to different levels of eutrophication and sedimentation can support similar benthic communities. Marine pollution bulletin **92:** 212-221.

Rowan, R. 1998. Review—diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. Journal of Phycology **34:** 407-417.

Rowan, R., and N. Knowlton. 1995. Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences **92:** 2850-2853.

Rowan, R., N. Knowlton, A. Baker, and J. Jara. 1997. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. Nature **388:** 265-269.

Ruiz-Moreno, D. and others 2012. Global coral disease prevalence associated with sea temperature anomalies and local factors. Diseases of aquatic organisms **100:** 249-261.

Ryan, G. D., S. Rasmussen, H. Xue, A. J. Parsons, and J. A. Newman. 2014. Metabolite analysis of the effects of elevated CO2 and nitrogen fertilization on the association between tall fescue (Schedonorus arundinaceus) and its fungal symbiont Neotyphodium coenophialum. Plant, cell & environment **37:** 204-212.

Saffo, M. B. 2001. Mutualistic Symbioses. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd.

Sale, P. F., and M. A. Hixon. 2014. Addressing the global decline in coral reefs and forthcoming impacts on fishery yields. Interrelationships between coral reefs and fisheries. CRC Press, Boca Raton**:** 7-18.

Santos, H. F. and others 2014. Climate change affects key nitrogen-fixing bacterial populations on coral reefs. The ISME journal **8:** 2272-2279.

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

Sawall, Y., A. Al-Sofyani, E. Banguera-Hinestroza, and C. R. Voolstra. 2014. Spatio-temporal analyses of Symbiodinium physiology of the coral Pocillopora verrucosa along large-scale nutrient and temperature gradients in the Red Sea. PloS one **9:** e103179.

Sawall, Y., M. C. Teichberg, J. Seemann, M. Litaay, J. Jompa, and C. Richter. 2011. Nutritional status and metabolism of the coral Stylophora subseriata along a eutrophication gradient in Spermonde Archipelago (Indonesia). Coral Reefs **30:** 841-853.

Schlöder, C., and L. D'Croz. 2004. Responses of massive and branching coral species to the combined effects of water temperature and nitrate enrichment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **313:** 255-268.

Schmidt, H.-E. 1973. The vertical distribution and diurnal migration of some zooplankton in the Bay of Eilat (Red Sea). Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen **24:** 333-340.

Schreiber, U., U. Schliwa, and W. Bilger. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis research **10:** 51-62.

Sebens, K. P., J. Witting, and B. Helmuth. 1997. Effects of water flow and branch spacing on particle capture by the reef coral Madracis mirabilis (Duchassaing and Michelotti). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **211:** 1-28.

Shantz, A. A., and D. E. Burkepile. 2014. Context-dependent effects of nutrient loading on the coral–algal mutualism. Ecology **95:** 1995-2005.

Shantz, A. A., M. C. Ladd, E. Schrack, and D. E. Burkepile. 2015. Fish-derived nutrient hotspots shape coral reef benthic communities. Ecological Applications **25:** 2142-2152.

Shantz, A. A., N. P. Lemoine, and D. E. Burkepile. 2016. Nutrient loading alters the performance of key nutrient exchange mutualisms. Ecology letters **19:** 20-28.

Shick, J., M. Lesser, and W. Stochaj. 1991. Ultraviolet radiation and photooxidative stress in zooxanthellate Anthozoa: the sea anemone Phyllodiscus semoni and the octocoral Clavularia sp. Symbiosis **10:** 145-173.

Silverman, J., B. Lazar, and J. Erez. 2007. Effect of aragonite saturation, temperature, and nutrients on the community calcification rate of a coral reef. Journal of Geophysical Research: Oceans (1978–2012) **112**.

Silverstein, R. N., R. Cunning, and A. C. Baker. 2015. Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. Global change biology **21:** 236-249.

Simister, R. L., P. Deines, E. S. Botté, N. S. Webster, and M. W. Taylor. 2012. Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. Environmental microbiology **14:** 517-524.

Six, D. L. 2009. Climate change and mutualism. Nature Reviews Microbiology **7:** 686-686.

Slattery, M., M. Lesser, D. Brazeau, M. Stokes, and J. Leichter. 2011. Connectivity and stability of mesophotic coral reefs. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **408:** 32-41.

Smil, V. 2000. Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. Annual review of energy and the environment **25:** 53-88.

Smith, G. B. 1975. The 1971 Red Tide and its Impact on Certain Reef Communities in the Mid-Eastern Gulf of Mexico. Environmental Letters **9:** 141-152.

Smith, N. P. 1982. Upwelling in Atlantic shelf waters of South Florida. Florida Scientist **45:** 117-125.

Smith, P. K. and others 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry **150:** 76-85.

Smith, V. H., and D. W. Schindler. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? Trends in Ecology & Evolution **24:** 201-207.

Smith, V. H., G. D. Tilman, and J. C. Nekola. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environmental pollution **100:** 179-196.

Snidvongs, A., and R. Kinzie III. 1994. Effects of nitrogen and phosphorus enrichement on in vivo symbiotic zooxanthellae of Pocillopora damicornis. Marine Biology **118:** 705-711.

Song, B., and B. B. Ward. 2004. Molecular characterization of the assimilatory nitrate reductase gene and its expression in the marine alga Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae) 1. Journal of phycology **40:** 721-731.

Sorokin, Y. I. 1973. On the feeding of some scleractinian corals with bacteria and dissolved organic matter. Limnol Oceanogr **18:** 380-385.

---. 1990. Aspects of trophic relations, productivity and energy balance in coral-reef ecosystems. Ecosystems of the world **25:** 401-418.

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

Sorokin, Y. I. 2013. Coral reef ecology. Springer Science & Business Media.

Spalding, M., C. Ravilious, and E. P. Green. 2001. World atlas of coral reefs. Univ of California Press.

Stambler, N., N. Popper, Z. Dubinsky, and J. Stimson. 1991. Effects of nutrient enrichment and water motion on the coral Pocillopora damicornis. Pacific Science **45:** 299-307.

Stanley Jr, G. D. 2013. The history and sedimentology of ancient reef systems. Springer Science & Business Media.

Starzak, D. E., R. G. Quinnell, M. R. Nitschke, and S. K. Davy. 2014. The influence of symbiont type on photosynthetic carbon flux in a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. Marine biology **161:** 711-724.

Stat, M., and R. D. Gates. 2010. Clade D Symbiodinium in scleractinian corals: a “nugget” of hope, a selfish opportunist, an ominous sign, or all of the above? Journal of Marine Biology **2011**.

Stephens, G. C. 1960. Uptake of glucose from solution by the solitary coral, Fungia. Science **131:** 1532.

---. 1962. Uptake of organic material by aquatic invertebrates. I. Uptake of glucose by the solitary coral, Fungia scutaria. Biological Bulletin **123:** 648-659.

Sterner, R. W., and J. J. Elser. 2002. Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University Press.

Steven, A., and A. Broadbent. 1997. Growth and metabolic responses of Acropora palifera to long term nutrient enrichment, p. 867-872. Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.

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.

Stoecker, D. K. 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. Journal of Eukaryotic Microbiology **46:** 397-401.

Swanson, R., and O. Hoegh-Guldberg. 1998. Amino acid synthesis in the symbiotic sea anemone Aiptasia pulchella. Marine Biology **131:** 83-93.

Szmant, A. M. 1997. Nutrient effects on coral reefs: a hypothesis on the importance of topographic and trophic complexity to reef nutrient dynamics, p. 1527-1532. Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.

---. 2002. Nutrient enrichment on coral reefs: is it a major cause of coral reef decline? Estuaries **25:** 743-766.

Takahashi, S., T. Nakamura, M. Sakamizu, R. van Woesik, and H. Yamasaki. 2004. Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. Plant and Cell Physiology **45:** 251-255.

Tambutté, E. and others 2007. Observations of the tissue-skeleton interface in the scleractinian coral Stylophora pistillata. Coral Reefs **26:** 517-529.

Tanaka, Y. and others 2014. Nutrient availability affects the response of juvenile corals and the endosymbionts to ocean acidification. Limnol. Oceanogr **59:** 1468-1476.

Tanaka, Y., T. Miyajima, I. Koike, T. Hayashibara, and H. Ogawa. 2007. Imbalanced coral growth between organic tissue and carbonate skeleton caused by nutrient enrichment. Limnology and oceanography **52:** 1139-1146.

Tchernov, D. and others 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101:** 13531-13535.

Tentori, E., and D. Allemand. 2006. Light-enhanced calcification and dark decalcification in isolates of the soft coral Cladiella sp. during tissue recovery. The Biological Bulletin **211:** 193-202.

Titlyanov, E., T. Titlyanova, K. Yamazato, and R. Van Woesik. 2001. Photo-acclimation of the hermatypic coral Stylophora pistillata while subjected to either starvation or food provisioning. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **257:** 163-181.

Todd, B. D., D. J. Thornhill, and W. K. Fitt. 2006. Patterns of inorganic phosphate uptake in Cassiopea xamachana: a bioindicator species. Marine Pollution Bulletin **52:** 515-521.

Tolosa, I., C. Treignier, R. Grover, and C. Ferrier-Pages. 2011. Impact of feeding and short-term temperature stress on the content and isotopic signature of fatty acids, sterols, and alcohols in the scleractinian coral Turbinaria reniformis. Coral Reefs **30:** 763-774.

Tomascik, T., and F. Sander. 1985. Effects of eutrophication on reef-building corals. Marine biology **87:** 143-155.

Topinka, J. A., and J. V. Robbins. 1976. Effects of nitrate and ammonium enrichment on growth and nitrogen physiology in Fucus spiralis. Limnology and Oceanography **21:** 659-664.

Tréguer, P., and P. Le Corre. 1975. Manuel d'analyse des sels nutrifs dans l'eau de mer: utilisation de l'Autoanalyzer II Technicon (R). Université de Bretagne occidentale.

Tremblay, P. 2012. Relations entre auto-et hétérotrophie chez les coraux scléractiniaires symbiotiques.

Tremblay, P., R. Grover, J.-F. Maguer, M. Hoogenboom, and C. Ferrier-Pagès. 2014. Carbon translocation from symbiont to host depends on irradiance and food availability in the tropical coral Stylophora pistillata. Coral Reefs **33:** 1-13.

Tremblay, P., R. Grover, J. F. Maguer, L. Legendre, and C. Ferrier-Pagès. 2012. Autotrophic carbon budget in coral tissue: a new 13C-based model of photosynthate translocation. The Journal of experimental biology **215:** 1384-1393.

Tremblay, P., J. F. Maguer, R. Grover, and C. Ferrier-Pagès. 2015. Trophic dynamics of scleractinian corals: stable isotope evidence. Journal of Experimental Biology **218:** 1223-1234.

Trench, R. 1993. Microalgal-invertebrate symbioses-a review. Endocytobiosis and Cell Research **9:** 135-175.

Trench, R., and H. Winsor. 1987. Symbiosis with dinoflagellates in two pelagic flatworms, Amphiscolops sp. and Haplodiscus sp. Symbiosis **3:** 1-21.

Turpin, D. H., and D. Bruce. 1990. Regulation of photosynthetic light harvesting by nitrogen assimilation in the green alga Selenastrum minutum. FEBS letters **263:** 99-103.

Tyrrell, T. 1999. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature **400:** 525-531.

Umezawa, Y., T. Miyajima, H. Kayanne, and I. Koike. 2002. Significance of groundwater nitrogen discharge into coral reefs at Ishigaki Island, southwest of Japan. Coral Reefs **21:** 346-356.

Underwood, A. J. 1997. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press.

Uthicke, S., N. Vogel, J. Doyle, C. Schmidt, and C. Humphrey. 2012. Interactive effects of climate change and eutrophication on the dinoflagellate-bearing benthic foraminifer Marginopora vertebralis. Coral Reefs **31:** 401-414.

Van de Waal, D. B., A. M. Verschoor, J. M. Verspagen, E. van Donk, and J. Huisman. 2009. Climate-driven changes in the ecological stoichiometry of aquatic ecosystems. Frontiers in Ecology and the Environment **8:** 145-152.

Van Woesik, R., A. Irikawa, R. Anzai, and T. Nakamura. 2012. Effects of coral colony morphologies on mass transfer and susceptibility to thermal stress. Coral Reefs **31:** 633-639.

Vanucci, S. and others 2012. Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis* cf.*ovata*. Harmful Algae **15:** 78-90.

Veal, C., M. Carmi, M. Fine, and O. Hoegh-Guldberg. 2010. Increasing the accuracy of surface area estimation using single wax dipping of coral fragments. Coral Reefs **29:** 893-897.

Vega Thurber, R. L., D. E. Burkepile, C. Fuchs, A. A. Shantz, R. McMinds, and J. R. Zaneveld. 2014. Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. Global change biology **20:** 544-554.

Vener, A. V. 2007. Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1767:** 449-457.

Venn, A., J. Loram, and A. Douglas. 2008a. Photosynthetic symbioses in animals. Journal of Experimental Botany **59:** 1069-1080.

Venn, A., J. Loram, H. Trapido-Rosenthal, D. Joyce, and A. Douglas. 2008b. Importance of time and place: patterns in abundance of Symbiodinium clades A and B in the tropical sea anemone Condylactis gigantea. The Biological Bulletin **215:** 243-252.

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

Vermeij, M. J., I. Van Moorselaar, S. Engelhard, C. Hörnlein, S. M. Vonk, and P. M. Visser. 2010. The effects of nutrient enrichment and herbivore abundance on the ability of turf algae to overgrow coral in the Caribbean. PLoS One **5:** e14312.

Veron, J. 2000a. Corals of the World, vol. 1–3. Australian Institute of Marine Science, Townsville.

Veron, J., and M. Stafford-Smith. 2002. Coral ID: an electronic key to the zooxanthellate scleractinian corals of the world. Australian Institute fo Marine Science.

Veron, J. E. N. 2000b. Corals of the World.

Vieira, C., C. Payri, and O. De Clerck. 2015. Overgrowth and killing of corals by the brown alga Lobophora hederacea (Dictyotales, Phaeophyceae) on healthy reefs in New Caledonia: a new case of the epizoism syndrome. Phycological Research **63:** 152-153.

Visser, M. E. 2008. Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **275:** 649-659.

Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco, and J. M. Melillo. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. Science **277:** 494-499.

Vogel, S., and M. LaBarbera. 1978. Simple flow tanks for research and teaching. Bioscience **28:** 638-643.

von Liebig, J. F. 1855. Principles of agricultural chemistry: With special reference to the late researches made in England. Walton & Maberly.

Vose, R. S. and others 2014. Monitoring and understanding changes in extremes: Extratropical storms, winds, and waves. Bulletin of the American Meteorological Society **95:** 377-386.

Voss, J. D., and L. L. Richardson. 2006. Nutrient enrichment enhances black band disease progression in corals. Coral Reefs **25:** 569-576.

Wang, J., and A. Douglas. 1998. Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga-invertebrate symbiosis? The Journal of experimental biology **201:** 2445-2453.

Wang, J., and A. Douglas. 1999. Essential amino acid synthesis and nitrogen recycling in an alga–invertebrate symbiosis. Marine Biology **135:** 219-222.

Wang, J.-T., and A. E. Douglas. 1997. Nutrients, signals, and photosynthate release by symbiotic algae (the impact of taurine on the dinoflagellate alga Symbiodinium from the sea anemone Aiptasia pulchella). Plant physiology **114:** 631-636.

Wang, X. and others 2015a. Isotopic composition of skeleton-bound organic nitrogen in reef-building symbiotic corals: a new method and proxy evaluation at Bermuda. Geochimica et Cosmochimica Acta **148:** 179-190.

Wang, X. T. and others 2015b. Isotopic composition of skeleton-bound organic nitrogen in reef-building symbiotic corals: A new method and proxy evaluation at Bermuda. Geochimica et Cosmochimica Acta **148:** 179-190.

Wangpraseurt, D., A. W. Larkum, P. J. Ralph, and M. Kühl. 2012. Light gradients and optical microniches in coral tissues. Frontiers in microbiology **3**.

Warner, M., and S. Berry-Lowe. 2006. Differential xanthophyll cycling and photochemical activity in symbiotic dinoflagellates in multiple locations of three species of Caribbean coral. Journal of experimental marine biology and ecology **339:** 86-95.

Warner, M., W. Fitt, and G. Schmidt. 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 & Environment **19:** 291-299.

Watanabe, T., I. Fukuda, K. China, and Y. Isa. 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.

Wear, S. L., and R. V. Thurber. 2015. Sewage pollution: mitigation is key for coral reef stewardship. Annals of the New York Academy of Sciences **1355:** 15-30.

Webb, K., and W. Wiebe. 1978. The kinetics and possible significance of nitrate uptake by several algal-invertebrate symbioses. Marine Biology **47:** 21-27.

Webb, K. L., and W. Wiebe. 1975. Nitrification on a coral reef. Canadian journal of microbiology **21:** 1427-1431.

Weger, H. G., and D. H. Turpin. 1989. Mitochondrial Respiration Can Support NO3− and NO2− Reduction during Photosynthesis Interactions between Photosynthesis, Respiration, and N Assimilation in the N-Limited Green Alga Selenastrum minutum. Plant physiology **89:** 409-415.

Wiedenmann, J. and others 2013. Nutrient enrichment can increase the susceptibility of reef corals to bleaching. Nature Climate Change **3:** 160-164.

Wild, C., and M. S. Naumann. 2013. Effect of active water movement on energy and nutrient acquisition in coral reef-associated benthic organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences **110:** 8767-8768.

Wilkerson, F., and R. Trench. 1986. Uptake of dissolved inorganic nitrogen by the symbiotic clam Tridacna gigas and the coral Acropora sp. Marine Biology **93:** 237-246.

Wilkerson, F. P., and P. Kremer. 1993. DIN, DON and PO4 flux by a medusa with algal symbionts. Marine Ecology-Progress Series **90:** 237-237.

Wilkinson, C. R., D. N. Souter, and G. C. R. M. Network. 2008. Status of Caribbean coral reefs after bleaching and hurricanes in 2005. Global Coral Reef Monitoring Network.

Winters, G., S. Beer, B. B. Zvi, I. Brickner, and Y. Loya. 2009. Spatial and temporal photoacclimation of Stylophora pistillata: zooxanthella size, pigmentation, location and clade. Mar Ecol Prog Ser **384:** 107-119.

Winters, G., Y. Loya, R. Rottgers, and S. Beer. 2003. Photoinhibition in shallow-water colonies of the coral Stylophora pistillata as measured in situ. Limnology and Oceanography **48:** 1388-1393.

Wooldridge, S. 2013. Breakdown of the coral-algae symbiosis: towards formalising a linkage between warm-water bleaching thresholds and the growth rate of the intracellular zooxanthellae. Biogeosciences **10:** 1647-1658.

Wooldridge, S. A. 2009. Water quality and coral bleaching thresholds: Formalising the linkage for the inshore reefs of the Great Barrier Reef, Australia. Marine Pollution Bulletin **58:** 745-751.

Wooldridge, S. A. 2014. Differential thermal bleaching susceptibilities amongst coral taxa: re-posing the role of the host. Coral Reefs **33:** 15-27.

Wooldridge, S. A., and T. J. Done. 2009. Improved water quality can ameliorate effects of climate change on corals. Ecological Applications **19:** 1492-1499.

Wyatt, A. S., R. J. Lowe, S. Humphries, and A. M. Waite. 2013. Particulate nutrient fluxes over a fringing coral reef: source-sink dynamics inferred from carbon to nitrogen ratios and stable isotopes. Limnology and Oceanography **58:** 409-427.

Wyman, K., Z. Dubinsky, J. Porter, and P. Falkowski. 1987. Light absorption and utilization among hermatypic corals: a study in Jamaica, West Indies. Marine Biology **96:** 283-292.

Wyndham, T., M. McCulloch, S. Fallon, and C. Alibert. 2004. High-resolution coral records of rare earth elements in coastal seawater: biogeochemical cycling and a new environmental proxy. Geochimica et Cosmochimica Acta **68:** 2067-2080.

Yellowlees, D., T. Rees, and W. Fitt. 1994. Effect of ammonium-supplemented seawater on glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activities in host tissue and zooxanthellae of Pocillopora damicornis and on ammonium uptake rates of the zooxanthellae. Pacific Science **48:** 291-295.

Yellowlees, D., T. A. V. Rees, and W. Leggat. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. Plant, cell & environment **31:** 679-694.

Zaneveld, J. R. and others 2016. Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. Nat Commun **7**.

Zeebe, R. E., J. C. Zachos, K. Caldeira, and T. Tyrrell. 2008. Carbon emissions and acidification. Science-New York then Washington **321:** 51.

Zhou, G., H. Huang, Z. Dong, and Z. Yu. 2011. Temporal stability of Symbiodinium phylotype in scleractinian coral Galaxea fascicularis from a tropical fringing reef in the South China Sea. Chinese Journal of Oceanology and Limnology **29:** 1186-1191.

Ziegler, M., C. M. Roder, C. Büchel, and C. R. Voolstra. 2015. Mesophotic coral depth acclimatization is a function of host-specific symbiont physiology. Frontiers in Marine Science.

Les coraux constructeurs de récifs se développent généralement dans des eaux oligotrophes, caractérisées par de faibles concentrations en nutriments inorganiques, tels que l'azote et le phosphore. Cette limitation se voit accentuée avec le réchauffement climatique. Cependant, aux abords des côtes, l'eutrophisation des eaux entraîne un phénomène inverse, un excès de sels nutritifs qui peut provoquer la rupture de l'association corail-dinoflagellés. Les enjeux principaux de cette thèse ont été d'évaluer: 1) l'utilisation de l'azote et du phosphore inorganique par les coraux dans diverses conditions environnementales; 2) l'effet d'une limitation ou d'un enrichissement en azote et/ou phosphore sur la physiologie corallienne. Les résultats obtenus ont montré que la forme et la source d'azote n'ont pas les mêmes effets sur la physiologie des coraux et que cet effet est également dépendant de la disponibilité en phosphore. En présence de faibles concentrations en phosphore, un enrichissement en ammonium stimule le métabolisme global et maintient l'association symbiotique en période de stress. Au contraire, un enrichissement en nitrate affecte négativement les processus de photosynthèse et de calcification, entrainant un blanchissement. Ces effets délétères sont exacerbés en présence de matière organique particulaire, mais estompés en présence de phosphore. En effet, les résultats ont montré une très grande dépendance entre la présence en phosphore et la santé corallienne. Ainsi, en période de stress thermique, les coraux ont la capacité d'augmenter leur taux d'absorption de phosphore, cet élément étant indispensable au métabolisme, à diverses échelles. Ces travaux apportent des éclaircissements sur les relations existant entre la disponibilité en sels nutritifs et l'équilibre nutritionnel au sein de la symbiose, et devraient permettre d'affiner les stratégies de gestions des écosystèmes récifaux.

Mots clés: Oligotrophie | Scléractiniaire | Azote | Phosphore | Changement climatique | Eutrophisation

Reef building corals are usually thriving in oligotrophic areas, characterized by low concentrations in inorganic nutrients, such as nitrogen and phosphorus. More, nutrient starvation is known to increase with global warming. However, along the urban coasts, water eutrophication induces nutrient excess, which could lead to the breakdown of the coral-dinoflagellate symbiosis. The major aims of this thesis were to assess: 1) the use and uptake capacities of inorganic nitrogen and phosphorus by tropical corals according to environmental parameters; 2) the effects of nutrient limitation or enrichments in nitrogen and/or phosphorus on reef coral physiology. Results showed that corals response differed according to the form, source of nitrogen and to the availability of phosphorus in the reef environment. In the presence of low phosphorus concentrations, ammonium supplementation enhanced coral metabolism and allowed coral colonies to overcome thermal stress. Conversely, nitrate enrichments negatively impacted photosynthesis and calcification processes, increasing coral bleaching susceptibility. These deleterious effects were enhanced when combined with organic matter supplementation, but repressed with addition of phosphorus. Indeed, results highlighted the tight relationship existing between phosphorus availability and coral health. During thermal stress, corals were able to increase their phosphorus uptake, this latter nutrient being essential for the holobiont metabolism. These outcomes shed a light into how marine symbioses cope with eutrophication, which is urgently required to refine risk management strategies.

Key words: Oligotrophy | Scleractinian | Nitrogen | Phosphorus | Global change | Eutrophication