



HAL
open science

La cryoconservation : un outil performant pour la sauvegarde des coraux en danger : son application à **Pocillopora damicornis**

Lionel Feuillassier

► **To cite this version:**

Lionel Feuillassier. La cryoconservation : un outil performant pour la sauvegarde des coraux en danger : son application à *Pocillopora damicornis*. Biologie végétale. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT177 . tel-02009251

HAL Id: tel-02009251

<https://theses.hal.science/tel-02009251>

Submitted on 6 Feb 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE
Et de l'unité de recherche DIADE et de l'UMS 2348

Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes

Présentée par Lionel FEUILLASSIER

**La cryoconservation : un outil performant
pour la sauvegarde des coraux en danger.
Son application à *Pocillopora damicornis*.**

Soutenue le 29 septembre 2015 devant le jury composé de

M. Pascal GANTET, Professeur, UM
Mme Isabelle DOMART-COULON, Maître de Conférences, MNHN
Mme Catherine LABBÉ, Chargée de recherche, INRA
M. Michel PETIT, Directeur de recherche, IRD
M. Philippe LEBARON, Professeur, UPMC
M. Florent ENGELMANN, Directeur de recherche, IRD
M. Pascal ROMANS, Ingénieur d'études, UPMC

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-encadrant

Thèse préparée à :

Centre IRD de Montpellier

UMR DIADE

911, avenue Agropolis

BP 64501

F-34394 Montpellier Cedex 5

Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS

UMS 2348 - CRBM

Avenue du Fontaulé

F-66650 Banyuls-sur-mer

La cryoconservation : un outil performant pour la sauvegarde des coraux en danger.

Son application à *Pocillopora damicornis*.

Résumé

Les nombreuses pressions naturelles et anthropiques qui pèsent sur les écosystèmes coralliens font craindre leur disparition pour les années futures. Parmi les mesures de conservation, la cryoconservation permet de maintenir en sécurité les échantillons sur le long terme et à coût réduit. Les premiers travaux sur la cryoconservation des Anthozoaires incitent à développer davantage la méthode de vitrification plutôt que la congélation lente. Dans ce contexte, cette thèse propose d'expérimenter la technique de vitrification sur plusieurs formes pluricellulaires dont les apex, les planulae, les polypes primaires, les polypes isolés et les balles tissulaires (TB), toutes issues du Scléactiniaire *Pocillopora damicornis*. Les meilleurs résultats ont été produits avec les TB obtenues après exposition à une solution de KSW puis traitées selon la méthode V Cryo-plate. L'éthylène glycol (EG) s'est avéré le cryoprotecteur (CPA) le mieux toléré jusqu'à 4.0 M pendant 20 min à température ambiante (RT). Les mélanges binaires et ternaires de CPA ont cependant permis d'obtenir une meilleure tolérance des TB que les solutions individuelles. L'utilisation de solutions successives a permis d'obtenir de la survie jusqu'à 4.5 M selon le protocole : 1.5 M EG + 0.5 M Glycérol (Gly) (5 min, RT) puis 1.5 M DMSO + 1.5 M EG + 1.5 M Gly (10 min, 0°C) et enfin 1.5 M EG + 0.5 M Gly (5 min, RT). L'intégrité des cellules épithéliales de l'ectoderme apparaît essentielle au maintien des TB durant et après les traitements. Si le protocole de vitrification n'a pu être mis au point, en revanche, l'utilisation des TB à des fins de cryoconservation apparaît très intéressante pour de futures investigations.

Mots clefs

Cryoconservation ; Balle tissulaire ; Scléactiniaire ; *Pocillopora damicornis* ; Histologie ; Ectoderme ; Masse Centrale ; Cryoprotecteur.

Cryopreservation: a performing tool for safeguarding threatened corals.

Application to *Pocillopora damicornis*.

Abstract

Numerous environmental and anthropic pressures threaten reef ecosystems, rising concerns on species loss in coming years. Among conservation measures, cryopreservation ensures the safe and cost-effective long-term conservation of biological material. The first publications focusing on Anthozoa cryopreservation reported that the vitrification approach was preferable to the slow-cooling approach. In this context, this thesis aimed at investigating a vitrification technique with several pluricellular forms from the Scleractinian *Pocillopora damicornis* including apices, planulae, primary polyps, isolated polyps and tissue balls (TB). The best results were obtained using TBs produced by exposing coral branches to a KSW solution. TBs were cryopreserved using the V Cryo-plate method. The highest TB tolerance was obtained after exposure to solution containing ethylene glycol (EG) concentrated to 4.0 M for 20 min at room temperature (RT). Binary and ternary cryoprotectant (CPA) solutions were better tolerated by TBs compared with individual cryoprotectant solutions. Exposure of TBs to a series of cryoprotectant solutions with progressively increased concentration allowed obtaining TB tolerance to cryoprotectant with a concentration of 4.5 M with: 1.5 M EG + 0.5 M Glycerol (Gly) (5 min, RT), 1.5 M DMSO + 1.5 M EG + 1.5 M Gly (10 min, 0°C) and then 1.5 M EG + 0.5 M Gly (5 min, RT). Epithelial cells from the ectoderm were essential to maintain TB integrity during and following CPA treatments. Successful cryopreservation was not achieved in this work; however, it demonstrated that the use of TBs constitutes a promising way for further cryopreservation research.

Keywords

Cryopreservation; Tissue Ball; Scleractinia; *Pocillopora damicornis*; Histology; Ectoderm; Central Mass; Cryoprotectant.

Remerciements...

Voici sans aucun doute la partie la plus difficile à rédiger de ce manuscrit. Comment choisir les bons mots et les bonnes tournures pour exprimer toute la gratitude que j'ai pour tant de personnes ? Cette thèse aura été une expérience exaltante et intense, riche en émotions et en rebondissements. Elle est certes une aventure scientifique mais elle demeurera surtout une formidable expérience humaine. Elle restera pour moi inoubliable et d'abord grâce à vous...

Je souhaite remercier Madame Isabelle Domart-Coulon (MNHN, Paris) et Madame Catherine Labbé (INRA, Rennes) qui ont eu la gentillesse d'accepter très rapidement de juger la qualité de mon manuscrit et de ma présentation orale. Soyez assurées de ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier Monsieur Pascal Gantet (UM, Montpellier), Monsieur Michel Petit (IRD, Montpellier) et Monsieur Philippe Lebaron (UPMC, Banyuls sur mer) pour m'avoir honoré de leur présence dans mon jury de thèse. Recevez là mes plus sincères remerciements.

J'adresse mes plus profonds remerciements à Monsieur Bernard Dreyfus (IRD, Marseille) et Monsieur Philippe Lebaron pour avoir accepté de financer mon doctorat. Merci également à Thomas Changeux (IRD, Marseille) pour avoir participé de très près à toutes ces démarches. Je sais désormais les efforts financiers et administratifs qu'il faut fournir pour mener à bien un tel projet et je vous demande de trouver en ces quelques lignes toute ma reconnaissance pour votre soutien. Je veux aussi vous remercier pour votre disponibilité à mon égard et l'intérêt que m'avez manifesté tout au long de cette thèse, Merci infiniment à vous trois.

Je souhaite remercier du fond du cœur mon directeur de thèse, Monsieur Florent Engelmann (IRD, Montpellier). Florent, je ne sais comment te remercier tellement cette expérience sous ton encadrement aura été

formidable. C'est un honneur de t'avoir eu comme directeur de thèse, je mesure aujourd'hui toute la chance que j'ai eu d'être ton doctorant. Je garderai très profondément ancré en moi les moments que j'ai pu passer à tes côtés. Je te remercie pour ton incroyable disponibilité et ta réactivité malgré toutes les responsabilités qui t'incombaient. Je te remercie également pour ton indéfectible soutien durant tous ces mois, y compris dans les moments les plus durs. Merci pour ta patience, ton respect et aussi ta bonne humeur. Merci pour ton humanité et ton humilité, ce sont certainement les plus belles leçons que je retiendrai de ton encadrement. Rendre une thèse inoubliable c'est une chose, la rendre agréable c'en est une autre... Avec mes plus sincères remerciements Florent.

Je remercie également Monsieur Pascal Romans (UPMC, Banyuls sur mer) pour avoir accepté de participer à l'encadrement de ma thèse et pour m'avoir accueilli au sein de son service, le Centre de Ressources Biologiques Marines. Pascal, si aujourd'hui j'en suis rendu là, c'est d'abord grâce à toi. Tu m'as proposé un beau jour de m'investir sur un cdd... Du cdd à la thèse, voilà où nous en sommes aujourd'hui. Merci pour avoir cru en moi et pour m'avoir permis d'évoluer dans ton service. Ce ne fut pas qu'une expérience de doctorat, ce fût bien plus grâce à la proximité de l'aquarium public et de toutes les autres structures expérimentales. Merci !

Un merci tout particulier à Monsieur Dominique Barthélémy (Océanopolis, Brest). Dominique, tu m'as permis de réaliser mon stage de maîtrise à Océanopolis et quelques années après c'est à nouveau avec beaucoup de plaisir que j'ai pu compter sur ton soutien. Tu as répondu présent dans les moments où j'avais besoin de ton appui et comme toujours, avec beaucoup de réactivité. Ça a été un vrai plaisir de pouvoir interagir avec toi pendant ces trois années. Merci sincèrement Dominique pour cette collaboration de grande qualité. Je n'oublie pas non plus l'équipe aquariologique d'Océanopolis pour leur soutien et leur disponibilité à mon égard. Merci infiniment !

Tous mes remerciements vont également à Monsieur Patrick Masanet (Aquarium de Canet en Roussillon). Patrick, tu fais parti de ceux pour lesquels je dois beaucoup dans la réalisation de ma thèse. Ta discrétion et ton humilité cachent une personne d'une grande qualité humaine et professionnelle. J'ai beaucoup appris à tes côtés, nos discussions m'ont été à chaque fois très instructives. Ton expérience dans le récifal est hors du commun. Je ne sais comment te remercier pour l'appui que tu m'as offert pendant ces trois années. Je n'oublierai jamais ta disponibilité et ta générosité. Tu as été à plusieurs reprises ma dernière chance et je ne me suis jamais trompé. Je te souhaite le meilleur pour la suite ! Avec tous mes remerciements ! Je pense également à l'équipe de l'Aquarium de Canet en Roussillon avec qui j'ai eu plaisir à échanger durant ma thèse. Bon courage dans la construction du nouvel Aquarium, c'est avec un grand plaisir que je viendrai le visiter !

Je tiens à remercier Madame Isabelle Sylvestre-Engelmann pour m'avoir initié à la cryoconservation au début du projet Cryocorail. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, la formation à tes côtés, tes encouragements ainsi que ton engouement pour le projet Cryocorail. Merci Isabelle !

Je remercie Madame Claude Payri et Madame Fanny Houlbrèque pour vos encouragements. J'espère avoir un jour l'occasion de pouvoir découvrir votre quotidien, la Nouvelle Calédonie...

Je veux aussi remercier Madame Isabelle Domart-Coulon pour ne pas avoir fermé la porte à une éventuelle collaboration. D'autres équipes ont été moins avenantes et je vous remercie donc pour l'effort que vous avez porté à mon égard. Nos discussions m'ont été très précieuses. Merci Isabelle.

Je tiens particulièrement à remercier Madame Myriam Collin pour tout l'enthousiasme et la générosité qui m'ont été donnés. Myriam... comment te remercier à la hauteur de ce que tu m'as apporté... Je n'oublierai JAMAIS cette réunion préliminaire où finalement dès le lendemain je me retrouvais dans le labo d'histo avec mes balles tissulaires... Merci pour m'avoir encadré,

formé, soutenu, pour t'être autant acharnée à donner le meilleur de toi-même pour que nous réussissions ces manip d'histo en à peine 4 mois. C'était nouveau pour tout le monde mais finalement notre investissement n'a pas été vain... Tu comptes parmi ces personnes à qui je dois beaucoup dans la réalisation de ma thèse. Vraiment merci Myriam et du fond du cœur je te souhaite le meilleur pour la suite ! J'en profite pour remercier le personnel de l'IRD de Montpellier qui m'a si gentilleme nt accueilli. Je pense en particulier à Monsieur Yves Duval ainsi qu'à Monsieur Serge Hamon. Merci également à Madame Sylvie Doulbeau en te souhaitant une agréable et reposante retraite...
· Je pense aussi au personnel du CIRAD et un grand merci à Monsieur Jean-Luc Verdeil et Monsieur Marc Lartaud pour votre accueil et votre disponibilité ainsi que votre aide dans l'exploitation d'Image J.

Il y a eu Myriam, mais il y a eu aussi Nancy Trouillard... et cette rencontre, en plus de m'avoir apporté une collègue, m'a aussi apporté une amie. Merci ma petite Nancy pour tous ces bons moments avec toi et il y en a eu tellement ! Tu m'as tant apporté pendant tous ces mois... je ne pourrai jamais t'oublier et te connaissant tu ne m'en laisseras pas l'occasion !! Tu fais partie de ces personnes qui donnent une résonnance toute particulière à cette thèse. Merci pour ton soutien dans cette thèse. Tu es quelqu'un de formidable et je te souhaite un réel épanouissement professionnel mais aussi personnel !

Je souhaite remercier sincèrement Monsieur Guillaume Mitta, Monsieur Mehdi Adjeroud, Monsieur Jérémie Vidal-Dupiol et Mademoiselle Kelly Brener pour m'avoir permis de participer à la mission de trois semaines au Sultanat d'Oman dans le cadre du projet ADACNI. Merci à vous pour cette très belle expérience ! Un merci tout particulier à Jérémie et à Kelly, pour les bons moments passés ensemble. Bon courage ma petite Kelly dans la réalisation de ta thèse. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à côté de toi et je garderai de très bons souvenirs de notre rencontre. Tu es une très belle personne, surtout ne change rien !

Un gros merci à Mademoiselle Lucie Martinez pour son investissement à mes côtés. Merci Lucie pour ta participation qui fût la bienvenue ! Merci également à Mademoiselle Amandine Hispa et Mademoiselle Marine Cambon pour vos interventions respectives.

Mes remerciements vont à Madame Sandrine Bodin pour l'aide dans l'obtention de certaines publications. Merci Sandrine pour nos échanges, ils ont toujours été très agréables et chaleureux !

Je veux aussi remercier Madame Francine Delmas, Madame Hanka Hensens et Madame Catherine Picq qui m'ont aussi été d'une aide très précieuse dans la fourniture de nombreuses publications. Un grand merci à vous trois pour votre réactivité et votre efficacité. Je vous en suis vraiment reconnaissant.

Je tiens à adresser des remerciements tous particuliers au service administration de l'UMS 2348 que j'ai harcelé et malmené pendant tous ces mois. Je pense notamment à Rémi Cucarella, merci Rémi pour ta redoutable efficacité et rapidité. Tu as été un vrai moteur pour faire avancer mes contrats, mes avenants, mes conventions et toutes autres formalités administratives et je t'en suis tellement reconnaissant..., tu m'as beaucoup parlé chinois mais aujourd'hui ma thèse touche à sa fin et tu n'y es pas pour rien. Je ne veux pas non plus oublier Maxime Fernandez pour avoir repris au pied levé et avec beaucoup de réactivité mon dossier. Merci aussi Maxime pour ta bonne humeur, ça a été un vrai plaisir d'interagir avec toi ces derniers mois. Mais il y a aussi, Josiane Fievet, Angélique Bugada, Catherine Toreille, Claire Biron, Sophie Sanchez, Véronique Champfay, qui ont dû supporter ces méandres administratifs, merci à vous toutes pour votre patience et votre bonne humeur !

Je remercie également le service enseignement, Julie Bœuf, Valérie Bayo et Nancy Trouillard pour m'avoir permis d'utiliser la verrerie et certains

consommables. Merci à vous trois pour votre gentillesse et votre bonne humeur !

Je souhaite aussi remercier Emilie Baye pour ses précieux conseils dans la culture cellulaire et toutes les manips de comptages. Merci Emilie pour avoir passé du temps à m'apprendre et à me conseiller. Ton rire résonne encore... Merci !

Plein de Mercis à Julien Loubet et à Rémi Pillot pour tous ces bons moments passés avec vous. Je vais sincèrement regretter ces échanges et cette bonne humeur. Quand la profession est une passion, les discussions deviennent intarissables, n'est ce pas Juju ?? Je vous souhaite à tous les deux le meilleur pour la suite, beaucoup d'épanouissement dans vos fonctions respectives. Je repasserai avec plaisir découvrir le nouvel Aquarium du labo Arago qui, j'en suis sûr, sera plein de belles surprises.

Merci à Michel Groc pour nos discussions si intéressantes ! J'en profite pour remercier le service informatique, Fabien, Nicolas et un merci particulier à Valérie Domien pour son œil expert dans la correction de mes posters. Bonne continuation à vous tous !

Et des Mercis, je les adresse également à beaucoup de personnes du laboratoire Arago avec qui j'ai pris plaisir à échanger. Je pense notamment à François Charles et à François Lantoine, Gilles, Béa, Franck, ... pour nos discussions et votre soutien. Merci aussi François pour ton expertise autour des *Symbiodinium* sp ! Merci également à Hervé Moreau et à Anne-Marie Genevière pour m'avoir permis d'accéder à la hotte à flux laminaire, merci à François-Yves Bouget et à Philippe Schatt pour la disponibilité de la sorbonne. Je ne veux pas non plus oublier Nuria Alonso, Jean-Clair Horveno et Mohammed pour les soirs et les weekends où je finissais à pas d'heure. Merci à vous trois pour votre soutien. Un très gros Merci à Karine et à Mounir pour votre soutien durant la thèse et pour la suite... Merci aussi à Sandrine, Nathalie, Amandine, Mareike, ... pour votre gentillesse et vos soutiens, et vive

la salsa !! Tant de personnes restent à citer, pardonnez moi de ne pouvoir tous vous remercier nominativement mais recevez ce Merci si sincère et amical. Je suis arrivé au laboratoire en fin d'année 2010 et après presque 5 ans, je ne peux que vous remercier pour le formidable accueil que j'ai reçu. A vous tous, Merci !

Je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à Madame Jacqueline Goy pour la formidable rencontre qui s'est faite autour de la thématique des Méduzoaires. Merci Jacqueline pour votre soutien et vos conseils mais surtout pour votre précieuse amitié.

Un merci sincère à Monsieur et Madame Lemaire, gérants du U Express de Port Vendres mais aussi à Sylvia et Florence pour avoir compris ma situation et permis de soutenir mon doctorat sans encombres. Merci également à Monique, Jacques, Francis, Marine... pour votre accueil si chaleureux.

Enfin, il est de coutume de les citer en dernier alors qu'ils sont sans conteste ceux qui ont du supporter mon sale caractère (si si !), mes angoisses et mes inquiétudes depuis toutes ces années. Ils devraient être les premiers à être remerciés car je leur dois tellement, ma chère famille. Merci Maman pour la richesse de ton éducation, pour ton éveil à la culture, pour ton indéfectible soutien malgré les vicissitudes de la vie. Merci pour m'avoir toujours porté haut et sans aucune retenue. Cette thèse, c'est toi qui m'en as donné le courage, tu y es pour beaucoup, bien plus que tu ne le crois. Merci Papa pour tes encouragements et pour ton aide à mon épanouissement. Merci pour avoir supporté durant toutes ces années et sans jamais te plaindre mes déménagements dans la France entière et parfois jusqu'à 4 fois dans une même année... Merci mes parents, je vous dédie cette thèse à tous les deux.

Je veux remercier mon jumeau de frère pour avoir compris que cette thèse était devenue une priorité pendant ces trois dernières années. Merci pour tout ce que tu m'apportes Benoît, et encore aujourd'hui merci à Elodie

et à toi pour m'offrir mon premier rôle de Tonton Yo... Bienvenue à ma petite Andréa, je suis sûr qu'elle va aimer mes méduses !

Et enfin, entre une naissance et une thèse, l'année 2015 ne serait pas complète sans citer mes grands parents et leurs 90 ans respectifs... Merci Pépé et Mémé ainsi que Mémé B. et Joceline pour votre soutien sans limites et si important pour moi. Merci pour avoir compris et accepté l'importance de mes très longues absences. Je vous dois beaucoup et je suis tellement fier de pouvoir vous présenter ce travail de doctorat. Merci infiniment ma chère famille !

Table des Matières

Liste des Figures	p. 18
Lexique	p. 23
Glossaire des sigles et des abréviations	p. 33
Introduction générale	p. 36
Partie I	p. 38
Chapitre 1	
Le récif corallien, quel constat ?	p. 39
I.1. - Etude bibliographique	p. 39
I.2. - Les évènements naturels	p. 41
I.2.1. - Le réchauffement climatique	p. 41
<i>Régulation du climat</i>	p. 42
<i>Notion de bleaching</i>	p. 43
I.2.2. - L'acidification des océans	p. 46
I.2.3. - Les cyclones, ouragans, ...	p. 48
I.2.4. - La prédation d' <i>Acanthaster planci</i>	p. 48
I.2.5. - Les maladies	p. 49
<i>La place particulière des Vibrio</i>	p. 52
I.3. - Activités anthropiques	p. 53
I.3.1. - Les pollutions	p. 53
I.3.1.1. - Les métaux lourds	p. 53
I.3.1.2. - Les produits phytosanitaires	p. 54
I.3.1.3. - Les éléments nutritifs	p. 54
I.3.1.4. - Les microplastiques	p. 55
I.3.1.5. - La sédimentation	p. 56
I.3.2. - Les activités récréatives	p. 57
I.3.3. - Les aménagements côtiers	p. 57
I.3.4. - La surpêche et la collecte d'organismes	p. 58
I.4. - Quelles capacités de recouvrement ?	p. 59
I.5. - Le lien entre les écosystèmes	p. 59
I.6. - Les services de l'écosystème corallien pour l'humanité	p. 60
I.7. - Quels moyens de protection ?	p. 63
Synthèse	p. 67
Chapitre 2	
La cryobiologie	p. 68
II.1. - Historique	p. 68
II.2. - Compréhension des changements de phase liquide-solide	p. 69
II.2.1. - De la surfusion à la solidification	p. 69

II.2.2. - L'état de cristallisation	p. 70
II.2.3. - L'état amorphe	p. 71
II.3. - Le principe de la cryoconservation	p. 72
II.3.1. - Contraintes physicochimiques sur les structures biologiques	p. 72
II.3.1.1. - Adaptations des organismes au froid	p. 73
II.3.1.2. - La température	p. 75
<i>Quelle température pour quelle conservation ?</i>	p. 75
<i>Le choc thermique</i>	p. 76
II.3.1.3. - La cristallisation extra- et intracellulaire	p. 76
II.3.1.4. - La déshydratation intracellulaire et l'effet de solution	p. 77
II.3.2. - Les solutions cryoprotectrices	p. 78
II.3.2.1. - Les solutés pénétrants	p. 78
II.3.2.2. - Les solutés non pénétrants	p. 80
II.3.2.3. - Autres cryoprotecteurs	p. 81
II.3.2.4. - Quelles perturbations sur la biologie ?	p. 81
II.3.3. - Les techniques de cryoconservation	p. 82
II.3.3.1. - La congélation lente	p. 82
<i>Les cryoprotecteurs</i>	p. 83
<i>Les vitesses de refroidissement et de réchauffement</i>	p. 83
II.3.3.2. - La vitrification	p. 84
<i>Les vitrificateurs</i>	p. 84
<i>Les vitesses de refroidissement et de réchauffement</i>	p. 85

Chapitre 3

La cryoconservation chez les organismes aquatiques	p. 87
III.1. - Les avancées de la cryoconservation en aquaculture	p. 87
III.1.1. - Quels intérêts ?	p. 87
III.1.2. - Les piscicultures marines et continentales	p. 88
III.1.3. - Les invertébrés d'intérêt aquacole	p. 90
III.1.3.1. - La conchyliculture	p. 90
III.1.3.2. - La pénéculture	p. 91
III.1.3.3. - L'échinoculture	p. 92
III.1.3.4. - Les autres invertébrés marins...	p. 93
III.1.3.5. - Le germoplasme cryoconservé	p. 94
III.1.3.6. - Quels paramètres pour une congélation efficace ?	p. 97
III.1.3.6.1. - Les solutions cryoprotectrices	p. 97
<i>Les associations de cryoprotecteurs</i>	p. 98
<i>L'eau de mer et l'eau Milli Q</i>	p. 98
<i>Congélation lente ou vitrification ?</i>	p. 99
III.1.3.6.2. - La vitesse de refroidissement	p. 99
III.1.3.6.3. - Les conditions de vie	p. 100
III.1.3.6.4. - L'après cryoconservation	p. 100
III.2. - L'application de la cryoconservation aux Anthozoaires	p. 101

III.2.1. - Etat de l'art	p. 101
III.2.2. - La cryo et les coraux...des prédispositions ?	p. 105
III.2.2.1. - Le rôle ambigu du glycérol	p. 106
III.2.2.2. - La synthèse du tréhalose chez les Scléactiniaires	p. 107
III.2.2.3. - Des antioxydants tels que les acides aminés de type mycosporine	p. 107
III.2.2.4. - La glycine bétaïne, un osmolyte prometteur	p. 109
III.2.2.5. - La place des composés sulfurés	p. 109
<i>Le DMSP</i>	p. 109
L'acrylate	p. 110
<i>Le DMS</i>	p. 110
<i>Le DMSO</i>	p. 111

Chapitre 4

Introduction à la biologie corallienne

Introduction à la biologie corallienne	p. 112
IV.1. - Classification phylogénétique des Scléactiniaires	p. 113
IV.1.1. - Le sous-règne des Métazoaires	p. 113
IV.1.2. - Les embranchements, la place des Cnidaires	p. 114
IV.1.3. - Quatre classes dont celle des Anthozoaires	p. 115
IV.1.4. - Deux sous-classes importantes	p. 116
IV.1.5. - L'ordre des Scléactiniaires	p. 117
IV.1.6. - La Famille, le <i>Genre</i> et l' <i>espèce</i> , la place de <i>Pocillopora damicornis</i>	p. 120
IV.2. - Organisation squelettique de <i>Pocillopora damicornis</i>	p. 121
IV.2.1. - Les éléments squelettiques	p. 121
IV.2.1.1. - Les polypiérites	p. 121
IV.2.1.2. - Le coenosteum	p. 122
IV.2.1.3. - La thèque	p. 123
IV.2.1.4. - Les septes	p. 123
IV.2.1.5. - Les épines squelettiques	p. 124
IV.2.1.6. - La columelle	p. 124
IV.2.1.7. - Le plateau basal	p. 125
IV.2.2. - La squelettogenèse	p. 125
IV.3. - Anatomie corallienne	p. 127
IV.3.1. - Le polype	p. 127
IV.3.2. - Les tentacules	p. 128
IV.3.3. - La cavité gastrique	p. 131
IV.3.4. - Le coenosarque	p. 132
IV.4. - Organisation histologique et cytologique	p. 133
IV.4.1. - L'ectoderme oral	p. 134
IV.4.2. - Les endoderms oral et aboral	p. 134
IV.4.3. - L'ectoderme aboral	p. 135
IV.4.4. - La mésoglée	p. 135
IV.4.5. - Détails des types cellulaires les plus fréquemment mentionnés	p. 136

IV.4.5.1. - Les amoebocytes	p. 136
IV.4.5.2. - Les cellules calicoblastiques	p. 137
IV.4.5.3. - Les cellules épithéliales	p. 137
IV.4.5.4. - Les cellules gastrodermiques	p. 137
IV.4.5.5. - Les cellules glandulaires	p. 138
IV.4.5.6. - Les cellules interstitielles	p. 138
IV.4.5.7. - Les cnidocytes	p. 138
IV.4.5.8. - Les desmocytes	p. 140
IV.4.5.9. - Les endosymbiontes	p. 140
IV.4.5.10. - Les gamètes	p. 142
IV.4.5.11. - Les mucocytes	p. 142
IV.4.5.12. - Les scléroblastes	p. 144
Partie II	p. 145
Chapitre 1	
Le microbouturage et la cryoconservation, une équation à 2 inconnues	p. 147
I.1. - Préambule	p. 147
I.2. - Etude bibliographique : le concept du microbouturage	p. 148
I.3. - Le choix des traitements	p. 150
I.4. - Quelle tolérance des apex de <i>P. damicornis</i> exposés aux cryoprotecteurs ?	p. 151
Synthèse	p. 163
Chapitre 2	
Prospection à l'échelle individuelle	p. 164
II.1. - Les planulae	p. 164
II.1.1. - Préambule	p. 164
II.1.2. - Etude bibliographique : la production larvaire de <i>P. damicornis</i>	p. 164
<i>Broadcasters versus brooders</i>	p. 165
<i>Plusieurs reproductions pour une espèce</i>	p. 166
<i>Les avantages des reproductions combinées</i>	p. 166
<i>L'embryogenèse</i>	p. 167
<i>La planulation</i>	p. 167
II.1.3. - Démarche expérimentale	p. 169
<i>Matériel et Méthode</i>	p. 169
Matériel biologique	p. 169
Suivi des pontes	p. 169
Traitement des planulae	p. 170
Observations post-traitements	p. 171
<i>Résultats et Discussion</i>	p. 171
Les cycles de planulation	p. 171
La tolérance des planulae aux solutions cryoprotectrices	p. 174
Synthèse	p. 175
II.2. - Les polypes primaires	p. 176

II.2.1. - Préambule	p. 176
II.2.2. - Etude bibliographique : La métamorphose et la fixation	p. 176
<i>La métamorphose</i>	p. 176
<i>La fixation</i>	p. 177
<i>Les techniques de fixation</i>	p. 178
<i>La méthode OozoFix</i>	p. 179
Méthode	p. 180
Des essais	p. 181
II.3. - Les polypes isolés	p. 184
II.3.1. - Préambule	p. 184
II.3.2. - Mise en application	p. 184
Synthèse	p. 186

Chapitre 3

La micropropagation et la cryoconservation, une équation simplifiée	p. 188
III.1. - Préambule	p. 188
III.2. - Etude bibliographique : Les Cnidaires à l'épreuve de la dissociation tissulaire et cellulaire	p. 188
III.2.1. - Historique	p. 188
III.2.2. - Identification des balles tissulaires	p. 190
III.2.3. - Méthodes de préparation des balles tissulaires	p. 191
III.2.3.1. - Les types de dissociation	p. 191
III.2.3.2. - Les milieux de dissociation	p. 192
III.2.3.3. - La place du calcium dans l'eau de mer	p. 193
III.2.3.4. - Le recours aux enzymes	p. 194
III.3. - Le choix de la dissociation et des traitements	p. 195
III.4. - L'exposition des balles tissulaires de <i>P. damicornis</i> aux solutions cryoprotectrices	p. 196
Synthèse	p. 207

Chapitre 4

Combiner pour mieux concentrer	p. 208
IV.1. - Préambule	p. 208
IV.2. - Etude bibliographique : une espèce, un protocole, un mélange de CPA	p. 208
IV.3. - Le choix des traitements	p. 210
IV.4. - L'étape des 4.0 molaires	p. 210
Synthèse	p. 223

Chapitre 5

Une approche à trois solutions: expulsion au KSW, exposition aux CPA, observation au PAS-NBB	p. 225
V.1. - Préambule	p. 225

V.2. - Etude bibliographique : le chlorure de potassium chez les invertébrés marins	p. 226
V.3. - Le choix des traitements	p. 229
V.4. - Tolérance des balles tissulaires aux solutions cryoprotectrices	p. 229
Synthèse	p. 255
Chapitre 6	
Une équation non résolue à -196 °C	p. 257
VI.1. - Préambule	p. 257
VI.2. - Etude bibliographique : le rôle clé des cryoprotecteurs dans la technique de vitrification	p. 257
VI.3. - Le choix des traitements	p. 260
VI.4. - La vitrification des balles tissulaires	p. 260
Synthèse	p. 287
Conclusion générale et perspectives	p. 289
Communications	p. 295
Présentation orale	
Tolerance of tissue balls from the coral <i>Pocillopora damicornis</i> to exposure to cryoprotectant treatment.	
Posters	
Poster 1 : Cryopreservation: a new tool for coral conservation.	
Poster 2 : Les balles tissulaires du corail <i>Pocillopora damicornis</i> au service de la cryoconservation.	
Poster 3 : Histological evidence of the role of cortex in preserving the integrity of tissue balls from the coral <i>Pocillopora damicornis</i> (Linnaeus 1758) during cryoprotectant treatment.	
International Conference - CryoBiotech2015 - STL B Best Poster Award Poster 3.	
Poster 4 : Cryopreservation for long-term conservation of coral diversity: a case study with <i>Pocillopora damicornis</i> .	
Références Bibliographiques	p. 301

Liste des Figures

Partie I - Chp 1

- p* - 39 - **Figure 1** : Distribution des récifs coralliens. Source : Bryant *et al.*, 1998.
- p* - 40 - **Figure 2** : Le Triangle de Corail abritant la plus forte diversité de madrépores. Source : outremer.mnhn.fr
- p* - 41- **Figure 3** : Bilan radiatif de la Terre. Source : calipsooutreach.hamptonu.edu.
- p* - 42- **Figure 4** : Schématisation du cycle biogéochimique permettant la production de DMSP et de DMS et des groupes fonctionnels intervenant dans le cycle (couleur). Vert : Phytoplancton, Bleu : Zooplancton, Rouge : Bactéries, Noir : facteurs abiotiques. CCN : cloud-condensation nuclei, DOM : dissolved organic material, MeSH : methanethiol, MPA : mercaptopropionate, MMPA : methylmercaptopropionate, MSA : methanesulphonic acid. Source : Stefels *et al.*, 2007.
- p* - 43- **Figure 5** : Les oiseaux marins détectent le DMS. Source : Espèces n°15.
- p* - 44- **Figure 6** : Blanchissement d'une même branche de *Pocillopora damicornis*. A : Tissus zooxanthellés. B : Tissus azooxanthellés. Echelle = 0.5 cm
- p* - 44 - **Figure 7** : Rupture de la symbiose algue-corail. A : Fixation du carbone inorganique dissous et production de photosynthétats grâce à l'activité photosynthétique des zooxanthelles. B : Perturbation de la photosynthèse impactant l'autotrophie. Induction d'un stress oxydatif conduisant à l'expulsion des zooxanthelles et au phénomène de bleaching. Source : Wooldridge *et al.*, 2012.
- p* - 46 - **Figure 8** : Evolution des concentrations en dioxyde de carbone en Antartique et à Hawaï. Source : rac-f.org.
- p* - 47 - **Figure 9** : Influence de la bathymétrie sur la dissolution du carbonate de calcium dans les différents bassins océaniques. Source : Feely *et al.*, 2004.
- p* - 48 - **Figure 10** : Prédation d'*Acanthaster planci*. Source : ird.fr
- p* - 51 - **Figure 11** : Description d'*Halofolliculina corallasia* responsable de l'érosion squelettique. Source : Antonius et Lipscomb, 2000.
- p* - 52 - **Figure 12** : Recensement des maladies touchant les Scléactiniaires de Floride et des Caraïbes. Source : Hayes et Goreau, 1998.
- p* - 56 - **Figure 13** : Microplastique retrouvé dans les mésentéries de *Dipsastrea pallida*. Source : Hall *et al.*, 2015.
- p* - 60 - **Figure 14** : Interactions entre les écosystèmes. Source : Moberg et Folk, 1999.
- p* - 61 - **Figure 15** : Relations entre les intérêts politico-économiques, sociaux et environnementaux fournis par l'écosystème récifal. Source : De Groot *et al.*, 2002.
- p* - 62 - **Figure 16** : Principaux composés bio-actifs produits par les invertébrés marins. Source : Datta *et al.*, 2015.
- p* - 64 - **Figure 17** : Evolution temporelle de la couverture récifale à l'échelle globale. Source : GEO-EXTRA, 2015.
- p* - 67 - **Figure 18** : Principales menaces anthropiques sur l'écosystème récifal. Source : Bryant *et al.*, 1998.
- p* - 67 - **Figure 19** : Menaces naturelles et anthropiques sur l'écosystème corallien.

Partie I - Chp 2

p - 70 - Figure 20 : Nucléation homogène de la molécule d'eau en fonction des conditions thermique et barométriques. Source : Debenedetti, 2003.

p - 71 - Figure 21 : Organisation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau de la phase liquide (a) à la phase cristalline (d) et (e). Le cercle jaune (b) indique une amorce nucléique. La configuration hexagonale est bien visible en (d) et (e). Source : Matsumoto *et al.*, (2002).

p - 75 - Figure 22 : Les températures rencontrées en cryoconservation. Source : Morris, 1981.

p - 80 - Figure 23 : Détails des cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants les plus couramment utilisés.

Partie I - Chp 4

p - 106 - Figure 24 : Production photosynthétique nécessaire à la production de glycérol chez deux clades de *Symbiodinium sp.* Source : Suescun-Bolivar *et al.*, 2012.

p - 108 - Figure 25 : Différences de productions des MAA entre quatre Scléactiniaires 14 jours après incubation à 27°C (Test : +UV ; Témoin : -UV). 1 : Palythine-serine-sulfate ; 2 : Mycosporine-glycine ; 3 : Shinorine ; 4 : Porphyra-334 ; 5 : Palythine ou Palythine-serine ; 6 : Mycosporine-NMA:serine ; 7 : Usujirene ; 8 : Palythene. Source : Ferrier-Pagès *et al.*, 2007.

p - 108 - Figure 26 : Formules développées des mycosporines et des acides aminés de type mycosporine. Source : Oren et Gunde-Cimerman, 2007.

p - 109 - Figure 27 : Production de DMSP chez *Emiliania huxleyi* en fonction de la température et de l'irradiance. Source : Stefels *et al.*, 2007.

Partie I - Chp 5

p - 114 - Figure 28 : Classification de *Pocillopora damicornis* selon les critères ontogénétiques. Source : D'après la classification phylogénétique simplifiée de Lecointre et Guyader (2001).

p - 115 - Figure 29 : Caractérisation des quatre classes des Cnidaires en fonction des stades libres et fixés. Source : Galliot, 2000.

p - 119 - Figure 30 : Exemple de classification de Madréporaires élaborée à partir des éléments radiaires. Source : Beauvais, 1980.

p - 120 - Figure 31 : Arbre phylogénétique construit à partir des données transcriptomiques illustrant les distances entre les familles de Scléactiniaires dites complexes ou robustes, confrontées à un environnement stressant. Traylor-Knowles *et al.*, 2011.

p - 120 - Figure 32 : Colonie de *Pocillopora damicornis*.

p - 121 - Figure 33 : Schéma d'organisation d'un polype de Scléactiniaires coloniaux. Source : Grassé *et al.*, 1987.

p - 122 - Figure 34 : Disposition céroïde (A) et plocoïde (B) des calices de *Pocillopora damicornis*.

p - 123 - Figure 35 : Eléments calcaires constituant la corallite. Source : Sorauf, 1972.

p - 123 - Figure 36 : Organisation des cristaux dans le squelette de *Porites lutea*. A : Structures cristallines rayonnantes ou sphérulitiques. B : Croissance et évolution de la forme

des cristaux (i) cubique, (ii) tabulaire, (iii) dendritique, (iv) sphérulitique grossier, (v) sphérulitique fin. Source : Cohen et McConnaughey, 2003.

p - 124 - Figure 37 : Représentation schématique des cycles septaux d'un polype de Scléactiniaire. Source : Grassé *et al.*, 1987.

p - 126 - Figure 38 : Taux de calcification en fonction de la région squelettique d'*Acropora cervicornis*. Source : Goreau et Goreau, 1959.

p - 126 - Figure 39 : Différences de calcification des polypes de Scléactiniaires. Source : Goreau, 1959.

p - 128 - Figure 40 : Polypes de *Pocillopora damicornis*. A : Profil latéral, le polype s'organise en un disque oral séparé de la base par une colonne murale. B : Vue apicale du disque oral divisé par les 12 tentacules et ouvert au centre par l'orifice bucco-anal.

p - 129 - Figure 41 : Observations par SEM. A : Tentacules balayants d'*Erythropodium* sp. B : Acrosphère chargé d'isorhizes holotriques. Echelle = 10 µm. Source : Kass-Simon et Scappaticci, 2002.

p - 130 - Figure 42 : Observations des acrosphères à l'extrémité des tentacules des polypes de *Pocillopora damicornis*. A : Coloration blanche caractéristique des acrosphères. B : Autofluorescence des acrosphères. C : Acrosphères en défense avec la rétractation du polype. D : Transparence des tentacules et opacité des acrosphères chargés d'isorhizes.

p - 131 - Figure 43 : Fente buccale d'un polype de *Pocillopora damicornis*.

p - 131 - Figure 44 : Filaments mésentériques hors de la cavité gastrique de deux polypes de *Pocillopora damicornis*.

p - 133 - Figure 45 : Représentation schématique de l'organisation tissulaire chez *Pocillopora damicornis*. Cn : cnidocyte ; N_A : nucleus cellule animale ; N_V : nucleus zooxanthelles ; C_L : chloroplaste ; P_Y : pyrénolide. Echelle : 5 µm. Source : Allemand *et al.*, 2011.

p - 139 - Figure 46 : Identification des Cnidocytes. Source : Östman, 2000.

p - 144 - Figure 47 : Symbiose entre le corail et les bactéries dans le mucus. Source : Brown et Bythell, 2005.

Partie II - Chp 1

p - 150 - Figure 48 : Les différentes étapes du microbouturage aux traitements. A : Acclimatation des branches de *Pocillopora damicornis*, B : Microbouturage des apex, C : Mise en culture des apex isolés, D : Exposition des apex aux solutions cryoprotectrices, E et F : Suivi post-traitements.

Partie II - Chp 2

p - 167 - Figure 49 : Production larvaire au cours d'une nuit de planulation pour *Favia fragum*. Source : Goodbody-Gringley, 2010.

p - 168 - Figure 50 : Echantillon de taille de trois Pocilloporidés répartis en trois classes ; S : small, M : medium, L : Large. Source : Isomura *et al.*, 2001.

p - 170 - Figure 51 : Collecte des planulae de *Pocillopora damicornis*. A : Flacons isolant les planulae pour la fixation, B : Collecteurs, C : Larve de *P. damicornis*, D : Larve de *P. damicornis* après exposition au glycérol, E : Larve en cours de métamorphose et de fixation. Echelle = 100 µm.

p - 172 - **Figure 52** : Cycle de planulations de *Pocillopora damicornis* en fonction du temps et du calendrier lunaire.

p - 173 - **Figure 53** : Cycle de ponte des planulae (gros spots : planulae, petits spots : pré-planulae). a : *Euphyllia paradivisa*, b : *Favia fragum*, c : *Pavona cactus*, d : *Pocillopora damicornis*, e : *Pocillopora verrucosa*, f : *Porites sp.*, g : *Seriatopora hystrix*, h : *Stylocoeniella guentheri*, i : *Stylophora pistillata*. Source : Barthélémy, 2008.

p - 174 - **Figure 54** : Tolérance des planulae de *Pocillopora damicornis* aux solutions cryoprotectrices binaires contenant 1.5 M CPA pénétrant + 0.5 M Sucrose (15 planulae/traitement) pendant 20 min à température ambiante.

p - 178 - **Figure 55** : Larves métamorphosées et fixées de *Pocillopora damicornis* sur feuille plastique érodée. Source : Hidaka, 1985.

p - 178 - **Figure 56** : Lames microscopiques en verre permettant la métamorphose et la fixation des larves de plusieurs Scléactiniaires. Source : Wyers *et al.*, 1991.

p - 179 - **Figure 57** : Tuiles céramiques. Source : Petersen *et al.*, 2005.

p - 183 - **Figure 58** : Application de la méthode OozoFix pour tester la tolérance des polypes primaires de *Pocillopora damicornis* aux solutions cryoprotectrices. A : Collecte d'une larve métamorphosée de moins de 1h, B : Métamorphe détaché laissant une empreinte cristalline, C : Larve métamorphosée déposée sur un carré nylon, D-H : Fixation des larves en moins de 24h, E-F : Polypes primaires de 3 jours fixés, G : Trois polypes primaires fixés sur le même carré nylon, I : Colonie de *P. damicornis*, J : Quatre colonies sur un seul carré nylon, K : Polypes primaires en culture, L : Colonie après 1 mois de culture, M : Observations des polypes primaires sous binoculaire, N : Exposition des polypes primaires aux cryoprotecteurs, O : Séchage sur papier absorbant.

p - 184 - **Figure 59** : Balle tissulaire de *Seriatopora hystrix*. Source : Sammarco, 1982.

p - 186 - **Figure 60** : Polypes mobiles expulsés de *Pocillopora damicornis*.

Partie II - Chp 3

p - 194 - **Figure 61** : Différentes compositions d'eau de mer artificielle. Sources : Sverdrup *et al.*, 1942 ; Rice, 1956.

Partie II - Chp 5

p - 225 - **Figure 62** : Balles tissulaires de *Pocillopora damicornis* (A) et de *Stylophora pistillata* (B). Source : Domart-Coulon *et al.*, 2004.

p - 228 - **Figure 63** : Stratégies pour induire la métamorphose des Hydrozoaires. Source : Walther *et al.*, 1996.

Partie II - Chp 6

p - 258 - **Figure 64** : Solutions vitrifiantes testées sur les embryons de *Paralichthys olivaceus*. Source : Chen et Tian, 2005.

Liste des Tableaux

p - 40 - **Tableau 1** : Diversité des coraux constructeurs de récifs. Modifié du site outremer.mnhn.fr

p - 61 - **Tableau 2** : Valeur économique des récifs coralliens. Source : Hoegh-Guldberg, 1999.

p - 107 - **Tableau 3** : Excrétion osidique par les *Symbiodinium* hébergés dans trois espèces de Scléactiniaires. Source : Hagedorn *et al.*, 2015.

p - 111 - **Tableau 4** : Concentrations en DMSP chez 6 espèces d'Anthozoaires et 4 cultures de zooxanthellae provenant de la Grande Barrière de Corail. Source : Broadbent *et al.*, 2002.

Lexique

Acyl-CoA : Issu de l' α oxydation des acides gras ramifiés formant un thioester (R-C(=O)-S-R) CoenzymeA. Le nouvel acide gras obtenu par la décarboxylation oxydative du thioester va être dégradé par des β oxydations pour former plusieurs thioester dont l'Acyl-CoA, ou association acide acétique-CoenzymeA. On parle aussi d'acéthyl-CoA.

Albédo : Valeur physique définissant la quantité d'énergie solaire incidente réfléchiée par une surface donnée. Ce facteur de réflexion (% ou entre 0 et 1) sera d'autant plus élevé que le corps réfléchissant sera clair. On peut aussi écrire « Albedo ».

Aérobic : En lien avec le dioxygène. Activités physiques, chimiques ou biologiques contraintes par la présence de dioxygène en quantités non limitantes. Environnement influencé par la représentation du dioxygène.

Amorphe : Soluté à l'état solide dont la désorganisation moléculaire est proche de l'état liquide et se différencie de la cristallisation. Le point critique de l'amorphie est estimée à -130°C pour la molécule d'eau.

Anaérobic : Contraire de l'Aérobic. Activités physiques, chimiques ou biologiques contraintes par l'absence de dioxygène en quantités non limitantes. Environnement influencé par l'absence de dioxygène.

Annexe V : Annexe parmi les 6 annexes de la Directive européenne « Habitat Faune Flore » de 1992. Régie sur le sol européen les prélèvements dans le milieu naturel et les exploitations des espèces animales et végétales d'intérêt communautaire.

Anoxie : Désigne un manque de dioxygène dans un environnement ou dans les tissus biologiques, susceptible d'induire l'asphyxie.

Anthropocène : Aire du Quaternaire succédant à l'Holocène et traduisant l'anthropisme comme nouveau facteur d'influence de la géologie terrestre. La naissance de l'Anthropocène est encore sujette à débat entre le début de la révolution industrielle (années 1800) ou à la sédentarisation des peuples il y a 10 000 ans.

Apomorphie : Dérive d'un caractère par rapport à l'état ancestral. Changement phénotypique par des modifications génotypiques.

Apical : Désigne l'extrémité haute d'une entité biologique (apex, pôle, ...). Localise l'environnement proche d'une structure considérée comme un point de référence.

Apoptose : Processus de mort cellulaire programmée et nécessaire à la pérennité (destruction cellules cancéreuses, cellules auto-immunes, ...) ou au développement (structuration lors du développement embryonnaire) d'un organisme vivant.

Archéocyte : Cellule totipotente de l'embranchement des Spongiaires. Aussi écrite Archaeocyte.

Autophagie : Processus de dégradation partielle et non discriminatoire du cytoplasme cellulaire. Les vésicules cytoplasmiques appelées autophagosomes associées aux lysosomes sont à l'origine de l'autophagie. L'autophagie peut être utilisée pour limiter la prolifération virale, protéger contre la senescence,

Autapomorphique (=apomorhique) : caractère dérivé spécifique à un taxon permettant d'identifier l'espèce.

Autotrophie : Production de carbone organique à partir de carbone minéral par un organisme vivant.

Bathymétrie : Science permettant de déterminer la profondeur en milieu aqueux, souvent associée à la topographie.

Barométrie : Science mesurant la pression atmosphérique

Benthique : Qualifie un milieu, un processus ou le mode de vie d'un organisme en relation avec les fonds subaquatiques.

Benthos : Ensemble des organismes vivants (phytobenthos ou zoobenthos) en relation étroite avec les fonds subaquatiques (*définition Ifremer*).

Biosphère : Espace autosuffisant concentrant une diversité faunistique et floristique. L'ensemble des écosystèmes de notre planète est souvent mentionné comme la biosphère terrestre.

Blanchissement : voir Bleaching

Bleaching : Terme anglophone traduisant la perte de la coloration des organismes zooxanthellés (Cnidaires, Spongiaires, Mollusques) attestant d'une perte du pigment photosynthétique voire d'une expulsion des zooxanthelles. Les tissus devenus translucides laissent apparaître un squelette souvent blanc qui a valu l'expression de bleaching ou de blanchissement.

Bionte : Synonyme d'organisme.

Bloom : Forte prolifération planctonique.

Broadcaster : Mot anglophone définissant les coraux libérant les gamètes dans le milieu externe (coraux à fertilisation externe).

Brooder : Mot anglophone décrivant les coraux à fertilisation interne et incubateurs. L'embryogénèse est protégée dans la cavité gastro-vasculaire du polype jusqu'à la libération d'une planula compétente.

Clade : Identifie l'évolution génétique des différentes lignées ou phylotypes évoluées à partir d'un même genre. Pour le genre *Symbiodinium* sp., 9 clades (A à I) ont été déterminées. En général, chaque clade contient une diversité de sous-clades.

Chilling sensitivity : Aussi indiqué comme « Chilling injuries ». Ces deux expressions anglophones définissent les dommages liés au refroidissement : les lésions liées au froid (cold injuries) et celles liées au choc thermique (cold choc).

Chimiotrophe : Micro-organisme utilisant l'énergie issue de l'oxydation de composés chimiques.

Chimio-lithotrophe : Micro-organisme utilisant l'énergie issue de l'oxydation de composés minéraux.

Chimio-organotrophe : Micro-organisme utilisant l'énergie issue de l'oxydation de composés organiques.

Chimiosynthèse : Formation de la matière organique à partir de la matière minérale ; par opposition à l'énergie lumineuse utilisée pour la photosynthèse.

Coenosarque : Tissu de liaison permettant les échanges nutritifs, la diffusion de l'eau, ... entre les polypes formant une colonie corallienne.

Coenosteum : Surface squelettique commune du corail constituée d'éléments calcaires et localisée entre les calices.

Congélation : Réorganisation des molécules d'eau sous la forme de cristaux de glace. Le terme de « congélation » est utilisé de façon générale pour décrire l'arrêt des processus cellulaires. L'utilisation de ce terme apparaît inappropriée pour désigner le processus de vitrification (Fahy et Wowk, 2015).

Cristallisation : Formation de cristaux obtenus à partir d'un soluté soumis à des conditions physico-chimiques spécifiques.

Cryobiologie : Science étudiant les effets des températures négatives sur les êtres vivants et à différentes échelles (moléculaires, cellulaires, tissulaires, organismes).

Cryoprotecteur : Agent pénétrant ou non pénétrant utilisé pour sa capacité à prévenir et/ou à limiter les dommages cellulaires au moment de la congélation (Fahy and Wowk, 2015).

Devitrification : Cristallisation durant la période de réchauffement (décongélation) après la vitrification (Sakai et Engelmann, 2007 ; Fahy et Wowk, 2015).

Dichotomique (clé) : Classification basée sur le choix binaire et la succession de caractères permettant la classification, l'identification d'un organisme dans le règne du vivant.

Dulcicole : Organisme vivant en eau douce, on emploie aussi « aquicole ». Le qualificatif « dulçaquicole » est aussi utilisé bien que ce terme face exclusivement référence à des organismes se reproduisant en eau douce.

Effet de solution : Concentration et précipitation des solutés en état de sursaturation, induit lors de la formation des cristaux de glace au moment de la déshydratation (Tiersch, 2007).

Electrolyte : Composé à l'état liquide ou en solution fournissant un courant électrique par le déplacement des ions ainsi caractérisés par leur charge électrique.

Epizootie : Epidémie touchant les animaux. L'épidémie s'applique à l'homme, elle traduit le développement d'une maladie et sa propagation dans une région et pour un temps donné. Sa propagation à l'échelle globale devient une pandémie.

Eutrophisation : Enrichissement excessif d'un milieu terrestre et/ou aquatique dont les conséquences peuvent s'avérer létales pour les communautés en place.

Exothermique : Transformation (chimique, mécanique,...) qui produit de l'énergie sous forme de chaleur.

Explantation : Isolement de cellules ou d'une pièce tissulaire à partir d'une entité vivante.

Fécondité : Faculté de reproduction et de taux de production d'une nouvelle génération.

Fertilité : Capacité à produire une fécondation viable.

Fusion (point de) : Température à laquelle se produit le changement de phase d'un corps (ex : liquide-solide, solide-liquide, ...).

Gardening concept : Expression anglophone utilisée pour décrire la culture de coraux directement *in situ* pour permettre le développement de nurseries destinées à favoriser le recrutement *in situ*.

Gemmulation : Production de gemmules chez les Spongiaires. Formes de résistances tissulaires sphéroïdes produites en conditions défavorables et capables de régénération en un organisme compétent.

Géotactisme : Pour les Anthozoaires, le géotactisme fait référence à l'attraction larvaire sur le substrat (géotactisme positif).

Germoplasme : En référence au plasma germinatif, ressources génétiques soutenant la production d'une nouvelle génération.

Gonadogénèse : Formation des gonades, organes de la reproduction.

Gonochorisme : Aussi mentionné « dioïque », caractérise la production d'un seul type de gamètes (séparation des sexes).

Habitats (directive) : Directive européenne (92/43/CEE) définissant un cadre commun entre les états membres pour la conservation des habitats naturels et le maintien de la biodiversité faunistique et floristique sauvage.

Hermaphroditisme : Définit la production simultanée ou successive dans le temps des gamètes mâles et femelles par un même individu. Hermaphroditisme protandre : mâle puis femelle, hermaphroditisme protogyne : femelle puis mâle.

Hétérotrophie : Capacité à synthétiser de la matière organique à partir d'autres matières organiques.

Holocène : Ere géologique s'étendant sur les 11 000 dernières années caractérisant la fin de l'ère quaternaire. C'est une période considérée comme géologiquement stable. L'Anthropocène débutant avec la révolution industrielle (1800) est pressentie pour succéder à cette ère.

Homéostasie : Capacité d'un écosystème (ou d'un organisme) à maintenir son équilibre des pressions externes et internes.

Hotspot : Terme anglophone dont l'expression littérale signifie « point chaud ». Zones géographiques terrestres ou marines hébergeant une abondante biodiversité et soumises à la pression anthropique.

Hygrométrie : Science déterminant le taux de saturation de l'eau dans un gaz, exprimé en % d'eau. On parle également de degré d'hygrométrie ou du taux d'humidité en faisant souvent référence à l'air.

Hypertoncité : L'hypertoncité cellulaire caractérise un contenu intracellulaire doté d'une concentration en soluté supérieure au milieu extracellulaire. Le gradient de concentration va induire une importante pression osmotique s'illustrant par une entrée d'eau dans le

compartiment cellulaire. L'absence de régulation du flux d'eau peut entraîner une distorsion excessive de la membrane cytoplasmique allant jusqu'à l'éclatement de la cellule, c'est le phénomène d'hémolyse.

Hypotonicité : Phénomène inverse de l'hypertonie. Les cellules sont plus faiblement concentrées en solutés que le milieu extracellulaire. La sortie d'eau du compartiment cellulaire va induire un phénomène de plasmolyse, c'est-à-dire une rétractation de la cellule.

Hypoxie : Décrit une situation pour laquelle la concentration en dioxygène disponible devient limitante pour une entité biologique donnée. Une augmentation du phénomène d'hypoxie entraîne une situation d'anoxie.

Hystérèse : Aussi mentionné comme l'hysteresis, état correspondant à un décalage inhabituel entre la cause et la conséquence. Dans le contexte de la cryoconservation, l'hystérèse thermique qualifie la situation pendant laquelle est observée en écart entre la température de fusion et la température de solidification.

Infrarouge (IR) : Ondes électromagnétiques de basses fréquences de rayonnement, inférieures à celle du rouge visible. Les longueurs d'ondes (inverse de la fréquence) sont supérieures (0.7 μm - 1600 μm) à celles de la lumière blanche (0.4 μm - 0.7 μm), perçues par l'œil humain. L'absorption par l'atmosphère terrestre des infrarouges provenant des radiations solaires va entraîner une augmentation des températures.

Jurassique : En référence aux strates sédimentaires calcaires découvertes dans le Jura, témoignant de la vie tropicale dans l'Arc jurassien entre -199 et -145 millions d'années. Des lagons ainsi que des récifs coralliens y ont notamment été mis à jour. Le Jurassique se place dans l'ère Secondaire (ou Mésozoïque), succédant au Trias.

Lécithotrophe : Dont l'alimentation du bionte repose sur sa réserve vitelline. Ce soutien nutritionnel permet aux larves de s'affranchir pour un temps défini des échanges matrotrophes (avec la mère) ou du milieu environnant.

Matrice : Trame macromoléculaire pourvue de récepteurs membranaires et constituée de polysaccharides, protéines fibreuses et glycoprotéines. La matrice organique est synthétisée à partir de certaines cellules du bionte bien que l'ensemble des cellules aient une capacité de synthèse (*cours-pharmacie.com*).

Métapopulation : Ensemble des populations d'une espèce réparties dans un espace donné et séparées dans l'espace (fragmentation de l'habitat) et dans le temps. La métapopulation est basée sur les interconnexions qui existent entre les populations tel que le phénomène de dispersion (actif ou passif).

Mésentère : Cloisons endodermiques de la cavité gastro-vasculaire. Les mésentères sont reliés dans leur partie supérieure au pharynx et constituent les chambres radiaires communiquant avec les tentacules. Dans la cavité gastro-vasculaire, les mésentères ont un bord libre constitué d'endoderme et se prolongent dans la base de la cavité sous la forme d'un bourrelet. Les mésentères sont également décrits comme les mésentéries et les mésentéroïdes.

Filaments mésentériques : extension et épaissement endodermique au niveau du bord libre des mésentères. En plus des cellules endodermiques, ces filaments sont pourvus de nématocytes, de cellules glandulaires muqueuses et granuleuses ainsi appelé tractus cnidoglandulaire (Grassé *et al.*, 1987).

Mésophile : Bionte dont les optima de développement et de reproduction se font à des températures entre 20 et 45 °C.

Mésozoïque : Ere géologique appelée également Ere Secondaire et s'étendant sur 185 millions d'années de -251 à -65.5 millions d'années, entre le paléozoïque et le cénozoïque. Cette ère a débuté juste après l'extinction massive du Permien (~ -245 millions d'années) et s'est achevée avec celle du Crétacé (~ -65 millions d'années). La dominance des reptiliens sous cette ère a valu aussi le nom « Age des reptiles ».

Micro-onde : Ondes électromagnétiques de fréquences plus petites que les infrarouges mais avec des plus grandes longueurs d'ondes (de 1 mm à 1 m). Elles sont plus petites cependant que les ondes de radiodiffusion et furent ainsi baptisées de micro-ondes.

Microbouturage : Technique de multiplication asexuée (végétative) permettant d'isoler un fragment tissulaire d'une entité donnée et capable de régénérer un ou des individus conservant les mêmes performances de développement et de reproduction que l'entité initiale.

Microcolonie : Technique de multiplication asexuée pour l'obtention d'entités clonales et capables de développement et de reproduction. Selon l'étude de Tambutté *et al.*, 1995, les microcolonies se définissent comme des fragments d'Anthozoaires coloniaux, conservés dans leur organisation squelettique et tissulaire. Les microcolonies se caractérisent par une longueur initiale proche du centimètre. Elles permettent d'isoler quelques polypes voire un seul individu.

Microparticule : Particule de taille hétérogène entre 0.1 et 100 µm.

Microplastique : Particules de plastiques dont la fragmentation a entraîné la formation de pièces de plastiques de taille inférieure à 5 mm aussi qualifiées de microparticules de plastiques.

Mixotrophie : Mode trophique non spécifique utilisant l'autotrophie ou l'hétérotrophie.

Monocentrique : Individus isolés dans leur calice.

Monophylétique : Groupes issus d'un ancêtre commun et contenant tous les descendants connus. On peut parler aussi de « clades » comme pour les *Symbiodinium* sp. .

Nubbin : Terme anglophone utilisé pour décrire une microcolonie.

Nucléation : Phénomène aléatoire basée sur l'ordonnation d'une structure constituée d'ions et d'atomes à l'origine de la formation des premiers germes cristallins ou nuclei. On parle aussi de germination.

Oligotrophe : Milieu pauvre en éléments nutritifs, faiblement chargé en matière organique. Les eaux sont souvent transparentes. Un milieu riche sera à l'inverse qualifié d'eutrophe et un milieu de charge intermédiaire sera dit mésotrophe.

Ontogénétique : Description des caractères reflétant l'évolution du phénotype jeune vers le phénotype adulte.

Oozoïte : Etre initial issu du développement de l'œuf.

Oligocène : Période s'étendant entre -34 et -24 millions d'années. Elle constitue la deuxième période de l'ère tertiaire entre l'éocène et le miocène. La répartition des continents est

semblable à aujourd'hui. Le Nord de l'Atlantique s'ouvre à l'Arctique entraînant un refroidissement des eaux, ainsi qu'une circulation océanique davantage renforcée par la jonction des deux Amériques au niveau de l'isthme de Panama.

Ordovicien : L'Ordovicien constitue la seconde période du Paléozoïque entre -488 et -444 millions d'années. Les récifs coralliens se seraient développés pendant cette ère. L'Ordovicien est cité également pour l'extinction entre 60% et 85% de la biodiversité. C'est une période pendant laquelle la glaciation a entraîné d'importantes perturbations des paramètres abiotiques océaniques.

Organelle : Aussi mentionné organelle, structure organisée et différenciée contenue dans le cytoplasme des cellules ayant une fonction spécifique indispensable à l'activité cellulaire.

Osmolyte : Molécules utilisées comme des petits solutés par la cellule permettant la régulation de la pression osmotique.

Osmorégulateur : Ensemble des mécanismes homéostatiques permettant de réguler la pression osmotique cellulaire pour la conservation d'un équilibre isosmotique.

Paléozoïque : Ère géologique la plus ancienne également appelée ère Primaire. Elle est comprise entre -542 et -251 millions d'années. Cette ère est décrite pour son abondante biodiversité et un climat davantage tropical à la fin de cette période.

Paraphylétique : Groupe constitué d'une partie des descendants d'un ancêtre commun mais dont les autres descendants sont exclus (exemple des crocodiles partageant un ancêtre commun avec les oiseaux, mais ces derniers restent hors du groupe des reptiliens).

Parthénogénétique : Reproduction de type asexuée dont la fécondation de l'œuf ne requiert pas l'insémination d'un spermatozoïde. En fonction du sexe obtenu, la parthénogénèse peut être qualifiée de thélytoque (femelle), arrhénotoque (mâle) ou deutérotoque (les deux sexes). Elle peut être également facultative, cyclique, ...

Pélagique : Qualifie un milieu, un processus ou le mode de vie d'un organisme en relation avec la colonne d'eau, excluant les fonds subaquatiques.

Pelagos : Ensemble des organismes vivants en relation étroite avec la colonne d'eau, dans la tranche d'eau supérieure du benthos et jusqu'à la surface.

Permien : Dernière période du Paléozoïque s'étendant de -299 à -252 millions d'années. L'extinction du Permien est à l'origine de la disparition des Tabulés et des Rugueux. C'est une des régressions les plus importantes de la biodiversité terrestre et marine.

Peroxydation : Oxydation des lipides induite par les dérivés de l'oxygène. Ce processus va s'accompagner d'une perturbation des fonctions et de la fluidité des membranes plasmiques cellulaires et des organites.

Phototactisme : Processus de mouvement d'un organisme entraîné par la production d'une source lumineuse. Le phototactisme positif traduit le mouvement en direction de la lumière, inversement le phototactisme négatif illustre la répulsion à une exposition lumineuse.

Piriforme : En forme de poire.

Planula : Synonyme de larve. Individu planctonique produit par voie sexuée ou asexuée formé à l'issue d'une embryogénèse interne ou dans le milieu externe. Le déplacement des

planulae peut être passif ou actif (ciliature). Terme très utilisé pour les Cnidaires reflétant un mode de vie benthopélagique avant une métamorphose et une fixation sessile ou vagile au substrat.

Plasticène : Terme nouveau apparu avec l'émergence d'un type de sédiment directement produit par l'activité humaine, les plastiglomérats. Ces agglomérations d'éléments minéraux et de matières plastiques d'origine anthropique mais aussi la présence des particules et microparticules de plastiques enfouies dans le sédiment seraient synonymes d'une nouvelle ère géologique, reflétant l'Anthropocène. L'expression « plasticène » reste encore à débat.

Plasticité : Capacité d'un organisme à s'adapter aux facteurs limitant son développement et sa reproduction.

Polymérisation : Synthèse macromoléculaire (polymères) à partir de molécules de masses molaires inférieures (monomères).

Polymorphie : Capacité de paraître sous différentes formes selon des contraintes environnantes (physiques, chimiques, biologiques).

Polype : Invertébré marin mais aussi dulcicole capable ou non de produire un polypierite à partir de la bioaccumulation du carbonate de calcium. Le polype constitue l'unité de base d'une colonie corallienne mais peut également être solitaire chez d'autres espèces. C'est un animal sessile ou vagile selon les espèces et doté de nombreuses stratégies de reproduction.

Polypier : Masse distincte formée par les parties dures (calcaires) d'un ou plusieurs polypes unis organiquement entre elles. Polypiers simples : faisant référence à des individus isolés ; Polypiers composés : union de plusieurs individus isolés (Milne Edward et Haine, 1849).

Polypierites : Ensemble des parties dures appartenant à chacun des individus agrégés (Milne Edward et Haine, 1849).

Polyp Bail Out : Expression anglophone. Processus de survie et type de reproduction asexuée basés sur la dissociation du polype de son polypier puis sa dispersion du polypierite vers des conditions de vie plus optimales.

Polyplœide : Entité possédant plus de $2n$ chromosomes.

Primmorphe : Aggrégat cellulaire obtenu par explantation ou généré à partir de cellules dissociées et capables de développement en un individu possédant les capacités de développement et de reproduction de l'espèce. Type de reproduction asexuée chez les Spongiaires (= gemmulation).

Radiations ionisantes : Particules ou rayonnements énergétiques capables de transmettre à la matière irradiée son énergie, de l'ioniser et d'y entraîner parfois une recombinaison ou une réaction chimique (*Larousse*).

Radicaux libres : Produits issus des réactions chimiques utilisant la molécule d'oxygène. Ce sont des molécules chimiques instables souvent produites en faibles quantités ayant la capacité d'oxyder les cellules de l'organisme. Ces réactions sont responsables du vieillissement cellulaire et peuvent s'avérer toxiques pour l'organisme. La production d'antioxydants permet de limiter la production des radicaux libres.

Recristallisation : Formation de nouveaux cristaux de glace au moment de l'augmentation des températures à partir de -120 °C et croissance des petits cristaux formés avant la congélation.

Scléractiniaires : Coraux durs bâtisseurs des récifs, aussi appelés Madréporaires.

Seeding : Mot anglophone utilisé pour décrire le phénomène associé à la congélation lente visible comme un palier dans le processus de congélation et qui correspond à la formation de la cristallisation.

Sténotherme : Organisme de faible valence thermique.

Stratopère : Seconde couche de l'atmosphère terrestre comprise entre 10 et 50 km d'altitude et située entre la troposphère et la mésosphère dans l'étage supérieur. La stratosphère supérieure contient la couche d'ozone limitant la pénétration du rayonnement solaire et participant à l'albédo.

Strobilation : Reproduction asexuée produite par la segmentation spontanée et transversale du scyphopolype pour donner chez certains Méduzoaires des éphyres ou éphyrules libres et mobiles.

Surfusion : Etat métastable dans un intervalle de température pendant lequel un corps reste liquide malgré une température inférieure à son point de fusion.

Symbiose : Relation permanente ou de longue durée entre deux organismes hétérospécifiques voire plus, dont l'association est bénéfique pour l'ensemble des partenaires.

Symbionte : Définit l'organisme établi dans une relation de symbiose dont son activité apporte un bénéfice à l'organisme hôte. Le symbionte représente l'organisme le plus petit par la métrique (et non par le nombre) parmi les partenaires associés et l'hôte, le plus grand. Aussi mentionné comme « Symbiote ».

Symbiocosme : Décrit la nouvelle entité biologique produite par la symbiose de deux ou plusieurs biontes, apportant une dynamique de développement et de reproduction spécifique à l'association.

Symbiosome : Nouvelle organisation cellulaire formée par l'association de deux entités biologiques différentes.

Symbiophagie : Dégradation (digestion, ...) du symbionte par les cellules hôtes.

Synapomorphie : Partage d'un caractère commun entre deux ou plusieurs organismes.

Taux de congélation critique : Vitesse de congélation au-dessus de laquelle la formation de glace n'est pas observée (Fahy et Wowk, 2015).

Taux de réchauffement critique : Vitesse de décongélation permettant la suppression complète ou suffisante des cristaux de glace durant le réchauffement (Fahy et Wowk, 2015).

Taxon : Groupe d'organismes vivants partageant des caractères communs issus d'un même ancêtre, de l'embranchement jusqu'à l'espèce.

Température de transition de la glace/vitreuse : Température à laquelle s'opère le changement de phase (liquide-solide).

Thermodynamique : Science étudiant les échanges et les évolutions d'énergie (travail, entropie, chaleur) lors d'un changement d'état de la matière.

Thermosensible : Sensible à la chaleur. Synonyme de thermoèce.

Transplantation : Intervention dans le cadre de cette thèse destinée à isoler une pièce tissulaire d'une entité donnatrice.

Tissue balls : Aggrégats cellulaires utilisés dans le contexte de cette thèse dans l'objectif d'atteindre une métamorphose en un polype compétent. A cette expression anglophone, d'autres qualificatifs furent employés comme « polyp-balls ».

Trias : Première période de l'ère secondaire précédant le Lias et comprise entre -251 - 200 millions d'années. Cette période est caractérisée par trois formations sédimentaires, le marne mélangeant le calcaire et l'argile, le dépôt coquillier calcaire et le grès.

Ultraviolet : Radiations dont les fréquences de rayonnements électromagnétiques précèdent le violet. Les longueurs d'ondes sont plus courtes (entre 20 nm et 400 nm) que celles composant la lumière blanche mais plus longues que les rayons X (entre 0.01 nm et 10 nm).

Viscosité : La viscosité est la résistance de frottement induite par le déplacement d'un liquide. Unité la Poise. A 20 °C, la viscosité de l'eau est de 1 cPo.

Vitreux : Obtenu par la solidification très rapide d'un liquide lorsque le point de transition vitreuse est atteint. A cette température, les atomes ne sont plus mobiles et prennent une configuration proche d'un liquide mais dotée d'une déformation importante des liaisons hydrogènes imprimant une forte densité.

Vitrificateur : Agents permettant d'accéder à l'état d'amorphie, propre à la vitrification. Les vitrificateurs sont souvent désignés comme des cryoprotecteurs (Fahy et Wowk, 2015).

Vitrification : Congélation requérant de fortes concentrations en cryoprotecteur et des vitesses de congélation ultra rapides. Cette méthode évite le phénomène de cristallisation des molécules d'eau en obtenant un phénomène d'amorphie. L'état vitreux va être caractérisé par une forte densité due à un nombre de liaison hydrogène moindre et très déformé par rapport à l'eau à l'état liquide ou cristalline. La vitrification est obtenue grâce à une déformation importante des tétraèdres formés par les molécules d'eau.

Zooxanthelle : Terme utilisé abusivement par la communauté scientifique (<http://www.centrescientifique.mc>) pour désigner les dinoflagellés symbiotiques du genre *Symbiodinium* sp. des holobiontes.

Glossaire des sigles et des abréviations

Acyl-CoA : Acyl-coenzyme A
AFP : Antifreeze Proteins
AFGP : Antifreeze Glycopeptides
AI : Artificial Insemination
AMP : AntiMicrobial Peptide
ASW : Artificial Sea Water
24h- ASW : 24 h-aged Artificial Sea Water
BT : Bleu de Toluidine
BDD : Black Band Disease
BJS : Brown Jelly Syndrom
BSA : Bovine Serum Albumin
BS : Basic Saline Solution
Ca-FSW : Ca²⁺-free Filter Sea Water
CCA : Crustose Coralline Algae
CCN : Cloud Condensation Nuclei
CHP : Congélation sous Haute Pression
CN : Condensation Nuclei
CPA : CryoProtective Agents
npCPA : Cryoprotecteur non pénétrant ou non perméant
pCPA : Cryoprotecteur pénétrant ou perméant
COTS : Crown-Of-Thorns-Star-Fish
CITES : Convention on International Trade in Endangered Species
CSP : Cold Shock Proteins
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DCMU : 3-(3,4-DiChlorophényl)-1,1-diMéthyl-Urée (=DIURON)
DDVP : 2,2-DichloroVinyl Dimethyl Phosphate
DMA : N-DiMéthylAcetamide
DMF : N-DiMéthylFormamide
DMS : DiMéthylSulfure
DMSP : DiMéthylSulfonioPropionate
DMSO : DiMéthyl Sulfoxide
ECM : Extracellular Matrix
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EG : Ethylène Glycol
FBS : Fetal bovine serum
FCS : Fetal Calf Serum
FSW : Filter Sea Water
GBR : Great Barrier Reef
GCRMN : Global Coral Reef Monitoring Network
GIS : Groupement d'Intérêt Scientifique - CryoBanque Nationale
Glu : Glucose
Gly : Glycérol
GlyB : Glycine betaïne
HDA : High-Density Amorphous ice
HIFBS : Heat Inactivated Fetal Bovine Serum
HQI : Hydrargyrum Quartz Iodide

HPF : High Pressure Freezing
HSP : Heat Shock Proteins
IBP : Ice-binding Proteins
ICRAN : International Coral Reef Action Network
ICRI : Initiative Internationale pour les Récifs Coralliens
IFRECOR : Initiative Française pour les Récifs Coralliens
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
IRCP : Initiative Récifs Coralliens dans le Pacifique
IRIP : Ice Recrystallization Inhibition Proteins
ISO 14001 : International Organisation for Standardization, norme 14001
ISP : Ice Structuring Proteins
IUCN : International Union for Conservation of Nature
KCl : Chlorure de Potassium
KSW : K^+ + Sea Water
L15 : milieu de Leibovitz
LDA : Low-Density Amorphous ice
LS : Loading Solution
MAC : Marine Aquarium Council
MAA : Mycosporine-like Amino Acid
MAA-Gly : MAA-Glycine
Met : Méthanol
MG : Méthylène Glycol
MPSL : MucoPolySaccharide Layer
MSNA : Methane Sulfinic Acid
MVC : Minimum Volume Cooling
NBB : Naphtol Blue-Black
OA : Ocean Acidification
ONG : Organisation Non Gouvernementale
OozoFix : Oozoïte Fixé
OPS : Open Pulled Straws
 Ω_{arag} : Taux de saturation en aragonite
PAS-NBB : Periodic Acid Schiff's–Naphtol Blue-Black
PBS : Phosphate Buffered Saline
PG : Propylène Glycol
pH : Potentiel Hydrogène
PVP : PolyVinylPyrrolidone
PVS : Plant Vitrification Solution
RBD : Red Band Disease
ROS : Reactive Oxygen Species
RT : Room Temperature
RTN : Rapid Tissue Necrosis
SASW : Sterile Artificial Sea Water
SDR : Shut-Down Reaction
SEB : Skeleton Eroding Band
SML : Surface Mucus Layer
SP : Seminal Plasma
SRN : Stress Related Necrosis
SST : Sea Surface Temperature
SSW : Synthetic Sea Water ou Sterile Sea Water
Suc : Sucrose = saccharose

SYSAAF : Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français
TB : Tissue-Ball
TBL : Coral Tissue Bleaching
TBT-Cl : Tributyltin Chloride
THP : Thermal Hysteresis Protein
Tre : Tréhalose
ULS : UnLoading Solution
UNESCO : United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
VHDA : Very-High-Density Amorphous ice
VS : Vitrification Solution
WS : White Syndrom
WWF : World Wildlife Fund
X-1000TM : Synthetic Ice Blocker
YBD : Yellow Band Disease
Z-1000TM : Synthetic Ice Blocker

Introduction générale

Disparaîtront ? Disparaîtront pas ? Pour certains, le décompte est enclenché avec une disparition programmée des récifs coralliens* pour 2050 ; pour d'autres, au contraire, ce serait sous-estimer le potentiel évolutif dont nous sommes tous issus. Le débat est ouvert et si aujourd'hui l'incertitude prédomine, l'écosystème corallien aura au moins focalisé notre attention sur l'urgence de sa conservation.

L'entrée de l'Humanité dans le XXI^{ème} siècle s'est accompagnée d'une émergence des préoccupations environnementales. Le développement des connaissances scientifiques et technologiques ainsi que la vulgarisation du savoir permettent aujourd'hui de mieux appréhender l'évolution des écosystèmes. La biodiversité marine comme terrestre subit à l'échelle globale, une pression environnementale et anthropique qui ne cesse de s'accroître depuis le début de l'ère industrielle. L'influence de l'activité humaine sur Terre a tellement progressé que l'évolution des écosystèmes à l'échelle globale devient désormais dépendante de nos actions. L'âge de l'Holocène laisse désormais la place à celui de l'Anthropocène. Cette nouvelle ère est considérée pour beaucoup comme un basculement climatique de la Terre enclenché par la déforestation excessive, l'élevage intensif et l'émission irraisonnée des gaz à effet de serre. Il est maintenant admis que la sixième extinction des espèces est en marche dans un processus considéré de plus en plus irréversible.

Pourtant, la Terre a déjà connu des bouleversements sans précédents depuis sa formation. Si aujourd'hui l'émission des gaz à effet de serre inquiète, c'est oublier qu'il y a quelques 4 milliards d'années, ces mêmes molécules généraient plusieurs effets de serre indispensables à l'apparition de la vie. C'est aussi omettre que depuis l'apparition des premiers coraux constructeurs de récifs il y a 580 millions d'années, ces organismes ont traversé cinq crises biologiques majeures qui ont décimé pour certaines d'entre-elles jusqu'à 95 % de la biodiversité sur Terre.

Si la disparition des récifs préoccupe certains scientifiques dès les années 1970, aujourd'hui d'autres apportent un message plus contrasté. Les études récentes démontrent que la dotation génétique de certaines espèces influe sur leur capacité à tolérer les futures conditions. Le corail ne disparaîtrait donc pas, il diminuerait en diversité et en abondance mais continuerait de figurer à l'instar de ces millions d'années écoulées. Alors pourquoi la régression de la ressource corallienne entretient-elle autant les inquiétudes ? L'acidification des eaux marines de 0.7 unité est en cause dans la disparition rapide (moins de 10 000 ans) de nombreux organismes pendant l'extinction du Permo-Trias. Aujourd'hui, la baisse de 0.1 unité du pH marin en 200 ans préfigure comme une amorçe à la prochaine extinction de masse. Si les coraux ont montré des capacités de recouvrement après les crises biologiques, l'effondrement des populations s'est aussi accompagné d'une sévère réduction de la diversité marine. En plus d'être un réservoir et un pilier de la biodiversité, les récifs coralliens apportent aussi à l'Humanité un pool de services aujourd'hui indispensables pour la survie des

populations locales et pour le soutien économique de nombreux pays. Encore peu exploité, le potentiel médical et pharmaceutique des récifs devient de plus en plus incontestable pour les années futures.

Entreprendre la conservation sur le long terme de ce patrimoine génétique exceptionnel, c'est offrir aux générations futures le témoignage d'une diversité disparue. C'est aussi leur transmettre une ressource médicale dont nous ne maîtrisons pas encore tous les aspects aujourd'hui mais qui peut être la base d'avancées cruciales pour les décennies à venir.

Dans ce contexte, l'entente entre l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) a permis d'ouvrir une collaboration entre l'UMR DIADE du Centre de Recherche IRD de Montpellier et l'UMS2348-CRBM de l'Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer. Débuté en novembre 2011, le projet Cryocorail dans lequel s'inscrit cette thèse, a ainsi eu pour objectif d'approcher la cryoconservation de structures pluricellulaires issues du corail constructeur de récif, *Pocillopora damicornis*.

La première partie de ce document s'attachera à comprendre les menaces qui pèsent sur la pérennité de l'écosystème corallien et qui ont conduit à proposer une démarche de cryoconservation. Le principe de la cryoconservation sera exposé dans un second chapitre auquel fera suite une synthèse des connaissances acquises sur la cryoconservation des invertébrés marins et notamment sur les Anthozoaires. Enfin, cette première partie s'achèvera par une présentation du modèle biologique utilisé, *P. damicornis*.

La seconde partie de ce document s'articulera autour de la présentation par chapitres des différentes démarches expérimentales réalisées en suivant la trame temporelle. L'objectif de ces expérimentations a été de constituer une ébauche pour la réalisation d'un protocole de congélation rapide. Les différentes formes pluricellulaires de *P. damicornis* qui ont été utilisées seront présentées au fil des chapitres.

*Le « corail » (du latin *coralium* ou *corallium*) fait référence à l'Octocoralliaire, *Corallium rubrum*, corail emblématique de Méditerranée. Ce mot a ensuite été plus largement utilisé pour désigner d'autres Octocoralliaires puis étendu à l'autre sous classe des Hexacoralliaires. Bien que très utilisé dans le langage courant, le terme « corail » n'a pas de sens taxonomique (Allemand *et al.*, 2004). Nous utiliserons dans ce manuscrit le mot « corail » pour désigner la classe des Anthozoaires.

Partie I

User de la congélation pour préserver du réchauffement, la température occupe une place prépondérante dans cette démarche.

En plus du réchauffement climatique, les principales menaces affectant la survie de l'écosystème récifal sont détaillées dans le Chapitre 1.

Diminuer la température tout en limitant les effets négatifs de la congélation, le Chapitre 2 présente les techniques de cryoconservation les plus couramment utilisées.

Les coraux parmi tous ces invertébrés marins. Le Chapitre 3 présente les connaissances acquises sur la cryoconservation des différents phyla d'invertébrés marins. La conservation des espèces menacées, est une thématique contemporaine. Les avancées récentes de la cryoconservation des Anthozoaires sont retranscrites dans ce chapitre.

Le corail tropical *Pocillopora damicornis*, une espèce beaucoup étudiée. Le Chapitre 4 apporte une description de ce modèle biologique.

Chapitre 1

Le récif corallien, quel constat ?

I.1. - Etude bibliographique

L'écosystème corallien renvoie l'image paradoxale d'une abondance de diversité et de vie concentrée sur des espaces extrêmement réduits. Ces récifs couvriraient une surface totale de 284 803 km² (Kumaraguru, 2002 ; Chen *et al.*, 2015), surface étendue à 617 000 km² en prenant en compte les écosystèmes associés tels que les lagons de sable et les mangroves (Spalding *et al.*, 2001 ; Salvat, 2015). L'étendue océanique est estimée à 361 132 millions de km² ramenant la surface des récifs entre 0.2 et 1.0 % de l'environnement marin malgré une diversité spécifique évaluée à près du tiers ou du quart des espèces décrites à ce jour dans le milieu océanique (Kumaraguru, 2002 ; Obura et Grimsditch, 2009 ; Branchini *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2015). Les récifs sont répandus autour de la ligne équatoriale, dans la zone intertropicale. Ils se répartissent entre les latitudes 30 °N et 30 °S et sous de nombreuses longitudes. La répartition entre les tropiques du Cancer et du Capricorne est un repère souvent cité. Les températures océaniques fluctuent entre les isothermes 18 et 35 °C avec un optimal de croissance pour le corail de 25 et 29 °C. L'océan Pacifique concentre près de 40 % des récifs de notre planète, 20 % sont localisés dans l'océan Indien et 8 % dans les Caraïbes (Fig. 1).

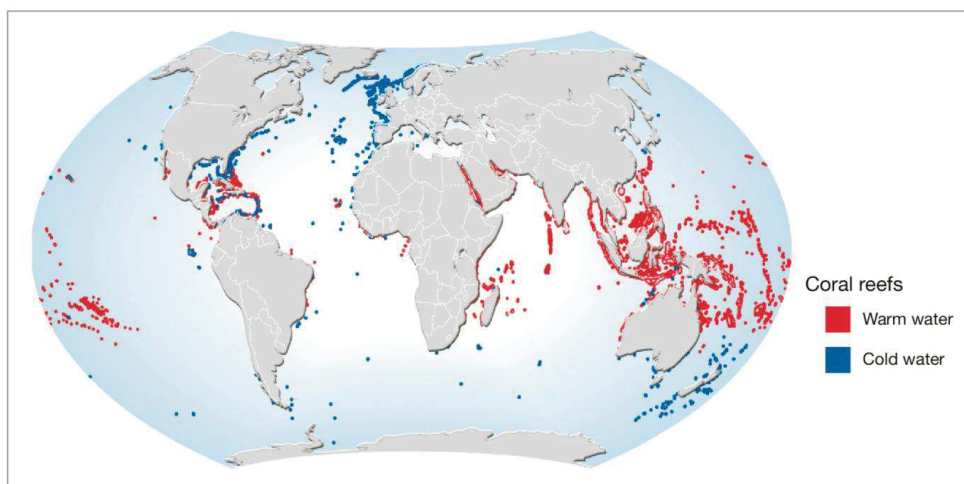


Figure 1 : Distribution des récifs coralliens. Source : Bryant *et al.*, 1998.

Réparti sur six Etats archipel de l'indo-pacifique, le Triangle de Corail représente à lui seul 30 % de la surface récifale globale et abrite plus de 76 % de la diversité corallienne (Fig.

2). L'Indonésie compte à elle seule 51 020 km² de récifs, l'Australie 48 960 km² et les Philippines 25 060 km². La Grande Barrière de Corail couvre sur une superficie de 350 000 km² et ses 2 600 km linéaires sont connus de tous comme la bioconstruction la plus imposante de notre planète. Le récif des Bahamas constitue après la Nouvelle Calédonie la troisième plus grande bioconstruction étalée sur 225 km de long. En considérant les récifs coralliens, les lagons et les mangroves, la France cumule près de 57 557 km² de récifs et 5 000 km de linéaire côtier (Joannot, 2009). Grâce aux territoires d'outre-mer, l'hexagone reste le seul pays au monde à bénéficier d'une répartition de ses récifs dans toutes les régions océaniques. Le récif de Nouvelle Calédonie et ses quelques 1 600 km de long s'étend sur 35 000 km². Il concentre près de 11 000 espèces dont 419 espèces bâtisseuses de récifs (Tab.1). Les récifs moins diversifiés des Caraïbes représentent malgré tout 20 000 km² de surface couvrée. Le récif de la Réunion s'étale sur 13 km² et ne constitue que 10 % du linéaire côtier réunionnais.

Les récifs de l'Inde couvrent 2 379 km² et regroupent plus de 200 espèces de madrépores et 32 phyla sur 34 y sont représentés (Kumaraguru, 2002).

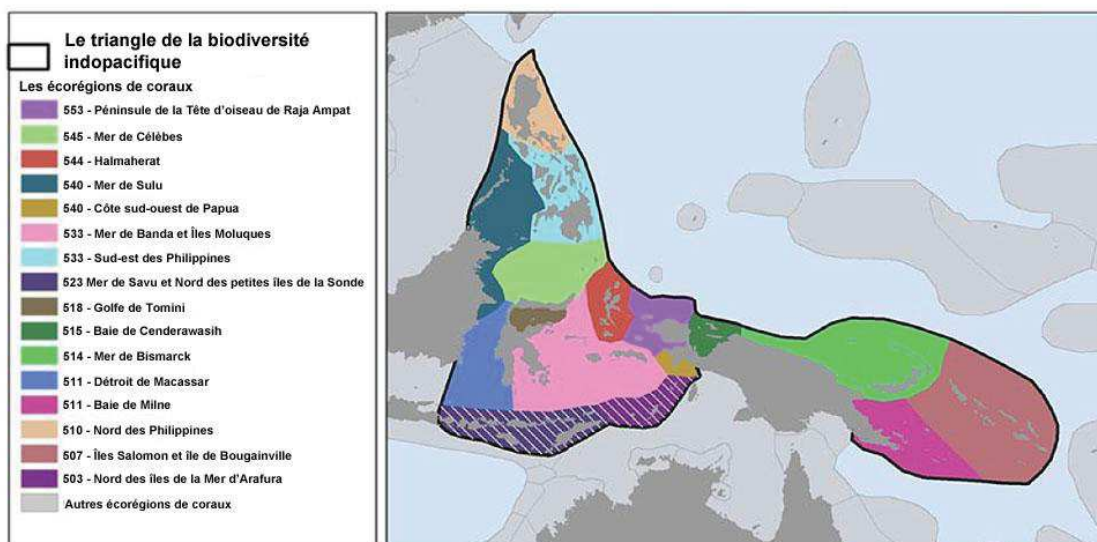


Figure 2 : Le Triangle de Corail abritant la plus forte diversité de madrépores. Source : outremer.mnhn.fr

Localisation géographique	Nombre d'espèces de Madrépores
Triangle de corail	605
Nouvelle Calédonie	419
Australie Nord-Est	360
Fidjii	230
Inde	200
Japon	200
Polynésie française	127
Ile de Pâques	17

Tableau 1 : Diversité des coraux constructeurs de récifs. Modifié du site outremer.mnhn.fr

I.2. - Les évènements naturels

I.2.1. - Le réchauffement climatique

Les estimations portent à 25 - 30 % l'énergie solaire directement réfléchi par la couche atmosphérique (albédo) et à 10 % l'énergie absorbée par un ciel découvert voire 30 % pour un ciel nuageux. La réflexion par la surface terrestre représente entre 4 à 6 %, soit un pourcentage minime de l'albédo planétaire (Fig. 3). L'énergie solaire restante va réchauffer le sol terrestre, émettant de ce fait un rayonnement thermique à l'état d'infrarouges. Parmi les gaz qui composent l'atmosphère terrestre, le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4), l'ozone (O_3) ou encore la vapeur d'eau participent activement à l'effet de serre en absorbant en partie ce rayonnement infrarouge terrestre.

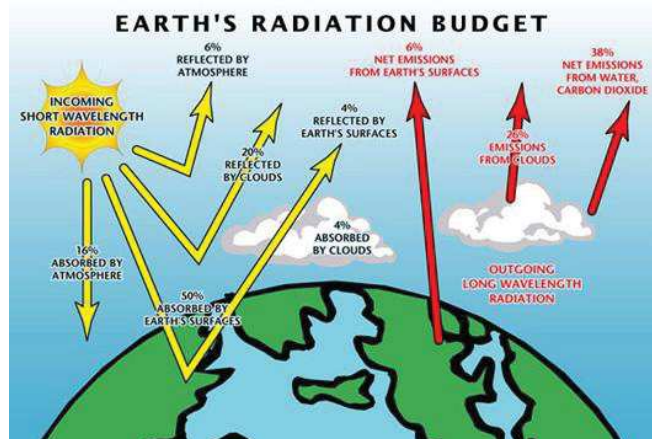


Figure 3 : Bilan radiatif de la Terre.

Source : calipsooutreach.hamptonu.edu.

Le processus de réchauffement apparaît primordial pour maintenir une température moyenne à la surface de notre planète de +15 °C. Sans ce phénomène, la température terrestre ne dépasserait pas -19 à -17 °C. A une telle température, la congélation des océans participerait à amplifier l'albédo et à diminuer les températures jusqu'à -100 °C. L'atmosphère se comporte également comme une enveloppe protectrice de 700 km d'épaisseur, agissant contre les radiations solaires (photons sous différents états : Ultraviolet, Infrarouge, Visible, Micro-onde) et les rayonnements cosmiques chargés de protons et d'hélium sous forme ionique.

La combustion du pétrole fossile est la principale cause de l'augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone atmosphérique. La demi-vie de ces gaz dans l'atmosphère est également un facteur clé du phénomène de réchauffement climatique. Un siècle est nécessaire à la dégradation du CO_2 . Pour une même période, le forçage radiatif du méthane ou sa capacité d'absorption des infrarouges (CH_4) est 25 fois supérieure à celle du CO_2 .

Régulation du climat

La réflectivité des nuages et de la neige peut atteindre 80 %. La couverture nuageuse s'étend sur 60 % de la surface terrestre avec de fortes disparités. Le pouvoir réfléchissant des nuages reste très variable en fonction de la densité nuageuse. Si les nuages participent à l'albédo, ils sont aussi capables d'absorber le rayonnement infrarouge et de participer au réchauffement. Actuellement, la réflectivité des nuages domine d'un facteur 2. L'évolution de la couverture nuageuse dans le contexte du réchauffement global reste incertaine. Les prédictions actuelles ne permettent pas de définir avec certitude l'impact des futures couches nuageuses.

Les aérosols sulfatés d'une taille proche de 0.05 μm servent de noyaux de condensation (CN) pour la plupart des gouttelettes formant la vapeur d'eau et participant à l'albédo (Jones et Trevena, 2005). Le grossissement des CN entre 5 et 10 μm (CCN : Cloud Condensation Nuclei) va permettre de façon plus conséquente la formation des nuages (Jones et Trevena, 2005).

En abritant et en soutenant la production phytoplanctonique dans des eaux peu profondes et oligotrophes, les récifs coralliens occupent une place non négligeable dans la réalisation du cycle du soufre

(biogénique). Les dinoflagellés en position de dominance dans les récifs comptent parmi les nombreuses micro-algues capables de produire le diméthylsulfoniopropionate (DMSP). Ces micro-algues représentent entre 0.3 et 1.5 % de la production primaire globale (Broadbent *et al.*, 2002). Elles sont considérées comme l'un des plus gros producteurs en DMSP et plus particulièrement en diméthylsulfure (DMS). Le DMS représente jusqu'à 60 % des composés gazeux sulfurés atmosphériques dont 95 % de la production est d'origine océanique (Stefels, 2007). La lyse enzymatique (DMSP-lyases et Acyl-CoA

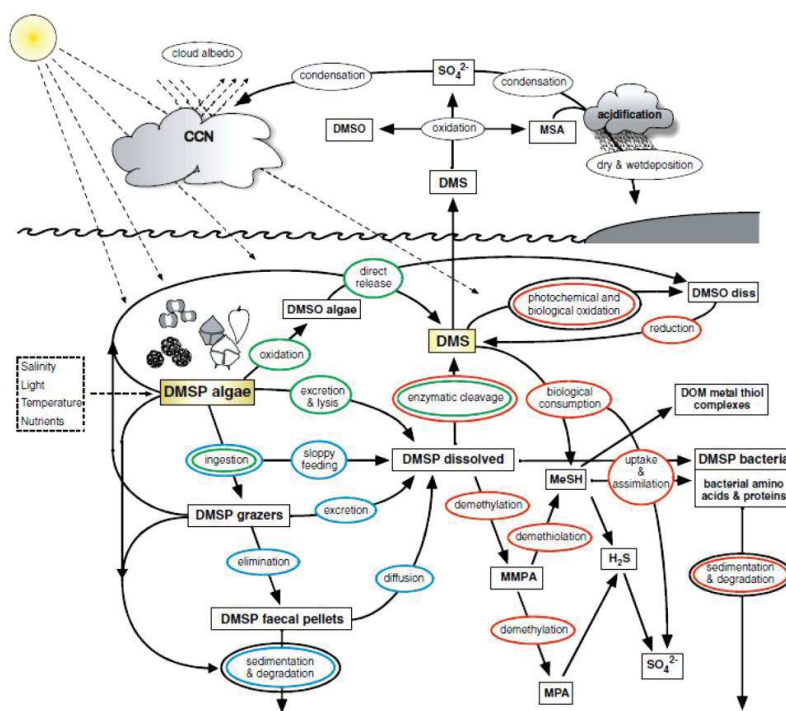


Figure 4 : Schématisation du cycle biogéochimique permettant la production de DMSP et de DMS et des groupes fonctionnels intervenant dans le cycle (couleur).

Vert : Phytoplancton, Bleu : Zooplancton, Rouge : Bactéries, Noir : facteurs abiotiques. CCN : cloud-condensation nuclei, DOM : dissolved organic material, MeSH : methanethiol, MPA : mercaptopropionate, MMPA : methylmercaptopropionate, MSA : methanesulphonic acid.

Source : Stefels *et al.*, 2007.

transférases) du DMSP va entraîner la production de plusieurs composés, le DMS, l'acrylate, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acide méthylsulfonique (MSNA) (Fig. 4). Le DMS représente une part importante, évaluée entre 50 et 60 %, des sulfures atmosphériques. L'émission dans l'atmosphère du DMS s'accompagne d'une réduction en dioxyde de soufre (SO_2) puis en ions sulfate (SO_4^{2-}) (Fig. 4).

Des auteurs suggèrent une stratégie de défense des micro-algues basée sur l'odeur caractéristique du DMS. L'action de broutage par des organismes planctonophages permettrait la production du DMS (Stefels, 2007). Certains oiseaux marins dont ceux de la famille des Procellariiformes tels que les pétrels ou les albatros seraient capables de détecter la production de DMS (Nevitt *et al.*, 2008). Cette faculté leur permettrait de localiser des zones abondantes en plancton et donc en poissons (Fig. 5).



Soufre dans l'air
Krill dans la mer

Figure 5 : Les oiseaux marins détectent le DMS. Source : *Espèces n°15*.

La température influençant la production de DMS, le rôle des micro-algues dans la lutte contre le réchauffement climatique prend ici toute son importance (Raina *et al.*, 2013). Fait intéressant, Broadbent *et al.* (2002) observeront une production en DMSP significativement plus importante pour des colonies symbiotiques préalablement blanchies. Les nouvelles zooxanthelles ont été décrites avec des tailles plus larges et plus fortement concentrées en chlorophylle a et c que pour des coraux symbiotiques non blanchis (Broadbent *et al.*, 2002). Alors que la production en DMSP augmente avec l'augmentation des températures, la régulation thermique par le DMS s'en trouve perturbée par le contexte d'acidification des océans. En effet la production en DMS semble menacée car influencée par l'augmentation de la pression partielle en CO_2 . L'équilibre homéostatique régulant le climat de notre planète s'en trouverait perturbé avec le risque d'une accélération du phénomène de réchauffement global (Raina *et al.*, 2013). A cela s'ajoutent la régression graduelle de la couverture corallienne et une diminution programmée de la croissance squelettique, perturbée par l'acidification.

Notion de bleaching

Les prévisions pour la fin de ce siècle indiquent une augmentation de la température des océans entre 0.3 et 2.1 °C. Les premières manifestations de blanchissement ont été rapportées au début des années 1980 dans l'Est Pacifique avec des taux de mortalités de 52 à 97 % (Glynn *et al.*, 2001). Les fortes températures enregistrées pendant le phénomène El Niño en 1997-1998 ont aussi lourdement affaibli les écosystèmes récifaux. Avec des températures

enregistrées jusqu'à 32 °C, El Niño a impacté à lui seul près de 16 % de l'ensemble des récifs, avec dans certaines régions une régression de 80 % à 90 % de la couverture corallienne (Hoegh-Guldberg, 1999 ; Obura et Grimsditch, 2009).

Une exposition prolongée de la température (sea surface temperature : SST) de 1 voire 2 °C par rapport à la moyenne est susceptible d'entraîner un stress physiologique s'accompagnant d'une perturbation de l'activité photosynthétique des zooxanthelles* contenues dans le tissu corallien, et ce jusqu'à l'expulsion des cellules et/ou de leurs pigments photosynthétiques (Glynn *et al.*, 2001 ; Hoegh-Gulberg *et al.*, 2005 ; Weis *et al.*, 2008). Outre le phénomène d'expulsion, la perte des zooxanthelles consécutive à un stress thermique ou lumineux serait aussi à l'origine d'une autophagie des cellules hôtes digérant le symbionte. Ce phénomène est décrit par Downs *et al.* (2009) comme la symbiophage (Downs *et al.*, 2009). Le coenosarque devient alors translucide laissant apparaître la blancheur du squelette (Fig. 6). Ce processus est communément identifié comme le phénomène de « bleaching » ou « blanchissement du corail » (Fig. 6). La rupture de la symbiose entre les cellules animales et végétales n'est pas sans conséquences sur la sensibilité du corail face aux agressions externes et sur sa survie.

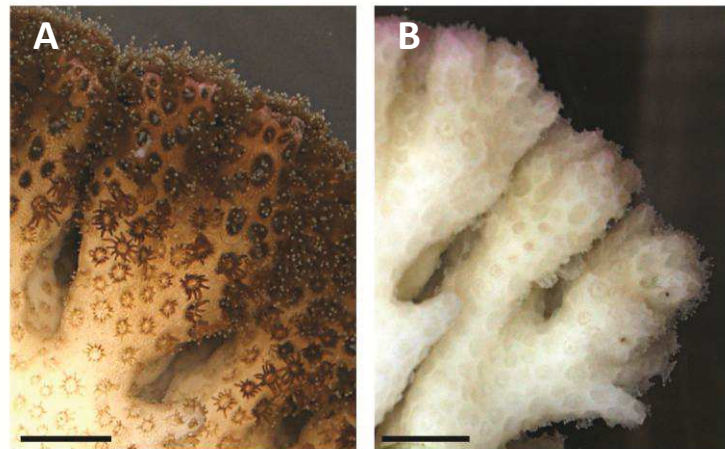


Figure 6 : Blanchissement d'une même branche de *Pocillopora damicornis*. A : Tissus zooxanthellés. B : Tissus azooxanthellés. Echelle = 0.5 cm

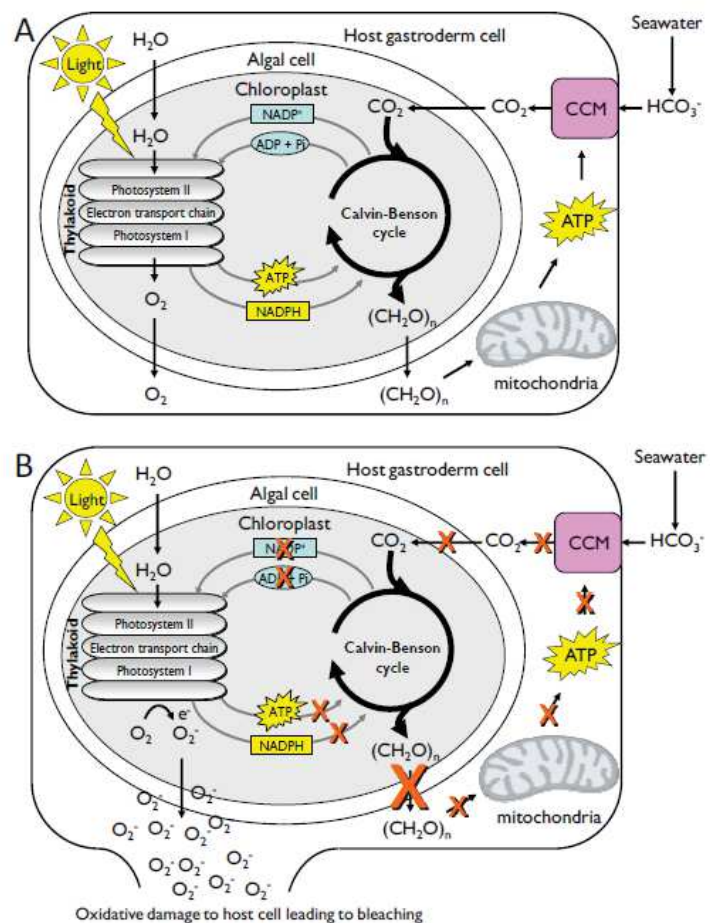


Figure 7 : Rupture de la symbiose algue-corail. A : Fixation du carbone inorganique dissout et production de photosynthétats grâce à l'activité photosynthétique des zooxanthelles. B : Perturbation de la photosynthèse impactant l'autotrophie. Induction d'un stress oxydatif conduisant à l'expulsion des zooxanthelles et au phénomène de bleaching. Source : Wooldridge *et al.*, 2012.

Si les montées de températures sont souvent citées comme une cause de bleaching, d'autres stress sont également à l'origine du bleaching tels qu'une forte irradiance ou à l'inverse une obscurité prolongée, une bactériose, un stress osmotique, une pollution voire même un choc froid (Downs *et al.*, 2009). Pour la plupart des espèces coralliennes zooxanthellées, la symbiose est vitale (Fig. 7). Les récentes études ont démontré que le changement climatique allait augmenter les fréquences du phénomène de blanchissement, lourde menace quant à la viabilité sur le long terme des ces espèces. Les essais conduits par Donner *et al.* (2005) décrivent un phénomène de blanchissement de plus en plus récurrent au rythme annuel ou biannuel pour la majorité des récifs dans les 30 - 50 prochaines années (Donner *et al.*, 2005).

Certaines conséquences du réchauffement global sur les performances coralliennes sont déjà bien identifiées. Une augmentation de la fréquence et de l'intensité des phénomènes de blanchissement entraînerait une réduction de la capacité de reproduction, de la croissance, de la résistance aux maladies ainsi qu'une survie fortement impactée (Hoegh-Guldberg, 1999; Douglas, 2003).

La température exerce une forte influence sur *P. damicornis* (Browne *et al.*, 2015). Cette espèce est considérée comme sténotherme (Gibbin *et al.*, 2015). La plasticité du timing reproductif de *P. damicornis* apparaît plus restreinte lors d'une augmentation de température. Des températures plus élevées s'accompagnent d'une libération plus précoce des larves (Crowder *et al.*, 2014), entraînant des fluctuations quant aux succès de reproduction.

Cuming *et al.* (2013) ont démontré que *Pocillopora* sp. est une espèce typiquement associés avec les *Symbiodinium* de clade C et/ou D. Les associations avec le clade D permettent une augmentation de la tolérance aux montées de températures et une résistance au blanchissement. A l'inverse, le clade C apparaît thermosensible.

***Les zooxanthelles désignent les algues unicellulaires ayant développé une association symbiotique avec les cellules animales. La diversité des symbiotes observés pour un même Scléactinaire ainsi que l'absence de spécificité hôte-symbiote rendent imprécis la désignation de zooxanthelles. Dans ce manuscrit, les zooxanthelles définissent les Dinoflagellés symbiotiques (<http://www.centrescientifique.mc>).**

I.2.2. - L'acidification des océans

Si la consommation du pétrole fossile influence l'équilibre thermique de notre planète, le rejet de CO₂ a également une incidence sur la composition chimique des océans. Les océans ont le rôle indispensable d'absorber une partie du CO₂ atmosphérique, régulant ainsi les hausses de températures. On estime que 25 à 30 % du CO₂ provenant de l'activité humaine serait absorbé par ces puits de CO₂ et 20 % par la biosphère terrestre. Pendant les 400 000 ans précédents la période industrielle et d'exploitation des sols et sous sols, les concentrations en CO₂ atmosphérique ont varié entre 200 et 280 ppm (ou 20 à 28 Pa). Désormais, la pression partielle en CO₂ est estimée à des valeurs de 39.0 Pa (Van Vuuren *et al.*, 2011) voire 40.5 Pa (Bramanti *et al.*, 2015) (Fig. 8). En quelques décennies, la moitié du CO₂ rejeté par l'homme est restée dans l'atmosphère. Les estimations des concentrations en CO₂ atmosphérique et océanique suggèrent qu'à la fin du siècle, le niveau de CO₂ devrait représenter 800 ppm. Van Vuuren *et al.* (2011) projettent même une augmentation comprise entre 49.6 et 85.1 Pa induisant une réduction du pH à la surface des océans. La baisse du pH est évaluée à 0.015 unité par décennie (Haugan et Drange, 1996) soit au cours du 20^{ème} siècle à environ 0.10 unité dans les eaux froides et 0.09 unité dans les eaux de surface plus chaudes. Les projections prédisent une diminution entre 0.30 (Haugan et Drange, 1996 ; Edmunds *et al.*, 2014) et 0.40 unité (Feely *et al.*, 2004). Une telle évolution du pH ne se serait pas produite depuis les 20 millions dernières années et aurait un impact significatif sur les systèmes biologiques des océans (Feely *et al.*, 2004).

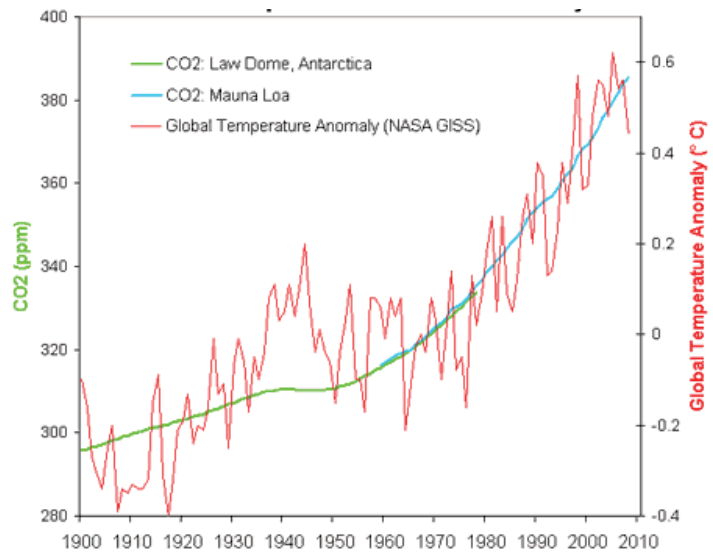


Figure 8 : Evolution des concentrations en dioxyde de carbone en Antarctique et à Hawaï. Source : rac-f.org.

En plus de la réduction du pH, l'augmentation de la teneur atmosphérique en CO₂ a pour effet d'altérer la chimie des eaux marines en diminuant les concentrations en carbonate et la saturation en aragonite (Ω_{arag}) (Caldeira et Wickett, 2003 ; Orr *et al.*, 2005). En raison de l'état de sursaturation du carbonate de calcium (CaCO₃) à la surface des océans, l'importance de la chimie carbonatée a été sous-estimée. Aujourd'hui, les récentes investigations démontrent l'importance du degré de sursaturation sur le taux de calcification des espèces. En outre, la dissolution du CaCO₃ a longtemps été considérée comme s'opérant dans des zones supérieures à 1 000 m. Il semblerait que la dissolution se produise à des profondeurs inférieures (Fig. 9). L'acidification des eaux présente le risque d'une amplification du

phénomène de dissolution dans ces 1 000 premiers mètres (Feely *et al.*, 2004). Une diminution de la production de CaCO_3 dans les eaux de surface peut entraîner une augmentation de la dissolution sédimentaire des carbonates et induire une augmentation du pH des océans. L'absorption du CO_2 atmosphérique par les océans en serait amplifiée. La communauté scientifique estime que, d'ici la fin de ce siècle, les taux de calcification des coraux constructeurs de récifs auront diminué de 17 à 37 % (Gattuso *et al.*, 1999 ; Kleypas *et al.*, 1999 ; Orr *et al.*, 2005).

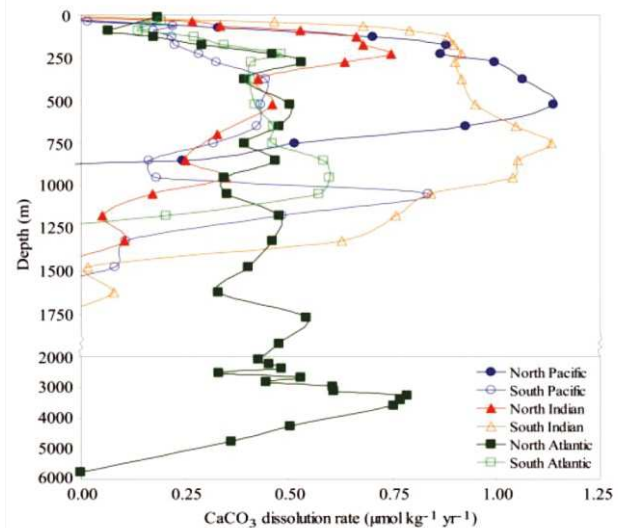


Figure 9 : Influence de la bathymétrie sur la dissolution du carbonate de calcium dans les différents bassins océaniques.
Source : Feely *et al.*, 2004.

L'acidification des océans constitue ainsi une menace sérieuse pour la survie des organismes calcifiants dont la communauté corallienne (Orr *et al.*, 2005). La perturbation de la respiration et de la photosynthèse est corrélée avec le phénomène d'acidification (Edmunds *et al.*, 2014). Bramanti *et al.* (2015) ont modélisé l'impact cumulé du phénomène d'acidification des océans et de réchauffement climatique sur la dynamique d'une population fermée de *P. damicornis* sur 100 ans. Une hausse thermique de +3 °C conjuguée à une augmentation de la pression partielle en CO_2 à 91.2 Pa aurait pour conséquence la disparition totale de cette population en moins de 100 ans. Le maintien de la métapopulation serait tributaire des larves provenant de populations isolées (Bramanti *et al.*, 2015). Le rôle de la dispersion larvaire prend dans cette étude toute son importance. D'autres auteurs s'accordent sur ces prévisions pessimistes des 100 prochaines années quant à l'évolution de la pression partielle en CO_2 .

Comeau *et al.* (2014) révèlent la résistance de certains Scléroractiniaires exposés pendant de courtes durées à de plus faibles valeurs de pH. En présence de courants importants, la calcification de *P. damicornis* et de *Porites* sp. ne semble pas impactée (Comeau *et al.*, 2014). En revanche, Houllbrèque *et al.* (2015) montrent une intensification des efforts d'alimentation du corail *S. pistillata* confronté à une augmentation de l'acidification. La réduction des capacités de prédation entraîne des répercussions métaboliques extrêmement dommageables pour la stabilité du corail (Houllbrèque *et al.*, 2015). D'après Comeau *et al.* (2014), la capacité des espèces calcifiantes à répondre à l'acidification des océans est dépendante de leur position taxonomique. Leurs résultats réfutent la disparition totale des récifs coralliens et suggèrent un milieu récifal moins diversifié et composé des espèces les plus résistantes.

I.2.3. - Les cyclones, ouragans, ...

D'après De'ath *et al.* (2012), les cyclones sont responsables à 48 % de la régression corallienne de la Grande Barrière de Corail. Gardner *et al.* (2005) constatent une réduction de 17 % de la couverture corallienne des Caraïbes dans l'année qui a suivi le passage de l'ouragan. Les dommages provoqués par les cyclones tropicaux, les typhons ou les ouragans sont multiples. Ces phénomènes portent une réelle atteinte à la dynamique du récif, fonction de la sensibilité des espèces impactées mais également de la fréquence et de la sévérité de ces événements climatiques (Massel et Done, 1993).

Les extrémités croissantes ainsi que les branches des colonies peuvent se retrouver fragmentées, allant même jusqu'à la scission des larges colonies (Beeden *et al.*, 2015). Massel et Done (1993) ont étudié le délogement des coraux massifs comme *Porites* sp. après un événement cyclonique. De telles structures peuvent se retrouver complètement retournées ou en position instable dans la pente récifale. Les tissus désormais au contact du substrat ou exposés à l'air présentent un risque de nécroses important. Les coraux solidaires du substrat montrent une plus grande résistance à l'action des vagues tandis que les organismes non fixés ont développé de plus grandes circonférences, les rendant plus vulnérables au déplacement (Massel et Done, 1993). D'autres individus développent une plus grande résistance où les dommages se limitent à la mort de certaines parties de la colonie exposée à des projectiles ainsi qu'à l'ensablement et aux gravats (Massel et Done, 1993 ; Beeden *et al.*, 2015). Si les colonies massives ou branchues sont impactées par les ouragans, les espèces épousant davantage le substrat le sont également, comme bon nombre de coraux mous. Ces populations se retrouvent bien souvent écrasées par les fragments de coraux durs (Hughes, 1994). Les dommages tissulaires peuvent aussi être liés à l'érosion par le substrat et au sédiment en suspension. Des cas de blanchissements ont été observés. Certaines situations ont démontré une plus grande sensibilité des coraux aux perturbations anthropiques après un événement cyclonique (Hughes, 1994). Des proliférations algales très rapides précédant le cyclone ont aussi été observées, dues à un lessivage intense des sols et à la mise en suspension dans le milieu marin des nutriments terrestres. A l'inverse, certains auteurs révèlent la réduction des dommages sur les coraux suite au passage des cyclones. La destruction des infrastructures touristiques et des activités de pêche induit une baisse de la pression anthropique et donc des dommages sur les récifs (Gardner *et al.*, 2005).

I.2.4. - La prédation d'*Acanthaster planci*

L'intérêt scientifique pour *A. planci* n'est pas récent puisque les premiers articles paraissent dès les années 1930. Les impacts d'une telle prédation sur l'écosystème corallien ainsi que ses répercussions économiques sont évoquées dès les années 1960. En 1969,



Figure 10 : Prédation d'*Acanthaster planci*.
Source : ird.fr

les Etats Unis débloquent quelques 225 000 dollars pour suivre l'évolution des populations d'*A. planci*. Depuis, les Etats n'ont cessé de se mobiliser afin de mieux comprendre puis combattre cet organisme. L'augmentation de la population d'*A. planci* (COTS= crown-of-thorns-star-fish) est corrélée avec l'enrichissement des eaux en nutriments, qui profite directement aux larves de l'Echinoderme (Riegl *et al.*, 2003 ; Uthicke *et al.*, 2015). L'augmentation de la température favorise également la survie des larves d'*A. planci* (Uthicke *et al.*, 2015). La prédation par les populations d'*A. planci* (Fig. 10) de la couverture corallienne de la Grande Barrière de Corail représente une lourde pression évaluée entre 42 et 50 % des agressions (De'ath *et al.*, 2012 ; Uthicke *et al.*, 2015). Le blanchissement ne représente quant à lui que 10 % (De'ath *et al.*, 2012). Riegl *et al.* (2013) observent également que 1/3 des sites échantillonnés en Mer Rouge sont dégradés par *A. planci*. La réduction de la prédation d'*A. planci* permettrait une augmentation de la couverture corallienne de la Grande Barrière de Corail de 0.89 % par an (De'ath *et al.*, 2012).

I.2.5. - Les maladies

Les Scléactiniaires disposent de plusieurs moyens de défense pour se protéger des micro-organismes pathogènes. L'activité ciliaire permet un flux d'eau à la surface du coenosarque, permettant l'évacuation des déchets et des agents susceptibles de nuisances. Les cellules sécrétrices dont les mucocytes ou immunocytes, permettent l'excrétion d'un mucus libérant des toxines. Elles sont également pourvues d'une action bactériostatique grâce à la production des immunoglobulines de type IgA. Pour autant, les maladies sont de plus en plus considérées comme une réelle menace pour la pérennité des écosystèmes récifaux (Fig. 11). Les pathologies coralliennes sont pour la plupart associées à une modification des conditions de vie engendrées par des perturbations d'origine naturelle ou anthropique. La situation stressante fragilise les coraux aux agressions des bactéries, virus, champignons, protistes, Winkler *et al.* (2004) ont démontré le lien entre la susceptibilité du corail face aux agents pathogènes et la diminution de la qualité de l'eau des zones industrielles et touristiques. Bruno *et al.* (2003) insistent sur la virulence des agents pathogènes, amplifiée par la concentration en nutriments.

Coral Tissue Bleaching (TBL) est souvent mentionné sous les termes de « bleaching » ou de blanchissement. Le phénomène de blanchissement des coraux correspond à une perte partielle ou totale des micro-algues symbiotiques contenues dans les tissus coralliens (appelées communément zooxanthelles) et/ou à la diminution de la concentration en pigments chlorophylliens dans ces zooxanthelles. Le blanchissement a des effets immédiats sur la croissance, la fertilité et la reproduction des coraux et peut conduire à des mortalités de masse modifiant la dynamique des communautés coralliennes. Les modèles climatiques suggèrent que les limites thermiques des coraux seront atteintes de plus en plus fréquemment,

entraînant des événements de blanchissement de plus en plus sévères et de plus en plus fréquents (Donner *et al.*, 2005 ; Veron *et al.*, 2009 ; Pandolfi *et al.*, 2011 ; Guest *et al.*, 2012).

Rapid Tissue Necrosis (RTN) : Les nécroses tissulaires rapides sont couramment observées chez les coraux durs sauvages et en captivité. Les RTN se manifestent par une perte tissulaire (peeling) rapide et la mort de la colonie. Les bactéries du genre *Vibrio* sont quantitativement dominantes dans les tissus atteints (Luna *et al.*, 2007). Les observations de Luna *et al.* (2007) sur les tissus de *P. damicornis* montrent une forte représentation de *Vibrio harveyi*. Ben-Haim et Rosenberg (2002) attribuent le phénomène de blanchissement de *P. damicornis* à l'espèce *V. coralliilyticus*. D'autres pathologies ont été recensées telles que les Shut-Down Reaction (SDR) et Stress Related Necrosis (SRN).

La maladie de la bande blanche aussi appelée « White Syndrom » (WS) est désormais bien identifiée et représente un groupe prévalent de maladies avec une répartition Indo-Pacifique et jusqu'aux Caraïbes (Bourne *et al.*, 2015). Cette épizootie est mentionnée sous diverses appellations telles que « white band », « white plague » ou « white pox ». En aquarium, cette pathologie peut progresser de 0.1 cm à 10.0 cm/h (Sweet *et al.*, 2013). L'agent causal est identifié comme appartenant au genre *Vibrio*. Cette maladie se caractérise par un ensemble de symptômes dont la perte tissulaire sous forme de bandes irrégulières ou de spots laissant apparaître le squelette blanc. Les Scléactiniaires sont particulièrement affectés et notamment ceux à croissance rapide. Les formes branchues telles que les Acroporidés et les Pocilloporidés y sont sensibles mais également parmi les formes massives, les Poritidés pourtant réputés plus résistants.

La maladie de la bande noire ou « Black Band Disease » (BDD) est aussi connue pour affecter une large proportion de Scléactiniaires. Des nécroses tissulaires sont provoquées par un mélange microbien incluant des cyanobactéries (*Phormidium corallyticum*), des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries sulfato-oxidatrices et des bactéries hétérotrophes (Richardson, 1992 ; Ritchie et Smith, 1998 ; Winkler *et al.*, 2004 ; Glas *et al.*, 2012). Les lésions apparaissent comme des bandes de 1 - 4 cm de large et de couleur foncée qui contrastent vivement avec le squelette blanc. Cette couleur noire est due à la présence de la phycoérythrine, pigment photosynthétique contenu par *P. corallyticum* (Richardson, 1992). La progression peut être rapide, jusqu'à 1 cm/j (Richardson, 1992). Des fortes teneurs en sulfure jusqu'à 4977 μM ont été détectées dans les BDD microbiens ainsi qu'une situation d'hypoxie voire d'anoxie et s'accompagnant d'une réduction du pH (Glas *et al.*, 2012).

La maladie de la bande jaune (YBD : Yellow Band Disease) touche aussi bien les récifs d'Indo-Pacifique que ceux des Caraïbes (Cervino *et al.*, 2008). L'augmentation des

températures est désormais reconnue comme favorisant le développement de cette maladie. Cette bactériose est la résultante de l'action combinée de plusieurs espèces appartenant au genre *Vibrio* sp. (Cervino *et al.*, 2008) et se manifeste sous la forme de nécroses circulaires ou irrégulières et bordées par une coloration jaune (Santavy *et al.*, 1999). Cervino *et al.* (2008) rapportent les dommages causés au niveau des membranes des thylakoïdes et perturbant de fait le bon déroulement de la photosynthèse.

La maladie des bandes rouges (RBD : Red Band Disease). Selon Richardson (1992), cette maladie présente les mêmes symptômes que la WS ou la BDD excepté que les bandes nécrotiques sont de couleur rouge. Les cyanobactéries constituent la forme dominante parmi les agents pathogènes. Deux espèces du genre *Oscillatoria* sp. sont particulièrement représentées en plus du genre *Spirulina* sp. (Richardson, 1992).

Le phénomène d'hyperplasie squelettique est également rapporté chez certains Scléactiniaires dont les Acroporidés ainsi que chez *Porites compressa* (Domart-Coulon *et al.*, 2006). Il se visualise sous la forme d'excroissances anormales, rondes et comparées à des formations tumorales. Ces anomalies se distinguent nettement de la structure corallienne et demeurent plus pauvres en polypes et zooxanthelles. La prolifération non contrôlée (néoplasme) des calicoblastes ou des cellules gastrodermiques serait la cause de ces protubérances squelettiques, s'accompagnant de lésions tissulaires, d'un appauvrissement en mucocytes et d'une perturbation de la reproduction jusqu'à la mort du polype.

Les bandes d'érosion du squelette (SEB : Skeleton Eroding Band) sont causées par un cilié *Halofolliculina corallasia* (Fig. 11) qui se développe logé dans le squelette corallien et dégrade la surface du coenosteum, les polypes et le coenosarque (Antonius et Lipscomb, 2000 ; Winkler *et al.*, 2004). Ces organismes n'apparaissent pas létaux pour le corail mais leur comportement invasif constitue une première étape à leur pathogénécité. *H. corallasia* va se développer en logeant leur loricae dans des chambres du squelette. La colonisation s'opère souvent à partir d'une branche de corail morte à partir de laquelle *H. corallasia* s'étendra sur les branches saines (Antonius et Lipscomb, 2000).

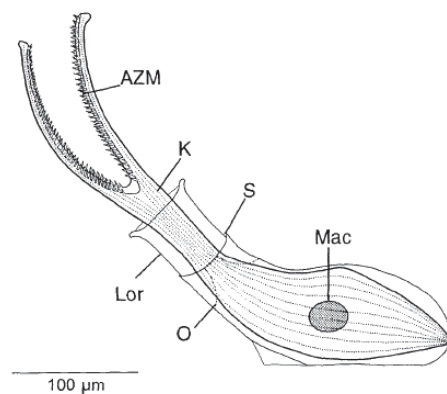


Figure 11 : Description d'*Halofolliculina corallasia* responsable de l'érosion squelettique.
Source : Antonius et Lipscomb, 2000.

La maladie de la gelée brune (BJS : Brown Jelly Syndrom) semble due à l'action du cilié *Helicostoma nonatum* ou *Philaster digitiformis* (Sweet *et al.*, 2013). Cette pathologie se

visualise sous l'aspect d'une gangue recouvrant la surface de la branche. La dégradation des tissus laissera apparaître le squelette.

Disease	Host	Pathogen	Reference
Black band	Many coral species	<i>Phormidium corallyticum</i> and consortium incl. <i>Beggiatoa</i> sp.	Antonius 1973 Richardson <i>et al.</i> 1997 Carlton and Richardson 1995 Kuta and Richardson 1996
Coralline algae lethality	<i>Porolithon</i> sp.	bacterium ?	Littler and Littler 1995 Goreau unpublished
Dark blotch	<i>Montastrea cavernosa</i>	?	Peters 1997
White pox	<i>Acropora palmata</i>	?	Porter and Meier 1992
Red band	<i>Siderastrea</i> sp. <i>Porites</i> sp. <i>Montastrea</i> sp. <i>Diploria</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp.	Richardson 1992
Sea fan aspergillois	<i>Gorgonia ventalina</i> and <i>G. flabellum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Nagelkerken <i>et al.</i> 1996 Smith and Ritchie 1997
White band	<i>Acropora palmata</i> and <i>A. cervicornis</i>	<i>Vibrio</i> sp.?	Peters 1983 Dustan 1977 Ritchie and Smith 1995
Rapid wasting	<i>Montastrea</i> sp. <i>Colpophyllia</i> sp.	fungus	Cervino <i>et al.</i> 1997 Cervino and Smith 1997
Coral plague	<i>Acropora</i> sp. <i>Dichocoenia stokesi</i>	? <i>Sphingomonas</i> sp.	Dustan 1977, Peters 1983 Richardson <i>et al.</i> 1997
Yellow band	<i>Montastrea</i> sp.	?	Quirolo, unpublished

Figure 12 : Recensement des maladies touchant les Scléractiniaires de Floride et des Caraïbes.
Source : Hayes et Goreau, 1998.

La place particulière des Vibrio

Le genre *Vibrio* sp. (du latin *Vibrare* = vibrer, onduler) appartient à la famille des Vibrionacées (Véron, 1965). Ce sont des γ -proteo bactéries ubiquistes dans les environnements marins mais également présents en milieu dulcicole et dans les eaux saumâtres. Les *Vibrio* sp. sont des bacilles mobiles Gram-, de forme droite ou incurvée, aérobies-anaérobies facultatifs, mésophiles et chimio-organotrophes. Le genre *Vibrio* est largement répandu avec plus de 30 espèces identifiées. Si certaines espèces sont décrites comme pathogènes pour la communauté corallienne, d'autres le sont également pour l'être humain. Parmi celles-ci, on trouve *Vibrio cholerae*, agent du choléra ainsi que *V. parahaemolyticus* responsable d'infections alimentaires et d'entérites.

Du fait de leur large distribution écologique et de leur importance dans le milieu marin, la famille des Vibrionacées a été beaucoup étudiée. Des relations symbiotiques ont été

observées chez beaucoup d'espèces marines comme pour les Arthropodes, les Mollusques ou les Téléostéens. Pour chacun d'eux, les Vibrionacés ont été reconnues à l'origine de pathologies sévères voire mortelles identifiées comme des « Vibrioses », comparables à des septicémies hémorragiques. Si les *Vibrio* sp. peuvent s'avérer de redoutables pathogènes, ils constituent paradoxalement une barrière protectrice vitale pour de nombreux organismes. Ces bactéries colonisent tous types d'épithélia (épithélium kératinisé jusqu'au tractus digestif) et produisent une défense chimique contre les agressions bactériennes en produisant des peptides antimicrobiens (AMP) aussi désignés « Host Defence Peptides » (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2014).

Les changements environnementaux vont constituer des déclencheurs de pathogénicité tels que précédemment décrits pour les coraux.

I.3. - Activités anthropiques

I.3.1. - Les pollutions

I.3.1.1. - Les métaux lourds

La pollution par les métaux lourds constitue une réelle menace pour la communauté récifale. La toxicité à de faibles concentrations, la bioaccumulation sans possibilité d'excrétion, l'impossibilité de biodégradation révèlent toute la dangerosité des métaux lourds sur le monde du vivant. Les métaux lourds sont issus de différentes activités (portuaire, plaisance, antifouling, rejets d'eau polluée, industrie du transport, raffineries, terminaux pétroliers, déchetterie, ...) mais peuvent être également d'origine environnementale (érosion du sol).

L'espèce *P. damicornis* et plus largement le genre *Pocillopora* sp. semblent être sujets à la bioaccumulation des métaux lourds tels que le cadmium, le cuivre, le zinc, le plomb, ... (Barakat *et al.*, 2014, 2015). A l'inverse, les *Porites* sp. se révèlent les moins impactés (Harland et Brown, 1989 ; Barakat *et al.*, 2014, 2015). Les métaux lourds sont trouvés dans le squelette corallien, tout comme dans les tissus qui concentrent davantage d'éléments (Barakat *et al.*, 2014, 2015). Brown *et al.* (1991) ont mis en évidence une rétraction des tissus coralliens après une période d'exposition à des métaux lourds tels que le fer et Harland et Brown (1989) ont démontré la perte de zooxanthelles de *Porites lutea* après exposition à de fortes concentrations en eau de mer enrichie en fer (Harland et Brown, 1989 ; Brown *et al.*, 1991). Cependant, une tolérance de *P. lutea* exposé à ces fortes concentrations en fer a été observée sur des individus cultivés dans des eaux enrichies en fer (Harland et Brown, 1989).

I.3.1.2. - Les produits phytosanitaires

Plusieurs études relatent les impacts négatifs sur la communauté récifale d'un certain nombre de molécules de synthèse retrouvées dans les eaux océaniques. Parmi celles-ci, les pesticides, les herbicides, les fongicides et les insecticides s'avèrent particulièrement agressifs pour les populations coralliennes, tout comme l'usage d'antifouling et d'anticorrosifs par le monde naval. Le milieu agricole est aussi montré du doigt pour son utilisation intensive de produits chimiques, mais les usages domestiques sont également remis en cause. Le lessivage des sols à l'occasion des fortes pluies (mousson, cyclone, ...) favorise la mise en suspension de ces molécules dans les eaux marines. Une estimation porte à 50 % des herbicides commerciaux ayant la capacité de bloquer la chaîne de transport des électrons dans le cytoplasme. Negri *et al.* (2005) mettent en évidence l'atteinte au bon déroulement de la métamorphose des larves d'*Acropora millepora* et de *Montipora aequituberculata* après exposition à un herbicide, le diuron (DCMU). Seules les larves de *P. damicornis* se montreront tolérantes à de fortes concentrations (Negri *et al.*, 2005). Jones et Kerswell (2003) ont établi la phytotoxicité de huit herbicides sur *Seriatopora hystrix* dont les plus toxiques sont l'irgarol, l'ametrym et le DCMU (Jones et Kerswell, 2003). Leur toxicité est évaluée de l'ordre de 50 à 200 ng/L. Vandermeulen *et al.* (1972) ont mis en évidence la capacité de re-métamorphose de *P. damicornis* après exposition au DCMU.

Le caractère réversible des perturbations physiologiques engendrées par l'exposition aux herbicides a été également soulevé par un certain nombre d'auteurs (Jones et Kerswell, 2003 ; Watanabe *et al.*, 2006). Des processus de rétractation tissulaire ont été également observés sur les colonies et ce jusqu'à l'expulsion des polypes. Cependant, aucune fixation n'a été rapportée après leur expulsion (Negri *et al.*, 2005). Watanabe *et al.* (2006) signalent un détachement tissulaire ou la mort des juvéniles d'*Acropora tenuis* après exposition au DCMU, mais aussi avec le dichlorvos (DDVP) et le tributyltin chloride (TBT-Cl), respectivement un insecticide et un anti-fouling (Watanabe *et al.*, 2006). Watanabe *et al.* (2006) observent une réduction des algues symbiotiques dans les tentacules des jeunes recrues ainsi qu'une sensibilité accrue des juvéniles zooxanthellés par rapport aux juvéniles azooxanthellés. Ces auteurs établissent un parallèle entre le phénomène de Polyp Bail Out observé par Sammarco (1982) et les détachements tissulaires ou les rétractations observées. L'expulsion tissulaire pourrait permettre une re-métamorphose du polype exposé à des conditions plus optimales.

I.3.1.3. - Les éléments nutritifs

L'enrichissement en nutriments des eaux tropicales oligotrophes est considéré comme l'une des principales causes de dégradation des récifs coralliens. Une agriculture intensive et les rejets d'eaux usées et non traitées sont extrêmement destructeurs pour la communauté récifale. Plusieurs études exposent l'étroite relation entre des eaux riches en nutriments et

l'apparition de maladies coralliennes (Epizooties) et du blanchissement. Vega Thurber *et al.* (2014) démontrent l'apparition d'épizooties telles la maladie de la tâche noire (DSS : Dark Spot Syndrom) en lien avec l'enrichissement des eaux en azote et en phosphore (Vega Thurber *et al.*, 2014). Bruno *et al.* (2003) décrivent la virulence amplifiée d'*Aspergillus sydowii* sur *Gorgonia ventalina* et l'évolution rapide de la maladie des bandes jaunes sur *Montastrea annularis* et *M. franksii*. Le caractère aigu des maladies sera d'autant plus fort que l'enrichissement est abondant. Koop *et al.* (2001) rapportent l'impact important des nutriments sur la reproduction de deux *Acropora* sp. et la diminution de la richesse lipidique tissulaire (Koop *et al.*, 2001). Des eaux riches permettent une multiplication plus importante des *Symbiodinium* sp. dans le tissu corallien. Des hausses de températures n'en seront que plus visibles lors des phénomènes de blanchissement. Egalement, les organismes zooxanthellés absorbent plus rapidement les éléments dissous et rejettent de ce fait davantage de nutriments dans la colonne d'eau (Koop *et al.*, 2001). La croissance squelettique et la survie peuvent également être directement impactées par la qualité et la quantité des nutriments. Koop *et al.* (2001) mettent en évidence que la mortalité élevée de *P. damicornis* est consécutive à une sensibilité accrue aux concentrations élevées en nutriments. De fortes concentrations d'azote peuvent entraîner des retards de croissance (Browne *et al.*, 2015), une réduction de la taille et de la quantité des oocytes ainsi qu'une réduction de la fixation des larves (Koop *et al.*, 2001). Si le phosphore n'influe pas sur la fixation des larves de coraux incubateurs tels que *P. damicornis*, son excès réduit malgré tout la densité squelettique corallienne avec des risques de fractures amplifiées (Koop *et al.*, 2001).

Aux concentrations élevées en nutriments s'accompagne souvent le risque de détérioration de la qualité de l'eau et du phénomène d'eutrophisation. La prolifération algale s'en trouve renforcée, tout comme l'apparition de blooms phytoplanctoniques. Les risques de phénomènes d'hypoxie, voire d'anoxie, constituent une réelle menace pour la population corallienne en place.

De façon intéressante, Bongiorno *et al.* (2003) rapportent que l'enrichissement en nutriments des eaux issues d'une ferme aquacole s'est avéré bénéfique à la croissance et à la gonadogénèse de *Stylophora pistillata* et d'*Acropora eurystoma*. D'autres auteurs relatent l'aspect positif de tels enrichissements. La sensibilité des coraux sera ainsi fonction de l'espèce et de la variabilité individuelle, de la forme chimique des éléments nutritifs et de la qualité initiale des eaux en nutriments.

I.3.1.4. - Les microplastiques

L'influence du plastique dans le milieu environnemental est une particularité de l'Anthropocène, au point que l'âge du Plasticène est maintenant mentionné par certains auteurs. L'abondance des déchets plastiques dans le milieu océanique est évaluée à plus de 300 millions de km². Ces déchets plastiques représentent 10 % des 280 millions de tonnes produites annuellement mais constituent entre 60 et 80 % des débris retrouvés dans le milieu

marin (Kaposi *et al.*, 2013). Une telle accumulation préoccupe de plus en plus la communauté scientifique sur les répercussions engendrées sur le long terme. La mise en évidence récente de microparticules d'une longueur n'excédant pas 3 mm de long bouscule les chiffres jusqu'alors estimés sur les quantités de plastiques dans le milieu marin (Woodall *et al.*, 2014). Les risques produits sur les organismes marins par les pièces plastiques de grande taille sont bien connus. L'étranglement et l'ingestion sont les principaux dangers identifiés, entraînant des mortalités provoquées par étouffements ou hémorragies, mais aussi par empoisonnement ou par risques d'occlusion. Les microplastiques représentent eux aussi une menace sérieuse pour de nombreuses espèces et pour tous les embranchements du vivant. Si les menaces directes de l'ingestion des microplastiques sur la survie des organismes restent limitées, en revanche, des modifications dans la réponse immunitaire, dans la production de pseudofécès, le changement de comportement alimentaire et la perte de poids ont été rapportées (Kaposi *et al.*, 2013). Egalement, de nombreuses larves d'organismes marins ingèrent ces microparticules et des corrélations positives ont été observées entre le taux d'ingestion et la concentration en microparticules (Kaposi *et al.*, 2013). Hall *et al.* (2015) observent une ingestion de microplastiques de taille inférieure à 2 mm par près de 21 % des polypes du Scléactiniaire *Dipsastrea pallida* (Fig. 13). Ces micro-déchets se retrouvent notamment localisés dans le tissu mésentérique des polypes, rendant difficile leur extraction. Le taux de capture de ces micro-particules de plastique apparaît proche de celui du plancton et pourrait à long terme impacter la santé des coraux (Hall *et al.*, 2015).

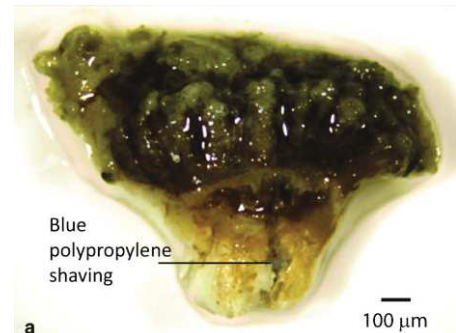


Figure 13 : Microplastique retrouvé dans les mésentériques de *Dipsastrea pallida*.
Source : Hall *et al.*, 2015.

I.3.1.5. - La sédimentation

Le phénomène de sédimentation peut être induit par la déforestation et l'érosion du sol. Les rivières jouent un rôle important dans l'apport de la charge organique. La sédimentation induit des situations de stress, aussi bien à l'état de suspension que par la déposition. Ce phénomène entraîne une diminution de la disponibilité à la lumière, engendrant une réduction de la photosynthèse et donc du soutien énergétique. Il est susceptible d'étouffer les coraux et de réduire les surfaces pour la fixation larvaire (Te, 1992). La concentration et la qualité de la charge sédimentaire influent également sur la croissance des coraux, le risque infectieux et la survie (Te, 1992 ; Browne *et al.*, 2015).

La mise en suspension des sédiments et la disponibilité à la lumière ont une forte influence sur les coraux foliacés (Browne *et al.*, 2015). Les coupes foliacées ou fuselées de certaines espèces permettent de concentrer ce sédiment dans les régions centrales des colonies, limitant la couverture des surfaces.

Certaines espèces sont capables d'adapter leur métabolisme à la sédimentation et la turbidité grâce à leur adaptation génétique comme pour les Poritidés.

I.3.2. - Les activités récréatives

L'exploitation touristique des écosystèmes récifaux génère à elle seule des bénéfices estimés à 10 milliards de dollars par an. La demande touristique croissante pour ces activités de loisirs a entraîné une augmentation des dégradations des organismes récifaux. La plongée, la plaisance, l'ancrage, le snorkeling et les excursions à pied sur le récif sont identifiés parmi les différentes pratiques susceptibles d'impacter les récifs.

Les actions de dégradations sont multiples. Elles peuvent être accidentelles ou intentionnelles. Parmi celles-ci, la sédimentation, la fragmentation des branches, les phénomènes d'abrasion, le risque bactérien par contact, l'enfouissement dans le sédiment, les dommages tissulaires par contact, le déplacement de certaines colonies, ... illustrent les réelles pressions que subit la communauté en place (Rinkevich, 1995).

Même de faibles perturbations peuvent s'avérer dommageables sur le long terme. Les répercussions sont multiples, comme une réduction de la croissance corallienne, une prolifération algale, des activités de reproduction perturbées, des pontes de moindre qualité, une expulsion partielle des zooxanthelles, le développement de nécroses ou directement la mort de l'organisme. L'abondance et la diversité récifale sont impactées. Parmi les actions de restauration, le gardening concept proposé par Rinkevich (1995) apparaît comme une stratégie pour recoloniser les zones dégradées. Egalement, l'accès réglementé et limité à certains espaces, les actions de sensibilisation, la dissuasion par la surveillance et la répression ont pour objectifs de préserver l'état des populations tout en maintenant une activité économique.

I.3.3. - Les aménagements côtiers

La pression très forte de l'urbanisation conduit dans certaines régions du globe à un bétonnage du littoral. Les coraux sont directement impactés par cette expansion rapide nécessitant l'installation de remblais et d'importants besoins en matériaux à des fins de construction. En plus de la sédimentation, les prélèvements de substrats entraînent des perturbations de la courantologie susceptibles d'impacter la communauté récifale. Browne *et al.* (2015) remarquent que les aménagements portuaires et pétroliers de Singapour se sont accompagnés d'une perte de près de 60 % de la couverture récifale. Les limites de cette zone portuaire, parmi les plus fréquentées au monde, jouxtent un récif abritant près de 255 espèces de Scléactiniaires.

I.3.4. - La surpêche et la collecte d'organismes

La surpêche et l'exploitation des ressources naturelles constituent une réelle menace pour la pérennité des récifs coralliens. Près de 10 % des espèces consommées par l'homme proviennent du milieu récifal (Moberg et Folke, 1999). La pêche intensive dans les Caraïbes a conduit en 40 ans à la réduction des plusieurs espèces de poissons, allant même jusqu'à leur disparition. Les espèces prédatrices restent les plus touchées comme les requins, les Lutjanidés, les Carangidés, les Ballistidés et les Serranidés (Hughes, 1994). Les tortues et les lamantins ont pratiquement disparu. Les espèces herbivores telles que les Scaridés et les Acanthuridés ont vu leurs effectifs divisés par deux, avec des tailles en deçà de celles correspondant à la maturité sexuelle (Hughes, 1994).

La surpêche induit également un déséquilibre de l'écosystème récifal. Les prélèvements répétés sur les espèces prédatrices privilégient le développement de certains organismes aux intérêts économiques moindres. C'est le cas de l'Echinoderme *Diadema antillarum* qui a ainsi proliféré, limitant de ce fait la prolifération algale, mais réduisant l'accès à la nourriture des poissons herbivores. Une mortalité accrue des *D. antillarum* dans les années suivantes s'est accompagnée d'une explosion algale perturbant la communauté corallienne (Hughes, 1994).

En plus des prélèvements à des fins alimentaires, les captures pour le commerce aquariophile ont rapidement progressé ces dernières années. Les collectes répétées d'organismes ne sont pas sans conséquences sur les populations sauvages. Ce sont près de 350 millions de poissons qui sont ainsi prélevés chaque année (Tissot et Hallacher, 2003). Les Etats Unis d'Amérique représentaient à eux seuls en 1992 l'export de 201 millions de poissons (Wood, 2001). Les collectes uniquement ciblées sur certaines espèces constituent un risque supplémentaire pour la stabilité de ces populations. Parmi les 103 espèces de poissons à haute valeur commerciale, 11 d'entre elles représentent 90 % des captures, l'espèce la plus recherchée étant *Zebrasoma flavescens* avec près de 52 % des prises. Egalement, certaines méthodes de capture telles que l'utilisation de cyanure, de narcotiques comme la quinaldine ou même d'acétone et de solvants alcoolés se sont avérées particulièrement nocives pour les organismes exposés. L'usage de dynamite dans le but d'assommer les poissons peut tuer les organismes et s'accompagne d'une action destructrice sur l'environnement. Si ces méthodes deviennent de plus en plus proscrites aujourd'hui grâce à des exportations contraintes de suivre un cahier des charges plus rigoureux, certaines populations d'organismes restent affaiblies sous la pression des prélèvements.

La collecte de nombreux herbivores entraîne de plus une prolifération algale préjudiciable au développement corallien. Les fortes pressions de collecte ont conduit à décimer certaines populations de poissons autochtones (Wood, 2001).

I.4. - Quelles capacités de recouvrement ?

Le suivi sur 17 années opéré par De'ath *et al.* (2012) sur la Grande Barrière de Corail a démontré une réduction de la couverture corallienne de 50 % et un taux de régression évalué à 0.53 %/an. Certaines régions du globe ont particulièrement souffert à la suite d'aléas climatiques comme lors du passage d'El Niño en 1998. La réduction de la couverture corallienne des Seychelles a atteint les 90 % (Sheppard *et al.*, 2003 ; Linden *et al.*, 2002). La modification du paysage a été profondément perturbée et a également impacté les organismes associés. Graham *et al.* (2006) ont pu démontrer l'appauvrissement taxonomique sur les populations de poissons. Le blanchissement corallien a directement influencé l'abondance de certaines espèces de poissons dont trois familles, les Monacanthidés, les Chaetodonthidés et les Pomacentridés. La disparition des zones branchues qu'offraient les coraux arbustifs a été préjudiciable au recrutement, limitant les abris et la nourriture. La compétition pour l'espace s'est accentuée, privilégiant davantage des organismes de petite taille. Profitant d'une colonisation algale sur les colonies mortes, les populations d'alguivores ont vu leur population se stabiliser (Graham *et al.*, 2006). Les recrues coralliennes dans ces zones ont été aussi observées à la hausse.

Donner *et al.* (2005) soulignent que la flexibilité de la symbiose peut constituer une stratégie d'adaptation permettant aux coraux d'augmenter leur résistance au stress thermique. Cette faculté pourrait leur permettre la recolonisation de la couverture corallienne après un épisode de blanchissement.

I.5. - Le lien entre les écosystèmes

Les récifs coralliens regroupent quatre principales formations : les récifs frangeants, les barrières récifales, les atolls et les platiers récifaux. Ces systèmes se distinguent par leur fonctionnement mais restent connectés entre-eux, ainsi qu'avec d'autres écosystèmes tels que les mangroves, les couvertures algales dont les herbiers et l'océan (Moberg et Floke, 1999 ; Obura et Grimsditch, 2009). Des écosystèmes impactés peuvent affecter la stabilité des écosystèmes proches ou tributaires (Kumaraguru, 2002 ; Moberg et Folk, 1999). Cette mosaïque d'écosystèmes interconnectés reste sous l'influence des activités terrestres et de l'océan. Les forêts de mangrove et les champs d'algues absorbent les éléments nutritifs et les polluants apportés par les arrivées d'eau douce (Fig. 14). Ces zones intermédiaires permettent de soutenir la croissance des récifs coralliens et ont également un rôle de nurserie pour de nombreuses espèces. Des perturbations entraîneraient un risque pour la pérennité des récifs. Inversement, les formations récifales assurent une protection de ces zones tampons en limitant la houle et le processus d'érosion (Chavanich *et al.*, 2015).

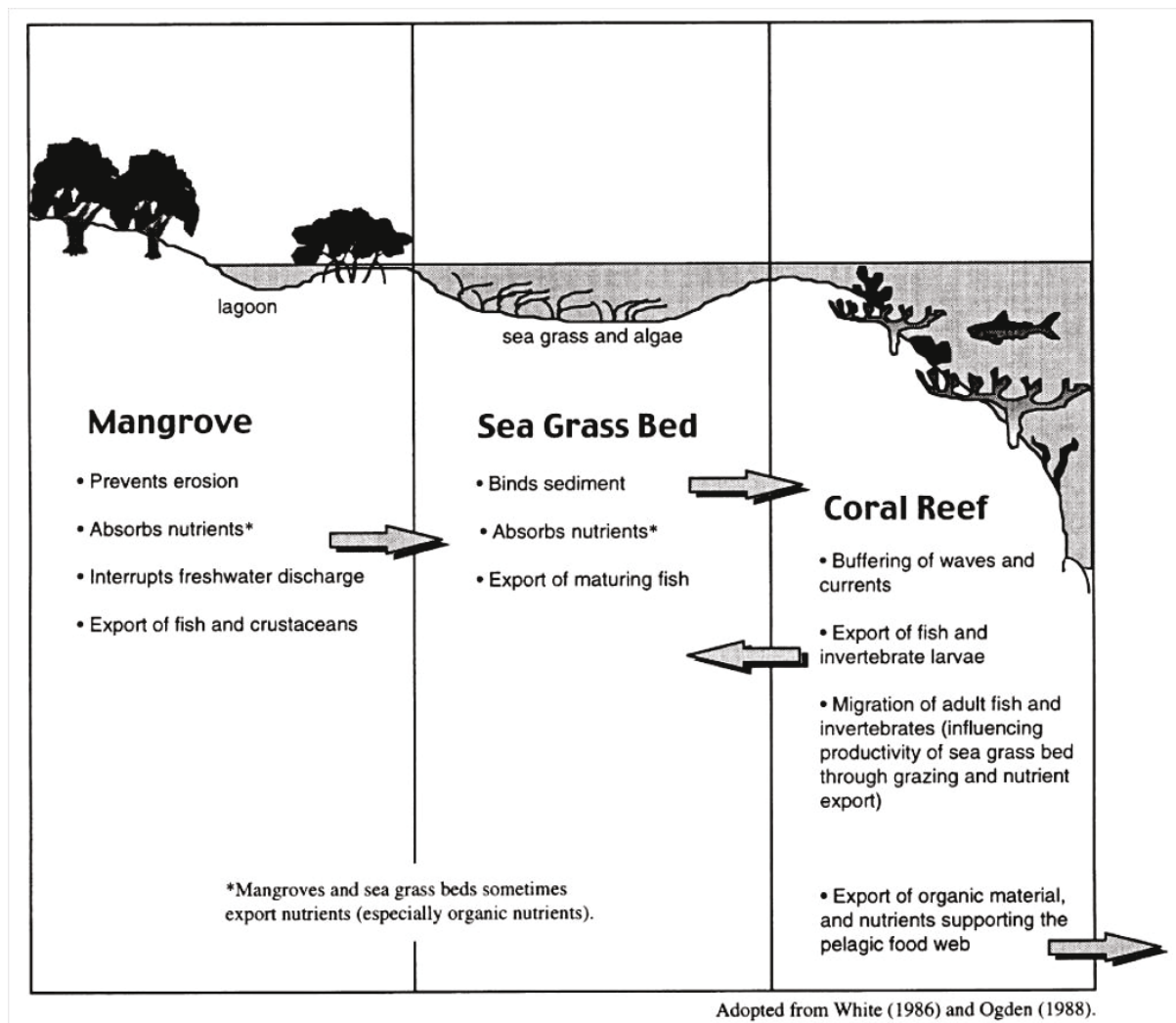


Figure 14 : Interactions entre les écosystèmes. Source : Moberg et Folk, 1999.

I.6. - Les services de l'écosystème corallien pour l'humanité

Les fonctions d'un écosystème se définissent selon De Groot *et al.* (2002) comme « la capacité des processus naturels et des compartiments de l'écosystème ciblé à fournir les biens et les services pour satisfaire les besoins humains, de façon directe ou indirecte ». Les écosystèmes coralliens fournissent des ressources et des services estimés à 375 milliards de dollars chaque année (Obura et Grimsditch, 2009). On estime aujourd'hui que plus d'une centaine de pays bordés par 150 000 km de côtes et près de 500 millions de personnes bénéficient à travers le monde, de façon directe ou indirecte, des ressources de cet écosystème (Moberg et Folk, 1999 ; Koop *et al.*, 2001 ; Obura et Grimsditch, 2009 ; Branchini *et al.*, 2015). Certains chiffres montent même jusqu'à 900 millions de personnes bénéficiaires de cet écosystème et nourrissant plus de 30 millions d'humains. 10 % de la population mondiale, soit près de 655 millions de personnes, vivent dans les 100 premiers kilomètres en bordure de côte (Mora *et al.*, 2015).

Les récifs rapporteraient entre 100 000 et 600 000 dollars/km²/an. Des régions telles que la Grande Barrière de Corail ou les Caraïbes génèrent une richesse de plusieurs milliards de dollars (Tab. 2). L'activité de plongée dans les Caraïbes produit à elle seule 1.2 milliards de dollars par an (Hoegh-Guldberg, 1999 ; Koop *et al.*, 2001) et l'activité touristique générerait en 1990 près de 350 000 emplois. L'ensemble des récifs coralliens constituerait une ressource évaluée à près de 30 milliards de dollars en bénéfice net chaque année (Cesar *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2015 ; <https://www.coralguardian.org>).

Situation géographique	Gain par année (\$)	Auteurs
Caraïbes	90 milliards	Jameson et al, 1995
GBR - Australie	1 - 1.5 milliards	Done et al, 1996 ; Richmond, 1993
Floride	1.6 milliards	Birkeland, 1997

Tableau 2 : Valeur économique des récifs coralliens. Source : Hoegh-Guldberg, 1999.

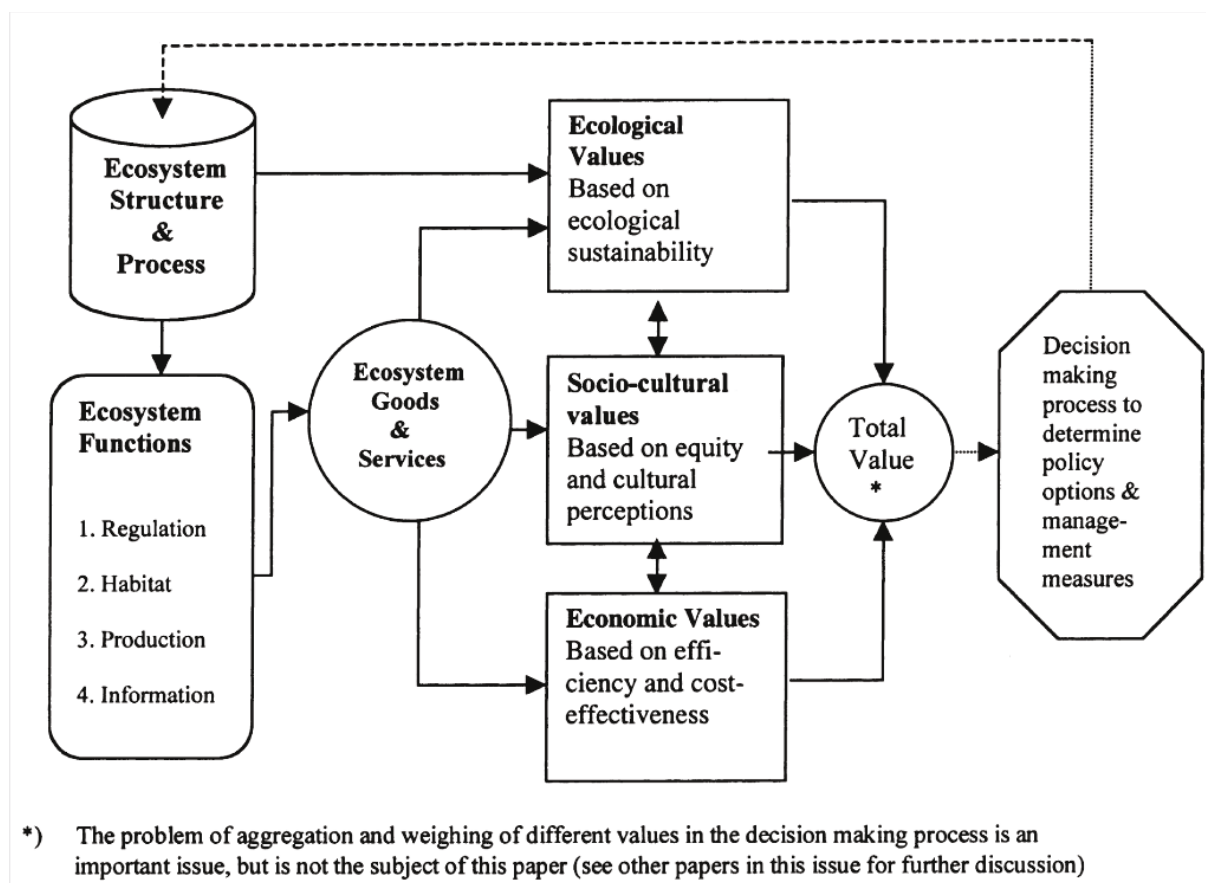


Figure 15 : Relations entre les intérêts politico-économiques, sociaux et environnementaux fournis par l'écosystème récifal.

Source : De Groot *et al.*, 2002.

Le tourisme constitue la principale ressource économique du tiers des pays bordés par des récifs (Branchini *et al.*, 2015). En prévision d'une diminution des ressources récifales, les pertes financières ont été évaluées sur ce domaine d'activité. Les Caraïbes devraient perdre entre 350 et 870 millions de dollars en 2015 (Burke et Maidens, 2004). Les scénarii montés par Chen *et al.* (2015) indiquent une perte estimée entre 3.72 et 23.78 milliards de dollars par an uniquement pour les activités touristiques et de loisirs (Chen *et al.*, 2015).

L'activité de pêche est parfaitement identifiée. Le récif joue un rôle nourricier de premier rang pour les populations autochtones. 1 km² de récif croissant suffit pour fournir un apport de protéines à quelques 300 personnes (Moberg et Folk, 1999). Dans certaines régions, l'activité de pêche dans la zone récifale fournit jusqu'à 1/4 des ressources en poisson. Un récif en bonne santé peut produire jusqu'à 15 tonnes de produits consommables par kilomètre carré et par an (Joannot, 2009).

Le domaine de la santé : La recrudescence des cancers dans les pays industrialisés est une réalité, mais si leur nombre est en progression, en revanche les avancées biomédicales permettent de diminuer les cas de mortalité. La santé publique devenant une préoccupation majeure dans nos sociétés, l'intérêt pour les biotechnologies marines s'est accru et a révélé un potentiel prometteur. Environ 16 000 produits naturels ont été extraits à ce jour à partir des organismes marins (Datta *et al.*, 2015).

Le domaine pharmaceutique dispose ainsi d'un véritable réservoir de molécules actives pour lutter contre un nombre important de cancers, de leucémies, de tumeurs, ... (Fig. 16). Les propriétés anti-tumorales ont pu être testées sur près de 60 cancers différents (Datta *et al.*, 2015). La probabilité de trouver de nouvelles molécules dans les océans et en particulier à partir d'espèces issues des récifs coralliens est 300 à 400 fois plus

Marine sources (Major phylum)	Major bioactive compounds	Disease prevention
Porifera	Manzamine, phenolic or quinoid, alkaloids, terpenoids, brominated tryptamines,	Antimalarial, antiviral especially AIDS, antibacterial, antifungal, anticancer
Coelenterata	Prostaglandins, proteins, enzymes, steroids, terpenoids, brominated alkaloids, macrolides and ceramides	antibacterial, antifungal, antialgal, cardiac and nerve muscle relaxation, antitumour, anticancer, antineoplastic
Annelida	Peptides, Arenecins, hedistins, antimicrobial peptide (AMP),	Arthritis, osteoporosis, bone cancer, antimicrobial, antibacterial, antifungal
Arthropoda	Lectin viz. limulin and carinoscorpion, thiol ester protein, fatty acids, triglycerides, carotenoids and lipids,	Antibacterial, anti cancer, antioxidant, antiproliferative, antimutagenic, antiinflammatory, immune response
Mollusca	Dolostatin, lectin, steroid, terpenoids, acetylenic compounds, dollstains, polysaccharides	Antileukemic, immune response, hypotension, relaxation smooth muscle, antinicotinic activity, antiviral especially HIV virus inhibiting compound
Echinodermata	Saponins and sterol derivatives, terpenoids, glycoproteins, cerebrosides, pyrimidine nucleosides, thymine deoxyriboside and uracil deoxyribose, polysaccharides, β -carotene	Hemolytic, antibacterial, antifungal, antineoplastic, antitumor, antiviral especially anti HIV activity, antiinflammatory, anti cancer, anti allergic

Figure 16 : Principaux composés bio-actifs produits par les invertébrés marins. Source : Datta *et al.*, 2015.

élevée que pour des organismes provenant d'un écosystème terrestre (Bruckner, 2002 ; Costa-Neto, 2005). Les récifs coralliens concentrent une diversité d'embranchements sessiles et fortement inféodés au récif. Face à l'impossibilité de s'échapper vers des conditions plus favorables, ces organismes ont élaboré des stratégies de défense mécaniques et chimiques pour combattre la prédation, les maladies, la compétition entre organismes et contre le fouling. Les composés peuvent être aussi produits par les symbiotes présents dans les tissus. Toutes ces molécules peuvent fournir de nouvelles avancées pharmaceutiques et médicales. Des anti-inflammatoires, des anti-coagulants mais aussi des anti-microbiens, anti-protistes, anti-fongiques ou anti-helminthes ont ainsi été extraits d'un certain nombre d'espèces coralliennes et des organismes associés tels que les Spongiaires et les Mollusques (Moberg et Folk, 1999 ; Datta *et al.*, 2015). Des anti-viraux (Ara-A et AZT) et des anti-carcinogéniques (Ara-C) ont ainsi été produits à partir d'éponges se développant dans les récifs des Caraïbes. D'autres produits comme la Dolastatine 10 ont été isolés à partir du lièvre de mer trouvé dans l'océan indien. Les anti-tumoraux Eleutherobine, Sarcodictyine ou Stolonigeran ont été extraits à partir de différentes espèces de coraux (Datta *et al.*, 2015). L'activité anti-inflammatoire de l'Hirsutocospiro A a été découverte sur le corail mou *Cladiella hirsuta* (Chen *et al.*, 2015). D'autres anti-inflammatoires ont été isolés à partir de l'éponge *Luffariella variabilis* (Costa-Neto, 2005) et une certaine diversité d'anti-tumoraux (Halichondrine B, Spongistatines, Althohyrines, ...) ont été isolés chez nombre de Spongiaires. Aujourd'hui les principales contraintes restent l'accessibilité de la ressource, les quantités requises d'organismes parfois trop importantes, les coûts de prospection, la difficulté d'identifier les organismes cibles ainsi que l'investissement clinique et commercial (Bruckner, 2002).

L'industrie de l'aquariophilie affiche un essor considérable. En 1985, les bénéfices étaient estimés entre 24 et 40 millions de dollars par an pour des gains oscillant aujourd'hui entre 200 et 300 millions de dollars par an (Moberg et Folk, 1999 ; Wabnitz *et al.*, 2003). Ce sont près de 11 - 12 millions de pièces vendues par an et un revenu approchant les 30 millions de dollars par an uniquement généré par la vente de corail (Latypov *et al.*, 2013).

Les activités perlières, de joaillerie et la production de souvenirs multiples viennent grossir la manne providentielle que représentent les récifs.

Enfin, les récifs forment une barrière naturelle à l'érosion en absorbant 90 % des vagues. Ils permettent également de protéger les populations en place en formant avec les mangroves un brise-lame naturel contre les tsunamis.

I.7. - Quels moyens de protection ?

Aujourd'hui, 20 % des récifs ont complètement disparu, 33 % des espèces coralliennes sont face à un risque d'extinction (Mora, 2015) et entre 50 et 70 % des zones récifales sont

directement menacées par les activités humaines (Hoegh-Guldberg, 1999 ; Obura et Grimsditch, 2009) (Fig. 17). Ces trois dernières décennies, la couverture corallienne des Caraïbes a régressé de 80 % (Gardner *et al.*, 2005 ; Obura et Grimsditch, 2009 ; Mora, 2015). En 2004, la diminution des récifs coralliens du Golfe Persique a été évaluée à 65 % et à 38 % pour les récifs d'Asie du Sud-Est (Joannot, 2009). Cesar (2007) estime une perte jusqu'à 1 million de dollars/km de côte due à la dégradation des récifs coralliens.

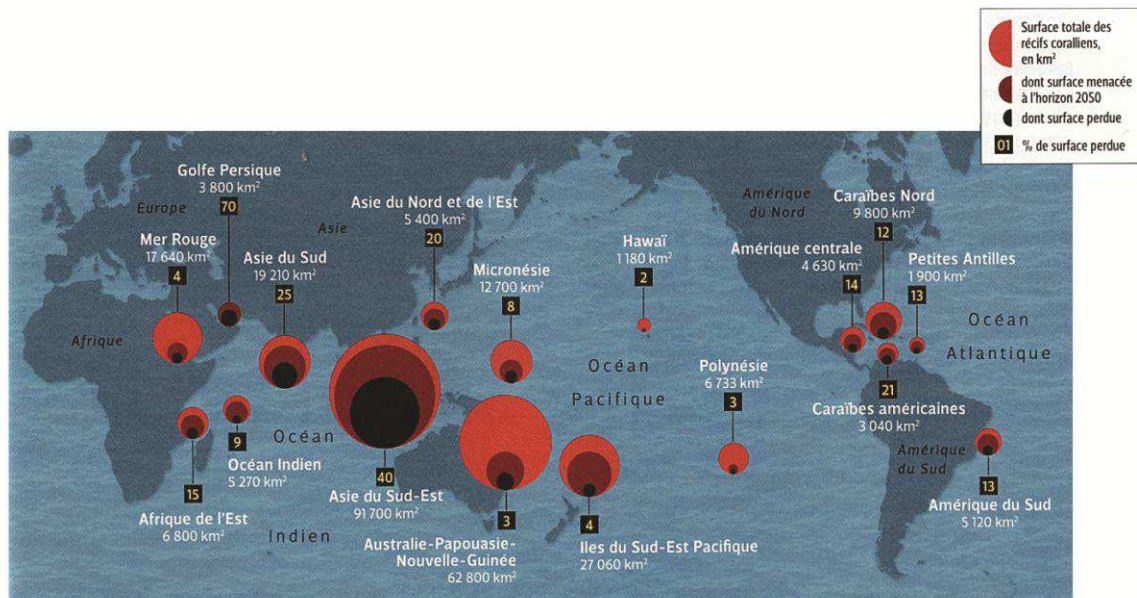


Figure 17 : Evolution temporelle de la couverture récifale à l'échelle globale.
Source : GEO-EXTRA, Août-Octobre 2015.

La réponse des milieux aux actions de protection diffère selon les niveaux de protection (Branchini *et al.*, 2015). Les réserves intégrales ont montré leur efficacité, permettant d'augmenter la taille des populations coralliennes ainsi que des populations associées (Chapman et Kramer, 1999). Si 27 % des récifs à travers le monde sont localisés dans des aires marines protégées (Marine Protected Areas - MPAs), en revanche seulement 6 % bénéficient d'une réelle protection et d'une surveillance régulière (Chavanich *et al.*, 2015). En 1975, la Great Barrier Reef Marine Park Authority a été créé par le gouvernement australien dans le but d'appliquer la législation destinée à protéger la Grande Barrière de Corail. En 1981, l'UNESCO a reconnu la Grande Barrière comme faisant partie du Patrimoine Mondial de l'Humanité. La France n'est pas en reste et possède un patrimoine corallien parmi les plus riches de notre planète. Plusieurs instituts ont ainsi été créés tels que l'Initiative Française pour les Récifs Coralliens (IFRECOR) et l'Initiative Récifs Coralliens dans le Pacifique (IRCP). En plus des actions de l'UNESCO, un consortium international regroupant 102 pays a permis la création en avril 1995 de l'Initiative Internationale pour les Récifs Coralliens (ICRI). L'ICRI mène plusieurs types d'actions comme la surveillance et le suivi des zones récifales sous l'égide du Global Coral Reef Monitoring Network (GCRMN), mais aussi des opérations de communication et de travail entre des organisations officielles et les ONG sous le contrôle de l'International Coral Reef Action Network (ICRAN). Parmi les ONG les plus

connues sur le plan international, la liste rouge de l'International Union for Conservation of Nature (IUCN) et la fondation World Wildlife Fund (WWF) œuvrent également à la protection des récifs.

La Convention sur le Commerce International des Espèces de Faune et de Flore Sauvages Menacées d'Extinction (CITES) ou Convention de Washington de 1975 classe les coraux durs en Annexe II B. L'Annexe I interdit le commerce des espèces menacées d'extinction. L'Annexe II réglemente le commerce des espèces en danger sous couvert d'un permis d'exportation ou d'un certificat de réexportation. L'Annexe III place les organismes sous surveillance à la demande d'un Etat. Parmi les coraux durs, les Ordres Helioporacea, Milleporina, Scleractinia, Stolonifera et Stylasterina sont ainsi concernés par l'Annexe II B. L'inscription de la famille des Corallidés à la même Annexe a été rejetée en mars 2010 malgré la pression énorme du commerce sur ces « coraux précieux ». A ce jour, quatre espèces (*Corallium elatius*, *C. konojoi*, *C. secundum* et *Paracorallium japonicum*) sont inscrites en Annexe III uniquement pour la Chine. *C. rubrum* est la seule espèce inscrite en Annexe III de la CITES et sous protection de l'Annexe V de la directive « Habitats » de l'Union Européenne.

La restauration écologique et la biologie de la conservation sont deux notions actuellement utilisées pour soutenir la préservation des habitats originaux et/ou pour une réhabilitation de sites dégradés selon leur état originel. La restauration écologique suggère des mesures actives tandis que les efforts de conservation développent des mesures passives plus en faveur d'une recolonisation naturelle et minimisant l'intervention humaine (Rinkevich, 2005).

Des efforts de restauration apparaissent dès les années 1970. Birkeland *et al.* (1979) exposent trois techniques de transplantation dont l'utilisation de colonies entières mais aussi des « pièces » de corail et enfin l'utilisation de fragments, les « nubbins ». Parmi les méthodes actuelles de conservation et de restauration des récifs coralliens, l'utilisation de récifs artificiels sur lesquels se développent les coraux est régulièrement citée (Sherman *et al.*, 2001). Birkeland *et al.* (1979) ont mentionné l'idée d'accrocher les colonies avec des fils électriques recouverts de plastique ; ils ignoraient que 20 ans plus tard l'usage de structures métalliques parcourues par un faible courant électrique allaient favoriser un développement rapide et une certaine résistance des organismes calcifiants sous le joug de l'électrolyse (Hilbertz et Goreau, 1996). La méthode de transplantation en utilisant des fragments de coraux apparaît aussi efficace pour une reconstitution rapide des récifs (Rinkevich, 2005 ; Latypov *et al.*, 2013).

A la technique de transplantation directe du corail, le concept de nurserie ou de « gardening concept » est venu enrichir les moyens de restauration (Epstein *et al.*, 2001 ; Rinkevich, 2005 ; Shafir *et al.*, 2006). Cette méthode a pour intérêt de cultiver *in situ* ou *ex situ* des apex ou des branches de coraux. Les fragments de faible taille cultivés (nubbins = un ou plusieurs polypes) facilitent par la suite la transplantation. Cette technique permet de promouvoir les comportements de reproduction et de faciliter la dispersion larvaire par la présence de nurseries *in situ* (Rinkevich, 2005 ; Shafir *et al.*, 2006 ; Amar et Rinkevich,

2007). Egalement, la notion de microbouturage a permis de démultiplier la production de certains génotypes.

De nouveaux sigles font leur apparition dans le marché de l'aquariophilie marine, dans le but de lutter contre les exportateurs indélicats. Parmi les certifications internationales, la norme ISO 14001 (International Organisation for Standardization) garantit un cahier des charges œuvrant pour un management environnemental. La protection de la biodiversité et la démarche en faveur du développement durable sont les deux principaux piliers de cette norme. D'autres certifications, comme le Marine Aquarium Council (MAC), garantissent l'usage de méthodes responsables pour la fourniture d'organismes à des fins aquariologiques. L'utilisation destructive du cyanure est désormais prohibée et remplacée par des techniques moins néfastes, telles que le filet chalut ou le filet barrière. La coralliculture est également privilégiée afin de préserver les souches sauvages.

Synthèse

Les impacts naturels et les agressions anthropiques (Fig. 18, 19) ont déjà conduit à la perte de près de 50 % des récifs en 50 ans (Carpenter *et al.*, 2008). Les récifs coralliens constituent des zones de nourriture, de refuge, de reproduction, de nurserie pour de très nombreuses espèces marines. Leur disparition aurait donc des conséquences dramatiques pour ces espèces. Les récifs coralliens, présents le long des côtes de plus d'une centaine de pays, jouent également un rôle essentiel pour leurs populations (environ un demi-milliard d'êtres humains). Leur extrême biodiversité, comparable à celle des forêts tropicales, contribue au développement économique de ces pays, grâce au tourisme, à leur apport en matériaux de construction et aux activités de pêche. Les récifs assurent également un rôle indispensable de protection des plages et des zones côtières contre la houle océanique. De plus, ils présentent un intérêt pour les entreprises de biotechnologie qui se tournent depuis peu vers l'utilisation des organismes récifaux à la recherche de nouveaux gènes et molécules pour l'industrie pharmaceutique.

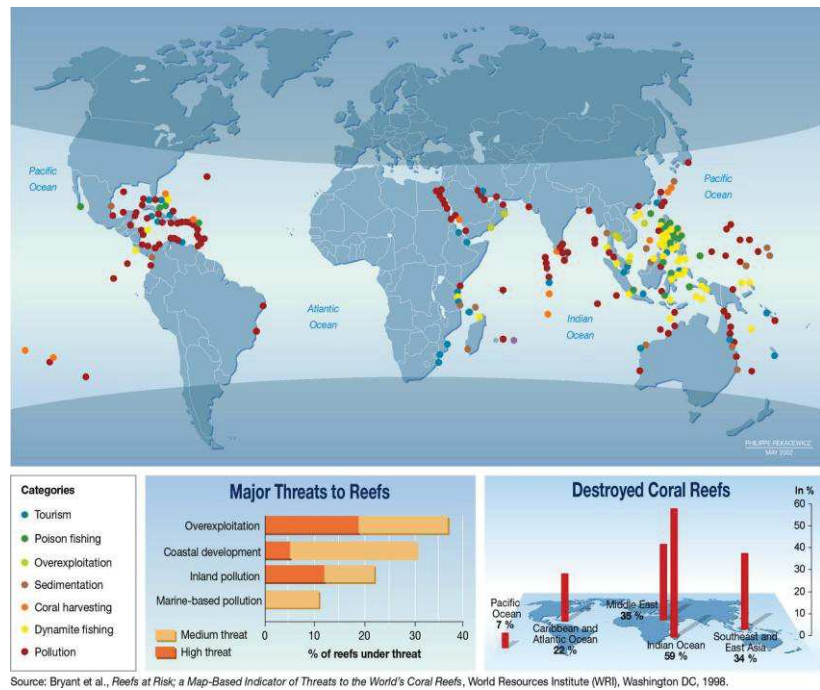


Figure 18 : Principales menaces anthropiques sur l'écosystème récifal.
Source : Bryant *et al.*, 1998.

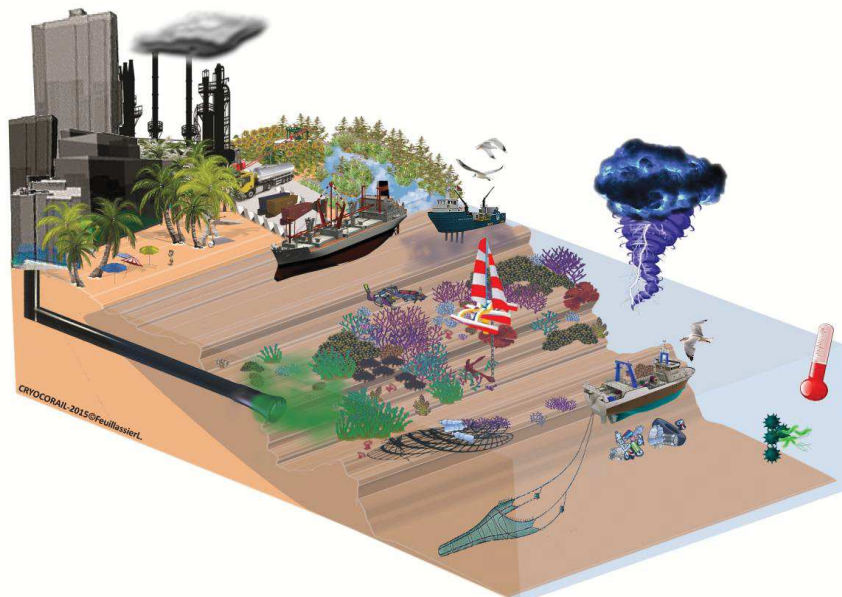


Figure 19 : Menaces naturelles et anthropiques sur l'écosystème corallien.

Chapitre 2

La cryobiologie

« (...) fous de terreur, les chevaux de l'artillerie soviétique (...) parvinrent à atteindre la rive du lac et se jetèrent dans l'eau. (...)

Soudainement, avec la sonorité particulière du verre se brisant, l'eau gela (...).

Le jour suivant, lorsque les premières patrouilles (...) atteignirent le lac, un spectacle horrible et surprenant se présenta à eux. Le lac ressemblait à une vaste surface de marbre blanc sur laquelle auraient été déposées les têtes de centaines de chevaux. »

(Curzio Malaparte, *Kaputt*, 1943).

II.1. - Historique

Les premiers écrits traitant de la cryoconservation remontent à 1663 avec les observations d'Henry Power. Ce pionnier rapporte la survie de petits nématodes (Méloïdogynes ou anguillules des racines) maintenus dans du vinaigre et après une congélation de quelques heures (Morris, 1981). La cryoconservation a d'abord été développée dans le domaine médical dès la moitié du 18^{ème} siècle. En 1776, les travaux de Lazaro Spallanzani décrivent la possibilité de conserver dans la neige des spermatozoïdes d'étalons. Dès les années 1900, le rôle des sucres a été identifié dans la résistance des plantes au froid (Fuller, 2004) et à partir des années 1910, le chirurgien Alexis Carrel s'intéresse à la conservation par le froid des organes humains à des fins de greffes. Les années 1940 marquent une réelle avancée des connaissances et des techniques en cryobiologie. Jahnel observe en 1938 une reprise de la motilité des spermatozoïdes humains stockés sans cryoprotecteur pendant 40 jours à -79 °C (Isachenko, 2005). Luyet publiera en 1937 une approche sur la vitrification puis Luyet et Gehenio publieront en 1940 un ouvrage de synthèse des travaux sur les avancées en cryobiologie. La cryoconservation s'intéresse dès cette époque aux règnes Animal et Végétal et les efforts portent déjà sur la tolérance aux traitements cryobiologiques des différents types cellulaires et des tissus isolés (Fuller, 2004). Luyet et Gehenio exposent notamment les différentes techniques de cryoconservation et les effets dommageables du froid et de la cristallisation sur le matériel biologique (Luyet, 1971). Dans la même année, Shelters (1940) congèle les spermatozoïdes humains contenus dans de fins capillaires en les exposant à des bains d'alcools à -79 °C et à des bains d'azote liquide à -196 °C. A la veille de la Seconde Guerre Mondiale, des banques monospécifiques de tissus sont en place. Les travaux de Christopher Podge *et al.*, publiés en 1949 et 1950, marquent un réel tournant dans la cryobiologie avec l'identification des propriétés cryoprotectrices du glycérol et la vitrification réussie des spermatozoïdes de plusieurs mammifères à des températures de -80 °C. Les années 1950 s'illustrent par l'utilisation de la cryoconservation à des fins

médicales. Bunge et Sherman démontrent en 1953 la fertilité recouvrée des spermatozoïdes humains après cryoconservation (Bunge et Sherman, 1953). La conservation des gamètes n'est plus le seul enjeu, désormais la transfusion et la transplantation à partir de matériel congelé (globules rouges, organes) deviennent une réalité (Sherman, 1980). Dix ans après la découverte de l'action cryoprotectrice du glycérol, Lovelock et Bishop découvrent en 1959 (Lovelock et Bishop, 1959) l'efficacité d'un nouveau cryoprotecteur, le diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les années 60 et 70 verront apparaître la création des premières banques de sperme aux USA et au Japon (1963) puis en France 10 ans plus tard. Whittingham se distinguera en 1972 par la cryoconservation des premiers embryons de souris (Whittingham, 1972). Il faudra attendre le 24 février 1982 pour apprendre la naissance en France d'Amandine, issue d'un embryon congelé.

Si la cryoconservation a été beaucoup focalisée sur l'homme, elle a été également testée très tôt sur des espèces d'intérêt économique, en particulier pour l'insémination artificielle (AI). Les enjeux financiers importants des courses hippiques poussent dès les années 1910 les gros propriétaires équestres à investir dans la recherche et la mise au point des techniques de cryoconservation. L'accessibilité du processus de congélation permet une conservation et une exportation rapide des semences dans le monde entier. C'est donc toutes les filières de productions animales (bovins, équins, porcins, ...) qui profitent de cette dynamique, en quête constante des performances d'élevage. La filière aquacole ne déroge pas à la règle et emploie la cryoconservation pour la sélection des espèces à forte valorisation (salmoniculture, conchyliculture). Le monde végétal ne fait pas non plus exception avec des programmes de conservation sur des espèces commercialement intéressantes (pomme de terre, igname, caféier). Le transfert d'échantillons congelés permet enfin de s'affranchir des risques de propagation des maladies (Engelmann et Dussert, 2000).

Aujourd'hui en plus de l'attrait commercial, la cryoconservation est utilisée pour des objectifs de conservation des espèces rares, des espèces anciennes issues du terroir régional et des espèces menacées de disparition.

II.2. - Compréhension des changements de phase liquide-solide

II.2.1. - De la surfusion à la solidification

Le ciel ne nous est toujours pas tombé sur la tête, et pourtant des km³ de nuage remplis d'air et d'eau le sillonnent au dessus de nos têtes. Les nuages sont la résultante d'un refroidissement produisant une augmentation du taux d'hygrométrie. En altitude et dans un air saturé en humidité, les molécules d'eau vont se condenser grâce à la diminution de la température et de la pression. A près de 6 000 m d'altitude, la température avoisine les -40 °C

et pourtant l'eau des nuages reste sous son état liquide avec des cristaux de glace en nombre minoritaire... Par Toutatis, ce phénomène est dû à la surfusion !

Malgré les basses températures, l'extrême pureté des microgouttelettes d'eau ne permet pas à la glace de se former autour d'amorces solides que forment les impuretés autrement dénommées noyaux de congélation ou noyaux glaçogènes. La surfusion caractérise donc un liquide ayant une température inférieure (jusqu'à -42 °C) à son point de fusion (Debenedetti, 2003). La molécule ou la matière se trouvent dans un état instable (équilibre métastable), entre l'état liquide et l'état solide. L'état métastable décrit une évolution du nombre des liaisons hydrogène influençant la densité des phases liquide, solide ou gazeuse. La glace intermédiaire représente l'ultime état liquide de la molécule d'eau avant l'état solide.

Mais le phénomène de surfusion a ses limites physiques. Cet état n'est pas stable dans le temps. Dans les couches supérieures de la stratosphère, la diminution de la température en dessous des -40 °C induit de fait la formation des cristaux de glace (Fig. 20). La nucléation définit la formation de ces premiers nuclei ou germes cristallins. Ces amorces solides vont induire une cristallisation très rapide du liquide avec une onde de cristallisation se propageant à une vitesse proche du cm/s. Dans des conditions normales, la nucléation se produit dès 0 °C (Fig. 20).

Ce processus constitue la première phase de formation des cristaux de glace. La température de nucléation est connue comme le point Schaefer. C'est une congélation spontanée qui, en l'absence de noyau de congélation est aussi qualifiée de nucléation homogène. La formation à -40 °C de zones de faibles densités proches de la glace intermédiaire suffirait à amorcer la nucléation. A l'inverse, la nucléation hétérogène identifie une cristallisation provoquée par des impuretés qui vont constituer des noyaux de congélation (Meryman, 2007 ; Rubinsky, 2003).

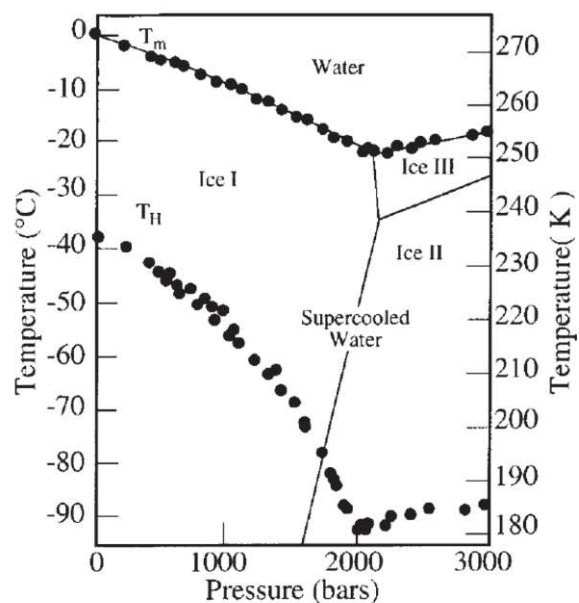


Figure 20 : Nucléation homogène de la molécule d'eau en fonction des conditions thermique et barométriques.
Source : Debenedetti, 2003.

II.2.2. - L'état de cristallisation

Les techniques de cryoconservation opposent le phénomène de la cristallisation à celui de l'amorphie. La cristallisation est l'agencement d'une structure solide et stable dans le

temps, constituée de molécules d'eau organisées de façon ordonnée (Fig. 21). L'organisation des cristaux va être fonction de la température, de la pression et de la sursaturation en eau.

La molécule d'eau est constituée d'un atome d'oxygène relié à deux atomes d'hydrogène et agencée selon un angle de 104.5° selon une organisation tétraédrique (Debenedetti, 2003). Les ponts hydrogène s'établissant entre les molécules d'eau se créent dans un espace à trois dimensions permettant un nombre important de configurations cristallines (Matsumoto *et al.*, 2002). L'eau sous des conditions normales (1 atm) cristallise selon une configuration hexagonale ou « ice hexagonal » (Ih) (Fig. 21). La forme cubique ou « ice cubic » (Ic) peut être aussi obtenue mais contrainte sous des conditions particulières (Svishchev et Kusalik, 1994 ; Debenedetti, 2003). Parmi les 13 polymorphes connues, neuf d'entre-elles sont stables pour une certaine gamme de températures et de pressions (formes II, III, V, VI, VII, VIII, X, XI et hexagonale) et quatre sont métastables (formes IV, IX, XII et cubique). Des anomalies de configuration apparaissent plus nombreuses lors de la nucléation d'une eau en surfusion (Debenedetti, 2003).

Le processus de nucléation sous configuration hexagonale entraîne une augmentation de 9 % la densité de la molécule d'eau et une réaction exothermique estimée à 6.01 kJ/mol sous atmosphère de 1 atm (Debenedetti, 2003).

II.2.3. - L'état amorphe

L'augmentation de la pression conjuguée à une diminution de la température induit une solidification des molécules d'eau en un état vitreux aussi qualifié d'amorphe. La vitesse de refroidissement joue aussi un rôle prépondérant. Egalement, à partir de la température de transition vitreuse, c'est-à-dire -135°C , l'eau évolue en une glace vitreuse. Dans le cadre spécifique de l'eau, la viscosité diverge dès le point Schaefer. La configuration hexagonale obtenue avec la cristallisation n'est pas observable pour un état amorphe. Les

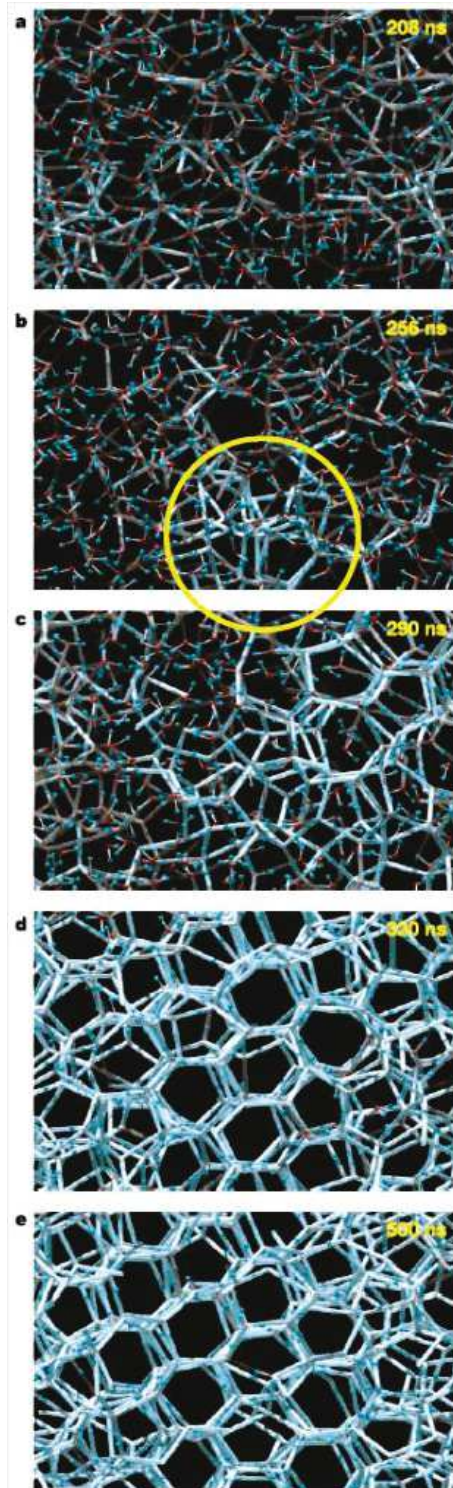


Figure 21 : Organisation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau de la phase liquide (a) à la phase cristalline (d) et (e). Le cercle jaune (b) indique une amorce nucléique. La configuration hexagonale est bien visible en (d) et (e).
Source : Matsumoto *et al.*, 2002.

molécules d'eau se répartissent de façon non périodique selon un agencement similaire à celui de l'état liquide.

Plusieurs types de glace sont identifiées selon leur densité : low-density amorphous ice (LDA), high-density amorphous ice (HDA) et very-high-density amorphous ice (VHDA). La distribution des liaisons hydrogène va être un facteur déterminant entre les types de glace (Fig. 21). La densité de l'eau va en effet décroître avec l'augmentation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau. Le rapprochement des molécules sera maximal pour une température de 4 °C, nécessitant un nombre minimal de liaisons hydrogène. L'eau à l'état liquide sera ainsi bien plus dense qu'à son état solide et en particulier concernant la glace cristalline dont le bon agencement des molécules permet un nombre maximal de liaisons hydrogène. La glace vitreuse se singularise par un nombre de liaisons hydrogène comparable à l'état liquide mais avec une densité bien supérieure. La déformation très importante des tétraèdres avec malgré tout la conservation des liaisons hydrogène permettrait d'expliquer une telle densité.

II.3. - Le principe de la cryoconservation

La cryobiologie est une science chronophage dont la maîtrise des techniques résulte de plusieurs années de recherche (Engelmann, 1992). La congélation réussie d'un échantillon biologique repose avant tout sur l'adaptation de la technique de cryoconservation au contenu cellulaire (Carpenter et Dawson, 1991). Chaque type cellulaire affiche une tolérance spécifique aux différents traitements. La difficulté de cryoconserver efficacement s'accroît d'autant plus que la structure de l'échantillon testé se complexifie et que sa diversité cellulaire augmente (Bakhach *et al.*, 2007).

II.3.1. - Contraintes physicochimiques sur les structures biologiques

La cryoconservation est un procédé de conservation longue durée des cellules, des tissus ou des organes à basses températures (de -80 °C à -196 °C) induisant un arrêt total des processus métaboliques et des divisions cellulaires et ayant pour objectif de conserver intact les structures fonctionnelles. Le recouvrement des conditions optimales de culture permet de récupérer vivante l'entité décongelée, dotée des mêmes performances physiologiques qu'avant congélation.

II.3.1.1. - Adaptations des organismes au froid

Les océans occupent 70 % de la surface de la Terre et arborent différents états (vapeur, glace, liquide,...) conditionnés par les conditions thermiques, bathymétriques, halines,

Les températures océaniques à l'échelle globale oscillent de -2 °C à plus de 30 °C selon les latitudes. L'adaptation des organismes à leurs conditions environnementales et leur capacité à répondre à des valeurs exceptionnelles (fortes ou basses températures, ...) est plus que jamais d'actualité dans un contexte de réchauffement global. Dès le début des années 1970, la corrélation entre un choc thermique et la synthèse de nouvelles protéines est établie. Les potentiels de résistance et de résilience d'un organisme sont donc dépendants de sa dotation génétique.

En 1979, les Heat Shock Proteins (HSP) permettent d'expliquer la tolérance des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), des bactéries et enfin des algues à des montées de température (McAlister *et al.*, 1979). Les HSP représentent différentes familles protéiques, réparties selon leur poids moléculaire : HSP10, 40, 70, 90 et 100. Le stress thermique n'est pas uniquement induit par la chaleur ; le froid constitue aussi un facteur de stress et entraîne une réponse biologique (Fink et Zeuthen, 1980). Le choc thermique va induire un dépliement des protéines, inactivant de ce fait leurs fonctions. Le repliement des protéines se fera sous la coordination des molécules chaperons (GroEL, GroES et les HSP), permettant de limiter les dommages moléculaires et favorisant le recouvrement. Les HSP70 et 40 sont directement impliquées au moment des chocs thermiques, la HSP90 est quant à elle naturellement présente dans l'espace intracellulaire et deviendra chaperon en situation de stress thermique.

L'intérêt pour les chocs froids s'est développé après les nombreuses investigations sur les HSP. Des protéines antigèle ont été isolées sur un certain nombre d'espèces de poissons, d'insectes, de bactéries, de microalgues, de plantes des régions polaires et nordiques. Ces nouvelles protéines ont pour rôle de lutter contre la cristallisation de l'eau intracellulaire à des concentrations souvent inférieures à 1 µg/ml (Carpenter et Hansen, 1992 ; Rubinsky *et al.*, 1992 ; Bang *et al.*, 2013). Parmi toutes celles impliquées dans la protection contre la cristallisation, sont ainsi représentées les CSP ou « Cold Shock Proteins », les IBP ou « Ice-binding Proteins », les AFP ou « Antifreeze Proteins » (7 types), les AFGP ou « Antifreeze Glycopeptides » (5 types d'AFGP : I à IV), les ISP ou « Ice Structuring Proteins », les THP ou « Thermal Hysteresis Protein » et enfin les IRIP ou « Ice Recrystallization Inhibition Proteins » (Fuller, 2004 ; Bang *et al.*, 2013 ; Braslavsky et Drori, 2013). Chez certains téléostéens tels que *Pleuronectes americanus*, des concentrations en AFP et AFGP ont été évaluées entre 10 et 25 mg/ml (Melamed *et al.*, 2002). Parmi les actions possibles, certaines protéines antigèle sont capables de diminuer la température de solidification de l'eau plasmique. La différence entre la température de solidification et la température de fusion est aussi décrite comme l'hystérèse thermique (Davies *et al.*, 2002). A l'inverse, d'autres protéines seront responsables de la nucléation de petits cristaux de glace, limitant ainsi la taille létale des cristaux et réduisant les quantités d'eau disponible à la cristallisation. D'autres encore ont la capacité de lier leur pôle hydrophobe avec les cristaux de glace nouvellement

formés. La matrice protéique va ainsi permettre de stopper la croissance de ces cristaux mais aussi de les isoler les uns des autres pour éviter qu'ils ne fusionnent entre eux.

Les CSP regroupent les enzymes et les protéines favorisant entre autre la fluidité membranaire, toutes ces molécules ayant des activités de protection et de restauration.

Les AFP et AFGP ont été découvertes en 1970 par DeVries *et al.* et sont aujourd'hui reconnues pour leur capacité à diminuer le point de congélation et limiter, voire retarder, la formation des cristaux de glace. Ces protéines, représentées dans de nombreux embranchements, limitent le phénomène de recristallisation au moment de la décongélation. Des petits cristaux seront formés, limitant des cristaux de plus grande taille, davantage dommageables pour la membrane cytoplasmique (Bang *et al.*, 2013). Les glycoprotéines et glycopeptides antigels sont aussi connus pour leur rôle important dans la différenciation immunitaire et cellulaire, l'adhésion cellulaire et la régulation de la croissance cellulaire (Bang *et al.*, 2013).

L'utilisation des AFP a été envisagée pour améliorer la capacité de résilience des cellules cryopreservées. Ainsi, Carpenter et Hansen (1992) montrent que de faibles concentrations en AFP, de l'ordre de 5 - 150 µg/ml sont suffisantes pour améliorer la survie des globules rouges cryopréservés. D'après leurs observations, l'inhibition de la croissance des cristaux de glace par les AFP serait d'autant plus visible au moment de la décongélation lors des derniers stades de réchauffement. Si l'utilisation de plus fortes concentrations en AFP (1.54 mg/ml) limite la recristallisation, en revanche, la croissance des cristaux de glace autour des cellules n'est pas inhibée et entraîne des dommages cellulaires plus importants (Carpenter et Hansen, 1992). L'addition d'AFGP à des concentrations de 20 à 40 mg/ml dans les solutions vitrifiantes a permis également d'améliorer la survie des oocytes et des embryons de souris et de porc après congélation (Rubinsky *et al.*, 1992). Dans cette étude, l'addition d'AFP n'a pas permis d'obtenir de survie post-congélation. Younis *et al.* (1998) améliorent la motilité des spermatozoïdes de chimpanzés grâce à l'addition d'AFP (type III à 100 µg/ml) à une solution de glycérol. Des essais ont également porté sur les embryons de *Scophthalmus maximus* (Robles *et al.*, 2006). La tolérance au froid des embryons et des spermatozoïdes de *Sparus aurata* a pu être améliorée grâce à des concentrations d'AFPIII de 1 µg/ml (Robles *et al.*, 2007 ; Beirão *et al.*, 2012) ainsi que les survies post-congélation des embryons de *Brachydanio rerio* (Martinez-Paramo *et al.*, 2008). Pour certaines espèces à haute valeur commerciale (saumon, tilapia, milkfish, ...), l'apport par injection d'AFP sur des stades embryonnaires ou par voie orale sur des juvéniles a été testée afin d'augmenter la tolérance au froid de ces espèces et de maximiser leurs performances de croissance. Le gène permettant la synthèse d'AFP a été introduit dans les embryons de saumon par micro-injection, permettant d'obtenir des organismes transgéniques aux taux de croissance multipliés jusqu'à 5 fois (Melamed *et al.*, 2002).

II.3.1.2. - La température

La maîtrise du paramètre température est essentielle pour la réussite de la cryoconservation. Avec les changements de température, c'est un ensemble de répercussions mécaniques, chimiques ou physiologiques qui doit être appréhendé pour préserver l'intégrité structurale et les fonctions cellulaires.

Quelle température pour quelle conservation ?

Il a été longtemps admis que des températures inférieures à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ suffisaient à conserver efficacement le matériel biologique. Dès $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'ultrastructure de la membrane plasmique et l'organisation des organites commencent à être perturbés (Renard, 1991). En l'absence de cryoprotecteurs, les premiers cristaux de glace commencent à se former à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 22) (Shaw et Jones, 2003 ; Guignot, 2005). La croissance des cristaux évoluera en fonction de la température et de la vitesse de refroidissement (Meryman, 2007). Pour des températures de 0 à $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'activité enzymatique et les fonctions cellulaires sont ralenties mais non figées. Des phénomènes de diffusion cellulaire sont encore effectifs et

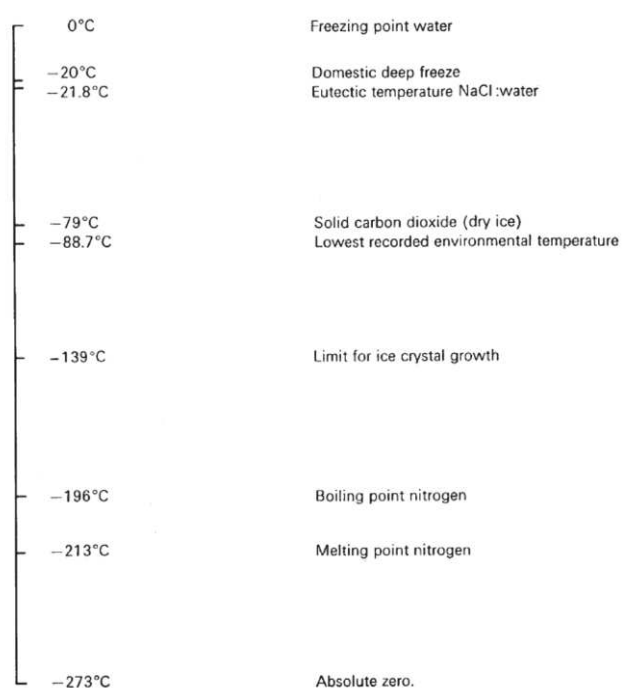


Figure 22 : Les températures rencontrées en cryoconservation.
Source : Morris, 1981.

responsables de déséquilibres ioniques. On considère que les échanges physicochimiques sont stoppés au niveau du compartiment cellulaire en présence de température inférieures à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un stockage à des températures comprises entre -40 et $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ est utilisable pour une conservation à court terme. A de telles températures, la structure cristalline de la glace est susceptible de se modifier, induisant des traumatismes mécaniques sur les structures biologiques. Pour des stockages de plus longues durées, des températures inférieures à $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ sont indispensables pour accentuer le phénomène de diapause cellulaire (Bakhach *et al.*, 2007). Si une température de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ réduit les échanges cellulaires et donc leur vieillissement, cependant certaines réactions sont encore possibles, telles que la formation de radicaux libres. Les radiations ionisantes doivent être également considérées, responsables d'atteintes macromoléculaires.

Le choc thermique

Ce phénomène est provoqué par un changement brutal de température. Il est souvent induit à des températures positives ($> 15\text{ °C}$) mais peut être également observé pour des températures inférieures à 0 et jusqu'à -80 °C . L'agression par le froid est un phénomène naturel, intégré par les organismes vivants. Des évolutions génétiques trouvent d'ailleurs leurs origines dans de tels phénomènes. Les cellules ont su développer une thermo-tolérance grâce à la production et à l'action des HSP et des AFP. Des variations thermiques trop importantes peuvent être fatales, dues à une contraction non uniforme des constituants membranaires (Bakhach *et al.*, 2007). Cette différence de réponse entraîne une lyse des membranes cellulaires. Le choc thermique est également responsable de la dénaturation de protéines.

L'utilisation de certains phospholipides (phosphatidyl sérine) et de refroidissements lents permet de limiter un tel choc (Bakhach *et al.*, 2007 ; Barlovatz-Meimon et Ronot, 2014). Également, la sélection physiologique du matériel biologique, sous la dépendance de ses caractéristiques génétiques, peut être une solution pour limiter le stress thermique. Des cellules pourvues de larges vacuoles seront moins résistantes à la cryoconservation que des cellules de petite taille et pourvues de petites vacuoles. Enfin, les conditions de culture avant traitement du matériel biologique doivent être aussi optimisées. Une diminution thermique progressive en préculture avant l'exposition des échantillons biologiques aux températures de congélation peut ainsi limiter les chocs thermiques.

II.3.1.3. - La cristallisation extra- et intracellulaire

La cristallisation, directement dépendante de la vitesse de refroidissement, apparaît traumatisante pour le matériel cellulaire. L'eau cellulaire devenue thermodynamiquement instable va permettre la formation des cristaux de glace. Le compartiment intracellulaire et le milieu externe sont alors en surfusion. La cristallisation entre les deux compartiments extracellulaire et intracellulaire n'intervient pas dans le même temps. La formation de glace est dépendante du volume. Le milieu extracellulaire est le premier soumis à ce processus car de volume beaucoup plus important que le compartiment intracellulaire (Mazur, 1989 ; Englemann et Dussert, 2000 ; Rubinsky *et al.*, 2003, Bakhach *et al.*, 2007). Cette observation est d'avantage accentuée dans le cadre de la cryoconservation lente.

La croissance des cristaux de glace est corrélée avec la vitesse de congélation. Dans le cadre de la congélation rapide, Meryman (2007) mentionnent la formation de nombreux cristaux de glace de petite taille distribués de façon homogène dans les cellules et le milieu extracellulaire. En effet, ces techniques de refroidissement rapide limitent par manque de temps la croissance des cristaux de glace déjà formés et évitent la cristallisation intracellulaire (Engelmann et Dussert, 2000). Les cristaux de glace vont exercer une pression mécanique sur

les membranes cellulaires pouvant conduire à leur déformation, voire à l'apoptose cellulaire (Bakhach *et al.*, 2007). De telles déformations peuvent être réversibles au moment de la décongélation. Le contact des cristaux de glace avec la bicouche lipidique peut enfin entraîner des dommages membranaires.

La cristallisation extracellulaire va provoquer la formation des cristaux au niveau intracellulaire. Les cristaux de glace présents dans le compartiment cellulaire peuvent être à l'origine des lésions des organites cellulaires. La viscosité plus importante des solutions cryoprotectrices par rapport à l'eau va permettre de diminuer le point de congélation dans l'espace intracellulaire et ainsi limiter le processus de cristallisation.

II.3.1.4. - La déshydratation intracellulaire et l'effet de solution

La cristallisation de l'eau intracellulaire doit être limitée pour réduire les risques de lésions mécaniques. La déshydratation du compartiment cellulaire peut s'opérer selon deux approches.

La première technique repose sur une déshydratation provoquée par le processus de congélation. La cristallisation préalable du milieu extracellulaire entraîne un différentiel de pression occasionnant la sortie de l'eau intracellulaire encore en surfusion vers le milieu externe (Engelmann et Dussert, 2000). Cette eau cellulaire est instantanément figée dans le compartiment extracellulaire. Ce processus de nucléation conduit à une augmentation de la concentration en électrolytes de l'eau restante. Cette plus forte concentration entraîne la sortie d'eau cellulaire et une diminution du point de fusion (Bakhach *et al.*, 2007 ; Shaw et Jones, 2003 ; Guignot, 2005). La nucléation se stabilise quand l'équilibre thermodynamique est atteint.

La limite de tolérance des cellules à la déshydratation est fonction du type cellulaire. La perte d'eau intracellulaire peut être comprise entre 80 et 95 % du volume d'eau (Bakhach *et al.*, 2007). En plus de cette déshydratation pouvant être mal supportée par les cellules, d'autres effets associés à ce processus apparaissent préjudiciables à l'intégrité cellulaire. L'augmentation de la concentration ionique de l'eau restante peut induire un effet de solution et s'avérer toxique pour les cellules. Les variations du volume cellulaire, les fluctuations nuisibles du pH, la dénaturation irréversible de certaines protéines, l'atteinte membranaire ou encore les perturbations occasionnées sur les jonctions cellulaires sont également à ne pas sous-estimer au cours du processus de congélation et de décongélation.

II.3.2. - Les solutions cryoprotectrices

Les cryoprotecteurs ont d'abord été mentionnés comme des « agents cryophylactiques » ou des « solutés modérateurs » (Fuller, 2004). Les cryoprotecteurs (ou CPA : CryoProtective Agents) ont un rôle essentiel bien qu'ils puissent s'avérer toxiques pour la cellule. Au-delà de -20 °C, les embryons ne pourraient survivre sans la protection de ces solutés. L'utilisation de cryoprotecteurs permet de limiter la formation de glace pendant le refroidissement et le réchauffement de l'échantillon biologique.

Ils ont aussi pour but de réduire les effets de l'hypertonie du milieu extracellulaire au moment du refroidissement.

Les cryoprotecteurs sont souvent des composés organiques, tels que des alcools de faible poids moléculaire (inférieur à 400 g/mol), ayant la capacité de pénétrer dans les cellules, on parle alors de cryoprotecteurs « perméants » (Maise *et al.*, 1998) ou « pénétrants ». En général, les méthodes de congélation lente utilisent un milieu protecteur avec un taux de cryoprotecteurs pénétrants proche de 10 %, contre un taux supérieur à 30 % pour les techniques rapides (Shaw et Jones, 2003). Au choix du cryoprotecteur sont souvent associés la concentration du soluté et le temps d'exposition. La tolérance du contenu cellulaire au cryoprotecteur doit être évaluée. Carpenter et Dawson (1991) utilisent la chromatographie liquide à haute performance afin d'évaluer la perméabilité de leurs échantillons aux solutions cryoprotectrices.

II.3.2.1. - Les solutés pénétrants

Présent naturellement dans l'organisme, le glycérol contribue à l'élaboration des lipides et peut servir de source d'énergie. Constitué de trois atomes de carbone (Fig. 23), ce trialcool a la capacité de se lier avec un acide gras pour former un mono-, di- ou triglycéride. Il est incolore, inodore, translucide et visqueux. Il est entièrement soluble dans l'eau et les alcools et faiblement soluble dans les solvants organiques (éther, ...). La viscosité du glycérol est croissante avec la baisse de la température, propriété utilisée pour retarder la formation des cristaux de glace. Les propriétés cryoprotectrices du glycérol sont connues depuis 60 ans grâce aux travaux de Polge *et al.* (1949). Cet agent permet de conserver l'intégrité des protéines et empêche leur dénaturation pendant le processus de congélation (Renard, 1989). La toxicité du glycérol est variable selon le type cellulaire. Son poids moléculaire élevé requiert des temps d'équilibration et de dilution plus importants.

Comme le glycérol, le diméthyl sulfoxyde (DMSO) est un liquide inodore et soluble dans l'eau (solvant polaire). Son poids moléculaire est inférieur à celui du glycérol (Fig. 23). Le DMSO peut être dégradé par la lumière (photo oxydation) pour former du diméthyl sulfure

(DMSO). Il s'avère toxique pour les cellules à des températures ambiantes et lors d'expositions prolongées. Certains auteurs exposent donc le matériel cellulaire à des solutions de DMSO à des températures proches de 0 °C. La fluidité des membranes est favorisée par l'emploi de DMSO, en particulier lors de la décongélation.

L'éthylène glycol a été utilisé pour la première fois pour la cryoconservation des embryons de souris par Miyamoto et Ishibashi en 1977. Ces auteurs rapportent les meilleurs taux de survie en utilisant des concentrations en EG de 0.9 à 1.5 M. L'éthylène glycol ainsi que le propylène glycol figurent parmi les composés présentant une efficacité cryoprotectrice comparable à celles du DMSO et du glycérol tout en étant moins toxiques pour le contenu cellulaire (Bautista et Kanagawa, 1998). L'éthylène glycol entre parmi les solutés les plus utilisés dans les combinaisons cryoprotectrices, Il est efficace seul ou en combinaison avec d'autres cryoprotecteurs. Bautista et Kanagawa (1998) quantifient jusqu'à 6 000 compositions différentes de cryoprotecteurs contenant de l'éthylène glycol. Cet agent cryoprotecteur est de faible poids moléculaire (Fig. 23) et caractérisé par un rapide taux de diffusion membranaire (Bautista et Kanagawa, 1998). Parmi les composés glycolés, l'éthylène glycol reste comme l'agent le plus protecteur et le moins toxique pour la vitrification des embryons de souris (Kasai *et al.*, 1990). Bautista et Kanagawa (1998) s'attachent à démontrer l'intérêt d'utiliser l'éthylène glycol dans les solutions de vitrification.

Le propylène glycol est utilisé dans la composition de solutions vitrifiantes, seul (Rall, 1987 ; Fahy et Rall, 2007) ou en combinaison. Le butylène glycol possède de fortes capacités vitrifiantes. Son poids moléculaire plus élevé (Fig. 23) permet de réduire la concentration des solutions.

Le méthanol est la molécule la plus simple parmi les agents cryoprotecteurs utilisés. Il possède le plus faible poids moléculaire et densité (Fig. 23). La vitesse de pénétration du méthanol à travers les membranes cellulaires est comparable à celle de l'eau. Ce composé apparaît efficace (Rall, 1984) et non toxique pour les embryons (Ali et Shelton, 1993).

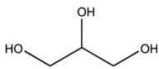
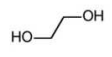
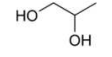
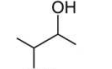

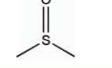
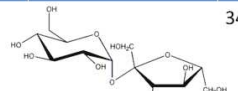
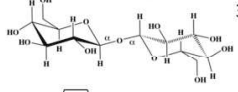


CPAs pénétrants	Synonymes	Formule brute	Formule développée	Masse molaire (g/mol)	Densité (g/cm ³) à 20-24°C	Point de fusion (°C)
Glycérol (Gly)	Glycérine Propane-1,2,3-triol GlyOH	C ₃ H ₈ O ₃		92.1	1.26	17.8
Ethylène glycol (EG)	Éthane-1,2-diol Glycol	C ₂ H ₆ O ₂		62.07	1.11	-12.9
Propylène glycol (PG)	Propane-1,2-diol	C ₃ H ₈ O ₂		76.09	1.04	-59
Butylène glycol (BG)	Butane-2,3-diol	C ₄ H ₁₀ O ₂		90.12	1.01	23
Méthanol (Met)	alcool méthylique MetOH Meth	CH ₄ O		32.04	0.79	-97.6
Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	Diméthylsulfoxyde Me ₂ SO	C ₂ H ₆ O _S		78.13	1.10	19
CPAs non pénétrants						
Saccharose	Sucrose Suc	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		342.30	1.59	186
Tréhalose	Tre	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		342.30	1.76	203
Polyvinylpyrrolidone	Polyvidone PVP	(C ₆ H ₉ NO) _n		2500 à 2500.103	1.2	150
Acétamide		C ₂ H ₅ NO		59.07	1.16	80.16

Figure 23 : Détails des cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants les plus couramment utilisés.

II.3.2.2. - Les solutés non pénétrants

D'autres composés organiques qualifiés de « co-cryoprotecteurs » peuvent avoir un rôle important dans la conservation des cellules (Muchlisin, 2005). On retrouve notamment les monosaccharides (glucose, lactose, ribose) et les diholosides tels que le saccharose (ou sucrose de composition glucose-fructose) et le tréhalose (glucose-glucose) (Fig. 23).

Ces disaccharides ne peuvent pas pénétrer dans la cellule (Renard, 1991). Leur action se fera donc dans le milieu extracellulaire. Ils ont un rôle osmotique lors du réchauffement en permettant au cryoprotecteur de sortir de la cellule. Ils maintiennent une pression osmotique supérieure dans le milieu extracellulaire, évitant une entrée d'eau trop importante dans le milieu intracellulaire qui pourrait endommager la structure cytoplasmique des cellules (Guignot, 2005). Dans le milieu protecteur, la concentration en diholosides varie entre 0.1 et 1.0 M (Shaw et Jones, 2003). L'utilisation des disaccharides et des acides aminés est privilégiée dans les protocoles de congélation rapide où ils assurent une meilleure protection de la membrane plasmique (Preston et Coman, 1998).

II.3.2.3. - Autres cryoprotecteurs

Si l'efficacité des solutions cryoprotectrices n'est plus à démontrer, en revanche leur toxicité peut constituer un réel frein au succès de la cryoconservation pour les espèces plus sensibles. Parmi les molécules de faible poids moléculaire, l'ajout d'acides aminés (alanine, glycine, proline) ou de peptones, de polyols (mannitol, sorbitol) ou de sels (acétate de sodium, phosphates, ...) est connu pour stabiliser les protéines (Arakawa *et al.*, 1990 ; Fuller, 2004). L'utilisation des amides peut être également une alternative (acétamides et formamides tels que le N-méthylformamide, N,N-diméthylformamide = DMF et N-diméthylacétamide = DMA) (Arakawa *et al.*, 1990 ; Fuller, 2004 ; Fahy, 2010) ou enfin l'emploi de molécules de masse moléculaire élevée telles que le polyvinylpyrrolidone (Fig. 23) et le dextrane. Le Ficoll 70 (polyfluorocarbone = polymère de saccharose) figure dès les années 1970 dans les compositions cryoprotectrices pour sa forte solubilité et sa faible viscosité. Kasai *et al.* (1990) indiquent que le Ficoll facilite l'absence de cristallisation en évitant la dévitrification lors du réchauffement.

Le sérum fœtal de veau est également indiqué pour compléter, voire remplacer, certains solutés constituant les solutions cryoprotectrices. Certaines lignées cellulaires supporteraient mieux la congélation en présence de sérum de veau fœtal (FCS ou FBS), d'albumine sérique fœtale (BSA).

II.3.2.4. - Quelles perturbations sur la biologie ?

Si le choc osmotique est très souvent considéré comme responsable des dommages cellulaires, les perturbations biochimiques ne doivent pas être négligées. L'activité enzymatique peut être modifiée, voire interrompue, suite à une dénaturation des sites actifs. Les pompes ioniques transmembranaires peuvent également voir leur activité perturbée (Arakawa *et al.*, 1990). Les dérivés réactifs de l'oxygène sont aussi identifiés comme ayant un impact négatif sur la motilité des spermatozoïdes ainsi que sur les dommages membranaires et sur l'ADN (He et Woods, 2004 ; Ponthier *et al.*, 2014). Les atteintes à l'activité mitochondriale des mammifères comme des téléostéens peuvent être à l'origine de la diminution de la motilité des spermatozoïdes (He et Woods, 2004).

Les investissements importants du milieu équestre dans le développement des techniques de cryoconservation du sperme ont aussi permis d'appréhender rapidement les dommages occasionnés par le glycérol sur le compartiment cellulaire. Les effets dommageables du glycérol sur les spermatozoïdes sont observés durant le processus de congélation. Le glycérol apparaît aussi contraignant pour les chocs osmotiques qu'il occasionne après décongélation. La dénaturation des protéines est identifiée parmi les actions néfastes du glycérol. Le glycérol induit un changement dans la viscosité cytoplasmique

impactant les organites. Ce CPA altère à différents degrés la polymérisation de la tubuline ainsi que la dépolymérisation (Dobrinsky, 1996). Il est responsable également d'altérations membranaires de la bicouche lipidique. Si He et Woods (2004) n'observent pas d'effet protecteur du glycérol sur la membrane plasmique des spermatozoïdes du bar rayé, en revanche ce cryoprotecteur s'est montré efficace pour protéger les fonctions mitochondriales.

Si le DMSO doit être manipulé à des températures basses pour limiter son effet néfaste, le glycérol doit être utilisé à température ambiante.

Il a été démontré que le DMSO préserve durant la congélation/décongélation, l'intégrité structurale des protéines isolées (Arakawa *et al.*, 1990, Ashwood-Smith *et al.*, 1970) et des membranes de phospholipides (Anchordoguy *et al.*, 1987). En revanche, la toxicité du DMSO a été identifiée très tôt par Meryman en 1966. De fortes concentrations en DMSO sont connues pour être toxiques. Ce composé est aussi responsable de la dénaturation des protéines à température ambiante (He et Woods, 2004). Il est susceptible d'interagir avec les bicouches lipidiques par des phénomènes électrostatiques (Fuller, 2004) ; il perturberait également les transporteurs et les pompes ioniques et enfin inhiberait l'action de la catalase et de la peroxydase. Le niveau de dommages engendré par le DMSO serait propre à l'espèce (He et Woods, 2004).

L'éthylène glycol et le propylène glycol provoquent des dommages membranaires par la diminution de la polarité de la phase aqueuse et en changeant l'agencement des molécules hydrophobes entre la membrane cellulaire et la phase externe.

II.3.3. - Les techniques de cryoconservation

Il existe actuellement plusieurs techniques de cryoconservation dont la congélation lente ou congélation dite à l'équilibre (Shaw et Jones, 2003 ; Guignot, 2005). Il s'agit d'établir une équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de la cellule.

Apparue dans les années 1980, la seconde technique dite de vitrification est basée sur la transformation du liquide cytoplasmique de la cellule en un état solide amorphe qualifié de vitreux (Guignot, 2005). A l'inverse de la congélation lente, elle n'est pas équilibrée (Shaw et Jones, 2003). Elle est basée sur des vitesses de refroidissement et de réchauffement très élevées ayant pour but de limiter la formation de glace intracellulaire.

II.3.3.1. - La congélation lente

La méthode de la cryoconservation lente est de loin celle la plus connue et utilisée en cryobiologie. Cette méthode est basée sur l'élimination d'une partie de l'eau cellulaire par

refroidissement progressif. La taille et la perméabilité de la cellule vont dicter le choix et la concentration du cryoprotecteur ainsi que les vitesses de congélation et décongélation (Shaw et Jones, 2003).

Les cryoprotecteurs

Durant l'abaissement de la température de +10 °C à -16 °C les dommages liés au refroidissement sont induits par une augmentation des tensions des membranes lipidiques avec le passage de la phase liquide à l'état solide (Hassan *et al.*, 2015). Ils se manifestent également par la cristallisation de l'eau intracellulaire risquant d'endommager les bicouches lipidiques à laquelle s'ajoute l'effet de solution risquant de dénaturer les fonctions cellulaires. Les cristaux de glace se composent en effet exclusivement d'eau exempte d'éléments minéraux, rendant le milieu hypertonique. La technique de congélation lente est aussi qualifiée de « congélation à l'équilibre » (Guignot, 2005). Le temps d'exposition important du matériel biologique aux solutions cryoprotectrices permet en effet de parvenir à une équilibration progressive des solutés entre le compartiment intra- et extracellulaire. L'objectif est d'éviter ou de limiter la formation de glace intra- et extracellulaire en utilisant sur de longues périodes, des concentrations en cryoprotecteurs faiblement concentrées et donc tolérées par le matériel biologique. Ces cryoprotecteurs tels que le glycérol vont réduire la formation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau, pour éviter la formation des cristaux de glace (Gosden, 2011). Les concentrations en cryoprotecteurs sont de l'ordre de 5, 10 et 15 % (soit de 1.0, 1.5 à 2.0 M). Les cryoprotecteurs peuvent être utilisés soit en une seule fois soit en plusieurs étapes successives en suivant en gradient de concentration dans le but de réduire les chocs osmotiques (ex : de 1.0 à 1.5 à 2.0 M avec des bains de 5 min par solution). Des pré-traitements peuvent être initiés avant l'exposition de l'échantillon aux cryoprotecteurs. Cette précaution permet d'amorcer une déshydratation (Engelmann et Dussert, 2000). La cryoconservation lente utilise une variété de contenants dont les paillettes de 0.25 ml, 0.50 ml, ou les cryotubes, ...En fonction du matériel biologique utilisé, il existe une diversité importante de protocoles de congélation.

Les vitesses de refroidissement et de réchauffement

De façon générale, la vitesse de congélation utilisée est comprise entre 0.5 et 3.0 °C/min. Des congélateurs programmables permettent une diminution constante et sécurisée de la température. Le choix de la vitesse de congélation sera influencé par la quantité de cristaux de glace formés et avec l'objectif de minimiser le temps d'exposition du matériel biologique aux solutions cryoprotectrices (Hassan *et al.*, 2015). L'étape du seeding est caractéristique de la cryoconservation lente. Elle permet l'induction de la cristallisation souvent sur des temps très courts ne dépassant pas 5 min. Les températures du seeding sont souvent comprises entre

-7 et -10 °C, bien que d'autres variables puissent être utilisées en fonction des protocoles de congélation. L'étape précédant le seeding soumet les échantillons à une congélation allant de -7 à -30 °C voire -80 °C selon une vitesse définie (de 0.1 à 3.0 °C/min) (Shaw et Jones, 2003). Cette phase lente permet la déshydratation progressive des cellules. Les échantillons sont ensuite directement transférés dans l'azote liquide à -196 °C. La déshydratation est alors stoppée, elle n'est donc pas totale et l'eau résiduelle va se transformer en glace.

L'étape de décongélation doit être rapide pour éviter la formation de cristaux lors du réchauffement. Les températures généralement utilisées varient entre 22 et 37 °C selon les protocoles (vitesse de réchauffement jusqu'à 2 500 °C/min). A ce stade, le matériel biologique doit être soustrait du ou des cryoprotecteurs, qui seront soit éliminés en une seule fois, soit en passant par des paliers successifs en suivant un gradient de concentration décroissant.

II.3.3.2. - La vitrification

En 1984, Fahy *et al.* définissent le processus de vitrification comme la solidification d'un liquide sans cristallisation due à une très forte élévation de la viscosité durant le refroidissement. La vitrification est une technique basée sur l'utilisation de cryoprotecteurs à de fortes concentrations et de vitesses de refroidissement et de réchauffement très élevées. Le processus de vitrification de l'eau est identifié dès 1860 (Fahy et Wowk, 2015). Si Stiles en 1930 puis Luyet en 1937 mentionnent très tôt le concept de vitrification, les premiers succès seront obtenus à partir de 1968 avec la vitrification réussie des érythrocytes humains (Fahy et Wowk, 2015). En 1985, Rall et Fahy réussissent à vitrifier des embryons de souris (Kasai *et al.*, 1990 ; Bautista et Kanagawa, 1998). D'autres réussites seront par la suite publiées sur des embryons de bovidés et d'équidés, ouvrant les possibilités de congélation rapide à de nombreuses espèces de mammifères (Bautista et Kanagawa, 1998). Aujourd'hui, la majorité des protocoles de cryoconservation développés pour les tissus et organes de végétaux utilisent des techniques basées sur la vitrification (Sakai et Engelmann, 2007). La vitrification est davantage adaptée aux espèces délicates à cryoconserver et aux structures biologiques complexes (Engelmann et Dussert, 2000 ; Engelmann, 2004). La vitrification peut permettre la congélation de certaines espèces sensibles au stress osmotique.

Les vitrificateurs

Les concentrations d'agents cryoprotecteurs utilisées, de l'ordre de 5.0 à 9.0 M, induisent une forte sortie d'eau intracellulaire et une viscosité la plus importante possible du milieu vitrifiant (Vajta et Kuwayama, 2006). Fahy (1984) décrit les concentrations nécessaires à la vitrification (pour 1 atm) de certains cryoprotecteurs pénétrants. Ainsi, le DMSO vitrifie à

6.3 M, l'éthylène glycol à 8.9 M, le propylène glycol à 5.7 M et le glycérol à 7.1 M (Fahy, 1984). A de telles concentrations, les solutés communément mentionnés comme des « cryoprotecteurs » peuvent être désignés comme des « vitrificateurs », c'est-à-dire des agents facilitant la vitrification (Fahy et Wowk, 2015). L'utilisation du terme « cryoprotecteur » restant toutefois adaptée pour le processus de vitrification puisque ce qualificatif identifie les agents prévenant ou limitant les dommages liés au froid (Fahy et Wowk, 2015). Autres que les cryoprotecteurs pénétrants, les « ice blockers » deviennent de plus en plus utilisés pour la vitrification. Ces agents tels que les AFP, permettent de maîtriser et de ralentir la nucléation mais aussi de limiter l'usage des fortes concentrations de cryoprotecteurs (Fahy et Wowk, 2015).

La technique de vitrification peut se réaliser en une étape (Shaw et Jones, 2003), cependant l'augmentation et la diminution de la concentration des cryoprotecteurs par étapes successives apparaît dans certains cas nécessaire pour limiter les chocs osmotiques. Egalement, l'exposition du matériel biologique à une succession de solutions de CPA a pour objectif d'accéder à des étapes très précises telles que la déshydratation du compartiment cellulaire par la solution de loading (LS), l'obtention de l'état d'amorphie avec une solution dite de vitrification (VS). Cette méthode de vitrification n'utilise pas de paliers de refroidissement, les échantillons seront directement plongés dans l'azote liquide à -196 °C. Enfin, la réalisation de la décongélation et de la réhydratation s'effectue en utilisant une solution d'unloading (ULS). Une dernière étape de rinçage permet d'achever le protocole de vitrification. Outre la tolérance du biomatériau aux concentrations élevées de cryoprotecteurs, le succès d'un protocole de vitrification repose également sur l'optimisation de la déshydratation avant l'exposition à la solution de vitrification. Les solutions de loading et d'unloading ont souvent une molarité intermédiaire par rapport à la solution de vitrification plus fortement concentrée (Sakai et Engelmann, 2007). L'objectif est de produire une augmentation graduelle de concentration (Kuleshova et Lopata, 2002). Généralement les cryoprotecteurs sont utilisés sous forme de mélanges en suivant un protocole très strict, que ce soit pour les concentrations, les temps d'immersion ou les températures d'exposition. Les protocoles de vitrification (nombre de solutions utilisées, composition des mélanges de CPA, temps d'exposition, températures, ...) sont très variables selon les auteurs et les espèces étudiées.

Les vitesses de refroidissement et de réchauffement

L'immersion directe de l'échantillon biologique dans l'azote liquide a pour objectif de maximiser la vitesse de congélation en supprimant les barrières dues au contenant tels que les tubes, les paillettes, ... susceptibles de réduire les vitesses de congélation et de décongélation. Cette technique permet d'obtenir des vitesses de congélation et de décongélation de l'ordre de 200 °C/min et 250 °C/min respectivement (Sakai et Engelmann, 2007). Les volumes de

cryoprotecteurs sont également réduits au minimum dans l'objectif d'augmenter les taux de congélation/décongélation (MVC : méthode du Minimum Volume Cooling) (Vajta et Kuwayama, 2006). D'autres méthodes permettent de renforcer le processus de vitrification telles que le dépôt des échantillons sur des plaques métalliques préalablement refroidies à l'azote liquide (SSV : méthode Solid Surface Vitrification), la congélation ultra-rapide (OPS : Open Pulled Straws) et la congélation sous pression proche de 200 - 210 MPa (HPF : méthode High Pressure Freezing ou CHP : Congélation sous Haute Pression). Ces méthodes ont pour intérêt d'augmenter les vitesses de congélation à des taux supérieurs à 2 500 °C/min grâce à l'utilisation de microcapillaires (Kuleshova et Lopata, 2002 ; Vajta et Kuwayama, 2006), 20 000 °C/min pour l'OPS (Shaw et Jones, 2003 ; Guignot, 2005) et 60 000 °C/min et l'HPF. Ces méthodes permettent d'accélérer la vitrification en limitant l'utilisation des concentrations élevées en cryoprotecteur (Renard, 1991). Cependant, les fortes pressions seront d'autant plus dommageables pour le matériel cellulaire que le temps d'exposition est augmenté. A titre d'exemple, la viscosité d'une eau congelée à 120 MPa et à -12 °C est proche de 2.5 mPa comparés aux 1.7 mPa obtenus pour la même eau soumise à une pression ambiante et à 0 °C (Greer, 2015).

Chapitre 3

La cryoconservation chez les organismes aquatiques

III.1. - Les avancées de la cryoconservation en aquaculture

III.1.1. - Quels intérêts ?

L'aquaculture est amenée à des fins de productivité à sélectionner les géniteurs aux potentiels d'élevage élevés. La sélection génétique a un rôle de plus en plus important, avec un souci de conservation des souches les plus performantes. La conservation *in situ* laisse progressivement place à la conservation *ex situ* grâce à la congélation des gamètes et des embryons (Maisse *et al.*, 1998). Les cryobanques renferment un véritable cheptel maintenu sur le long terme, en sécurité et à des coûts de maintenance réduits. Parmi les avantages qu'offre la cryoconservation pour l'aquaculture :

- **L'efficacité de reproduction** : La cryoconservation permet de constituer un potentiel de reproduction. Elle offre une facilité de réserve et d'approvisionnement et une augmentation de la disponibilité en semence (Dong *et al.*, 2007). La fourniture sur demande des gamètes permet de limiter, voire d'éviter, des temps d'induction des pontes (Tiersch *et al.*, 2007). Outre la maîtrise des pontes, la fécondité et la fertilité d'un individu ou d'une espèce s'en trouvent également renforcées. Chaque produit de la reproduction (spermatozoïdes ou oocytes) est utilisé sans perte. On augmente ainsi le potentiel reproducteur d'un individu ou d'une espèce.

- **La conservation et la sélection génétique** : La congélation est un moyen de conserver sur le long terme les lignées les plus rares et/ou aux performances d'élevage optimales (Tiersch *et al.*, 2007 ; Adams *et al.*, 2013b). Elle permet d'élaborer très rapidement des programmes de sélection des espèces, révélant tout le potentiel économique que représente la congélation du germoplasme (Tiersch *et al.*, 2007 ; Vitiello *et al.*, 2011). La cryoconservation offre aux producteurs la possibilité de sélectionner et de croiser les gamètes de géniteurs choisis pour obtenir des critères spécifiques (Dong *et al.*, 2007).

- **La réduction des coûts** : La conservation des stocks de géniteurs devient inutile et réduit de fait les coûts de maintenance, de transport et les risques sanitaires (Tiersch *et al.*, 2007). La facilité de transport des gamètes et des embryons est un avantage considérable pour l'aquaculture, autorisant une circulation rapide entre les fermes d'élevage. La réduction des

coûts de transport et de maintenance est synonyme de bénéfices économiques pour les producteurs (Dong *et al.*, 2007). Enfin, la cryoconservation d'embryons de Mollusques peut aussi être utilisée comme une alternative à l'alimentation des larves de Téléostéens en aquaculture (Vitiello *et al.*, 2011).

- **Le soutien économique** : Les maladies induites par les agents pathogènes, les polluants, ... représentent un problème majeur pour l'élevage des invertébrés (Le Marrec-Croq, 1998). La constitution de stocks permet de contrer les pertes potentielles dues à une épidémie ou aux désastres naturels (Hassan *et al.*, 2015). En limitant les variations de production, la cryoconservation maintient, voire améliore, l'activité économique (Anil *et al.*, 1997). Egalement, le soutien à la production passe par la sélection de gamètes de qualité standard dans le but d'obtenir une faible hétérogénéité dans les lots d'élevage.

- **Un support à d'autres disciplines** : Les avancées de la cryobiologie autour de la conservation des modèles biologiques peuvent présenter des intérêts pour les biotechnologies, l'écotoxicologie, ... La cryoconservation occupe une place de plus en plus importante dans les programmes de préservation des espèces pour la conservation du patrimoine génétique. Cette technique permet aussi d'inventorier les espèces.

Outre ces nombreux avantages, la cryoconservation présente des contraintes économiques telles que les coûts engendrés par l'approvisionnement en gamètes et embryons ainsi que les techniques réclamant la compétence spécifique de certains laboratoires. La cryoconservation est une technique qui n'est pas banalisée dans l'industrie aquacole. Beaucoup de doutes subsistent autour des bénéfices que peut apporter la cryoconservation. Les coûts encore élevés de la cryoconservation représentent un frein important face aux procédures classiques et maîtrisées des reproductions artificielles (Dong *et al.*, 2007).

La standardisation et l'amélioration de l'efficacité des pratiques de cryoconservation apparaissent comme une étape essentielle à la vulgarisation de cette technique auprès des professionnels (Fabbrocini *et al.*, 2014). Cependant, la cryoconservation reste spécifique, il n'existe pas de protocoles communs de cryoconservation qui pourraient s'avérer efficaces pour toutes les espèces (Hamaratoğlu *et al.*, 2005).

Des programmes de recherche piscicole sont actuellement en cours, tels que la coopération INRA-SYSAF autour de la formation d'une cryobanque aquacole, une des branches du GIS Cryobanque Nationale. Une méthode standard de congélation de la semence a pu être ainsi établie.

III.1.2. - Les piscicultures marines et continentales

La cryoconservation s'est intéressée à une large diversité d'espèces du monde aquatique. La première étude a été conduite par Baxter en 1953 sur les spermatozoïdes et oocytes de *Clupea harengus*. Si les oocytes n'ont pas supporté le protocole de congélation, en

revanche des taux de fertilité post-congélation de 80 à 85 % ont été obtenus pour les spermatozoïdes (Baxter, 1953). Depuis, des efforts importants ont été portés pour la constitution de banques de germoplasme de poisson destinées à conserver sur le long terme les gamètes (spermatozoïdes et oocytes) et les embryons (Tiersch *et al.*, 2007). A ce jour, la congélation des spermatozoïdes s'applique à plus de 200 espèces des téléostéens (Tiersch *et al.*, 2007 ; Tsai et Lin, 2012). La sensibilité au refroidissement et la faible perméabilité des membranes rendent difficiles la congélation des oocytes et des embryons de poissons (Tsai et Lin, 2012). Parmi les espèces d'intérêt aquacole les plus couramment conservées, on peut citer *Dicentrarchus labrax*, *Psetta maxima*, *Sparus aurata* ou encore la famille des Salmonidés (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*), celle des Cyprinidés (*Cyprinus carpio*), des Siluridés (*Silurus glanis*), des Acipenseridés (*Acipenser sturio*), des Cichlidés (*Oreochromis niloticus*), *etc* (Tiersch *et al.*, 2007 ; Tsai et Lin, 2012) sans oublier les nombreuses investigations réalisées sur *Brachydanio rerio*, cette dernière espèce ayant permis des avancées importantes dans la standardisation des techniques de cryoconservation des gamètes et embryons de poissons.

Spermatozoïdes : La congélation lente reste la technique la plus utilisée pour la conservation des spermatozoïdes de poisson avec l'emploi en majorité de DMSO (de 0.5 M à 4.0 M). Les taux de fertilité de la semence congelée atteignent 95 % pour certaines espèces de Salmonidés et Cyprinidés (Tsai et Lin, 2012). Les plus forts taux de survie et de fertilité sont obtenus sur les espèces marines (Gwo, 2000).

Oocytes : De par leur petite taille, les oocytes présentent un certain intérêt pour la cryoconservation. Ils contiennent une faible quantité d'eau et l'absence de chorion leur confère une perméabilité plus importante que les embryons (Tsai et Lin, 2012). Les oocytes apparaissent cependant très sensibles au froid et leur survie diminue avec la baisse de la température. Egalement, bien que les oocytes supportent le protocole de congélation, une réduction significative de la viabilité est observée après la décongélation. Des vitesses de congélation élevées pourraient être une solution pour conserver efficacement les oocytes (Tsai et Lin, 2012).

Embryons et larves : Si les embryons de mammifères peuvent tolérer la cryoconservation, en revanche, très peu de survies ont été rapportées pour les poissons. Pourtant, les intérêts sont importants. Réussir à cryoconserver les embryons, c'est permettre la conservation de l'information génétique des deux reproducteurs, c'est aussi le maintien d'un stock face à la pression des prélèvements ou enfin l'usage de la cryothérapie pour éradiquer certaines pathologies. En février 2010, une entreprise norvégienne (Cryogenetic), aurait permis le développement d'un embryon de morue après congélation et décongélation. La sensibilité au froid, notamment des premiers stades embryonnaires, la faible perméabilité membranaire et la complexité structurale, l'activité d'osmo-régulation, la taille importante des embryons et la richesse du vitellus constituent les principaux obstacles à la cryoconservation (Tsai et Lin, 2012). La faible perméabilité membranaire à l'eau et aux cryoprotecteurs

apparaît comme une réelle contrainte. L'immersion des embryons dans des cryoprotecteurs et l'usage de la micro-injection semblent constituer des alternatives, bien que les résultats soient encore très incertains et contestés. La vitrification est également de plus en plus envisagée avec des réussites sur les spermatozoïdes d'*Oncorhynchus mykiss* (Merino *et al.*, 2012) et la vitrification en micro-volumes des blastomères de *Brachidanio rerio* (Cardona-Costa et Garcia-Ximenez, 2007). Des essais de vitrification ont été entrepris sur les embryons de *Scophthalmus maximus* (Robles *et al.*, 2003 ; Cabrita *et al.*, 2003) de *Pagrus major* (Ding et Li, 2007), de l'espèce sub-polaire *Pseudopleuronectes americanus* (Robles *et al.*, 2005).

Blastomères : La congélation des blastomères (ou des blastocytes) peut constituer une alternative face à la difficulté de congeler les oocytes et les embryons de poissons. Ces cellules sont issues des premières divisions embryonnaires consécutives à la fécondation. Leur totipotence et leur pluripotence présentent un réel intérêt pour la cryoconservation. Si la congélation de blastomères de poissons s'est avérée efficace, en revanche, ces cellules perdent leur capacité de développement (Tsai et Lin, 2012). Comme pour les oocytes, la congélation lente a été davantage testée et la vitrification peut fournir une approche intéressante pour améliorer la survie et les performances de culture post-congélation.

III.1.3. - Les invertébrés d'intérêt aquacole

Les essais de cryoconservation ont été réalisés principalement sur les embranchements des Mollusques, des Echinodermes et des Arthropodes. Les Nématodes ont aussi fait l'objet d'investigations. En 2000, Gwo estimait à une trentaine les espèces d'invertébrés testées aux techniques de cryoconservation.

III.1.3.1. - La conchyliculture

La conchyliculture domine l'activité aquacole en France, avec près de 160 000 tonnes produites en 2012 pour un chiffre d'affaire approchant les 550 millions d'euros.

La conchyliculture garde de profonds stigmates des précédentes crises économiques engendrées par certaines épizooties. Les stocks d'huîtres ont été les plus fortement touchés. C'est d'abord une attaque virale (proche des *Iridoviridae*) qui a entraîné la quasi-extinction de l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* en 1966 - 1971. Les ravages provoqués par la marteiliose (*Marteilia refringens*) en 1968 et la bonamiose (*Bonamia exitiosa*) à partir de 1979 ont également lourdement impacté les gisements de l'huître plate *Ostrea edulis*. Si l'ostréiculture a pu se relever grâce à l'introduction de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, de nouvelles menaces planent depuis 2009 sur la filière avec l'apparition de surmortalités estivales sur le naissain et les juvéniles de 18 mois.

L'ostréiculture n'est pas la seule filière affectée. En 1987 - 1988, *Vibrio tapetis*, connu comme la maladie de l'anneau brun, a touché de plein fouet la vénériculture, entraînant un

effondrement des stocks de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. En 2014, une mortalité excessive a inquiété la mytiliculture avec des pertes estimées jusqu'à 70 % du stock des moules de bouchot et des élevages off-shore.

Ces quelques cas permettent de comprendre tout l'intérêt de la cryoconservation pour la conservation de ces différentes espèces et pour la constitution de stocks destinés à soutenir la filière conchylicole (Adams *et al.*, 2013b). L'embranchement des Mollusques reste le plus étudié pour les essais de congélation. Parmi les espèces d'huître les plus étudiées, *Crassostrea gigas* (Renard, 1991 ; Chao *et al.*, 1994 ; Gwo, 1995 ; Lin *et al.*, 1999 ; Paniagua-Chavez et Tiersch, 2001 ; Usuki *et al.*, 2002 ; Tervit *et al.*, 2005 ; Adams *et al.*, 2013a), *C. virginica* (Paniagua-Chavez *et al.*, 1998 ; Paniagua-Chavez et Tiersch, 2001), *Ostrea edulis* (Vitiello *et al.*, 2011 ; Horváth *et al.*, 2012), *Saccostrea glomerata* (Liu et Li, 2008). Des espèces d'huîtres perlières ont également été cryoconservées telles que *Pinctada fucata martensii* (Choi et Chang, 2003 ; Kawamoto *et al.*, 2007 ; Narita *et al.*, 2008), *Pinctada margaritifera* (Lyons *et al.*, 2005 ; Acosta-Salmón *et al.*, 2007).

D'autres familles de Mollusques ont été cryoconservées comme les Mytilidés avec les espèces *Mytilus galloprovincialis* (Di Matteo *et al.*, 2009 ; Paredes *et al.*, 2012 ; Liu et Li, 2015), *Perna canaliculus* (Smith *et al.*, 2012 ; Rusk *et al.*, 2013), les Pectinidés comme *Pecten maximus* (Marrec-Croq *et al.*, 1998) ou *Chlamys farreri* (Qin-Zhao et Jian-hai, 1995), les Vénéridés avec *Spisula sachalinensis* (Choi *et al.*, 2008) et les Haliotidés avec un certain nombre d'études sur les espèces *Haliotis laevigata* (Liu *et al.*, 2014), *H. tuberculata* (Poncet *et al.*, 2003), *H. midae* (Roux *et al.*, 2008) ou *H. rufescens* (Salinas-Flores *et al.*, 2005).

III.1.3.2. - La pénéculture

La pénéculture ou crevetticulture s'est développée à l'échelle mondiale à partir des années 1970 et son développement est à l'image des autres productions aquacoles. Comme pour la conchyliculture, les bactérioses et les viroses ont été la cause d'importants dégâts sur les stocks de Pénéidés. Les *Vibrio* sp. dont *V. harveii*, *V. nigripulchritudo*, *V. penaeicida* ont été identifiés parmi les agents infectieux à l'origine de ces mortalités. La pénéculture représente près de 8 % de la production mondiale aquacole. C'est une source de revenus importante pour l'Asie qui assure près de 80 % de la production mondiale. Les risques récurrents d'épizooties associés aux larges enjeux économiques ont entraîné d'importantes investigations sur le terrain de la cryoconservation pour une large majorité d'Arthropodes Décapodes. La famille des Pénéidés représente l'essentiel des espèces testées à la congélation : *Penaeus monodom* (Arun et Subramoniam, 1997 ; Vuthiphandchai *et al.*, 2005, 2007 ; Bart *et al.*, 2006), *P. esculentus* (Preston et Coman, 1998), *P. indicus* (Diwan et Joseph, 1999), *P. japonicus* (Gwo et Lin, 1998) ; *P. semisulcatus* (Diwan et Kandasami, 1997), *P. stylirostris* (Alfaro *et al.*, 2001), *Litopenaeus vannamei* (Dong *et al.*, 2004 ; Lezcano *et al.*, 2004), *Trachypenaeus byrdi* (Alfaro *et al.*, 2001).

Outre les Pénéidés, les techniques de cryoconservation ont aussi été testées sur quelques Arthropodes. La recherche sur les antifouling s'est intéressée aux barnacles comme des bioindicateurs permettant de tester l'efficacité des produits et leur toxicité. Les nauplii de *Balanus amphitrite* (Anil *et al.*, 1997) ont ainsi été soumis à la cryoconservation.

Egalement, la fourniture de proies zooplanctoniques pour les premiers stades larvaires pourrait s'avérer très utile pour la pisciculture. La distribution de larves planctoniques cryoconservées permettrait de limiter les coûts de production tout en distribuant des proies n'ayant rien perdu de leur qualité nutritionnelle et présentant peu de risques sanitaires. Les embryons de *Brachionus plicatilis* (Toledo et Kurokura, 1990) ont ainsi été cryoconservés avec succès, tout comme les nauplii d'*Artemia salina* (Baust et Lawrence, 1979).

Enfin, la semence du crabe des palétuviers, *Scylla serrata* (Jeyalectumie et Subramoniam, 1989 ; Bhavanishankar et Subramoniam, 1997), du Chélicérate *Limulus polyphemus* (Behlmer et Brown, 1984) et du crabe *Eriocheir sinensis* (Kang *et al.*, 2009) ont aussi été cryoconservés et figurent parmi les espèces élevées en Asie à des fins alimentaires.

Une espèce dulcicole, *Macrobrachium rosenbergii* a été également soumise à la cryoconservation (Chow *et al.*, 1985).

III.1.3.3. - L'échinoculture

L'échinoculture regroupe la production des organismes constituant l'embranchement des Echinodermes. Parmi ceux-ci, l'intérêt pour l'élevage des oursins ou l'échiniculture est devenu croissant ces 30 dernières années. C'est une filière récente dont les premiers essais datent du début des années 1980. De façon similaire, l'holothuriculture fait référence à l'élevage des holothuries, développé en particulier dans l'Océan indien (Asie, Réunion).

La cryoconservation s'est surtout appliquée aux Echinidés. L'intérêt de congeler réside dans l'utilisation des invertébrés marins et notamment des oursins comme bio-matériels communément utilisés pour évaluer les niveaux de pollution des eaux marines à travers le monde. Fabbrocini *et al.* (2014) précisent que la congélation du germoplasme permettrait de s'affranchir des saisons de pontes et des décalages de pontes pour une fourniture constante en gamètes. Les premiers travaux ont été menés sur les oocytes et les spermatozoïdes de *Strongylocentrotus intermedius* par Asahina à partir des années 1960. D'autres espèces ont été par la suite étudiées telles que *Strongylocentrotus dröbachiensis* (Dunn et McLachlan, 1972), *Hemicentrotus pulcherrimus* (Asahina et Takahashi, 1978), *Evechinus chloroticus* (Adams *et al.*, 2006), *Paracentrotus lividus* (Paredes et Bellas, 2009 ; Fabbrocini *et al.*, 2014). Les oursins irréguliers ont aussi été approchés tels que *Echinarachnius parma* communément appelé dollar des sables (Dunn et McLachlan, 1972).

Parmi les autres Echinodermes, l'obtention des semences du concombre de mer (holothurie) *Apostichopus japonicus* s'avère très fluctuante et la différenciation gonadique demeure compliquée. La cryoconservation réussie des spermatozoïdes d'*A. japonicus* permet d'établir des banques de semence préservant la bonne qualité des gamètes pour de futures

utilisations (Shao *et al.*, 2006). Les gamètes des Astérides ont aussi été cryoconservés comme les spermatozoïdes de *Pisaster ochraceus* (Jalali et Crawford, 2012) et les oocytes d'*Asterina miniata* et de *Marthasterias glacialis* (Hamaratoğlu *et al.*, 2005). Dunn et McLachlan (1972) ont aussi testé la cryoconservation des spermatozoïdes d'*Asterias vulgaris*.

III.1.3.4. - Les autres invertébrés marins...

La cryoconservation s'est intéressée, mais de façon plus anecdotique, à d'autres invertébrés marins qui présentent aussi des intérêts aquacoles. C'est le cas pour les Plathelminthes *Nereis virens* et *Arenicola marina*, espèces recherchées comme compléments alimentaires pour la pénéculture et la pisciculture, comme leurres de choix pour la pratique de la pêche sportive et pour le maintien des stocks sauvages très convoités. Les Nereidés sont aussi exploités pour l'écotoxicologie, en particulier pour la détermination de substrats toxiques de l'environnement marin (Olive et Wang, 1997 ; Wang et Olive, 2000). Si la cryoconservation des larves est effective, en revanche des cristaux de glace et des dommages membranaires et ciliaires sont visibles sur les individus post-traitement. Les stades plus avancés ne supportent pas les traitements testés (Olive et Wang, 1997 ; Wang et Olive, 2000).

Kang *et al.* (2009) ont rapporté la cryoconservation réussie des larves véligères du triton *Charonia sauliae*. Ce Mollusque tropical est menacé de disparition du fait d'un faible taux de croissance et d'une maturation sexuelle tardive (Kang *et al.*, 2009). La cryoconservation des larves pourrait être un soutien aux stocks naturels. Malgré les survies obtenues après décongélation, ces auteurs ont remarqué une augmentation rapide du taux de mortalité après traitement. Parmi les raisons évoquées, la qualité des larves avant traitement conditionnerait la survie post-décongélation (Kang *et al.*, 2009).

Les essais réussis de cryoconservation sur l'embranchement des Spongiaires ouvrent de réelles opportunités pour la culture cellulaire des éponges. En 1997, Pomponi *et al.* proposent un protocole de cryoconservation des archeocytes de l'espèce *Teichaxinella morchella*. En 1998, Rinkevich *et al.* tenteront de constituer des stocks d'embryons du genre *Negombata* sp. pour rendre le bio-matériel disponible toute l'année. Ils obtiennent une viabilité cellulaire post-congélation comparable aux témoins mais une contamination bactérienne aura raison des embryons décongelés. Mussino *et al.* (2012) ont rapporté la congélation des primmorphes issus de l'espèce *Petrosia ficiformis*. Ces agrégats multicellulaires ont présenté de bons taux de prolifération cellulaire et une spiculogénèse post-cryoconservation (Mussino *et al.*, 2012). De plus, l'expression des HSP70 a été similaire entre les primmorphes testés et les témoins. Les Spongiaires concentrent beaucoup d'intérêt pour la diversité de leur utilisation pour la médecine, la cosmétique, les anti-fouling, ...

Ces auteurs ont tous utilisé la technique de congélation lente pour la conservation des différents biomatériaux. Le DMSO a été privilégié dans ces différentes études à des concentrations de 1.5 à 3.0 M.

La cryoconservation des Cnidaires a été très peu développée. Les travaux sur les Méduzoaires sont inexistantes. Frank *et al.* (1994) ont publié un protocole de cryoconservation de cultures cellulaires issues de Cnidaires. Cependant, peu d'informations ont été produites et il semble que parmi les Hydrozoaires, seul *Millepora dichotoma* ait été étudié. Les travaux sur les Anthozoaires sont développés dans la section III.2. - *L'application de la cryoconservation aux Anthozoaires.*

III.1.3.5. - Le germoplasme cryoconservé

La cryoconservation des spermatozoïdes est une technique éprouvée sur de nombreuses espèces aquacoles. Pour autant, la cryoconservation des oocytes et des embryons de poisson reste encore mal maîtrisée. Certaines techniques de congélation se sont avérées efficaces sur les spermatozoïdes mais également sur les oocytes, les embryons et les larves d'invertébrés tels que les huîtres et les oursins. Les études conduites laissent ainsi entrevoir des possibilités de cryoconservation de nouvelles espèces marines.

Spermatozoïdes : La cryoconservation des spermatozoïdes a été réalisée avec succès sur un certain nombre d'espèces d'huîtres (*Crassostrea gigas*), de moules (*Perna canaliculus*) et d'ormeaux (*Haliotis iris*) (Adams *et al.*, 2013b).

Parmi les cryoprotecteurs testés, le DMSO à des concentrations de 0.5 à 2.7 M fournit pour nombre d'entre elles la meilleure protection durant le processus de cryoproservation (Asahina *et al.*, 1978 ; Gwo, 2000 ; Bart *et al.*, 2006 ; Vuthiphandchai *et al.*, 2007 ; Vitiello *et al.*, 2011 ; Adams *et al.*, 2013b). L'addition de tréhalose au DMSO permet de maximiser les taux de fertilité et de motilité post-congélation (Jeyalectumie et Subramoniam, 1989 ; Diwan et Joseph, 1999 ; Acosta-Salmon *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2012 ; Adams *et al.*, 2013b ; Fabbrocini *et al.*, 2014).

Le glycérol s'est avéré un cryoprotecteur efficace dans quelques études (Chow *et al.*, 1985 ; Jeyalectumie et Subramoniam, 1989 ; Bhavanishankar et Subramoniam, 1997) mais a aussi été rapporté comme toxique pour une majorité d'espèces (Gwo, 2000). Asahina *et al.* (1978) constatent des dommages importants liés à la pénétration du glycérol pour *H. pulcherrimus* et *S. centrotus*. Dunn et McLachlan (1972) décrivent l'arrêt de la motilité des spermatozoïdes des Echinodermes testés pour des concentrations en Gly inférieures à 0.7 M (Dunn et McLachlan, 1972) et aucun recouvrement de motilité post-traitement.

L'utilisation du propylène glycol s'est aussi avérée intéressante pour la cryoconservation des spermatozoïdes de *C. virginica* (Paniagua-Chavez et Tiersch, 2001).

L'éthylène glycol et le méthanol se sont montrés les plus toxiques pour les spermatozoïdes de *L. vannamei* (Castelo-Branco *et al.*, 2015) et les moins efficaces sur les

spermatophores de *P. monodom* (Bart *et al.*, 2006). A l'inverse, ces deux composés sont considérés comme les mieux tolérés par les spermatozoïdes d'*O. edulis*, sans réduction de leur motilité (Vitiello *et al.*, 2011). Pour certains auteurs, la protection du méthanol reste la plus efficace durant la congélation et ce, malgré sa toxicité (Lezcano *et al.*, 2004 ; Castelo-Branco *et al.*, 2015).

L'addition de saccharose à l'éthylène glycol a optimisé la survie des spermatozoïdes de *C. gigas* (Choi et Chang, 2014).

Di Matteo *et al.* (2009) montrent la sensibilité au froid des spermatozoïdes de *Mytilus galloprovincialis*. Les meilleures motilités et fertilités post-congélation ne seront obtenues qu'avec les plus faibles vitesses de congélation (Di Matteo *et al.*, 2009). La congélation lente reste la plus utilisée pour la cryoconservation des spermatozoïdes des invertébrés marins, bien que Castelo-Branco *et al.* (2015) aient montré la possibilité de vitrifier les spermatozoïdes de *L. vannamei*.

Le taux de fertilité des spermatozoïdes cryoconservés de *Pinctada fucata martensii* a pu aussi être amélioré grâce à l'addition de sérum (Fetal Bovine Serum : FBS) (Kawamoto *et al.*, 2007 ; Narita *et al.*, 2008).

Oocytes : La réussite de la cryoconservation des oocytes est réputée difficile pour les espèces aquatiques. Peu d'oocytes d'invertébrés marins sont aujourd'hui accessibles à la congélation. Parmi ces espèces, sont représentées *C. gigas* et très récemment, *M. galloprovincialis* (Liu et Li, 2015). Ces derniers auteurs insistent sur le rôle primordial du saccharose lors de la décongélation. Paredes et Bellas (2009) ont réussi à cryoconserver les oocytes de *P. lividus* et remarqueront que le DMSO est le cryoprotecteur le plus toxique contrairement à l'éthylène glycol (Paredes *et al.*, 2009). L'augmentation des vitesses de congélation est souvent suggérée pour pallier aux difficultés de congeler efficacement les oocytes. C'est par une technique de congélation ultra-rapide qu'Hamaratoğlu *et al.* (2005) ont réussi à congeler les oocytes des Astérides *Asterina miniata* et *Marthasterias glacialis*.

Embryons et larves : Les dommages sur la motilité et la morphologie des larves décongelées diffèrent beaucoup en fonction du développement larvaire. Choi et Chang (2014) mentionnent que le stade de développement optimal pour la cryoconservation dépend de l'espèce. Cependant, un besoin de standardisation des protocoles apparaît nécessaire.

Plusieurs espèces sont connues pour avoir des tolérances aux fortes concentrations et aux vitesses d'exposition qui augmentent avec le stade de développement des larves. Les stades larvaires (trocophore, véligère, larve-D) apparaissent beaucoup plus résistants que les stades morula et blastula (Renard, 1991 ; Chao *et al.*, 1994 ; Gwo, 1995 ; Usuki *et al.*, 2002 ; Vuthiphandchai *et al.*, 2005 ; Kang *et al.*, 2009 ; Paredes *et al.*, 2012). Egalement, les derniers stades larvaires (larve D) ont présenté de meilleures résiliences que les larves trocophores (Asahina et Takahashi, 1978 ; Adams *et al.*, 2013b) avec cependant des cas de malformations après traitement. A l'inverse, les derniers stades larvaires d'*A. salina* et de *T. byrdis* montrent une plus grande sensibilité aux traitements que les stades plus précoces (Baust et Lawrence, 1979 ; Gwo et Lin, 1998 ; Alfaro *et al.*, 2001). Au sein même du stade trocophore, les larves

présentent une cryotolérance dépendante de leur phase de développement (par exemple avant ou après formation de la glande produisant la coquille, ou formation du vélum, ...).

Le taux de survie post-cryoconservation des clams augmente aussi avec le développement embryonnaire. Le meilleur taux de survie obtenu avec le stade Umbo est peut être du à l'augmentation du nombre de cellules que contient la larve métamorphosée et à la formation à ce stade d'un exosquelette (Dong *et al.*, 2007). Enfin, Adams *et al.* (2006) observent jusqu'à 30 jours après la cryoconservation, la métamorphose et la fixation des larves pluteus, stade le plus développé. Cependant, une larve trop développée, avec entre autres de nombreuses inclusions cytoplasmiques, risque de subir des dommages importants lors de la cryoconservation (Renard, 1991). Ainsi, Liu et Li (2008) constatent que des larves de *S. glomerata* âgées de 24 h ont un meilleur taux de survie que celles de 6 et 12 h, mais aussi par rapport à celles de 48 et 96 h.

Le vitellus est souvent cité comme étant à l'origine des difficultés de congélation et peut être une des explications des différences de tolérance entre les stades larvaires. La composition des réserves lipidiques influencerait la sensibilité et la survie des larves post-traitement (Renard, 1991 ; Arun et Subramoniam, 1997 ; Alfaro *et al.*, 2001). Les larves d'Arthropodes Décapodes contiennent ainsi de nombreuses gouttelettes phospholipidiques riches en acides gras polyinsaturés (Alfaro *et al.*, 2001). Les embryons de *C. gigas* ont une sensibilité membranaire accrue (Renard, 1991) et les inclusions lipidiques des premiers stades larvaires de *N. virens* seraient en partie responsables des mortalités post-décongélation (Olive et Wang, 1997).

Le glycérol s'est avéré très peu toléré par *P. indicus* au stade morula, par les plutei d'*H. pulcherrimus*, les nauplii de *B. amphitrite* et par les embryons de *T. byrdi* (Asahina, 1978 ; Anil *et al.*, 1997 ; Subramoniam et Arun, 1999 ; Alfaro *et al.*, 2001).

Egalement, le DMSO s'est avéré toxique pour les embryons et larves de *P. japonicus* et les nauplii de *B. amphitrite* (Anil *et al.*, 1997 ; Gwo et Lin, 1998). Au contraire, les embryons de *P. monodom* et les larves de *S. glomerata* ont mieux toléré le glycérol et le DMSO (Vuthiphandchai *et al.*, 2005 ; Liu et Li, 2008). Les plutei d'*H. pulcherrimus* et les embryons de *P. monodom* tolèrent de façon similaire le DMSO et l'éthylène glycol (Asahina, 1978 ; Arun et Subramoniam, 1997), bien que le DMSO soit davantage toxique à température ambiante (Asahina, 1978).

Les meilleures survies post-traitement des embryons de *P. vannamei* ont été obtenues après exposition à l'éthylène glycol (Dong *et al.*, 2004), tout comme les nauplii de *B. amphitrite* pour des concentrations en éthylène glycol entre 3 et 4 M (Anil *et al.*, 1997). Renard et Cochard, 1989 rapportent l'effet moins toxique de l'éthylène glycol par rapport au DMSO pour la congélation des embryons de *C. gigas*. Si pour Adams *et al.* (2006), l'éthylène glycol apparaît moins toxique pour les larves d'*Evechinus chloroticus*, en revanche il ne permet pas de survie après congélation.

Le propylène glycol permet aussi de cryoconserver les larves trocophores de *C. virginica* (Paniagua-Chavez et Tiersch, 2001).

Avec un pouvoir de pénétration élevé à travers les membranes, le méthanol est reconnu faiblement toxique pour les larves de *P. japonicus* (Gwo et Lin, 1998), de *P. esculentus* (Preston et Coman, 1998) et de *P. vannamei* (Dong *et al.*, 2004). A l'inverse,

Vuthiphandchai *et al.* (2005) obtiendront une faible survie des embryons de *P. monodom* après exposition au méthanol.

Enfin, un certain nombre de références font état de l'interruption de la mobilité des spermatozoïdes et des stades embryo-larvaires durant leur exposition aux solutions cryoprotectrices. Le recouvrement de la motilité des spermatozoïdes et de l'activité ciliaire des embryons et larves après traitement est une variable très utilisée pour évaluer l'effet traitement. Cette mobilité a été suivie immédiatement après l'exposition et jusqu'à plus de 24 h post-traitement (Anil *et al.*, 1997 ; Gwo, 1995 ; Liu et Li, 2008 ; Horvath *et al.*, 2012). Adams *et al.* (2006) indiquent ainsi que l'exposition aux cryoprotecteurs induit l'arrêt du déplacement des larves d'*E. chloroticus* pendant quelques secondes. Ce n'est que 1 à 2 h après le rinçage, que certaines d'entre-elles retrouvent leur mobilité. En plus de la capacité de déplacement des larves, certains auteurs ont utilisé le phototactisme pour estimer l'état de la larve. Les Arthropodes sont particulièrement concernés comme c'est le cas sur les nauplii d'*A. salina*, de *P. semisulcatus* et *L. vannamei* (Baust et Lawrence, 1979 ; Diwan et Kandasami, 1997 ; Dong *et al.*, 2004). Les embryons et les larves de Mollusques se caractérisent par des mouvements rotatoires dus à une ciliature active (Chao *et al.*, 1994 ; Gwo et Lin, 1998 ; Choi et Chang, 2003). Certains auteurs comme Choi et Chang (2003) se réfèrent également aux battements de cœur des stades les plus avancés (larve-D et Umbo) de *P. fucata martensii*.

III.1.3.6. - Quels paramètres pour une congélation efficace ?

III.1.3.6.1. - Les solutions cryoprotectrices

En fonction du temps d'exposition et de leur concentration, les cryoprotecteurs peuvent présenter un effet toxique pour les cellules. L'efficacité des cryoprotecteurs dépend d'un ratio entre la protection cellulaire et la toxicité (Vitiello *et al.*, 2011). Beaucoup de solutés ont des toxicités variables lorsqu'ils sont employés seuls mais aussi en combinaison (Lyons *et al.*, 2005). Comme exposé dans les paragraphes précédents, le DMSO fait partie des cryoprotecteurs les plus utilisés car il traverse facilement les membranes cellulaires et n'est toxique qu'à forte concentration (Kang *et al.*, 2009). Les résultats obtenus avec le glycérol indiquent une forte toxicité de ce cryoprotecteur pour les gamètes des organismes aquatiques notamment à cause de son poids moléculaire élevé (Vitiello *et al.*, 2011). La vitesse de pénétration du cryoprotecteur est ainsi négativement corrélée avec son poids moléculaire (Renard et Cochard, 1989). Renard (1991) propose une hiérarchie des cryoprotecteurs les moins toxiques pour la conservation des embryons de *C. gigas*. Du plus toléré au plus dommageable : méthanol > éthylène glycol > propylène glycol > DMSO > glycérol > saccharose. Alfaro *et al.* (2001) déclinent un ordre similaire pour les embryons de *T. byrdi*. Qin-Zhao et Jian-Hai (1995) indiquent pour les spermatozoïdes de *C. farreri* un ordre légèrement différent : DMSO > méthanol > éthylène glycol > glycérol.

Les associations de cryoprotecteurs

L'addition d'un oside permet d'augmenter la tolérance à la congélation et réduit les dommages cellulaires (Renard, 1991). Si de nombreuses études soulignent les bons résultats obtenus par l'association cryoprotecteur/oside (Jeyalectumie et Subramoniam, 1989 ; Diwan et Joseph, 1999 ; Choi et Chang, 2003 ; Choi *et al.*, 2008 ; Hengherr *et al.*, 2008, Acosta-Salmon *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2014), d'autres associations ont également été testées. Ainsi, l'augmentation de la tolérance au froid des larves d'*A. salina* a été démontrée en présence de combinaisons de cryoprotecteurs (Baust et Lawrence, 1979).

Ces mélanges peuvent être osidiques comme l'association glucose + saccharose (Baust et Lawrence, 1979) ou entre deux cryoprotecteurs pénétrants DMSO + glycérol sur les nauplii de *P. indicus* et des spermatozoïdes de *P. indicus* (Diwan et Kandasami, 1997 ; Diwan et Joseph, 1999), éthylène glycol + DMSO appliqué aux larves de *P. monodom* (Arun et Subranomian, 1997) ou d'autres combinaisons tels DMSO + acétamide (Chao *et al.*, 1994), éthylène glycol + PVP (Paredes et Bellas, 2009) ou méthanol + FBS (Fetal Bovine Serum) (Kawamoto *et al.*, 2007 ; Narita *et al.*, 2008 ; Mussino *et al.*, 2012) dans l'optique d'améliorer les taux de survie post-traitement. Plusieurs auteurs mélangent également les cryoprotecteurs à des milieux de culture cellulaire comme DMSO + L15 (milieu de Leibovitz) (Le Marrec-Croq, 1998), DMSO + HBSS (Solution Saline Equilibrée de Hanks) (Paniagua-Chavez et Tiersch, 2001 ; Lyons *et al.*, 2005). Les antioxydants contenus dans ces milieux augmentent le pouvoir cryoprotecteur. L'antioxydant échinochrome a ainsi été mélangé au DMSO pour la conservation des cellules embryonnaires d'oursins, ainsi que les vitamines E et C (Odintsova et Boroda, 2012).

Des combinaisons ternaires ont aussi été testées comme glucose + DMSO + propylène glycol sur les spermatozoïdes de *P. maragaritifera* (Acosta-Salmon *et al.*, 2007).

L'eau de mer et l'eau Milli Q

L'utilisation d'eau de mer filtrée à 0.45 µm (FSW : Filter Sea Water) dans le milieu cryoprotecteur semble avoir un impact sur le taux de survie des larves. Usuki *et al.* (2002) observent que les larves de *C. gigas* conservées dans un milieu cryoprotecteur avec de l'eau de mer ne produisent pas de coquilles. Une augmentation de la dilution en diminuant à ¼ l'eau de mer dans ce même milieu permet la formation de coquilles. La formation normale de coquille est positivement corrélée avec la concentration en eau de mer.

L'utilisation de l'eau Milli Q plutôt que de FSW a permis d'améliorer la fertilisation des oocytes de *C. gigas*, avec 20.4 ± 3.0 % de réussite pour l'eau Milli Q contre 8.7 ± 2.2 % pour FSW (Tervit *et al.*, 2005). L'eau Milli Q a également été utilisée pour la congélation des

spermatozoïdes, permettant de démontrer qu'une faible concentration en sels améliore leur congélation (Hamaratoğlu *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2012 ; Adams *et al.*, 2013b).

Durant l'équilibration avec le cryoprotecteur, l'eau Milli Q semble réduire le stress osmotique. Elle permettrait de limiter l'exposition à une forte concentration en électrolytes et d'améliorer ainsi la motilité des spermatozoïdes post-congélation. Kawamoto *et al.* (2007) rapportent que l'utilisation d'eau de mer non diluée pour la conception des solutions cryoprotectrices n'est pas favorable à une cryoconservation réussie des spermatozoïdes de *P. fucata*. Cependant, malgré l'addition d'eau Milli Q aux cryoprotecteurs, les larves trocophores et les larves-D de *P. canaliculus* ont développé des anomalies de développement après décongélation (Rusk *et al.*, 2013).

Congélation lente ou vitrification ?

La vitrification peut constituer une alternative face à la sensibilité (au refroidissement, osmotique, ...) de certaines espèces. La vitrification nécessite des concentrations entre 5 et 9 M (Fahy, 1984 ; Anil *et al.*, 1997 ; Vajta et Kuwayama, 2006). Pour des concentrations en cryoprotecteurs supérieures à 4 M aucune survie n'a été obtenue sur les nauplii de *B. amphitrite* (Anil *et al.*, 1997). Les stades embryo-larvaires de *P. esculentus* n'ont pas non plus supporté des concentrations supérieures à 4 M (Preston et Coman, 1998).

III.1.3.6.2. – La vitesse de refroidissement

La vitesse de refroidissement est également un point critique pour la cryoconservation des échantillons biologiques :

- une vitesse de refroidissement faible peut provoquer une longue exposition des cellules à de fortes concentrations des solutés avec des variations de pH.
- Un refroidissement rapide peut malgré tout induire la formation de cristaux de glace intracellulaire.

Actuellement, la congélation lente est la technique la plus couramment utilisée pour la conservation des gamètes et embryons d'organismes aquatiques. Pour chaque protocole, est définie une ou plusieurs vitesses de refroidissement. Malgré tout, la vitesse de refroidissement optimale est évaluée entre 1 et 2 °C/min (Kang *et al.*, 2009). Tervit *et al.* (2005) ont obtenu des résultats significatifs pour la cryoconservation des oocytes de *C. gigas* en utilisant une vitesse de refroidissement très faible, 0.3 °C/min.

Des essais de vitrification et de congélation rapide ou ultra-rapide sont réalisés lorsque la congélation lente n'apporte pas de résultats. Ainsi, les oocytes d'*Asterina miniata* ont pu présenter un taux de survie post-cryoconservation de 34 % seulement après une courte

exposition au mélange 1.5 M DMSO + 1.0 M tréhalose et une congélation ultra-rapide (Hamaratoğlu *et al.*, 2005). Dans cette étude, du fait de la sensibilité accrue des oocytes aux trop fortes concentrations en cryoprotecteur, la congélation rapide ou ultra-rapide a pu être un bon compromis.

III.1.3.6.3. - Les conditions de vie

Si la réussite de la cryoconservation est directement dépendante des conditions intrinsèques des gamètes ou des larves, les conditions du milieu environnant ont aussi un rôle déterminant. La qualité des spermatozoïdes et des larves peut être influencée par les conditions de ponte ou d'émission des spermatozoïdes.

Parmi les paramètres abiotiques, la température de l'eau, l'oxygène dissous, et le pH ont un impact sur le taux de réussite de la cryoconservation (Lyons *et al.*, 2005). La température du milieu avant cryoconservation est inversement corrélée au taux de survie et de formation normale des coquilles des larves de *C. gigas*. Les effets des malformations larvaires en relation avec la température du milieu sont visibles après décongélation (Usuki *et al.*, 2002). La température avant cryoconservation affecte ainsi le taux de survie des larves après décongélation.

Kang *et al.* (2009) imputent la mortalité des larves de *C. sauliae* post-congélation à la qualité biologique des larves avant traitement. Le régime alimentaire des adultes peut aussi avoir des répercussions sur la composition biochimique des gamètes. La survie larvaire est directement affectée par la modification de la composition membranaire et de leur fluidité (Adams *et al.*, 2006). Le pourcentage de survie des larves après cryoconservation va être influencé par une sensibilité accrue des larves selon les conditions de congélation (chilling sensitivity).

Les différences de nourriture des géniteurs, les conditions d'élevage, les différents stades larvaires mais aussi les différences génétiques peuvent être des causes de variabilité dans la survie des larves cryoconservées (Tervit *et al.*, 2005). Ainsi, Adams *et al.* (2013a) mettent en évidence que les oocytes de *C. gigas* provenant de géniteurs nourris à satiété et pré-conditionnés au froid seront plus fertiles après congélation.

Pour compenser l'absence de qualité stable du fait de la variabilité individuelle et de la difficulté à maîtriser toutes les composantes biologiques, l'interprétation des résultats de la cryoconservation nécessite une quantité importante de gamètes, embryons, larves, ... et l'augmentation des répliques (Renard, 1991).

III.1.3.6.4. - L'après cryoconservation

La cryoconservation est une technique éprouvée sur de nombreuses larves mais qui n'en reste pas moins une technique traumatisante pour la structure tertiaire des cellules. Des

taux de survie variables pour chaque protocole et chaque espèce, des dommages morphologiques (larves déformées, queues incurvées, ...) et directement génétiques (larves haploïdes mis en évidence en 2005 par Miskolczi) sont autant de signaux des différents stress induits par la cryoconservation.

La survie ou la motilité des larves post-congélation sur quelques heures ou quelques jours ne garantit pas que la larve va se développer, commencer sa métamorphose et sa fixation. Les larves pluteus d'oursin présentent une motilité 2 à 4 h après avoir été décongelées. Au-delà de 24 h, une chute de la motilité a été constatée (Adams *et al.*, 2006). Usuki *et al.* (2002) observent quant à eux des effets 6 jours voire jusqu'à 30 jours après la cryoconservation. Avec le temps, de nombreuses larves présentent ainsi des malformations. Cette observation a aussi été reprise par Rusk *et al.* (2013) qui ont observé l'incapacité des larves-D décongelées à produire après 18 jours un développement correct.

La contamination bactérienne doit enfin être prise en compte sur le taux de réussite de la cryoconservation. Si la congélation peut être réussie, en revanche la sensibilité des échantillons biologiques après traitement peut s'avérer dupliquée (Rinkevich *et al.*, 1998).

III.2. - L'application de la cryoconservation aux Anthozoaires

La cryoconservation des espèces aquatiques présente deux intérêts majeurs, la conservation des génotypes des espèces d'intérêt aquacole et la conservation *ex situ* de la biodiversité de l'ichtyofaune sauvage (Maisse *et al.*, 1998 ; Tsai et Lin, 2012).

Les récifs coralliens sont soumis depuis ces dernières décennies à des perturbations environnementales et anthropiques de plus en plus fortes. Face aux menaces qui pèsent sur la pérennité de ces écosystèmes, la cryoconservation peut apparaître comme une solution de sauvegarde du patrimoine génétique, sinon comme un soutien à la restauration des récifs.

III.2.1. - Etat de l'art

Actuellement, peu de connaissances existent sur la cryoconservation des Anthozoaires. La première étude décrivant une démarche de cryoconservation a été publiée en 1994 par Frank *et al.*. Ces auteurs ont soumis neuf Anthozoaires (trois Hexacoralliaires : *Stylophora pistillata*, *Porites lutea*, *Favia fava* et six Octocoralliaires : *Parerythropodium fulvum fulvum*, *Dendronephthya hemprichi*, *Nephtya* sp., *Heteroxenia fuscescence* dont deux Gorgonidés *Clathraria rubrinoides*, *Plexaura A*) et un Hydrozoaire (*Millepora dichotoma*). Cette équipe israélienne, focalisée sur la culture cellulaire des invertébrés marins, s'est inspirée de deux milieux cryoprotecteurs préalablement décrits pour l'établissement de lignées cellulaires d'invertébrés marins coloniaux tels *Botryllus* sp. (Rinkevich *et al.*, 1994).

Ces milieux étaient composés de :

- 80 % tampon phosphate salin (PBS) + 20 % DMSO
- 80 % L15 + 10 % sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (HIFBS) + 10 % glycérol

Hormis ce protocole, peu d'informations ont été données sur la prolifération cellulaire post-congélation.

En 2006, deux études entièrement consacrées à la cryoconservation des Anthozoaires ont été publiées par Hagedorn *et al.* (2006a et b). Dans le premier article, des essais de cryoconservation des larves de *P. damicornis* et de *F. scutaria* sont rapportés. La toxicité des planulae zooxanthellées et azooxanthellées aux cryoprotecteurs a été évaluée et la tolérance des planulae s'est avérée importante pour des concentrations en cryoprotecteur (méthanol, glycérol, propylène glycol et DMSO) jusqu'à 10 %. Les travaux indiquent une perméabilité des larves de ces deux espèces au glycérol, avec des vitesses de pénétration du cryoprotecteur propre à l'espèce. Le glycérol est un produit du métabolisme des coraux, raison pour laquelle il a été utilisé comme cryoprotecteur pour cette étude. La perméabilité des larves de *F. scutaria* a été estimée supérieure à 2.0 $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ pour l'eau et de $1.1 \cdot 10^{-4}$ cm/min et de $5.0 \cdot 10^{-4}$ cm/min au glycérol respectivement concentré à 0.68 M et 0.96 M. La forte perméabilité larvaire de *F. scutaria* peut avoir un rôle de protection contre les larges variations de la salinité de l'eau de mer dans le milieu naturel où ont été prélevées les planulae (Hagedorn *et al.*, 2006a). Le glycérol a permis de remplacer 90 % du volume larvaire en 25 min pour *F. scutaria* contre 27 % pour *P. damicornis* après 4 h. *P. damicornis* apparaît comme ayant une faible perméabilité au glycérol. Hagedorn *et al.* (2006a) suggèrent que les espèces coralliennes ayant des grosses planulae seront plus difficiles à cryoconserver de par la durée importante de pénétration du cryoprotecteur. Les essais de congélation des larves de *F. scutaria* se sont accompagnés d'une nucléation spontanée à partir de -37.8 ± 1.4 °C. La déshydratation n'était semble-t-il pas suffisante. Les larves sont apparues très fragiles à la diminution de température et ont commencé à subir des dommages à partir de 10 °C. Egalement pour des essais de congélation à -11 °C et pour différentes vitesses de congélation, les larves se sont révélées sensibles au refroidissement pour tous les tests, avec 100 % de mortalité. Si de nombreux organismes présentent des traumatismes liés au refroidissement en fonction de leur stade de développement, ce n'est pas le cas pour *F. scutaria* qui présente les mêmes dégâts à chaque stade de développement. Les auteurs suggèrent l'utilisation de la vitrification afin de pallier aux difficultés rencontrées avec la conservation lente.

La seconde étude rapporte des essais préliminaires pour la congélation des spermatozoïdes de *F. scutaria* (Hagedorn *et al.*, 2006a, 2006b). Comme pour les larves, la nucléation des spermatozoïdes s'établit à -37.2 ± 1.7 °C. Contrairement au propylène glycol, le DMSO présente l'avantage de protéger efficacement la membrane des spermatozoïdes contre les différences de pressions osmotiques et ce, malgré le plus faible taux de fertilité obtenu avec ce dernier (Hagedorn *et al.*, 2006b). Ces deux publications sont innovantes dans le domaine de la cryoconservation corallienne.

En 2010, deux nouvelles publications paraissent sous son nom dans lesquelles la cryosensibilité des microalgues du genre *Symbiodinium* sp. de trois Scléactinaires (*F. scutaria*, *P. compressa* et *P. damicornis*) est évaluée ainsi que les processus d'osmo-régulation larvaire de *F. scutaria* (Hagedorn *et al.*, 2010a, 2010b). Les zooxanthelles sont reportées comme sensibles à une exposition de 20 min aux cryoprotecteurs (DMSO, propylène glycol, méthanol, glycérol) concentrés à 10 %. Seuls les dinoflagellés du Poritidé s'avèreront résistantes aux chocs hyper- et hypo-osmotiques. La perméabilité des zooxanthelles de *F. scutaria* est estimée à $2.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$. Les *Symbiodinium* sp. de *P. compressa* et *P. damicornis* se révèlent plus sensibles au refroidissement que ceux de *F. scutaria* (Hagedorn *et al.*, 2010a). La concentration osmotique des larves de *F. scutaria* est déterminée à 1 000 mOsm/L avec, parmi les osmolytes, une dominance de la glycine bêtaïne (90 %) (Hagedorn *et al.*, 2010b). Les petites quantités de glycérol présentes suggèrent un faible rôle de ce soluté dans le processus d'osmo-régulation (Hagedorn *et al.*, 2010b).

L'année 2010 voit également émerger deux nouveaux auteurs œuvrant tous deux à Taiwan, Tsai et Lin. Ces auteurs testent la tolérance des oocytes d'*Echinopora* sp. aux solutions cryoprotectrices. Tsai et Lin utilisent la fluorescence (mélange FDA+PI) pour évaluer la tolérance des oocytes aux traitements. Ils observent une augmentation de la toxicité dans l'ordre : méthanol < DMSO < propylène glycol < éthylène glycol. La concentration de 1 M semble la mieux supportée par les oocytes (Tsai *et al.*, 2010).

Deux nouvelles publications sont produites en 2011 par Lin et Tsai qui testent la sensibilité des oocytes de deux Gorgonidés, *Junceella juncea* et *J. fragilis* aux solutions cryoprotectrices. Le dosage de l'ATP leur permet d'évaluer la toxicité des cryoprotecteurs ainsi que la sensibilité des oocytes au froid. Le méthanol à 1 M est le cryoprotecteur le mieux toléré par les oocytes de ces deux nouvelles espèces. Les travaux de Lin *et al.* (2011) confirment la toxicité du DMSO. Le dosage de l'activité mitochondriale et le suivi du potentiel membranaire par fluorescence (JC-1 : 5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylimidocarbocyanine iodide) indiquent finalement la toxicité du méthanol à partir de 1 M. De plus fortes concentrations (3 M) perturbent la distribution des mitochondries.

Lin et Tsai produisent une publication en 2012 dans laquelle les oocytes d'*Echinopora* sp. sont soumis à des températures de +5, 0 et -5 °C en présence de méthanol pendant des temps d'exposition définis. Le dosage de l'ATP révèle la possibilité de stockage des oocytes à 0 °C pendant 8 h en présence de faibles concentrations en méthanol (Lin et Tsai, 2012). L'année 2012 sera surtout marquée par les publications de Hagedorn *et al.*, qui établissent pour la première fois un protocole de congélation performant des spermatozoïdes et des cellules embryogènes de *F. scutaria* et d'*Acropora palmata* (Hagedorn *et al.*, 2012a). Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'exposition des spermatozoïdes à 1.4 M de DMSO pendant 10 min à température ambiante avant une congélation entre 20 et 30 °C/min. La décongélation se fait après une immersion des cryo-tubes dans un bain-marie à 30 °C pendant 2 min.

La viabilité des spermatozoïdes ainsi décongelés a été évaluée. Le plus fort taux de fertilité a été de 65 % pour les spermatozoïdes d'*A. palmata* et de 51 % pour ceux de *F. scutaria*, exposés à 1.4 M DMSO. Le sperme décongelé a été mis en présence d'oocytes frais

pendant 5 min pour *A. palmata* et pendant 12 h pour ceux de *F. scutaria*. Douze heures après l'insémination, les planulae ont subi une dissociation mécanique et enzymatique (6 % pronase à 10 mg/ml, 2 min) afin de récupérer des suspensions cellulaires. Du BSA (4 %) a été rajouté à la suspension cellulaire par la suite diluée à 1:1 avec du DMSO (concentration finale DMSO = 1.4 M). L'équilibration s'est faite pendant 20 min sur glace à +4 °C avant une congélation à -80 °C à 0.5 °C/min puis un transfert dans l'azote liquide. La décongélation a été réalisée en bain-marie à 30 °C pendant 2 min. Les auteurs évaluent à 50 % la quantité de cellules dissociées viables après décongélation pour *F. scutaria*.

Ces deux premiers Scléactiniaux sont issus des Caraïbes. La seconde publication de Hagedorn *et al.* (2012b) concerne *A. tenuis* et *A. millepora*, originaires de la Grande Barrière de Corail ainsi que la création d'une cryobanque. Le protocole de cryoconservation utilisé est le même que dans la précédente publication avec la congélation de spermatozoïdes et de cellules embryogènes dissociées.

Enfin, les deux synthèses d'Odinstova et Boroda (2012) et de Tsai et Lin (2012) font état des avancées de la cryoconservation sur les invertébrés marins. Ce sont les premiers travaux de synthèse mentionnant des essais de cryoconservation des Anthozoaires.

En 2013, Hagedorn *et al.* publient une nouvelle étude décrivant la tolérance des apex de *P. damicornis* dans un objectif de cryoconservation. Ces auteurs révèlent la sensibilité au refroidissement de ces fragments coralliens et plus encore des zooxanthelles. Les apex présentent une tolérance au DMSO à des concentrations n'excédant pas 1.5 M pour un temps d'exposition de 1.5 h (Hagedorn *et al.*, 2013a). Dans le résumé d'un colloque, on apprend cette même année que Hagedorn *et al.* (2013b) ont agrandi la cryobanque qui inclut désormais des spermatozoïdes et cellules isolées de Scléactiniaux d'Australie, des Caraïbes et d'Hawaï. Parmi les nouvelles espèces, deux Acroporidés, *A. loripes* et *A. cervicornis* et aussi *Platygyra daedalea* et *Platygyra lamolina* (Hagedorn *et al.*, 2013b). Le protocole de congélation reste inchangé. Toujours en 2013, Lin *et al.* conduisent une étude comparant la composition lipidique des oocytes des Scléactiniaux *P. daedalea*, *Echinopora gemmacea*, *Echinophyllia aspera*, *Oxypora lacera* et *Astreopora expansa* à celle des oocytes de *J. juncea* et *J. fragilis*. Leur étude révèle que les oocytes des Scléactiniaux testés ont une concentration lipidique moins élevée que celle des deux Gorgonidés. L'augmentation de la teneur lipidique favorisant la fluidité membranaire, Lin *et al.* avanceront l'hypothèse que les oocytes des Gorgonidés sont plus aptes à supporter les processus de congélation que les oocytes des Scléactiniaux (Lin *et al.*, 2013).

La revue de Hagedorn et Spindler publiée en 2014 ajoute *Goniastrea aspera* parmi les spermatozoïdes et les cellules embryogéniques dissociées de Scléactiniaux accessibles à la cryoconservation. Cette revue nous apprend que des résultats encourageants ont été obtenus après des essais de vitrification des zooxanthelles (Hagedorn et Spindler, 2014). A ce jour, ils ne sont pas publiés.

Toujours dans un objectif de cryoconserver les oocytes des Gorgonidés, Lin *et al.* rapportent en 2014 une étude développant l'importance de la composition lipidique membranaire des différents stades d'oocytes soumis à +5 °C pendant des temps définis. Outre *J. juncea* et *J. fragilis*, une nouvelle espèce de Gorgonidés est étudiée, *Ellisella robusta*. Ils

démontrent ainsi que la température de transition de phase des lipides est plus basse pour les premiers stades d'oocytes, influençant la résistance aux basses températures (Lin *et al.*, 2014). Tsai *et al.* (2014) s'intéressent cette même année à la tolérance des sacs spermatiques de *J. juncea* et *J. fragilis* aux solutions cryoprotectrices. Ils utilisent l'ATP comme un indicateur de tolérance et concluent que le DMSO et le méthanol représentent les cryoprotecteurs les mieux tolérés par les sacs spermatiques.

En 2014 un protocole de cryoconservation des spermatozoïdes d'*Acropora digitifera* est publié par Ohki *et al.* (2014). Ce protocole utilise une combinaison de 4.9 M méthanol + 0.9 M saccharose avec une vitesse de refroidissement de 40 °C/min. Ces auteurs observent une nucléation à partir de -15 °C en présence de saccharose et à partir de -28 °C avec le mélange méthanol + saccharose.

Enfin, l'année 2014 a été l'occasion pour nous de publier nos premiers essais au travers deux publications, qui sont présentées dans les Chapitres 1 et 3 de la Partie II.

En 2015, Hagedorn *et al.* révèlent l'excrétion de tréhalose par les *Symbiodinium* sp. de clade C (mais de sous-clades variés) de *P. compressa*, *F. scutaria* et *P. damicornis* incubés dans les tissus adultes (faible quantité) et larvaires. Ces auteurs mettent même en évidence que le tréhalose constitue un attractant pour les larves de *F. scutaria* et une amorce à la symbiose. Le glycérol serait uniquement sécrété par les zooxanthelles lorsqu'elles sont en symbiose avec les cellules coralliennes. Les *Symbiodinium* sp. isolées des cellules animales produisent en continu du tréhalose mais peu de glycérol. Enfin, la tréhalase est retrouvée uniquement dans les tissus du corail.

Tsai *et al.* (2015a) publient à nouveau une étude sur la survie des oocytes d'*Echinopora* sp. après exposition aux cryoprotecteurs. Une concentration de 0.5 M de méthanol semble leur conférer la meilleure tolérance après une exposition de 8 h à +5 et 0 °C. Enfin ces auteurs ont produit cette même année une seconde publication dans laquelle ils rapportent la vitrification réussie des oocytes de *J. juncea* en utilisant la méthode Cryotop. Les oocytes ont été exposés à un mélange vitrifiant composé de 3.5 M propylène glycol + 1.5 M éthylène glycol + 2.0 M méthanol (à 5°C) (Tsai *et al.*, 2015b).

Enfin, pour cette année 2015 nous publierons une troisième publication présentée dans le Chapitre 4 de la Partie II.

III.2.2. - La cryo et les coraux...des prédispositions ?

Hagedorn *et al.*, révèlent dans leur publication de 2006, que le glycérol est naturellement produit par les symbiontes et donc métabolisé par le corail. La tolérance des cellules pour ce composé pourrait être ainsi avantageuse lors de son utilisation comme cryoprotecteur. D'autres composés aussi utilisés comme cryoprotecteurs, ont été identifiés dans le tissu corallien.

III.2.2.1. - Le rôle ambigu du glycérol

Le glycérol représente la forme majoritaire du carbone photosynthétiquement fixé par les zooxanthelles. Le glycérol est métabolisé par la respiration en glycérides (glycérol + AG). Les dinoflagellés ne produisent cet alcool qu'en situation de symbiose avec les cellules coralliennes. A l'état libre, le glycérol n'est pas produit (Muscatine, 1967 ; Hagedorn *et al.*, 2015). Il peut représenter 40 % et jusqu'à 82 % du carbone transféré vers les cellules animales (Muscatine, 1967 ; Gates et Edmunds 1999). Egalement, l'utilisation du glycérol peut être une source majeure pour la calcification des Scléactiniaires. Colombo-Pallotta *et al.* (2010) font notamment état de la place du glycérol dans le processus de calcification chez les coraux blanchis. Le glycérol serait une source externe d'énergie permettant de stimuler la calcification dans l'obscurité en l'absence de photosynthétats. D'autres auteurs décrivent à l'inverse l'effet négatif du glycérol sur la croissance corallienne (Al-Horani *et al.*, 2007 ; Colombo-Pallotta *et al.*, 2010). Les travaux de Suescun-Bolivar *et al.* (2012) indiquent que l'induction d'un stress osmotique augmente la synthèse de glycérol chez les *Symbiodinium sp.* en culture *in vitro* et ce jusqu'à 10 jours après le choc osmotique. Ce processus n'est pas unique aux *Symbiodinium sp.* et a été observé chez d'autres micro-algues (*Dunaliella sp.*) soumises à des concentrations élevées en glucides ou en sels (0.7 M NaCl). L'énergie allouée pour la synthèse de glycérol apparaît corrélée avec les performances photosynthétiques (Fig. 24) et la réduction du taux de division cellulaire (Suescun-Bolivar *et al.*, 2012). La production rapide de glycérol par les zooxanthelles pourrait être un moyen efficace de réguler les pressions osmotiques internes sur le court terme. Cependant, certains auteurs émettent des doutes sur la place réelle du glycérol dans l'osmo-régulation des larves et des colonies de *F. scutaria*. Les faibles quantités de cet osmolyte (0.86 mmol/kg de poids humide) ne permettraient pas d'influencer la balance osmotique (Yancey *et al.*, 2009 ; Hagedorn *et al.*, 2010b).

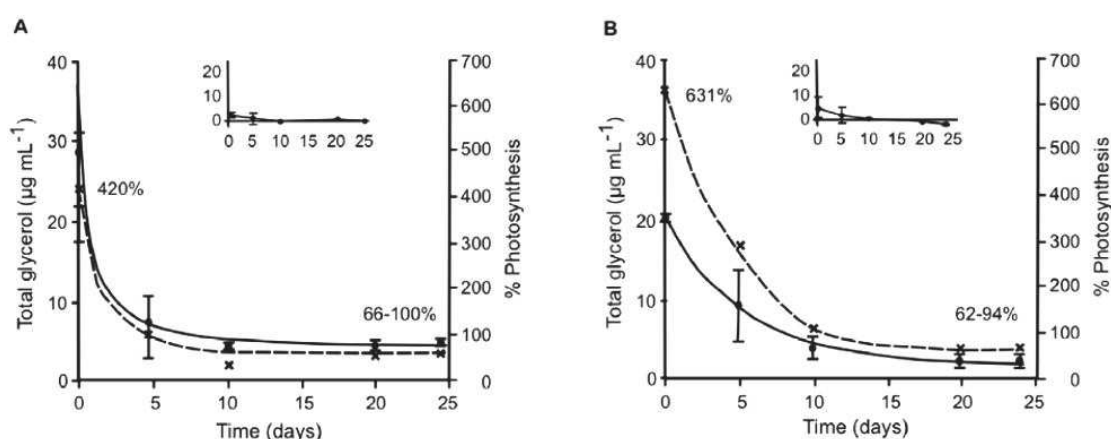


Figure 24 : Production photosynthétique nécessaire à la production de glycérol chez deux clades de *Symbiodinium sp.*
Source : Suescun-Bolivar *et al.*, 2012.

III.2.2.2. - La synthèse du tréhalose chez les Scléactiniaires

Le profil osidique des *Symbiodinium* sp. de clade C extraits des tissus de *P. scutaria*, *P. compressa* et *P. damicornis* a démontré une forte production de tréhalose pour les dinoflagellés issus des trois Scléactiniaires (Hagedorn *et al.*, 2015). Ces auteurs montrent également une production de saccharose très en deçà de celle du tréhalose (Tableau 3). D'après leurs expérimentations, la présence de tréhalose semblerait induire la symbiose entre les dinoflagellés et les larves ainsi que la métamorphose et la fixation des planulae. Si la production de glycérol par les *Symbiodinium* sp. s'apparente à une réponse à un stress, en revanche, Hagedorn *et al.* (2015) écartent la cause d'un stress dans l'induction de la production osidique. Les tissus adultes et larvaires contiennent également la tréhalase qui permet de métaboliser le tréhalose. Muscatine (1972) avait évalué chez *Agaricia agaricites* et *Millepora alcicornis* la production de glucose à des valeurs inférieures à 0.7 % de la production photosynthétique. Hagedorn *et al.* (2015) mesurent également pour *P. scutaria*, *P. compressa* et *P. damicornis* de faibles concentrations en glucose, inférieures à 9 μ M.

Source of <i>Symbiodinium</i>	Trehalose, μ M	Maltose, μ M	Sucrose, μ M	Glucose, μ M
<i>F. scutaria</i> (6 h, 10^7 /ml; n = 4)	650 \pm 90	24 \pm 18	53 \pm 16	< 9
<i>P. compressa</i> (24 h, 10^6 /ml; n = 3)	461 \pm 144	< 5	89 \pm 9	< 9
<i>P. damicornis</i> (24 h, 10^6 /ml; n = 3)	422 \pm 119	< 5	59 \pm 9	< 9

n = number of individual coral the *Symbiodinium* were extracted from.

Tableau 3 : Excrétion osidique par les *Symbiodinium* sp. hébergés dans trois espèces de Scléactiniaires.
Source : Hagedorn *et al.*, 2015.

III.2.2.3. - Des antioxydants tels que les acides aminés de type mycosporine

Ferrier-Pagès *et al.* (2007) ont observé la synthèse d'acides aminés de type mycosporine (MAA) chez plusieurs Scléactiniaires en réponse à un stress thermique et après une exposition aux radiations ultraviolettes (UVA et UVB). La production des MAA peut être également induite après un stress halin et par dessiccation (Yakovleva *et al.*, 2004 ; Oren et Gunde-Cimerman, 2007). Ces MAA ont pour rôle de réduire les dommages provoqués par les UV sur le compartiment cellulaire en limitant la dénaturation protéique et la production des ROS (Yakovleva *et al.*, 2004 ; Ferrier-Pagès *et al.*, 2007 ; Oren et Gunde-Cimerman, 2007). Ferrier-Pagès *et al.* (2007) ont rapporté une production en MAA plus importante pour les Scléactiniaires zooxanthellés pourvus du clade A et notamment chez un Pocilloporidé, *S. pistillata* (Fig. 25). Egalement, la synthèse semble être spécifique à l'espèce tant sur la diversité des MAA produits que sur les concentrations obtenues (Ferrier-Pagès *et al.*, 2007). Plus de 30 MAA seraient aujourd'hui identifiés parmi les Procaryotes et les Eucaryotes (Oren et Gunde-Cimerman, 2007) dont la mycosporine-glycine (Figs. 25 et 26) abondamment produite par les quatre Scléactiniaires testés par Ferrier-Pagès *et al.* (2007). Yakovleva *et al.*

(2004) rapporteront les propriétés antioxydantes de la mycosporine-glycine (MAA-Gly) chez le Scléactiniaire *Platygyra ryukyuensis* soumis à un stress thermique. La production de la MAA-Gly serait une réponse rapide des cellules coralliennes et des zooxanthelles contre le stress oxydatif (= antioxydant biologique), avant même la production des enzymes antioxydantes. Les protocoles de cryoconservation soumettent le compartiment cellulaire à des variations de température et à des solutions de CPA potentiellement toxiques. La photosynthèse des *Symbiodinium* sp. mais également l'activité des cellules coralliennes peuvent être impactées par de tels traitements. Ces MAA pourraient être envisagées dans la composition des solutions cryoprotectrices afin de limiter la production et l'impact des ROS pendant et après traitement.

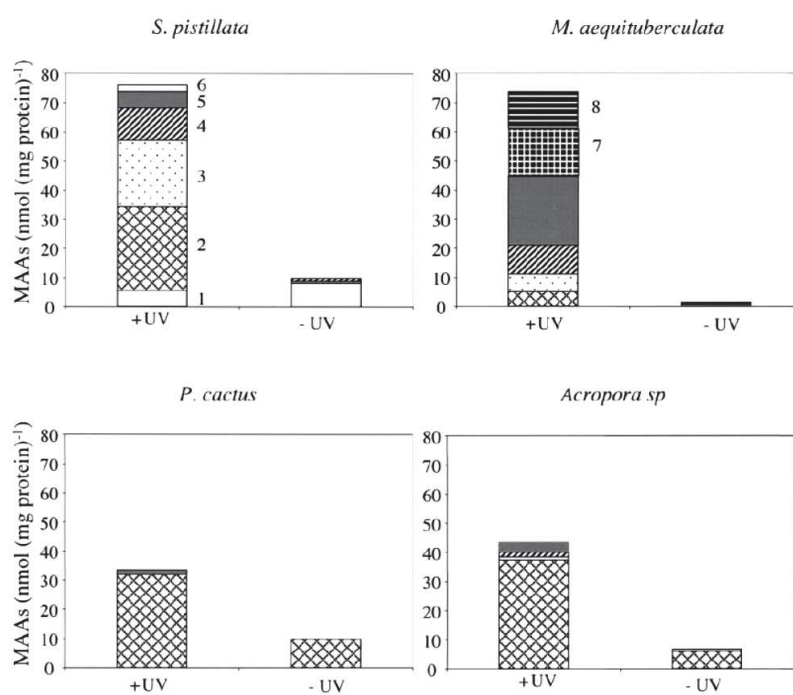


Figure 25 : Différences de productions des MAA entre quatre Scléactiniaires 14 jours après incubation à 27°C (Test : +UV ; Témoin : -UV). 1 : Palythine-serine-sulfate ; 2 : Mycosporine-glycine ; 3 : Shinorine ; 4 : Porphyra-334 ; 5 : Palythine ou Palythine-serine ; 6 : Mycosporine-NMA:serine ; 7 : Usujirene ; 8 : Palythene.
 Source : Ferrier-Pagès et al., 2007.

L'effet de solution est également identifié parmi les possibles dommages de la cryoconservation. Les MAA sont connus pour leur rôle osmotique chez certains micro-organismes comme les cyanobactéries exposées à des environnements hypersalés (Oren et Gunde-Cimerman, 2007).

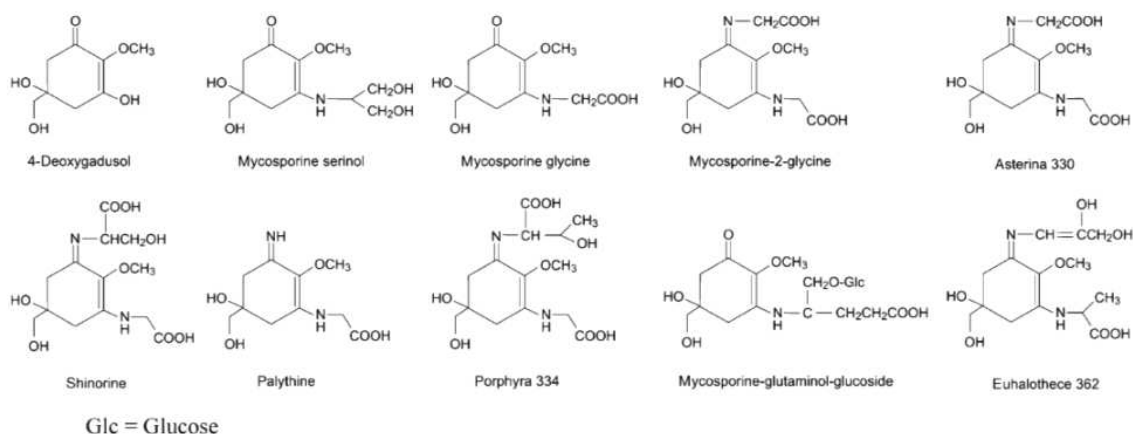


Figure 26 : Formules développées des mycosporines et des acides aminés de type mycosporine.
 Source : Oren et Gunde-Cimerman, 2007.

III.2.2.4. - La glycine bêtaïne, un osmolyte prometteur

Parmi les osmolites, le DMSP et la glycine bêtaïne (GlyB) sont des synthétats dominants pour les endosymbiontes de *P. damicornis* et de *F. scutaria* (Yancey *et al.*, 2009). Ces osmorégulateurs sont également synthétisés chez les bactéries, les micro-algues marines et les animaux et plantes terrestres (Cleland *et al.*, 2004 ; Hill *et al.*, 2010). La glycine bêtaïne est un acide aminé méthylé qui représenterait chez certaines espèces comme *P. damicornis* plus de 90 % des solutés avec 69 mmol/kg du poids humide (Yancey *et al.*, 2009 ; Hagedorn *et al.*, 2010b) ou 12 - 204 mmol/kg de tissu (Hill *et al.*, 2010). En plus des actions de répulsion et d'attraction de certains corallivores, cet osmolyte permettrait de préserver la stabilité de l'activité photosynthétique, de limiter la dénaturation des protéines et de maintenir les fonctions membranaires contre les variations de température, les hausses de salinité, de limiter les dommages liés au stress osmotique, de protéger la polymérisation des microtubules de la dénaturation par l'urée et de limiter le stress lumineux produit par l'action des UV (Yancey *et al.*, 2009 ; Hill *et al.*, 2010). Toutes ces actions de protection sont similaires aux propriétés protectrices des solutés cryoprotecteurs. Cleland *et al.* (2004) ont démontré l'action cryoprotectrice de la GlyB (à 6 %) lors de la congélation des espèces bactériennes *Haloferox volcanii* et *Halobacterium salinarum*.

III.2.2.5. - La place des composés sulfurés

Le DMSP

De fortes concentrations de diméthylsulfoniopropionate (DMSP) particulaire (0.7 - 10.0 μm) de l'ordre de 100 à 400 mM ont pu être détectées dans les algues marines et les dinoflagellés (Sunda *et al.*, 2002). Broadbent *et al.* (2002) détermineront des concentrations en DMSP entre 21 et 3831 fmol/zooxanthelle. Chez les Scléactiniaires symbiotiques, le DMSP représente entre 0.5 et 3.0 mmol/kg du poids humide (Yancey *et al.*, 2009). Broadbent *et al.* (2002) décrivent les plus fortes concentrations en DMSP dans les colonies d'*Acropora formosa* jusqu'à 2831 fmol par cellules (Tableau 4). Le mucus du corail contient entre 1 226 nM pour *P. damicornis* et 25 443 nM pour *Acropora formosa* (Broadbent et Jones, 2004). Ce composé organo-sulfuré est connu pour son action cryoprotectrice chez certaines algues

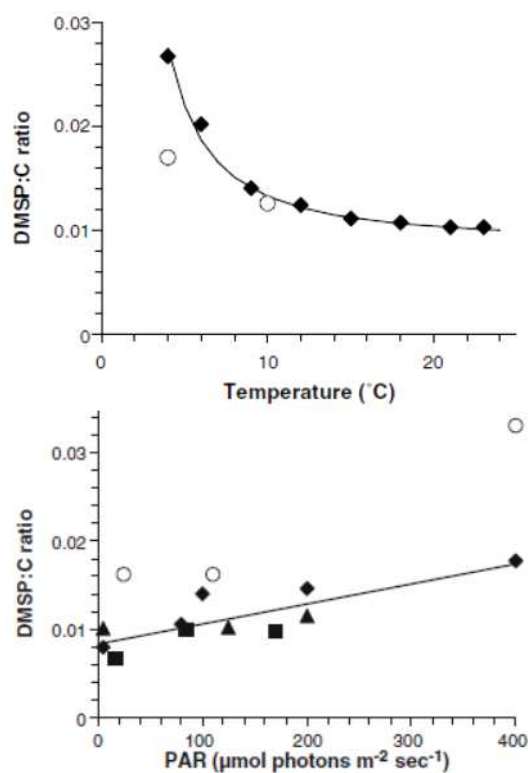


Figure 27 : Production de DMSP chez *Emiliana huxleyi* en fonction de la température et de l'irradiance.
Source : Stefels *et al.*, 2007.

polaires (Simo *et al.*, 1998 ; Stefels, 2000). Les qualités osmolytiques du DMSP particulaire et dissous préservent ces micro-algues de la dessiccation en leur offrant une résistance aux situations de saumure dans les glaces arctiques. A l'opposé des conditions polaires, les coraux sont considérés parmi les plus gros producteurs marins de DMSP (Yancey *et al.*, 2009 ; Raina *et al.*, 2013 ; Deschaseaux *et al.*, 2014).

Il apparaît même que les cellules d'*Acropora millepora* et *A. tenuis* sont directement impliquées dans la production de fortes concentrations de DMSP (jusqu'à 1.7 nmol/mm²) et ce, en l'absence de zooxanthelles (Raina *et al.*, 2013). La production de DMSP est identifiée comme une protection contre les radiations ultraviolettes (> 1 000 µmol/m²/s) (Fig. 27) ainsi que pour son action antioxydante en réagissant rapidement avec le radical hydroxyl (-OH[•]) (Sunda *et al.*, 2002 ; Stefels *et al.*, 2007).

L'acrylate

La dégradation du DMSP par la DMSP-lyase va entraîner la formation de l'acrylate et du DMS. L'acrylate est donc naturellement présent dans les cellules coralliennes des Scléactiniaires zooxanthellés. La toxicité de l'acrylate et de ses dérivés est connue notamment chez les poissons et invertébrés marins (Staples *et al.*, 2000). L'acrylate a également des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Stefels *et al.*, 2007 ; Raina *et al.*, 2013). A l'occasion de stress thermiques, son action semble être essentielle pour lutter contre la production du radical hydroxyl ainsi que des autres ROS (Raina *et al.*, 2013). L'acrylate a enfin été reporté comme un moyen de défense des micro-algues contre les brouteurs.

Le DMS

Les concentrations en DMS relevées dans les zones récifales figurent parmi les plus élevées (plus de 18 000 nM) à ce jour enregistrées dans l'environnement marin (Broadbent et Jones, 2004). Le DMS se comporte comme un antioxydant et son oxydation va conduire à la formation de deux autres antioxydants, le DMSO et le MSNA. L'acrylate et le DMS sont 20 à 60 fois plus réactifs au radical hydroxyl que le DMSP. Seul le DMS peut traverser les membranes et protéger ainsi les lipides des réactions de peroxydation (Sunda *et al.*, 2002). Ces composés seront produits particulièrement lorsque le corail sera en situation de stress (Broadbent et Jones, 2004).

Le DMSO

Le DMSO est le plus hydrophile des composés sulfurés. L'oxydation du DMS en DMSO semble être réversible grâce à des DMSO-réductases en conditions aérobiques et anaérobiques (Simo *et al.*, 1998 ; Stefels *et al.*, 2007) ou par une hydrolyse du DMSP suivi d'une réduction en DMSO (Simo *et al.*, 1998). L'oxydation sous la forme DMSO est particulièrement effective dans les eaux de surface, abondamment éclairées. L'action cryoprotectrice du DMSO intracellulaire des micro-algues présentes dans la glace de mer a été mentionnée mais son mode d'action demeure hypothétique de par les faibles concentrations mesurées (0.3 pg/cellules Simo *et al.*, 1998) et les investigations limitées.

Species	Location	Number of samples	DMSP (fmol cell ⁻¹)	DMSP (μmol cm ⁻³ cell volume)	DMSP (nmol cm ⁻²)
Corals					
<i>Pocillopora damicornis</i>	NBR	25	99 ± 59	181 ± 114	126 ± 168
	KR	75	179 ± 66	296 ± 110	56 ± 18
	OTR	26	89 ± 47	158 ± 83	43 ± 14
<i>Acropora formosa</i>	NBR	113	235 ± 113	419 ± 220	330 ± 174
	KR	5	641 ± 78	1193 ± 217	533 ± 157
	NBR (bl.)	5	436	673	572
<i>Acropora palifera</i>	NBR (unbl.)	5	171	356	237
	NBR	3	2831 ± 635	5968 ± 984	3842 ± 1237
	OTR	60	3831 ± 1476	7590 ± 2829	3538 ± 1349
<i>Lobophytum</i> sp.	OI	2	43 ± 13	72 ± 22	70 ± 27
<i>Favites</i> sp.	OTR	1	21	36	NR
<i>Acropora pulchra</i>	OTR	10	40 ± 8	81 ± 28	34 ± 17
Cultures					
<i>Tridacna squamosa</i>	Cultured	1	116	NR	NR
<i>Lobophytum compactum</i>	Cultured	1	285	NR	NR
<i>Cassiopeia xamachina</i>	Cultured	1	48	NR	NR
<i>Zoanthus</i> sp.	Cultured	1	164	NR	NR

NBR=Nelly Bay Reef, KR=Kelso Reef, OTR=One Tree Reef, OI=Orpheus Island. bl.=bleached colonies, unbl.=unbleached colonies; NR=No Result

Tableau 4 : Concentrations en DMSP chez 6 espèces d'Anthozoaires et 4 cultures de zooxanthellae provenant de la Grande Barrière de Corail.

Source : Broadbent *et al.*, 2002.

Chapitre 4

Introduction à la biologie corallienne

Mémoires
sur
différentes parties
des
Sciences et Arts
M. Jean Etienne Guettard,
de l'Académie Royale des Sciences
PARIS
1770

de cette classe : on n'a peut-être jamais autant varié de sentiment par rapport à la nature & à la formation d'aucun corps, qu'on a varié sur celles des coraux & de ses congénères; comme par leur forme, ils ont quelque rapport avec les plantes; comme par leur dureté, ils tiennent en quelque sorte de la pierre, on a voulu, les uns qu'ils fussent des pierres qui végétaient, les autres que ce fut des plantes pierreuses : quoique l'une ou l'autre de ces opinions eut quelque chose de révoltant, il semble qu'on a été moins révolté de placer ces corps avec les plantes qu'avec les pierres. Ce dernier sentiment a eu des adversaires multipliés, & qui prenoient un ton décifif, comme s'ils avoient eu des idées plus claires, plus nettes, plus certaines sur les propriétés de ces corps; l'idée de pierres qui avoient des semences, qui croissoient à la manière des

plantes, leur paroissoit aussi ridicule, que celle suivant laquelle les hommes étoient nés de pierres jetées par-dessus les épaules de deux vieilles personnes décrépites & incapables de renouveler le genre humain.

Le suc lapidifique ne circuloit pas dans la partie extérieure, dans l'écorce des coraux, dans la partie du **corail** qui étoit proprement la plante; mais il se déposoit dans la cavité intérieure de cette plante, qui n'étoit, en quelque sorte, qu'un tuyau plus ou moins ramifié; ce suc qui n'étoit qu'une espèce de fable très-fin & très-attenué, montoit par les vaisseaux de cette plante, ou étoit pompé par ses pores, & ensuite déposé dans la cavité intérieure de la plante; ce n'étoit seulement qu'une matière plus dure que celle qui forme le bois dans les arbres & dans les plantes ligneuses.

Le récif de corail
José-Maria de HEREDIA
(1842-1905)

*Le soleil sous la mer, mystérieuse aurore,
Éclaire la forêt des coraux abyssins
Qui mêle, aux profondeurs de ses tièdes bassins,
La bête épanouie et la vivante flore.*

*Et tout ce que le sel ou l'iode colore,
Mousse, algue chevelue, anémones, oursins,
Couvre de pourpre sombre, en somptueux dessins,
Le fond vermiculé du pâle madrépore.*

*De sa splendide écaille éteignant les émaux,
Un grand poisson navigue à travers les rameaux ;
Dans l'ombre transparente indolemment il rôde ;*

*Et, brusquement, d'un coup de sa nageoire en feu
Il fait, par le cristal morne, immobile et bleu,
Courir un frisson d'or, de nacre et d'émeraude.*

IV.1. - Classification phylogénétique des Scléractiniaux

IV.1.1. - Le sous-règne des Métazoaires

Le sous-règne des Métazoaires regroupe l'ensemble des organismes pluricellulaires Eucaryotes appartenant au règne Animal. Il s'agit d'organismes pourvus d'une certaine diversité de cellules différenciées et organisées en tissus et structures fonctionnelles telles que les organes. Les Métazoaires se caractérisent comme des organismes hétérotrophes, dépendant essentiellement des ressources autotrophiques d'origine photosynthétique. Parmi les schémas d'organisation classique, les critères ontogénétiques permettent de distribuer les organismes sous des groupes monophylétiques représentés par les embranchements. Ainsi, les Eumétazoaires (= « vrais Métazoaires ») se divisent en deux catégories, l'embranchement des Bilatériens d'une part et les organismes à symétrie radiaire d'une autre part incluant deux embranchements, celui des Cténares (ou Cténophores) et celui des Cnidaires (Fig. 28). La spécialisation des feuilletts embryonnaires, la différenciation cellulaire et la présence d'une cavité gastro-vasculaire constituent les autres caractères synapomorphes des Eumétazoaires.

Les Cnidaires sont considérés comme les premiers organismes Métazoaires dotés d'une véritable organisation tissulaire basée sur une structuration et une communication du compartiment cellulaire. Cnidaires et Cténares sont des organismes diploblastiques caractérisés par la présence de deux feuilletts embryonnaires représentés par l'ectoderme et l'endoderme, séparés par la mésogée. L'unique axe de polarité corporelle oral-aboral des Cnidaires apparaît similaire à l'axe dorso-ventral des Bilatériens (Finnerty *et al.*, 2004). Cependant, les Bilatériens diffèrent des embranchements précédents par une organisation non radiée et une disposition triploblastique, constituée d'un endoderme, d'un mésoderme et d'un ectoderme.

Les Spongiaires sont quant à eux pourvus d'une organisation cellulaire beaucoup plus primitive, souvent évoquée comme de simples regroupements cellulaires.

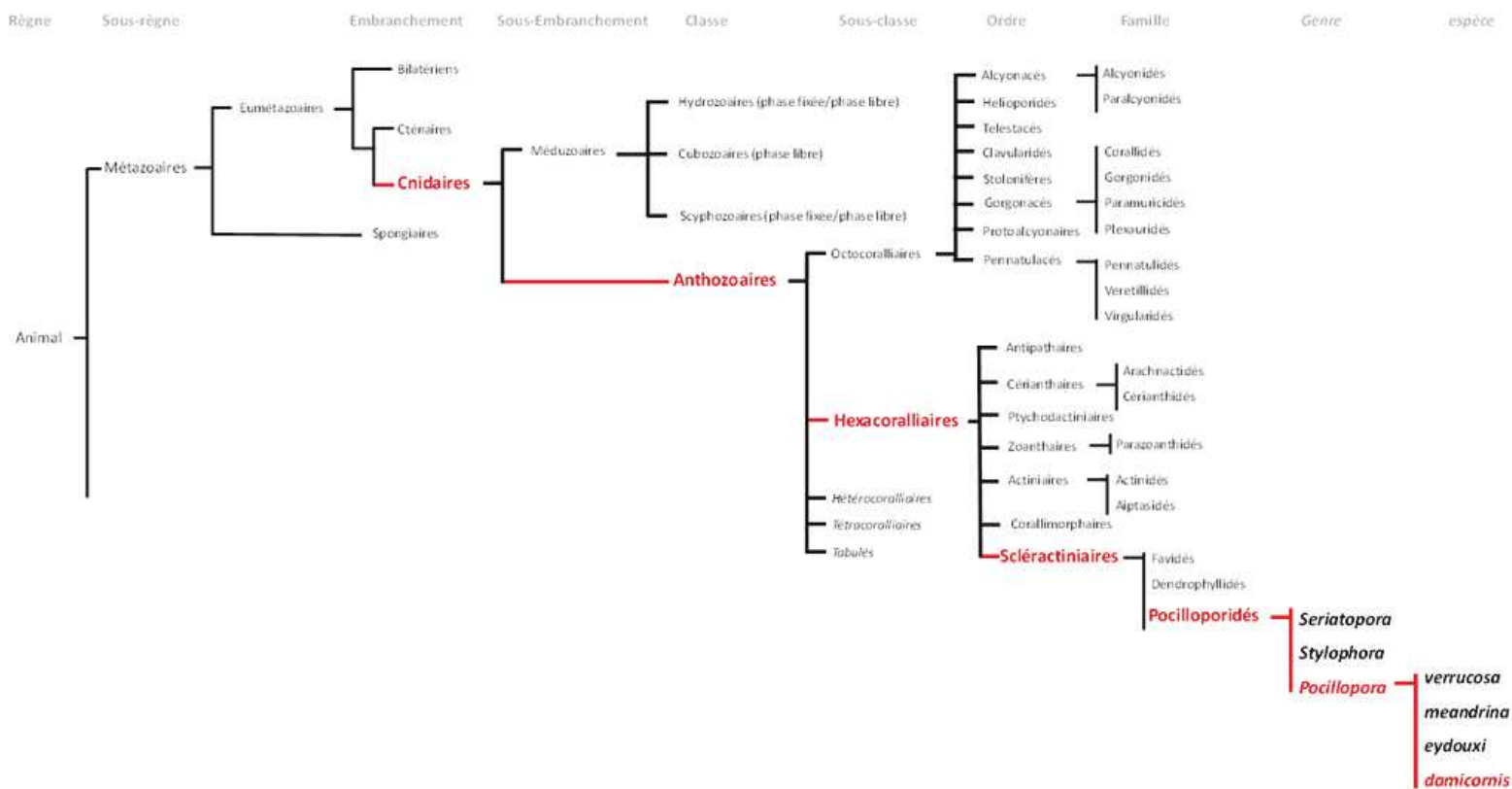


Figure 28 : Classification de *Pocillopora damicornis* selon les critères ontogénétiques.
 Source : D'après la classification phylogénétique simplifiée de Lecoindre et Guyader (2001).

IV.1.2. - Les embranchements, la place des Cnidaires

Les Cnidaires ont une organisation diploblastique à l'instar des Cténaïres et des Spongiaires, engendrant ainsi un groupe paraphylétique malgré leurs traits synapomorphiques. A ce niveau d'organisation, les Cnidaires (grec *knídê* : « ortie de mer », latin *ārīa/ārēa* : « surface, zone ») ont en commun la présence dans leurs tissus d'un type cellulaire spécifique à cet embranchement, les cnidocytes. Ces cellules spécialisées contenant une vésicule remplie de venin sont utilisées par les organismes pour de nombreuses fonctions (développées partie « Détails des types cellulaires les plus fréquemment mentionnés »), dont celles de la défense et de l'alimentation. Les Cubozoaires sont connus pour leur venin extrêmement puissant et mortel pour l'homme.

La proximité de la symétrie bilatérale et de la symétrie radiaire constitue également un autre caractère autapomorphique (ou apomorphique) des Cnidaires, représenté surtout par la bilatéralité interne des polypes d'Anthozoaires sur laquelle se superpose une organisation radiaire. Ce caractère bilatéral est visible au niveau du siphonoglyphe localisé dans le pharynx ainsi qu'au niveau des mésentères internes, sur les cloisons des entéroïdes (Finnerty *et al.*, 2004). Les larves ou planulae s'organisent aussi autour d'une organisation bilatérale (Finnerty *et al.*, 2004). Des cas de bilatéralité externe sont enfin observés sur des polypes de l'ordre des Antipathaires. L'ouverture unique de la cavité gastro-vasculaire combinant l'ingestion et l'excrétion est aussi un caractère propre aux Cnidaires. Parmi les autres critères distinctifs de

cet embranchement, doit également être mentionnée la production de planulae ciliées compétentes et organisées avec un ectoblaste et un endoblaste.

Les Cnidaires et les Cténares étaient autrefois regroupés sous le même embranchement, les Coelentérés. Cet embranchement caractérisait des organismes métazoaires diploblastiques à symétrie radiaire et pourvus d'une cavité digestive centrale (le coelentéron donnant son nom à l'embranchement) et de canaux de communication afférents. Les différences importantes d'organisation entre les Cnidaires et les Cténares ont conduit à les dissocier par la suite et jusqu'à ce jour selon deux plans d'organisation bien distincts.

IV.1.3. - Quatre classes dont celle des Anthozoaires

L'embranchement des Cnidaires se subdivise en quatre classes, dont trois d'entre-elles (les Hydrozoaires, les Scyphozoaires et les Cubozoaires) appartiennent au sous-embranchement des Méduzoaires. La dernière classe regroupe les Anthozoaires (Fig. 28).

Les quatre classes de Cnidaires se différencient par l'importance des stades libres (méduse) ou fixés (polype) dans le cycle de vie des organismes (Fig. 29). Les Hydrozoaires (grec *húdrios/ húdôr* : « eau », grec *zôon* : « animal ») et les Scyphozoaires (grec *skýphos* : « coupe ») possèdent les deux phases libre et fixe, seule la durée de ces phases diffère entre ces deux classes. Les Hydrozoaires ont des stades fixes et mobiles de temps équivalents, contrairement aux Scyphozoaires où la phase libre est beaucoup plus longue. Chez certains Scyphozoaires comme *Pelagia noctiluca*, la phase fixe n'existe pas. Les Cubozoaires (grec *kúbos* : « dé, cube ») ne produisent qu'une phase mobile. Les trois classes de Méduzoaires se distinguent également par le mode de production des formes méduses. Ainsi, chez les Hydrozoaires, c'est le bourgeonnement qui domine, les Scyphozoaires produisent des éphyrules après strobilation et scissiparité enfin c'est par la voie de la métamorphose que le stade méduse est produit chez les Cubozoaires. Chez les Anthozoaires (grec

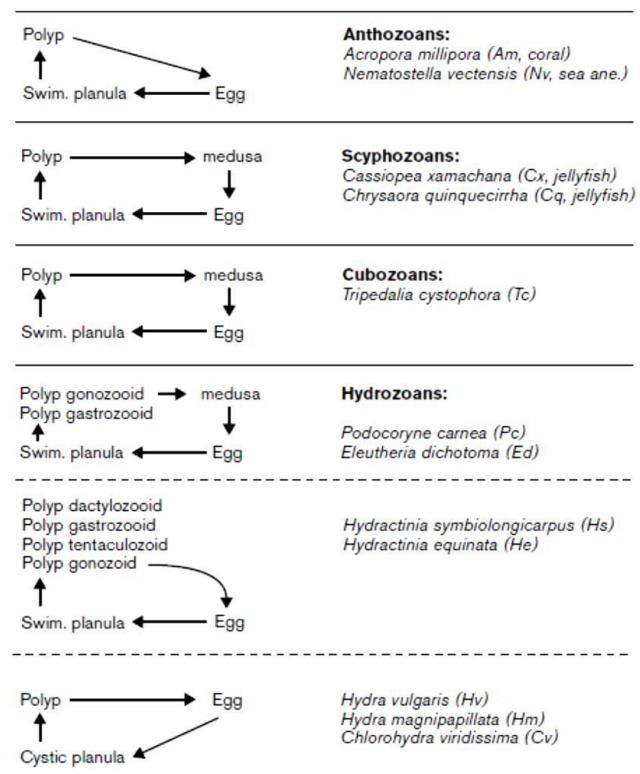


Figure 29 : Caractérisation des quatre classes des Cnidaires en fonction des stades libres et fixés.
Source : Galliot, 2000.

ánthos : « fleur »), c'est la forme fixe qui domine, représentation de la forme adulte de l'animal et capable de reproduction sexuée et asexuée. Cette classe n'a conservé de sa forme libre que le stade larvaire mobile et de symétrie bilatérale (planula ciliée) avant une métamorphose et une fixation en un polype primaire de symétrie radiale. Le stade méduse ayant complètement disparu. La domination, voire la disparition, de la phase fixe ou de la phase libre apparaît comme un trait évolutif des classes par rapport au caractère ancestral qui alternait de façon équivalente les deux phases.

Ces quatre classes sont enfin caractérisées par leur mode de vie solitaire (formes libres des Méduzoaires et formes fixées de certains Anthozoaires) ou colonial (formes fixées pour un certain nombre d'espèces chez les Hydrozoaires, Scyphozoaires et Anthozoaires).

La classe des Anthozoaires est constituée d'organismes exclusivement polyploïdes (Daly *et al.*, 2007). Cette classe constitue, à l'instar des Méduzoaires, un groupe monophylétique (Daly *et al.*, 2007) et se trouve dotée de plusieurs caractéristiques autopomorphiques (ou apomorphiques) représentées par l'actinopharynx, le siphonoglyphe et les mésentéries (Daly *et al.*, 2007). A noter que certains auteurs considèrent le siphonoglyphe comme une apomorphie de l'embranchement des Cnidaires.

IV.1.4. - Deux sous-classes importantes

La classe des Anthozoaires se divise en cinq sous-classes dont trois éteintes et retrouvées sous forme fossile (Tabulés, Tétracoralliaires, Hétérocoralliaires). Les Hexacoralliaires et les Octocoralliaires sont identifiés comme étant les deux dernières sous-classes encore représentées aujourd'hui dans le monde marin.

Les Tabulés et les Tétracoralliaires (ou les Rugueux) ont constitué les principaux représentants des coraux constructeurs de récifs à l'ère Primaire. Ces deux sous-classes sont apparues à l'Ordovicien (~500 millions d'années) et ont complètement disparu pendant l'extinction massive Permien / Trias (~250 Ma) qui représente la limite entre le Paléozoïque (l'ère Primaire) et le Mésozoïque (l'ère Secondaire).

Les Hexacoralliaires apparaissent au Trias moyen (~245 Ma) avec une prolifération importante pendant le Jurassique (~200 Ma). Cette nouvelle sous-classe remplace alors les Tabulés, les Tétracoralliaires et les Hétérocoralliaires après leur extinction. Les nombreuses perturbations biologiques ont conduit à de nombreuses évolutions sur la répartition et la diversité des espèces au niveau global. Certaines espèces rencontrées aujourd'hui sont apparues à partir de l'Oligocène (~30 Ma). L'origine des Hexacoralliaires reste incertaine au regard des compositions squelettiques très différentes, l'aragonite étant le composant minéral majeur chez les Hexacoralliaires alors que la calcite prédomine dans le squelette des Tétracoralliaires.

Les ordres appartenant aux Octocoralliaires (ou Alcyonaires) et aux Hexacoralliaires (ou Zoanthaires) sont répartis en fonction de leur symétrie, respectivement symétrie octoradiée (symétrie d'ordre huit ou multiple de huit) ou symétrie hexaradiée (symétrie d'ordre six ou multiple de six). Ces symétries sont visibles sur certains éléments tissulaires tels que les mésentères et dans leurs prolongements les tentacules mais aussi quantifiables sur les éléments squelettiques comme les septes et les côtes.

Les appellations « coraux durs » versus « coraux mous » sont souvent employées pour caractériser respectivement les Hexacoralliaires et les Octocoralliaires. La plupart des espèces d'Octocoralliaires ne sont pas dotées de squelette calcaire comme les Hexacoralliaires. Les tissus mous sont soutenus et rigidifiés grâce à la présence de spicules calcaires (ou sclérites). Toutefois, on peut noter que certains ordres parmi les Octocoralliaires tels que les Stoloniphères avec *Tubipora musica*, les Hélioporidés avec *Heliopora coerulea* ou les Alcyonacés avec *Corallium rubrum*, présentent des espèces capables d'édifier de véritables squelettes calcaires. Les Octocoralliaires possèdent enfin des tentacules dont les ramifications ont l'apparence de plumes, décrites sous le nom de pinnules, caractère absent chez les Hexacoralliaires.

IV.1.5. - L'ordre des Scléactiniaires

Au travers l'ordre des Scléactiniaires (grec *sklēros* : « dur » et grec *aktis, -inos* : « rayon »), les Hexacoralliaires concentrent un nombre important d'espèces capables de bio-accumuler le carbonate de calcium du milieu environnant en un exosquelette calcaire extrêmement résistant. Les Scléactiniaires (ou madréporaires = colonie mère du grec *madre* : « mère » et grec *poros* : « trou ») sont ainsi connus comme coraux « hermatypiques » (grec *hérma* : « récif » et grec *typoun* : « fonder ») ou coraux « constructeurs de récifs ». Les estimations portent entre 650 et 835 espèces de coraux constructeurs (Knowlton, 2001 ; Salvat 2015) fournissant un support de vie à 1 - 9 millions d'autres espèces (Knowlton, 2001). La base d'un récif corallien repose sur l'édification et l'accumulation de ces squelettes coralliens offrant un support de fixation et de croissance à la faune fixée.

La classification des Scléactiniaires suit une clé dichotomique bien définie concentrant un certain nombre de critères permettant de distinguer les familles puis les genres et enfin les espèces. L'identification des Scléactiniaires est ainsi basée sur l'organisation squelettique de la colonie (constituée d'un ou plusieurs polypiérites) en s'intéressant d'abord à l'aspect général de la colonie jusqu'à l'observation d'éléments spécifiques du calice (Fig. 30) :

Forme générale de la colonie :

- Etat libre ou fixé de la colonie,

- Forme de la colonie (arborescente, buissonnante, colonnaire, digitée, encroûtante, folliacée, laminaire, massive, tabulaire, turbinée ...),
- Colonies branchues (porosité/densité, diamètre des branches, alignement régulier/non régulier, ramifications, extrémités arrondies/coniques/effilées, ...),

Coenosteum (ou exothèque) :

- Aspect du coenosteum :
 - réticulé (uniforme et poreux),
 - sterome (uniforme et peu poreux),
 - ...
- Côtes (radiales/non radiales, lisses/dentelées, ...)
- Spinules (présence/absence, forme acérée/simple/fourchue, ...)

Corallite :

- Organisation des corallites (cérioïde, dendroïde, flabello-méandroïde, fungioïde, hydno-phoroïde, méandroïde, phacéloïde, plocioïde,...),
- Disposition des corallites (axial/radial, ...),
- Forme des corallites (apprimé, arrondi, conique, émergé, immergé, labial, nariforme, tubulaire, ...)
- Ouverture du corallite (biseauté, circulaire, droite, ovale, ...)
- Diamètre des corallites,
- Distance entre les corallites,
- Caractéristiques du mur des corallites (poreux, spinules, ...)

Eléments du calice :

- Columelle (présence/absence, développée/peu développée, longueur,...),
- Septes (disposition, épaisseur, hauteur régulière/irrégulière, ...),
- Lobes paliformes,
- Bourgeonnement intra-tentaculaire ou inter-tentaculaire (=extra-tentaculaire).

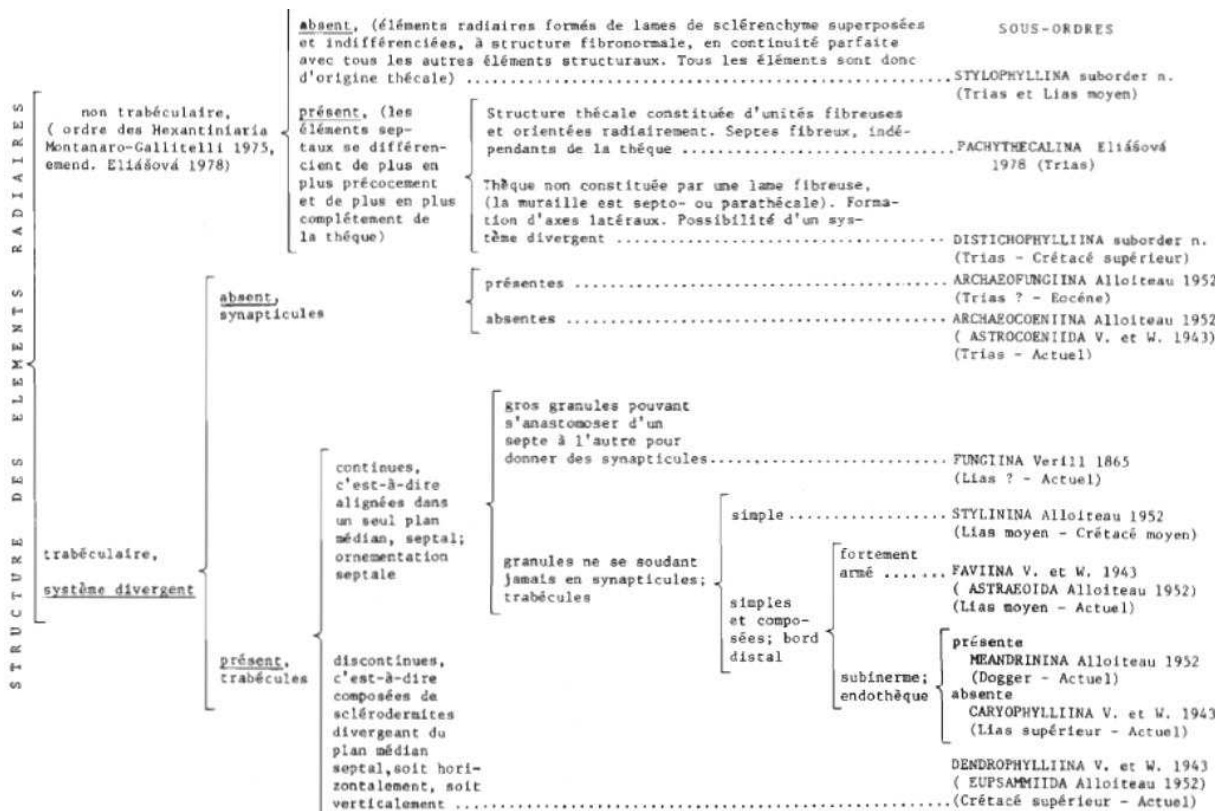


Figure 30 : Exemple de classification de Madréporaires élaborée à partir des éléments radiaires.
Source : Beauvais, 1980.

Egalement, l'observation de certains types cellulaires tels que l'examen des cnidocytes et plus finement encore, des cnidocystes apporte une aide précieuse à l'identification des Scléractiniaires. Le groupe des cnidocytes rassemble en effet jusqu'à 25 types de nématocystes (ou cnidocystes) identifiés et structurellement différents.

La génomique permet aussi d'apprécier la proximité génétique entre les espèces par la construction d'arbres phylogénétiques (Fig. 31). Différentes approches existent, telles que le critère de distance illustrant les degrés de différences entre deux entités, les méthodes de parcimonie restreignant les bruits ou substitutions (mutations, insertions, ...) et minimisant de ce fait le processus évolutif et enfin les méthodes de vraisemblance comptabilisant les substitutions en fonction du temps.

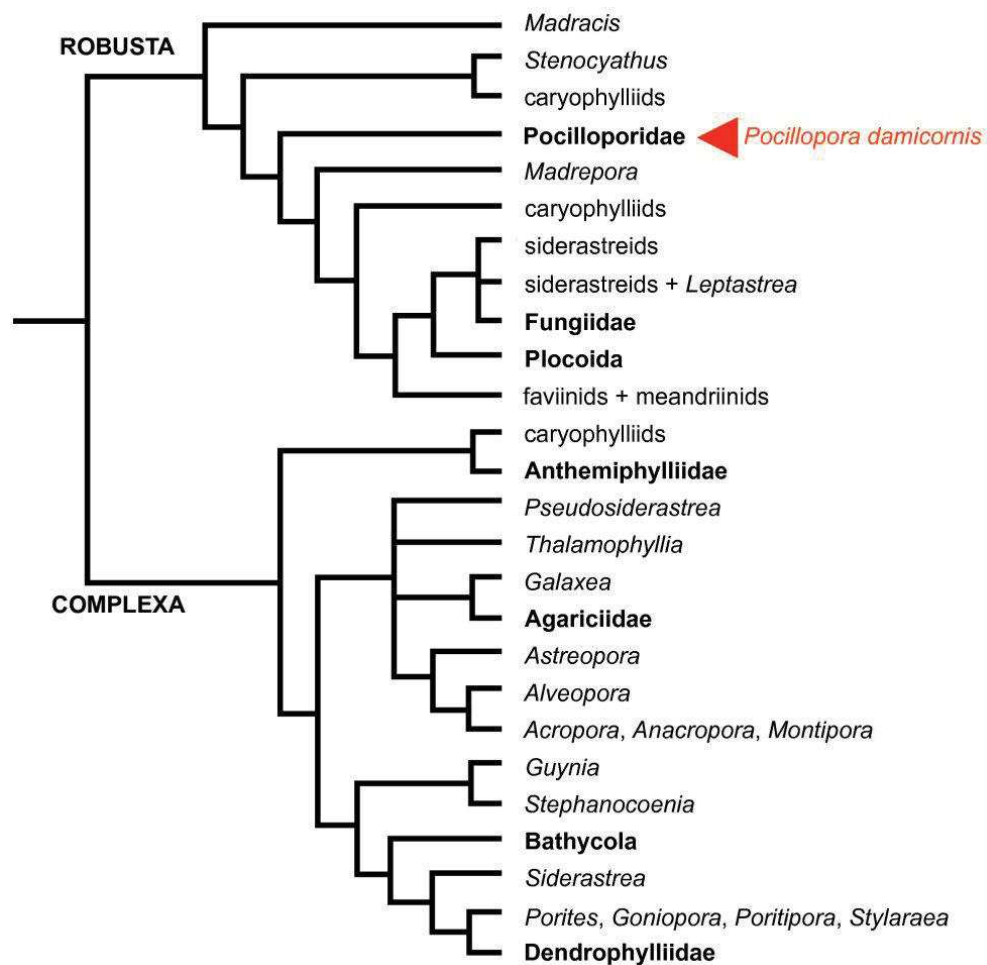


Figure 31 : Arbre phylogénétique construit à partir des données transcriptomiques illustrant les distances entre les familles de Scléactinaires dites complexes ou robustes, confrontées à un environnement stressant (méthode de parcimonie).

Source : Taylor-Knowles et al., 2011.

IV.1.6. - La Famille, le Genre et l'espèce, la place de *Pocillopora damicornis*

L'espèce *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) appartient à la famille des Pocilloporidés (Fig. 32). La famille des Pocilloporidés regroupe trois genres (*Pocillopora* sp., *Seriatopora* sp. et *Stylophora* sp.). Le genre *Stylophora* sp. (grec *stýlos* : « pilier » et grec *pherô* : « porter ») doit son nom à la columelle centrale d'aspect styloforme et peu représentée voire absente chez le genre *Pocillopora*. Le genre *Seriatopora* sp. (latin *seriatus* : « ordonné » et latin

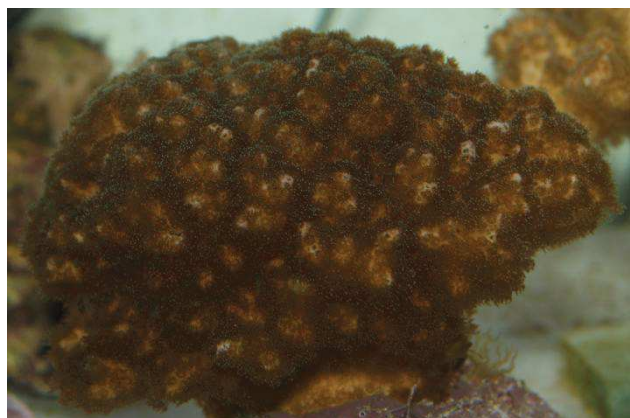


Figure 32 : Colonie de *Pocillopora damicornis*.

porus : « pore ») retranscrit à travers son nom l'organisation linéaire des calices suivant l'axe des branches, à la différence des genres *Stylophora* sp. et *Pocillopora* sp. .

Le genre *Pocillopora* sp. (latin *pocillum* : « petite coupe » et latin *porus* : « pore ») se différencie par des polypiérites en forme de coupe. Ce genre regroupe un certain nombre d'espèces reconnaissables pour les protubérances squelettiques souvent qualifiées de verrues et qui portent les calices. Les colonies, généralement buissonnantes et denses, massives (Fig. 32) et/ou encroûtantes, sont organisées en branches ramifiées dont la forme dépend des conditions du milieu environnant. Le genre *Pocillopora* sp. regroupe 17 espèces qui vont être identifiées en fonction de la configuration branchiale et de la forme conique ou cylindrique de la partie apicale.

Le squelette de *P. damicornis* est dendritique (Wainwright, 1963). Les branches de l'espèce *P. damicornis* (latin *dama* : « cerf » et latin *cornum* : « corne ») ont une configuration sphérique légèrement comprimée et de diamètre plus ou moins épais selon l'hydrodynamisme et l'irradiance. Le genre *Pocillopora* sp. et plus généralement, la famille des Pocilloporidés se distingue par des calices considérés comme petits.

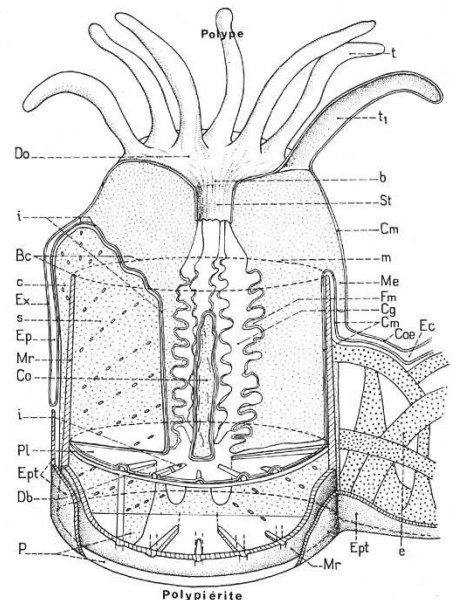
IV.2. - Organisation squelettique de *Pocillopora damicornis*

IV.2.1. - Les éléments squelettiques

IV.2.1.1. - Les polypiérites

Le polypier est constitué d'un exosquelette calcaire secrété par les polypes et pourvu d'un ou plusieurs polypiérites ou corallites. Il se distingue en deux parties (Fig. 33) :

- **une partie inférieure** : Elle est délimitée à sa base par le plateau basal. Elle est parfois définie comme le sommet du mur délimitant la cavité calicinale. Le plateau et la muraille forment une loge appelée le lumen. Le lumen peut être divisé transversalement par des lames calcaires formant l'endothèque. L'endothèque définit la partie interne du mur. La muraille est renforcée de l'intérieur grâce à la formation de septes. Les corallites



Représentation schématique d'un polype d'une forme coloniale, montrant les relations entre le polypiérite (en pointillés) et le squelette (en hachures). *b*, bouche; *Bc*, bord calicinal; *c*, côte; *Cg*, cavité gastrovasculaire; *Cm*, colonne murale; *Co*, columelle; *Coe*, coenosarcal; *Db*, disque basal; *Do*, disque oral; *e*, exothèque; *Ec*, espace coenosarcal; *Ep*, espace périmural; *Ept*, épithèque; *Ex*, exosarcal; *Fm*, entéroïdes (filaments mésentériques); *i*, invagination septale (à la partie inférieure du polype on a représenté en partie l'invagination septale recouvrant un septe à sa partie supérieure); *m*, mésentéroïdes; *Me*, mésentéroïdes externes; *Mr*, muraille; *p*, plateau basal; *Pl*, plancher; *s*, septe; *St*, stomodeum; *t*, tentacule (*t*₁, tentacule ouverte). (Les cassures des différents éléments du squelette ont été indiquées en traits hachurés).

Figure 33 : Schéma d'organisation d'un polype de Scléractiniaires coloniaux.

Source : Grassé et al., 1987.

constituent de petites murailles et restent « immergés » au niveau du coenosteum (Fig. 33).

La partie axiale du lumen est parfois constituée d'une formation squelettique, la columelle.

- **une partie supérieure** : Le calice est isolé ou monocentrique de petite taille de 0.8 à 3.0 mm. Les calices à l'extrémité des branches (les apex) sont souvent cérioïdes et de forme polygonale (Fig. 34). Ils sont séparés par un mur coenostal très fin de ~0.1 mm d'épaisseur (Brown *et al.*, 1983). Les calices du reste de la colonie sont généralement de configuration sub-cérioïde à plocoïde et de forme ovoïde ou circulaire. Les diamètres des calices plocoïdes sont plus importants que ceux des calices cerioïdes. L'espace calcaire qui se dessine entre les deux calices se nomme l'espace inter-caliculaire et peut être aussi qualifié de sillon inter-calicinal. La croissance du calice étire vers la lumière les tissus mous du polype, l'obligeant à construire un nouveau plancher basal. La croissance de *P. damicornis* est estimée à 5 cm/an (Wellington, 1980) bien que la biocrystallisation soit dépendante des performances individuelles et des conditions environnantes.

Par opposition à l'endothèque, la périthèque désigne la partie murale externe du calice. Il est l'assemblage du coenosteum et des côtes.

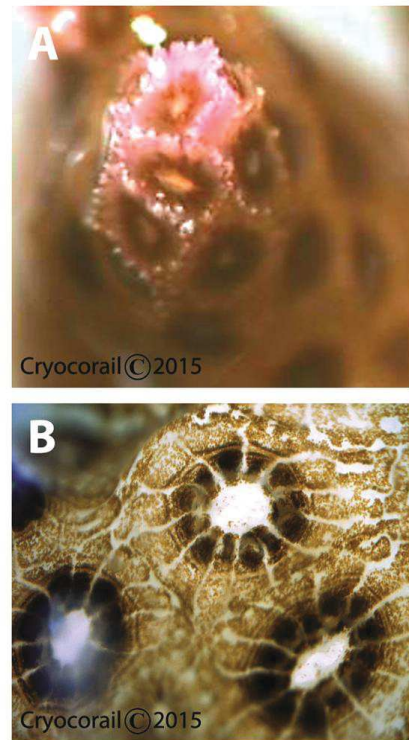


Figure 34 : Disposition cérioïde (A) et plocoïde (B) des calices de *Pocillopora damicornis*.

IV.2.1.2. - Le coenosteum

Le coenosteum, également défini comme l'exothèque ou l'épithèque, est une formation calcaire permettant de relier les thèques les unes aux autres chez les formes coloniales, par opposition aux coraux solitaires. D'après Sorauf (1972) il s'agit du seul élément longitudinal construit unilatéralement.

Chez *P. damicornis*, le coenosteum est visible entre les calices plocoïdes et présente l'apparence de fines granulations, bien que son aspect (taille, forme et densité) puisse être très variable en fonction des colonies d'une même espèce. L'épaisseur du coenosteum entre deux calices cérioïdes à l'extrémité apicale n'excède pas 0.3 mm. Si l'espacement s'accroît, un nouveau polype pourra alors être formé par bourgeonnement extra-tentaculaire (Wainwright, 1963). La production de nouveaux polypes n'est possible qu'au niveau des apex, seules parties croissantes des coraux hermatypiques. Sur les parties non croissantes telles que les

zones intermédiaires et basales des branches, l'augmentation de la section des branches de *P. damicornis* permet d'élargir l'espace coenostal entre les calices latéraux. Cet élargissement induit un isolement des calices devenant plocoides et de forme elliptique. Ces mêmes calices sont orientés de sorte que leur plus long diamètre soit aligné parallèlement à l'axe de la branche (Wainwright, 1963).

IV.2.1.3. - La thèque

La thèque aussi qualifiée de « muraille » est formée à partir d'extensions verticales ou longitudinales de l'ectoderme basal du polype. Elle apparaît après la formation des septes (Fig. 35). Comme ces derniers, elle est considérée comme un élément longitudinal de l'exosquelette des Scléactiniaires et présente une organisation interne bilatérale (Sorauf, 1972).

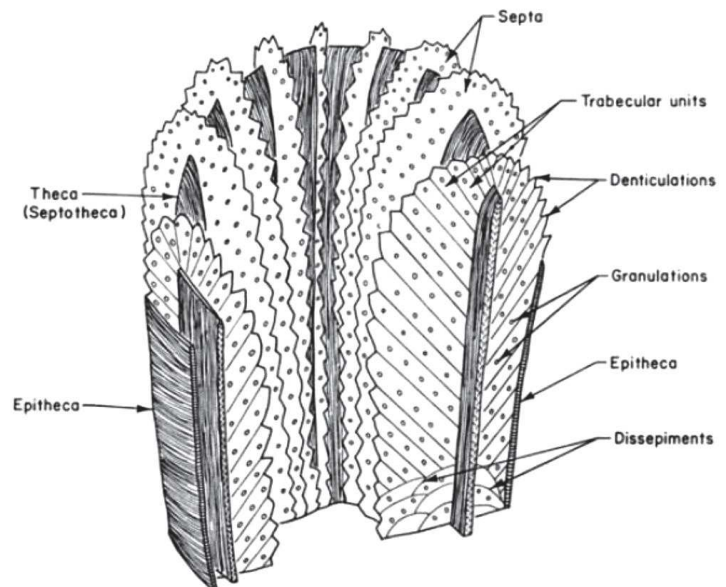


Figure 35 : Elements calcaires constituant la corallite.
Source : Sorauf, 1972.

IV.2.1.4. - Les septes

La taxonomie des Scléactiniaires utilise la microarchitecture des septes pour l'identification des taxons. La configuration des trabécules (Fig. 35 et 36) et encore plus finement l'alignement des sclérodermites, est spécifique à l'espèce. Les septes sont également connus comme les lames radiaires ou les éléments radiaires.

Les septes sont facilement identifiables à l'intérieur du calice par leur forme dirigée et découpée, ainsi que par leur disposition verticale, équidistante et radiaire. Constitués d'aragonite sphérolitique (Fig. 36), ces éléments sont formés à partir de l'ectoderme basal du polype. Les septes sont soudés

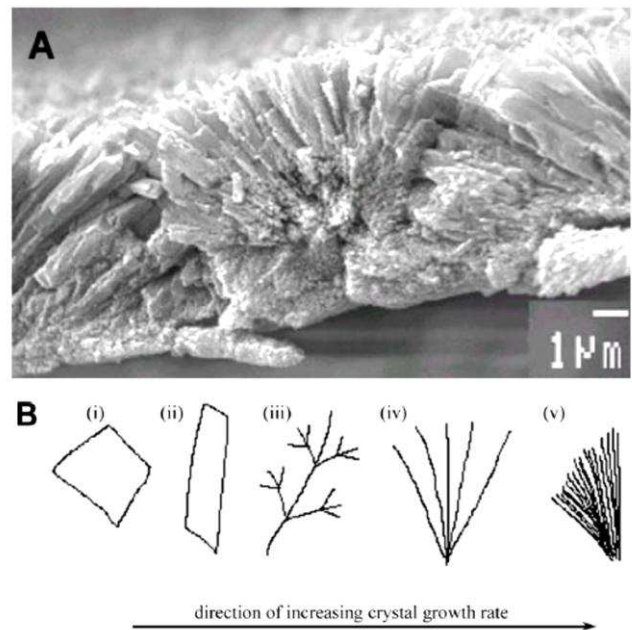


Figure 36 : Organisation des cristaux dans le squelette de *Porites lutea*.
A : Structures cristallines rayonnantes ou sphérolitiques. B : Croissance et évolution de la forme des cristaux (i) cubique, (ii) tabulaire, (iii) dendritique, (iv) sphérolitique grossier, (v) sphérolitique fin.
Source : Cohen et McConnaughey, 2003.

au plateau basal. Les lobes paliformes se développent dans la continuité des septes au niveau du centre du calice et constituent des formations plus imposantes que les septes. Les septes présentent une structure interne bilatérale et composent les éléments longitudinaux de l'exosquelette (Sorauf, 1972). Ils sont identifiés au travers des cycles caractérisant leur apparition dans le temps (Fig. 37). Ainsi chez *P. damicornis*, le premier cycle contient 6 septes davantage développés que les septes des cycles secondaire et ternaire. Les septes se prolongent vers l'extérieur du calice. Ces structures extra-calicinales constituent les côtes.

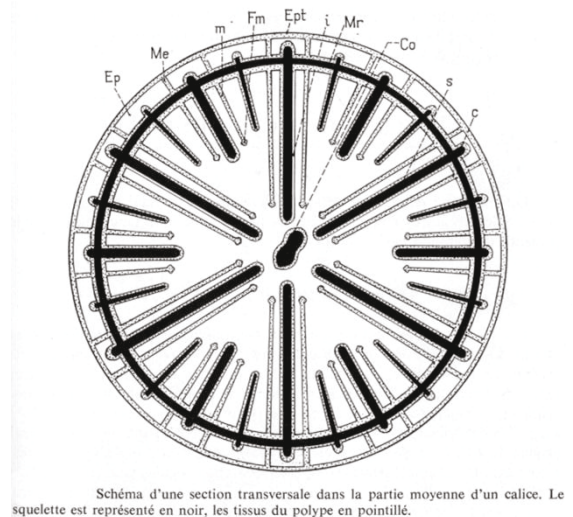


Figure 37 : Représentation schématique des cycles septaux d'un polype de Scléractiniaire.
 Source : Grassé et al., 1987.

IV.2.1.5. - Les épines squelettiques

L'agencement des structures squelettiques est dépendante des conditions environnementales. Ainsi, chez *P. damicornis*, l'espacement des épines squelettiques est variable. Les longueurs des épines fluctuent entre 55 et 120 µm pour un diamètre basal de 35 à 95 µm (Brown et al., 1983). Les épines composant l'extrémité des branches arborent une configuration fasciculée, tandis que les parties basales contiennent des épines aux surfaces lisses. Des épines courtes et resserrées témoignent d'une exposition à une courantologie ou un brassage important (Brown et al., 1983). Egalement, des ramifications sont observées sur les épines des régions costales et coenostales tandis que les épines des régions moins exposées prennent l'apparence de cônes (Brown et al., 1983).

IV.2.1.6. - La columelle

La columelle est une structure axiale des polypiérites. Elle est comparable à une hyper-croissance du plateau basal. Comme pour les septes, la columelle est un critère de détermination des espèces grâce aux ornements qu'elle porte ainsi que les formes qu'elle peut arborer : chicoracée, compacte, lamellaire, papilleuse, rudimentaire, saillante, spongieuse, styliforme, sublamellaire... . Chez *P. damicornis*, la columelle est très réduite voire absente.

IV.2.1.7. - Le plateau basal

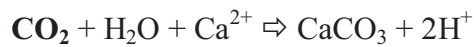
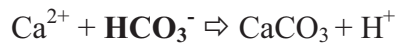
Le plateau basal ou plancher configure le disque basal qui constitue la première formation calcaire solidaire des six septes primaires ainsi constituée dans les 24 h précédant la fixation de la larve (Vandermeulen et Watabe, 1973). A partir de cette lame calcaire vont être édifiées les structures calcaires verticales du polypierite et notamment la thèque.

IV.2.2. - La squelettogenèse

En 1972, Sorauf distinguait le processus de biocristallisation de celui de la biominéralisation. La biocristallisation désignait les processus de formation externe de l'exosquelette se produisant au niveau de l'ectoderme basal du polype. La biominéralisation caractérisait l'imprégnation minérale ou le phénomène de cristallisation s'opérant à l'intérieur d'une membrane cellulaire ou d'un réseau comme chez les Mollusques (Sorauf, 1972). Aujourd'hui, les avancées techniques ont permis de décrire la capacité de calcification du corail comme un processus de biominéralisation. Estroff (2004) définit la biominéralisation comme l'étude des matériaux d'origine biologique et la compréhension des processus permettant leur formation (Allemand *et al.*, 2011). Le processus de minéralisation chez les coraux est considéré comme biologiquement contrôlé, bien que certains auteurs défendent aussi l'idée d'une minéralisation biologiquement induite.

Les Scléactiniaires se distinguent parmi les organismes calcifiant ayant un des taux de calcification les plus rapides de 2 à 6 kg CaCO₃/m²/an (Tambutté *et al.*, 1995 ; Tambutté *et al.*, 2007). Ceci est notamment dû à un flux de calcium important de l'ordre de 2.5 µmol/h tous les 3 - 4 cm de segments (Tambutté *et al.*, 1995). Les processus de calcification permettant la squelettogenèse se réalisent en dessous de l'ectoderme calcicoblastique, dans l'espace subcalicoblastique (Allemand *et al.*, 2011). Cet espace présente une largeur supérieure à 1 µm mais fluctuante dans une même journée. Les ions calcium Ca²⁺ provenant de l'eau de mer extérieure sont acheminés à travers les couches dermiques jusqu'à la surface externe du calcicoblaste (Goreau, 1959). Cet espace subcalicoblastique contient une matrice organique (MO) dense contenant une combinaison de protéines et de mucopolysaccharides. C'est au sein de ce milieu extracellulaire calcifiant (ECM : Extracellular Matrix) que se produirait la nucléation (Allemand *et al.*, 2011). La calcification est le produit de la réaction spontanée des ions Ca²⁺ et CO₃²⁻ en un précipité de carbonate de calcium CaCO₃ (Cohen et McConnaughey, 2003 ; Allemand *et al.*, 2011). En plus de l'ion carbonate, l'ion bicarbonate (HCO₃⁻) et le dioxyde de carbone (CO₂) sont également impliqués dans les processus de calcification. Le pH basique de l'océan induit une faible disponibilité de l'ion HCO₃⁻, induisant un ratio [CO₃²⁻]/[HCO₃⁻] très faible. L'apport du CO₂ provenant de l'activité photosynthétique des symbiontes semble donc constituer une source majeure pour la

calcification mais qui reste encore sujet à débats (Cohen et McConnaughey, 2003 ; Allemand *et al.*, 2011 ; Davy *et al.*, 2012). Les réactions qui s'opèrent sont les suivantes :



produit entre 40 à 60% de CaCO_3 (Allemand *et al.*, 2011)

Les éléments de base constituant le squelette sont appelés les sclérodermites constituées de fins cristaux ou de fibres d'aragonite et arrangés en trois dimensions. Les fibres d'aragonite ont un diamètre fluctuant entre 0.05 et 4.00 μm et un cristal d'aragonite peut grossir de 50 μm par an dans une eau à pH 8 (Cohen et McConnaughey, 2003). L'aragonite est la forme cristalline la plus stable parmi les trois polyformes (calcite et vaterite) du carbonate de calcium. L'agencement des cristaux est spécifique au taxon et permet une distinction entre les espèces (Cohen et McConnaughey, 2003). Les taux de calcification varient selon les régions squelettiques et l'espèce (Fig. 38, 39). Ainsi, les parties apicales de *P. damicornis* ont un taux de calcification 4 à 8 fois plus rapide que les régions latérales et basales (Brown *et al.*, 1983 ; Goreau, 1959) (Fig. 38). Egalement, les taux de calcification diffèrent en fonction de la forme du corail. Ainsi les coraux massifs et non branchus comme les Faviidés présentent des taux de calcification moindres que les Acroporidés davantage branchus (Goreau et Goreau, 1959).

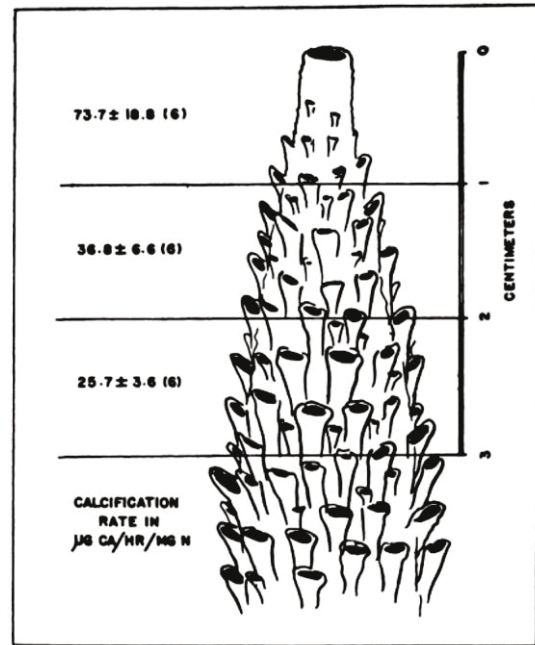


Figure 38 : Taux de calcification en fonction de la région squelettique d'*Acropora cervicornis*.
Source : Goreau et Goreau, 1959.

*Calcification rates in different parts of branching coral colonies, in $\mu\text{g Ca mg. N}^{-1} \text{hr}^{-1}$
Number of samples in brackets*

Species	Apical polyps of primary branches	Lateral polyps
<i>M. verrucosa</i>	11.8 ± 3.90 (9)	1.38 ± 0.50 (6)*
<i>P. compressa</i>	7.8 ± 1.70 (11)	1.55 ± 0.20 (5)*
<i>P. damicornis</i>	6.8 ± 2.65 (11)	1.31 ± 0.72 (6)*
<i>A. conferta</i>	8.2 ± 3.76 (10)	1.87 ± 0.92 (8)**

* Lateral polyps taken from base of branch.
** Apical polyps of secondary branches.

Figure 39 : Différences de calcification des polypes de Scléactiniaires.
Source : Goreau, 1959.

Les conditions environnementales influent également sur les performances de croissance. Le taux de calcification sera d'autant plus important en situation ensoleillée, plus faible pendant un taux nuageux et très lent dans l'obscurité (Goreau et Goreau, 1959). Le mode de déposition squelettique pour *P. damicornis* décrit par Le Tissier (1988) décrit une extension linéaire du corail uniquement visible sur les parties distales de la branche. La déposition apparaît plus importante en phase diurne sur les surfaces squelettiques sur lesquelles les cristaux fusiformes ont été déposés durant la phase nocturne. Enfin, c'est durant la phase nocturne que le milieu extracellulaire calcifiant sera synthétisé.

IV.3. - Anatomie corallienne

IV.3.1. - Le polype

D'une simple concrétion pierreuse aux orties de mer et pour aboutir finalement au règne Animal, l'identification des coraux a été fortement influencée par une botanique très développée et influente aux XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles. Même si la minéralogie a souvent remis en cause l'origine végétale du corail, celui-ci a malgré tout été longtemps considéré comme une plante marine. Les polypes étaient selon Marsigli en 1725, assimilés à des « fleurs de corail » dont les bords se divisaient comme des pétales (Cuvier, 1841). En 1727, Peyssonnel fût le premier à suggérer l'origine animale du corail. Cette idée très mal accueillie à l'époque par les hommes de sciences, fut reprise et confortée par Trembley en 1742 puis Baker en 1743 et enfin par les observations de Jussieu en 1741. La nature animale du corail a ensuite été évoquée dans un certain nombre d'ouvrages sous la plume d'illustres auteurs tels que Donati en 1750, Ellis en 1754 et enfin Linnaeus en 1759 (Cuvier, 1841). Dans la vingtième leçon de l'Histoire des Sciences Naturelles, Cuvier expose en 1841 le polype comme une classe du règne Animal dans laquelle les coraux « *étaient reconnus pour être une partie du corps de certains animaux composés* » (Cuvier, 1841).

Le mot polype dérive du latin *polypus* ou du grec *polýpous/ polýpodos*, signifiant littéralement en zoologie « de nombreux pieds ». Organisme pluricellulaire à tissus différenciés, hétérotrophe et benthique, le polype est aujourd'hui considéré comme un bionte appartenant au règne Animal et développant un mode de vie solitaire ou colonial. Il est caractérisé par une phase mobile à l'état larvaire grâce aux cils vibratiles. Chez les Anthozoaires, le polype peut conserver un état de mobilité pendant la phase adulte (Actiniaires). Il est sessile pour la majorité des Anthozoaires mais peut recouvrir une certaine mobilité à l'occasion d'événements exceptionnels (expulsion par Polyp Bail Out, reproduction asexuée par expulsion). Les polypes ont la particularité de bioaccumuler le carbonate de calcium allant de formes simples, les spicules ou sclérites pour une grande partie des Anthozoaires jusqu'à des exosquelettes calcaires plus complexes et imposants pour les Hexacoralliaires et plus particulièrement les Scléractiniaires. Le polype représente l'unité de

base de la colonie corallienne. En fonction des espèces, la taille des polypes est très variable, allant du millimètre pour s'étendre jusqu'au mètre pour les larges anémones (Robson, 1988).

Souvent rapproché à une configuration cylindrique, le polype est organisé selon une symétrie radiale arrangée autour d'un axe vertical et central (Finnerty *et al.*, 2004). Le polype s'ordonne entre une partie distale constituée par le disque oral et une fraction pédieuse représentée par le disque basal, tous deux reliés par une paroi désignée comme la colonne murale (Fig. 40). De composition ectodermique, le disque oral s'ouvre sur le milieu environnant contrairement au disque basal, davantage protégé des agressions externes et en contact avec le squelette calcaire.

IV.3.2. - Les tentacules

Le disque oral du polype est caractérisé par un prolongement digité du coelentéron mésentéroïdien sous la forme de tentacules tactiles et préhenseurs.

Chez *P. damicornis*, c'est donc un cycle unique (ou couronne) de 12 tentacules creux qui borde la partie distale du polype (Fig. 40). Les tentacules apparaissent très souvent translucides, pourvus d'une surface lisse et dotés d'une extrémité renflée plus ou moins colorée, identifiée comme l'acrosphère. Ils sont reliés à la cavité gastrique par un canal coelentérique s'étendant jusqu'à leur extrémité distale. La rétractation des tentacules est une réponse du polype aux stimuli du milieu environnant. A l'état déployé, la mouance et la longueur des tentacules est conditionnée par l'hydrodynamisme du milieu environnant, les autres paramètres physico-chimiques (température, salinité, ...) et la nutrition des polypes.

Chez les Anthozoaires, différents types de tentacules sont identifiés en fonction des besoins du polype. Les tentacules de capture sont communs à l'ensemble des Anthozoaires, permettant de capturer les particules et organismes pour l'alimentation. En revanche, les Actiniaires sont pourvus de tentacules d'attaque contrairement aux Scléactiniaires qui eux se trouvent dotés de tentacules balayants (Wellington, 1980 ; Williams, 1991). Des différences de composition en nématocytes sont observables selon les applications tentaculaires.

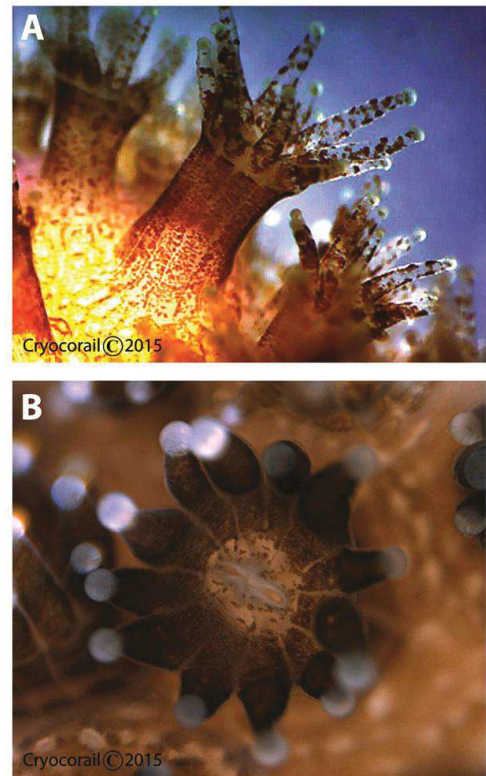


Figure 40 : Polypes de *Pocillopora damicornis*.
A : Profil latéral du polype. Son disque oral est prolongé par 12 tentacules et les mésentéroïdes externes sont bien visibles sur la colonne murale. B : Vue apicale du disque oral divisé par les 12 tentacules et ouvert au centre par l'orifice bucco-anal.

Les tentacules de capture contiennent principalement des spirocytes et des mastigophores pénétrants (développées la section *IV.4.5. - Détails des types cellulaires les plus fréquemment mentionnés*). Ces tentacules ont un pouvoir adhérent plus prononcé que les tentacules d'attaque ou balayants. Les isorhizes holotriques de petite taille, sont beaucoup plus abondants dans l'ectoderme oral des tentacules d'attaque et balayants (Glynn et Krupp, 1986 ; Kass-Simon et Scappaticci, 2002). Wellington (1980) mentionne également la présence d'isorhizes basitriques. Les tentacules d'attaque et balayants ne sont pas présents de façon uniforme et systématique parmi les tentacules du polype (Williams, 1991). Seuls quelques polypes disposent de tentacules de défense et l'apparition de ces tentacules est très souvent la résultante d'une agression antérieure. Ils ne sont développés par les polypes qu'au niveau des parties coralliennes agressées (Wellington, 1980 ; Williams, 1991). Les tentacules d'attaque et balayants dérivent d'une modification structurale et cellulaire des tentacules de capture. Si les tentacules d'attaque apparaissent trapus et massifs, les tentacules balayants quant à eux sont très longs (Fig. 41), dépassant les 30 mm par comparaison avec les tentacules de capture n'excédant pas les 2 mm de long (Wellington, 1980 ; Robson, 1988, Schuchert, 1993). Les tentacules balayants sont de plus terminés par de larges acrosphères chargés d'isorhizes holotriques (Fig. 41). La composition en cnidocytes évolue en passant d'un ratio 1 isorhize : 4 spirocystes dans les tentacules de capture à 1 : 0.2 dans les tentacules balayants. L'extrémité des tentacules d'attaque est uniquement concentrée en isorhizes holotriques, tandis que davantage de p-mastigophores microbasiques et d'isorhizes basitriques sont trouvés dans la partie médiane du tentacule (Robson, 1988).

Si les tentacules d'attaque sont dirigés directement sur l'organisme cible, en revanche, les tentacules balayants doivent leur nom à leur évolution passive dans la colonne d'eau dont les contacts seront davantage fluctuants. Le résultat reste le même, avec l'apparition d'une nécrose tissulaire sur l'organisme cible au niveau des points de contact, pouvant même entraîner la mort de ce dernier. La menace évacuée, les tentacules balayants se rétracteront par la suite jusqu'à redevenir des tentacules de capture et reprendre leur fonction initiale dédiée à l'alimentation.

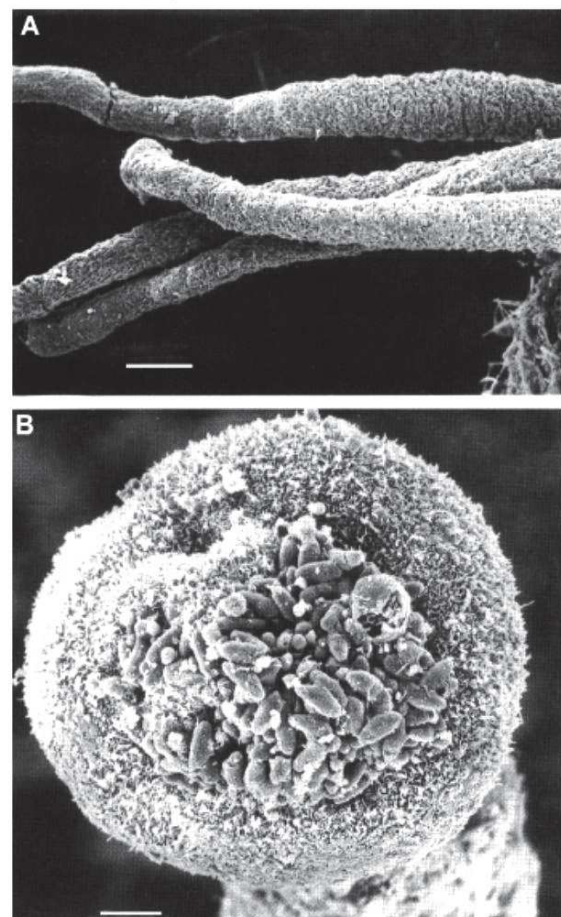


Figure 41 : Observations par SEM. A : Tentacules balayants d'*Erythropodium* sp. B : Acrosphère chargée d'isorhizes holotriques. Echelle = 10 µm. Source : Kass-Simon et Scappaticci, 2002.

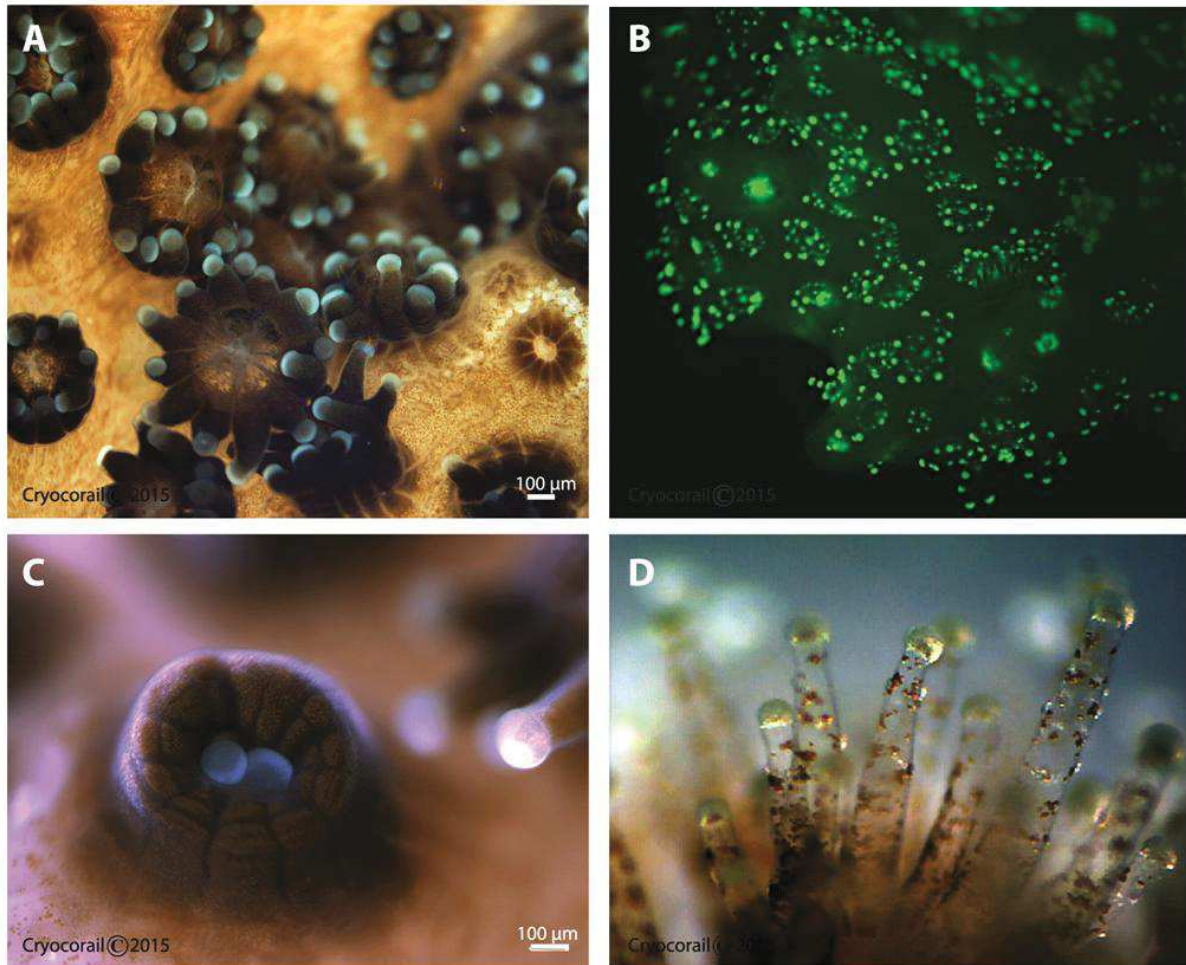


Figure 42 : Observations des acrosphères à l'extrémité des tentacules des polypes de *Pocillopora damicornis*. A : Coloration blanche caractéristique des acrosphères. B : Autofluorescence des acrosphères. C : Acrosphères en défense avec la rétractation du polype. D : Transparence des tentacules et opacité des acrosphères chargés d'isorhizes.

A l'extrémité de chaque tentacule, l'acrosphère est bien visible chez *P. damicornis* sous l'aspect d'une petite boule blanche (Fig. 42). C'est une zone fortement concentrée en isorhizes holotriques et en mastigophores microbasiques de type p et b conférant aux acrosphères une fonction de défense, voire d'attaque (Kass-Simon et Scappaticci, 2002 ; Acuna *et al.*, 2009). La rétractation des tentacules permet de rapprocher les acrosphères au centre du calice et de constituer de la sorte un bouquet de défense face aux agresseurs (Fig. 42). Un contact prononcé au niveau des acrosphères entraîne une décharge continue des nématocytes sur l'organisme cible. Le tissu attaqué va subir un phénomène de « peeling » jusqu'à l'état de nécrose.

Il faut enfin ne pas sous-estimer l'importance du mucus parmi les moyens de défense et d'attaque dont disposent les Sclérouctinaires et plus largement les Anthozoaires. Dans le cadre de la compétition pour l'espace, certaines espèces n'hésitent pas à se protéger dans une gangue de mucus chargée d'isorhizes holotriques, de mastigophores microbasiques et de spirocytes (Brown et Bythell, 2005). Un contact prolongé du mucus sur l'organisme cible peut s'accompagner d'une suffocation tissulaire et d'une attaque bactérienne (Brown et Bythell, 2005).

IV.3.3. - La cavité gastrique

Le polype est souvent comparé à une vésicule pourvue d'une cavité gastrique ouverte sur l'extérieur par un orifice central et unique assurant les fonctions buccale et anale. La cavité gastrique est une évolution de l'archentéron, cavité embryonnaire formée au moment de la gastrulation. Cette cavité gastrique est également mentionnée sous le nom de cavité gastro-vasculaire ou de coelentéron. Le coelentéron est constitué de plusieurs parties, le pharynx, la cavité gastrique et les canaux gastro-vasculaires (Agostini *et al.*, 2012). Ces différentes parties se distinguent de par leurs structures tissulaires et leurs fonctions distinctes.

La bouche s'ouvre au centre d'une membrane fine et transparente, le péristome. La fente buccale des polypes est de forme ovoïde et non circulaire (Fig. 43). Elle s'ouvre vers le haut contrairement au stade méduse. Cet orifice buccal est relié au coelentéron grâce à une invagination de l'épiderme ectodermique formant un passage étroit et aplati latéralement, l'actinopharynx. L'actinopharynx est aussi désigné comme le pharynx ou le stomodeum. Il constitue une communication avec le lumen. L'espace comprenant le disque oral et l'actinopharynx est qualifié de colonne. De nature ectodermique (Daly *et al.*, 2007), la paroi interne de l'actinopharynx est radiée par les mésentéries (ou mésentéroïdes) et pourvue d'une ciliature assurant la circulation d'eau vers la cavité gastrique. Ces flux inhalant et exhalant soutiennent l'alimentation, l'oxygénation des tissus, l'excrétion et l'élimination des particules couvrant les surfaces épithéliales. L'actinopharynx est aussi composé de gouttières densément ciliées identifiées comme les syphonoglyphes et particulières chez les Anthozoaires pour leur caractère bilatéral (Daly *et al.*, 2007). Les syphonoglyphes peuvent être mentionnés sous forme individuelle, par paires ou de nombre supérieur à deux dans le cadre de la reproduction asexuée (Daly *et al.*, 2007). Il semblerait que le syphonoglyphe ne soit pas représenté chez les Scléractiniaires et les Antipathaires (Grassé *et al.*, 1987), pourtant décrit chez d'autres Hexacoralliaires dont les Zoanthaires et les Actiniaires.

Le coelentéron est l'espace délimité par la base de

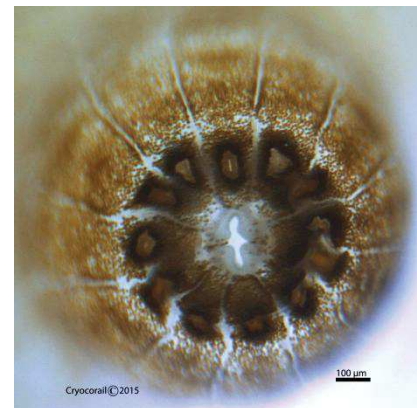


Figure 43 : Fente buccale d'un polype de *Pocillopora damicornis*.

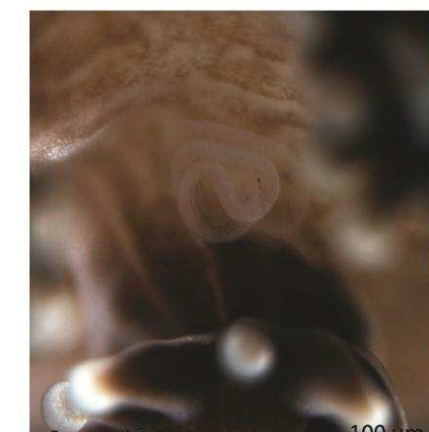
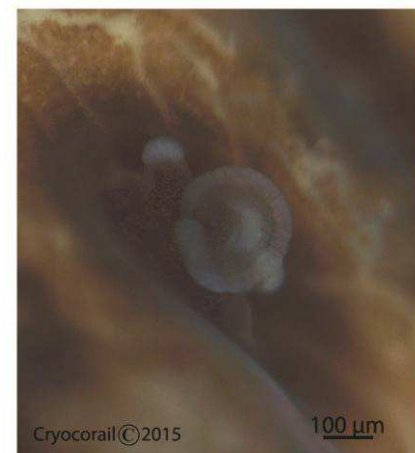


Figure 44 : Filaments mésentériques hors de la cavité gastrique de deux polypes de *Pocillopora damicornis*.

l'actinopharynx et la partie aborale (Galloway *et al.*, 2007). La cavité gastrique est partiellement divisée en chambres par les mésentéries arrangées radialement et par cycles (Daly *et al.*, 2007). Ces mésentéries impriment des saillies vers la paroi murale du tissu gastro-vasculaire (Bénazet-Tambutté *et al.*, 1996 ; Galloway *et al.*, 2007). Localisées entre les septes du polype, les mésentéries s'étendent de la paroi interne à l'axe du polype en s'attachant ou non au stomodeum. Les mésentéries dites complètes sont attachées au mur du polype tandis que les mésentéries incomplètes flottent librement dans le lumen et les canaux gastro-vasculaires (Galloway *et al.*, 2007). Les mésentéries sont associées à plusieurs fonctions. Elles permettent par leurs replis d'augmenter la surface de la cavité gastrique. Les plis mésogléens de la région orale sont proéminents et contiennent les cellules épithéliales et les fibres musculaires longitudinales permettant d'assurer les fonctions d'extension et de rétractation du polype. Les espaces intercellulaires abondants auraient une fonction hydrostatique importante durant la contraction en se comportant comme des espaces de remplissage du milieu aqueux (Marshall et Wright, 1993). La région aborale des mésentéries abrite les gonades (Robson, 1988 ; Daly *et al.*, 2007 ; Galloway *et al.*, 2007). Le bord libre des mésentéries porte un bourrelet entéroïdien autrement désigné comme filament mésentérique ou entéroïde. Ce filament mésentérique est pourvu d'un tractus central cnidoglandulaire qui est, chez certaines espèces, doté d'un acontium chargé de nématocytes (Robson, 1988 ; Galloway *et al.*, 2007). Les filaments mésentériques interviennent dans la digestion et l'excrétion (Robson, 1988) mais peuvent également être utilisés pour la défense et l'agression. Ils ont en effet la capacité de s'étirer pour sortir hors de la cavité gastrique par l'orifice buccal ou les ouvertures temporaires de la colonne murale (Fig. 44).

A l'instar des autres organismes, le compartiment gastrique est pourvu d'une flore bactérienne dont le rôle est encore mal connu. Les bactéries coelentériques sembleraient jouer un rôle dans la production de nutriments essentiels pour le corail (Agostini *et al.*, 2012). Les densités bactériennes de l'ordre de 10^5 et 10^6 cellules/ml seraient régulées par le fluide coelentérique du polype, avec des actions de croissance bactérienne ou de digestion (Herndl et Velimirov, 1986).

IV.3.4. - Le coenosarque

Une colonie corallienne est constituée de polypes clones issus d'un seul polype primaire, dont le nombre peut atteindre plusieurs milliers d'individus. Le terme de « colonie » décrit la communication entretenue entre les polypes grâce à un tissu de liaison, le coenosarque ou le coenenchyme (Allemand *et al.*, 2004). Ce tissu correspond à un prolongement de l'épithélium oral et aboral entre lesquels s'étend le coelentéron provenant de la cavité gastro-vasculaire des polypes. Ces extensions coelentériques sont visibles sous la forme de canaux appelés mésentères externes, abritées dans l'espace coenosarqual et permettant la circulation d'un certain nombre de molécules (éléments nutritifs, eau de mer,

...) entre les polypes. Le coenosarque est également un tissu par lequel sont induits les processus de calcification du squelette au niveau du coenosteum.

IV.4. - Organisation histologique et cytologique

Identifié parmi les Eumétazoaires, *P. damicornis* est reconnu comme un organisme pluricellulaire autonome grâce à un pool tissulaire issu des processus de différenciation et de regroupement cellulaire s'opérant au moment de l'embryogénèse. Chez les Cnidaires, la gastrulation représente une étape importante puisqu'elle constitue la phase durant laquelle les deux feuilletts embryonnaires sont formés. L'unique couche cellulaire de la blastula subit une division, dotant ainsi la gastrula de deux couches cellulaires. La planula issue de la gastrulation présente un axe opposant le pôle oral (pôle végétatif) et le pôle aboral (pôle animal).

Le pôle animal constitue la partie la plus active et sera l'extrémité par laquelle s'opérera la fixation de la larve pour former un polype primaire. A l'opposé, le pôle végétatif oral s'organise au niveau du blastopore pour constituer l'ouverture buccale et anale s'ouvrant sur la cavité gastro-vasculaire. Les polypes sont donc formés d'un disque oral ouvert sur le milieu extérieur et d'un disque pédieux aboral (ou disque basal) en contact avec l'exosquelette. Les deux épithélia, oral et aboral, représentent ensemble une épaisseur de 40 - 50 μm (Allemand *et al.*, 2004) et sont chacun constitués d'un ectoderme (épiderme) et d'un endoderme (gastroderme) séparés par une mésoglée anhiste ou non (Fig. 45). La composition et l'épaisseur des tissus ectodermiques et endodermiques sont dépendantes de leur localisation au niveau du polype.

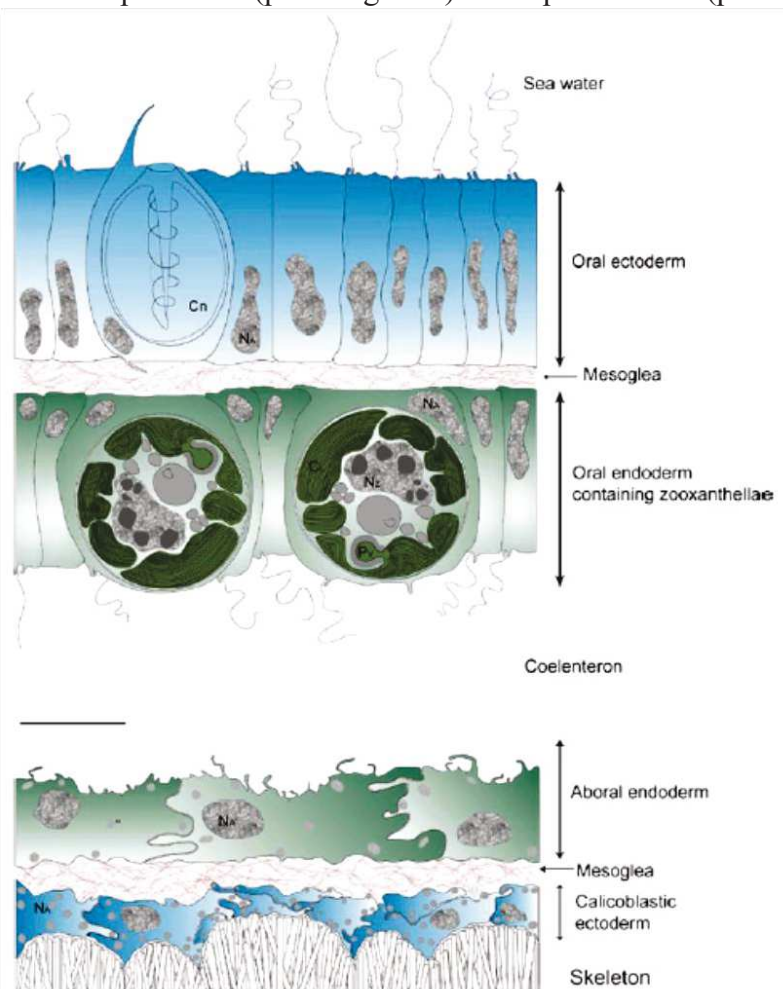


Figure 45 : Représentation schématique de l'organisation tissulaire chez *Pocillopora damicornis*. Cn : cnidocyte ; N_A : nucleus cellule animale ; N_V : nucleus zooxanthelles ; C_L : chloroplaste ; P_Y : pyrénoloïde. Echelle : 5 μm .
Source : Allemand *et al.*, 2011.

IV.4.1. - L'ectoderme oral

La relation étroite des Cnidaires avec le milieu environnant permet de bien comprendre les types cellulaires composant l'ectoderme oral. Cette couche tissulaire pseudostratifiée est ainsi pourvue d'une quantité importante de mucocytes et de cnidocytes, deux types cellulaires utilisés dans les fonctions de défense et d'alimentation en plus de l'exocytose pour les mucocytes. D'autres cellules interstitielles, sensorielles, épithéliales (ectodermiques) composent également ce feuillet externe pourvu également d'espaces intracellulaires étroits. Les cellules épithéliales sont les plus abondantes dans l'ectoderme oral. L'épaisseur de ce feuillet est variable en fonction des espèces coralliennes. L'ectoderme oral constitue l'une des couches cellulaires les plus épaisses (de 10 à 20 μm) et peut même atteindre des épaisseurs encore plus importantes comme chez *Galaxea* (~35 μm) (Marshall et Wright, 1993 ; Allemand *et al.*, 2004). Son épaisseur peut être variable d'un endroit à un autre du polype.

L'ectoderme oral est constitué d'une importante couverture ciliaire. D'aspect uniforme, cette abondance ciliaire est variable en fonction des parties coralliennes. La longueur de ces cils vibratiles ne dépasse pas 5 à 7 μm (Brown et Bythell, 2005). Vandermeulen (1974) décrira les cellules épithéliales des planulae de *P. damicornis*, munies d'un flagelle entouré d'une couronne de 9 à 11 microvillosités (de 0.1 μm de diamètre) par cellule. Ces cils vibratiles ont plusieurs fonctions, dont celle d'acheminer les particules alimentaires jusqu'au niveau du disque oral du polype. Ils participent également à l'évacuation de la matière organique et minérale susceptible de s'accumuler sur l'ectoderme oral et ils sont actifs dans le transport du mucus. Les cils participent à l'oxygénation des tissus par les circulations d'eau que leur motilité induit au niveau de la surface ectodermique. Les cils vibratiles ont enfin un rôle important dans la locomotion des larves, des polypes expulsés, des balles tissulaires, Dans la composition des cils vibratiles, la dynéine (protéine motrice) est responsable du mouvement ciliaire. Les cils et flagelles sont des prolongements cytoplasmiques pourvus d'un centriole (corpuscule basal). Le centriole est un organite riche en protéines, constitué de neuf groupes de trois tubules.

IV.4.2. - Les endodermes oral et aboral

Une partie des cellules endodermiques orales (ou gastroderme oral) ont une fonction digestive limitée à la production d'enzymes digestives qui opèrent uniquement dans la cavité gastro-vasculaire. Les cellules de l'endoderme oral se caractérisent par de longues et fines extensions réparties le long de la mésoglée (Marshall et Wright, 1993). Ces cellules possèdent également en position apicale une ciliature développée. L'endoderme oral contient également les zooxanthelles, endosymbiontes ainsi contenus dans de larges cellules endodermiques. Les

zooxanthelles sont également présentes dans l'endoderme aboral mais en quantité beaucoup plus faible (Allemand *et al.*, 2004). D'autres cellules telles que les mucocytes composent aussi cette couche cellulaire.

Les deux endodermes (oral et aboral) sont délimités par les canaux de communication du coelentéron permettant de véhiculer les éléments nutritifs et autres molécules, entre les différents polypes constituant la colonie corallienne.

L'endoderme aboral (ou gastroderme aboral) est composé des mêmes cellules que l'endoderme oral comme des mucocytes, des cnidocytes ou des zooxanthelles. Toutefois, ces cellules sont beaucoup moins abondantes que dans le tissu oral et sont séparées par des cellules endodermiques et de larges espaces intracellulaires. Les espaces intracellulaires restent communs à tous les épithéliums coralliens (Marshall et Wright, 1993). L'endoderme oral est cilié au niveau de sa partie apicale.

IV.4.3. - L'ectoderme aboral

L'ectoderme aboral en contact avec le squelette est aussi qualifié d'ectoderme calicoblastique par référence aux calicoblastes qui le composent (Tambutté *et al.*, 2007). Son épaisseur varie entre 1 et 3 μm (Le Tissier, 1988). Ces cellules spécifiques ont un rôle important dans le processus de calcification et de formation de l'exosquelette. Des espaces subectodermiques contenant un milieu contrôlé biologiquement identifié comme le milieu extracellulaire calcifiant, constituent les sites de la squelettogénèse (Allemand *et al.*, 2011). Ces espaces concentrent des vésicules sécrétrices et des vésicules précurseurs de la matrice organique (50 - 70 nm de diamètre) intervenant dans les processus de formation squelettique et de transport exocytotique de la matrice organique (Le Tissier, 1988 ; Allemand *et al.*, 2004). D'autres cellules sont en relation avec cet ectoderme basal comme les cellules d'ancrage, les desmocytes (Allemand *et al.*, 2011). Cet ectoderme est beaucoup plus fin que celui de l'épithélium oral avec une épaisseur de 0.5 à 3.0 μm (Le Tissier, 1988 ; Allemand *et al.*, 2004) et se reconnaît par un enchevêtrement cellulaire et de larges espaces intercellulaires entre la mésoglée et les cellules (Marshall et Wright, 1993 ; Allemand *et al.*, 2004). Il est monocouche malgré des cellules interdigitées lui conférant une apparence multicouche (Tambutté *et al.*, 2007).

IV.4.4. - La mésoglée

Les fonctions analogues de la mésoglée (ou mésenchyme) à celles du tissu conjonctif (ou lame basale), constituent l'un des critères permettant de considérer les Cnidaires comme

faisant parti des Eumétazoaires. D'aspect gélatineux, la mésoglée est une lamelle de soutien fortement hydratée et très mince (0.1 à 3.0 μm d'épaisseur) séparant les deux feuillets embryonnaires. Elle est formée à partir de l'ectoderme et composée de collagène et de microfibrilles conférant respectivement rigidité et élasticité. Des macromolécules sont également présentes comme les mucopolysaccharides, successions disaccharidiques reliées à une partie protéique (la mucine). Les mucopolysaccharides confèrent une viscosité importante à la mésoglée. Malgré tout, le gel mésogléen ne constitue pas une barrière aux échanges ioniques (Bénazet-Tambutté *et al.*, 1996). La structure mésogléique se trouve renforcée par la présence de sclérites calcaires. Une certaine divergence existe quant à la composition cellulaire de la mésoglée. Nombre d'auteurs définissent la mésoglée comme une couche acellulaire. D'autres au contraire mentionnent différents types cellulaires tels que la présence de fibroblastes sécrétant la matrice et les fibres de collagène. Les amoebocytes granuleux ou non ont également été mentionnés (Mullen *et al.*, 2004). En plus des protéines fibreuses (Marshall et Wright, 1993), ce feuillet translucide est également constitué de fibres nerveuses et de faisceaux musculaires et contient les gamètes.

IV.4.5. - Détails des types cellulaires les plus fréquemment mentionnés

Chez les Cnidaires, la taille parfois imposante de certaines cellules ne reflète pas la taille de l'animal mais davantage l'importance de leurs fonctions (Robson, 1988).

IV.4.5.1. - Les amoebocytes

Les amoebocytes phagocytaires (ou amiboïdes) sont localisés dans le gel mésogléique. Ces cellules ont été identifiées comme des cellules souches pluripotentes, capables de se diviser et de se différencier en plusieurs types cellulaires comme les cnidocytes, les scléroblastes ou les cellules germinales (Fadlallah, 1983 ; Rinkevich, 1996 ; Muller *et al.*, 2004). La mésoglée est également perçue comme un espace de migration des cellules en cours de différenciation. La circulation de ces cellules est fonction des besoins requis au niveau des épithelia.

Les amoebocytes sont également mobilisés dans la réponse immunitaire en ingérant par phagocytose les microorganismes ciblés. Ces cellules vont dégrader ces organismes par protéolyse enzymatique et par l'utilisation de radicaux libres. Les organismes invasifs de plus grande taille seront évacués sous la forme d'un nodule, résultant de l'agrégation des amoebocytes.

Les amœbocytes sont difficilement détectables dans une mésoglée de fine épaisseur. Ces cellules apparaissent rondes ou d'aspect fusiforme, quelquefois entourées d'un espace. Les granules acidophiles sont considérés comme des lysosomes ou des peroxisomes.

IV.4.5.2. - Les cellules calicoblastiques

Les calicoblastes prennent l'allure de cellules aplaties, allongées, minces et agencées sous la forme d'enchevêtrements. Ces cellules sont fortement interdigitées (Allemand *et al.*, 2004) et donnent à l'ectoderme calicoblastique un aspect multicouches bien qu'il soit monocouche (Tambutté *et al.*, 2007). Le cytoplasme est pourvu de nombreux granules de petite taille (Marshall et Wright, 1993 ; Tambutté *et al.*, 2007) et contient également de nombreuses mitochondries. Chez *Porites compressa*, les calicoblastes ont une longueur proche de 5 µm (Domart-Coulon *et al.*, 2006). Cependant, ces cellules peuvent atteindre entre 10 et 100 µm de long (Allemand *et al.*, 2004). Ces cellules sont responsables de la précipitation du carbonate de calcium (aragonite) sur une trame protéique. D'autres coraux présentent également des trames glucidiques sur la face externe de l'ectoderme basal du polype (Goreau, 1959).

IV.4.5.3. - Les cellules épithéliales

Ces cellules, disposées de façon longitudinale, apparaissent de forme allongée, cylindrique et sont mononuclées. Un renflement indique la position excentrée du noyau (Marshall et Wright, 1993). Également qualifiées de cellules ectodermiques, ces cellules épithéliales disposent de nombreux cils vibratiles en position apicale. On parle de cellules multi-ciliées. Au niveau basal, ces cellules s'entrecroisent avec les filaments mésogléens.

IV.4.5.4. - Les cellules gastrodermiques

Ces cellules pourvues d'une ciliature sont présentes dans les endodermes oraux et aboraux sous l'apparence d'une fine structure le long de la mésoglée (Marshall et Wright, 1993). Au niveau du gastroderme aboral, ces cellules s'étendent apicalement.

IV.4.5.5. - Les cellules glandulaires

Ces cellules contiennent les enzymes protéolytiques intervenant dans le processus de digestion. Ces enzymes sont contenues dans des granulations des cellules dites granulaires.

IV.4.5.6. - Les cellules interstitielles

Les cellules interstitielles sont surtout localisées au niveau basal de l'ectoderme oral sous forme d'amas ou isolées. Les cellules interstitielles ont le rôle de cellules pluripotentes permettant la production des autres cellules de l'épithélium oral. Les cellules germinales sont issues des cellules interstitielles d'origine endodermique (Rinkevich et Loya, 1979 ; Szmant-Froelich *et al.*, 1980). Ces cellules migrent dans la mésoglée des mésentéries dans laquelle elles démarrent leur différenciation. La totalité du développement des spermaries s'effectue également dans la mésoglée des mésentéries (Szmant-Froelich *et al.*, 1980). L'augmentation du volume et du nombre des oocytes comme des spermaries entraînent le passage des cellules matures dans l'endoderme mésentérique (Szmant-Froelich *et al.*, 1980). D'autres auteurs s'accordent pour souligner l'absence des véritables cellules interstitielles, remplacées dans la mésoglée par des amœbocytes indifférenciées ou d'autres cellules mésogléiques jouant le rôle de cellules souches (Fadlallah, 1983 ; Rinkevich, 1997).

IV.4.5.7. - Les cnidocytes

Les cnidocytes sont mobilisés pour différentes fonctions. Ils sont en effet impliqués dans le processus d'alimentation, de locomotion, d'adhésion larvaire, d'agression et de défense (Robson, 1988). Sous la désignation de cnidocytes, trois types cellulaires bien spécifiques sont actuellement représentés, les nématocytes, les spirocytes et les ptychocytes (Özbek *et al.*, 2009).

Les spirocytes sont des cellules pourvues d'un fil collant utilisé à des fins de capture en permettant d'immobiliser mécaniquement les proies. L'ensemble des Hexacoralliaires sont dotés de spirocytes (Daly *et al.*, 2007). Seuls les Anthozoaires contiennent des spirocytes.

Les ptychocytes sont surtout représentés chez les Cérianthidés. Les filaments ayant déjà servi et sous forme dévaginée, servent à l'édification du tube muqueux des Cérianthaires.

La morphologie variable des nématocystes permet d'identifier jusqu'à 25 types de nématocytes différents (Kass-Simon et Scappaticci, 2002). Les nématocytes sont utilisés dans les actions de prédation, de défense et de locomotion (Özbek *et al.*, 2009). Ces nématocytes

sont ainsi regroupés sous quatre catégories en fonction de leurs fonctionnalités (percer, piéger, adhérer aux proies et adhérer au substrat). Le venin des nématocytes (l'actino-congestine) est contenu dans une capsule (le nématocyste) dans laquelle baigne un long filament pourvu d'épines (ou harpons). Cette capsule est un assemblage protéique incluant de larges glycoprotéines (protéines NOWA) et des molécules similaires au collagène (mini-collagène), constituées de proline, de glycine et de cystéine. L'ensemble est maintenu par des ponts disulfures (Kass-Simon et Scappaticci, 2002 ; Özbek *et al.*, 2009). La structure du fil venimeux diffère selon les nématocytes.

On distingue deux catégories :

- les Stomocnidés regroupent les nématocystes dotés d'un fil à l'extrémité ouverte et capable de délivrer directement la toxine dans la proie. C'est notamment le cas des mastigophores contenus dans les tentacules de capture.
- les Astomocnidés désignent les nématocystes utilisés pour adhérer au substrat et enserrer les proies.

Dès la fin des années 1800, les cnidocytes ont suscité un intérêt particulier auprès de la communauté scientifique pour leur description mais aussi pour leur aide dans la classification des espèces (Fig. 46). L'avancée des connaissances et des technologies n'a eu de cesse d'affiner la description de ces cellules si particulières. Parmi les différents auteurs, Östman (2000) réalisera la synthèse présentée Fig. 46.

Les nématocytes observés chez *P. damicornis* ont une longueur de l'ordre de 40 µm, et sont considérés comme de petits nématocytes. Deux types de nématocytes sont observés, les p- et b-mastigophores microbasiques et les isorhizes holotriches (Glynn et Krupp, 1986). Comparée à d'autres Scléractiniales, la densité des cnidocytes chez *P. damicornis* reste importante (75 à 150 nématocytes/mg de tissu humide).

Les nématocytes sont représentés essentiellement

Modified classification based on Mariscal (1974)

I. ASTOMOCNIDAE: Tubule closed at tip; general-ly entangles prey.

Desmonemes: tubule forms a corkscrew-like coil. Few coils of tubule visible in undischarged capsule.

II. STOMOCNIDAE: Most tubules open at tip; mainly penetrants.

A. HAPLONEMES: no prominent, rod-shaped shaft visible inside undischarged capsule.

1. Isorhizas: tubule isodiametric or nearly isodiametric proximal to the mid-point and tapering thereafter.

a. Atrichous or holotrichous: tubule unspined or armed with tiny spines throughout.

b. Basitrichous: prominent large spines close to capsule. Remaining tubule unspined or armed with tiny spines.

2. Anisorhizas: tubule slightly dilated towards base.

a. Atrichous or holotrichous: tubule unspined or armed with tiny spines throughout.

b. Basitrichous: prominent large spines close to capsule. Remaining tubule unspined or armed with tiny spines.

B. HETERONEMES: prominent shaft visible inside undischarged capsule.

B1. Microbasic: discharged shaft or proximal tubule with prominent armature short, less than one and a half times capsule length.

B2. Mesobasic: discharged shaft or proximal tubule with prominent armature medium-sized, more than one and a half times longer but shorter than four times capsule length.

B3. Macrobasic: discharged shaft or proximal tubule with proximal armature long, more than four times the capsule length

1. Rhabdoids: inverted shaft rod-shaped, everted tubule with prominent spines generally of the same size.

a. Mastigophores: tubule continues beyond shaft or proximal armature.

(a) p-mastigophores: V-shaped notch at base of unfired, broad shaft; discharged shaft tapers abruptly into tubule.

(b) b-mastigophores: No V-shaped notch at base of unfired, narrow shaft; discharged shaft or proximal tubule approximately the same diameter as remaining tubule.

b. Amastigophores: no tubule beyond everted shaft;

(a) p-amastigophores: V-shaped notch at base of unfired shaft (changed terminology).

2. Rhopaloids: shaft of unequal diameter

a. Euryteles: discharged shaft dilated distally.

(a) Homotrichous: spines of shaft all of the same size.

(b) Heterotrichous: spines of shaft of unequal size.

b. Stenoteles: discharged shaft dilated at base, large spines at point of constriction between basal and distal part.

(a) Stenoteles proper: three stylets or especially strong spines at constriction, distal portion armed by rows of lamellae or spines.

(b) Pseudostenoteles: two to four large spines at constriction, distal portion of shaft long, armed with smaller spines; sometimes also with a few large ones (new category, Boullion *et al.*, 1986).

c. Birhopaloids: discharged shaft with one distal and one proximal dilations.

(a) Birhopaloides type I. The two dilations separated from each other.

(b) Birhopaloides type II. The two dilations close together (new category or similar to trirophaloids of Rifkin (1996)).

III. Spirocysts: thin capsule wall, containing a long spirally coiled tubule of uniform diameter (Fig. 4d). No shaft or spines distinguishable.

Figure 46 : Identification des Cnidocytes. Source : Östman, 2000.

dans l'ectoderme oral (Allemand *et al.*, 2004). Ils peuvent être également mentionnés en faible quantité dans les gastrodermes oral et aboral.

IV.4.5.8. - Les desmocytes

Ces cellules d'ancrage sont abondantes et irrégulièrement réparties dans l'épithélium calicoblastique et pour *P. damicornis*, au nombre de 150/mm² (Muscatine *et al.*, 1997). Les desmocytes ont une forme cylindrique et mesurent environ 20 µm de long pour une section de 1 µm. Ils sont visibles comme de petites bosses blanchâtres sur le polype et le coenosarque. Les desmocytes sont attachés à la mésoglye à l'aide de structures comparables à des mortaises et des tenons (Muscatine *et al.*, 1997). Les tenons cylindriques peuvent mesurer jusqu'à 4 µm de long avec un diamètre de 0.50 à 0.75 µm. Les desmocytes permettent la fixation des tissus du polype au squelette. Ces cellules sont plus nombreuses dans les zones de tension où les tissus doivent résister à l'action musculaire.

IV.4.5.9. - Les endosymbiontes

Les endosymbiontes communément appelées zooxanthelles (du grec *zōon* : « animal » et du grec *ksanthos* : « jaune ») sont des algues unicellulaires représentées chez les Anthozoaires par l'espèce *Symbiodinium microadriaticum* (Freudenthal, 1962), appartenant à la classe des Dinophycées (ou classe des Péridiniens), à l'ordre des Suessiales (Zooxanthelles) et à la famille des Symbiodinacées ou des Dinoflagellés (du grec *dino* : « tournoyer »). D'autres espèces sont également représentées telles que *S. thermophilum* capable de résister à des températures de 36 °C (Hume *et al.*, 2015). Dans les eaux oligotrophes dans lesquelles se développent les communautés récifales, la forte productivité de ces écosystèmes et la capacité de calcification des coraux reposent en grande partie sur la symbiose entre les dinoflagellés et les cellules coralliennes.

Dès 1931, Yonge propose une description très précise des zooxanthellae. Ces cellules coccoïdes d'après Freudenthal, sont aussi décrites comme ellipsoïdes ou sphéroïdes, isolées ou regroupées par deux et jusqu'à trois cellules. Elles ont un diamètre variant entre 6 et 15 µm voire plus (volume moyen de 400 à 600 µm³) (Wooldridge *et al.*, 2012). La forme libre se compose de deux flagelles que la cellule perd au moment de sa phagocytose par le corail. L'un des flagelles imprime le mouvement de rotation tandis que le second produit la propulsion. Les *Symbiodinium* sp. sont pourvus d'une thèque constituée d'un ensemble de plaques cellulodiques. Le noyau (ou dinocaryon) ne contient pas d'histones et se trouve dépourvu de centromères et de fuseau au moment de la division chromosomique (Lakkis, 2006). Le noyau est situé en position apicale (Marshall et Wright, 1993). Les chloroplastes sont localisés sur la périphérie du plasmalemme. La coloration marron des coraux est due au complexe péridinine-chlorophylle. La chlorophylle a est particulièrement représentée et la

péridinine entre parmi les caroténoïdes. Le noyau pyrénolide apparaît étroitement associé aux chloroplastes et entouré d'une gaine d'amidon et de vésicules lipidiques.

L'espèce *S. microadriaticum* est représentée par différents clades (A à I) (Pochon et Gates, 2010). Les clades A et B apparaissent plus représentés dans les Caraïbes. Le clade C est dominant dans la région Indo-Pacifique et apparaît comme ayant le meilleur taux de fixation du carbone. Le clade D est largement distribué mais représente moins de 10 % de la population des symbiotes dans les assemblages multi-phylogénétiques (Lesser *et al.*, 2013). Les zooxanthelles sont surtout représentées dans l'endoderme oral et peuvent être également retrouvées dans le gastroderme aboral, mais de façon occasionnelle et en très faible abondance (Marshall et Wright, 1993). Elles sont phagocytées mais non digérées dans les vacuoles de larges cellules sphériques constituées d'une fine couche de cytoplasme sur la région basale. Le symbiosome caractérise ainsi l'association du dinoflagellé et de la vésicule périsymbiotique. Ces cellules peuvent représenter jusqu'à 60 % de la biomasse protéique chez *P. damicornis*. L'abondance est estimée entre 1 et $10 \cdot 10^6$ zooxanthelles/cm² de tissu animal (Wooldridge *et al.*, 2012) ou $2.8 \cdot 10^5$ zooxanthellae/mg de tissu (Davies, 1984). Elles sont localisées dans les appendices et les tissus les plus externes de l'animal. Les tissus des planulae de *P. damicornis* sont également colonisés par les zooxanthelles dès leur émission par transmission verticale. Richmond (1987) suggère que la dispersion importante des larves de *P. damicornis* (jusqu'à 100 jours) repose sur la phototrophie des algues permettant par la synthèse des photosynthétats, de répondre aux besoins nutritionnels des larves.

Les symbiotes ont un rôle indispensable pour la fourniture énergétique aux cellules animales. Plus de 90 %, voire même jusqu'à 99 % du carbone fixé par l'activité photosynthétique des zooxanthelles peut être transmis aux cellules coralliennes (Davy *et al.*, 2012). La production des photosynthétats repose sur l'apport du carbone inorganique dissous (DIC). Klueter *et al.*, (2015) ont relevé jusqu'à 188 métabolites produits par les *Symbiodinium* sp. L'activité photosynthétique améliore ainsi la croissance squelettique du madréporaire par l'apport en CO₂ et par la supplémentation en acides organiques (malate, citrate, succinate, ...), en glycérol, glycérides et autres lipides, ainsi qu'en acides aminés (alanine, glutamate, glycine, bétaïne, taurine, proline, ...), en glucides comme le glucose, mais aussi en métabolisant les déchets azotés et phosphatés qui peuvent être limitants pour le corail (Buxton *et al.*, 2012 ; Davy *et al.*, 2012). La fourniture en glycérol peut représenter entre 25 et 95 % des photosynthétats transmis (Davy *et al.*, 2012).

Des conditions environnementales vont dépendre la colonisation des clades dans les tissus coralliens. Certains clades sont davantage thermorésistants (D) que d'autres (Buxton *et al.*, 2012 ; Lesser *et al.*, 2013 ; Deschaseaux *et al.*, 2014 ; Hume *et al.*, 2015). Les clades thermosensibles (C) seront beaucoup plus sujets à produire du DMSP et DMS (Deschaseaux *et al.*, 2014). Avec le réchauffement global, c'est la composition en clade dans les tissus coralliens qui va être modifiée. La distribution bathymétrique va aussi influencer la représentation des clades. Les espèces coralliennes les plus aptes à la zonation démontrent une certaine adaptation de leur communauté de *Symbiodinium* sp. (Bongaerts *et al.*, 2015).

IV.4.5.10. - Les gamètes

Les gonades sont situées sur les cloisons gastriques des mésentéroïdes. La distribution des organes génitaux est différente selon les espèces : les formes monoïques sont les plus fréquentes. Les Pocilloporidés ont des stratégies de reproduction variées mais sont principalement hermaphrodites, avec une fertilisation interne et une émission par voie externe des larves (Villanueva *et al.*, 2008). Les ovules et spermatozoïdes peuvent être libérés séparément ou ensemble. *P. damicornis* est surtout connu comme un hermaphrodite simultané (Richmond, 1987 ; Tanner, 1996) avec possibilité de fertilisation externe (Stoddart, 1983) et de reproduction asexuée. *Stylophora pistillata* et *Seriatopora hystrix* sont également des hermaphrodites simultanées bien que les petites colonies de *S. pistillata* soient capables de produire uniquement des gamètes mâles (Tanner, 1996). Ces deux espèces, ainsi que *P. damicornis*, relâchent des planulae pourvues de zooxanthelles (Isomura *et al.*, 2001). *P. damicornis* a une reproduction efficace (étroite synchronisation de planulae matures, développement rapide de la larve, compétence de la larve). *S. pistillata* et *S. hystrix* n'ont pas la même rapidité de synchronisation, due à une présence plus longue de la planula dans le polype (Tanner, 1996).

Les gonades mâles sont représentées par les spermaries qui contiennent de nombreux spermatozoïdes. Chez les femelles, chaque ovaire contient en moyenne entre un et cinq oocytes. L'ovule contient un cytoplasme granulaire et un noyau large muni d'un noyau excentrique mais d'aucune zooxanthelle.

IV.4.5.11. - Les mucocytes

Les mucocytes sont identifiables comme de larges et massives cellules pourvues d'un nucleus et de larges inclusions granulaires en position apicale (Marshall et Wright, 1993 ; Brown et Bythell, 2005). Représentées en nombre dans l'ectoderme oral, ces cellules sécrétrices peuvent présenter une forme allongée (entre 10 et 20 µm de long chez *Galaxea fascicularis*). Elles sont davantage concentrées au niveau du pôle oral chez la planula (Marshall et Wright, 1993). Les mucocytes peuvent représenter jusqu'à 90 % de la surface de l'ectoderme dans certaines régions tissulaires (Brown et Bythell, 2005). Dans le gastroderme aboral, les mucocytes sont de taille plus petite, de l'ordre de 5 à 10 µm. Ils sont également beaucoup moins nombreux et possèdent des granules de petite taille (Marshall et Wright, 1993 ; Brown et Bythell, 2005). Enfin, selon Brown et Bythell (2005), la distribution des mucocytes n'est pas universelle à tous les coraux.

Ces cellules sont à l'origine de la sécrétion de mucus, mais d'autres cellules glandulaires ont également été identifiées comme pouvant avoir une fonction sécrétrice. Dans le gastroderme oral, les mucocytes sont abondants autour des cellules contenant les zooxanthelles et occupent un volume tissulaire important. Enfin, les granules des mucocytes

qui constituent l'endoderme oral apparaissent plus larges que ceux de l'ectoderme du même épithélium (Brown et Bythell, 2005).

Le mucus constitue une interface vitale entre l'épithélium corallien et le milieu environnant (Brown et Bythell, 2005). Le terme « mucus » a été introduit par Crossland (1987) qui identifie des agrégats formés par un complexe polysaccharide-protéique produit à la surface du corail. Ces polysaccharides représentent entre 20 et 30 % du carbone total sécrété, le pourcentage restant étant principalement des lipides comme les esters de cire (Brown et Bythell, 2005 ; Bythell et Will, 2011). Parmi les constituants du mucus, les mucines assurent les propriétés visco-élastiques. Ces larges glycoprotéines sont composées de protéines filamenteuses dotées de résidus de cystéine susceptibles de rompre et de permettre la dispersion du mucus. Les chaînes linéaires ou ramifiées d'oligosaccharides peuvent compter jusqu'à 20 monosaccharides. Divers oses sont ainsi représentés tels que l'arabinose, le mannose, le fructose, le galactose ou l'acétyl-galactosamine (Brown et Bythell, 2005). Les terminaisons sulfates ou sialiques ont une importance dans les propriétés hydrophiles du mucus. Cette composition a d'ailleurs valu au mucus plusieurs appellations telles que « surface mucus layer » (SML) ou « mucopolysaccharide layer » (MPSL) (Marshall et Wright, 1993 ; Bythell et Will, 2011).

La composition du mucus varie en fonction du temps, du niveau de stress du corail et du milieu environnant (irradiance, profondeur, sédimentation, oxygénation, ...). Sa fluidité évolue selon les besoins et se trouve régulée à travers les échanges ioniques et hydriques.

Le mucus a plusieurs rôles :

- dans la nutrition : un mucus aqueux va permettre de piéger les particules alimentaires soutenant l'hétérotrophie des polypes. L'hétérotrophie peut représenter jusqu'à 60 % des besoins métaboliques en fonction des conditions de vie (Houlbrèque *et al.*, 2015). Les particules sont acheminées jusqu'au pôle oral grâce au transport muco-ciliaire. Seules les extrémités des cils (5 - 7 μm) vont pénétrer le mucus. L'ingestion du mucus constitue un gain énergétique pour le polype. Les photosynthates rejetés quotidiennement par les symbiontes dans le mucus avoisineraient les 20 % de carbone fixé pour *S. pistillata* et jusqu'à 40 % pour *Acropora acuminata* (Brown et Bythell, 2005). Inversement, le mucus éliminé par le corail est une source d'énergie pour des organismes planctoniques ou microbiens.

- dans la protection : le mucus constitue une gangue de protection contre les agressions des micro-organismes en contenant, comme c'est le cas pour *P. damicornis*, des substances limitant l'activité et la prolifération des communautés microbiennes (Ritchie, 2006 ; Fransolet *et al.*, 2013). Il semblerait même que certaines espèces bactériennes produisent directement des molécules antibiotiques (Ritchie, 2006). Le mucus est aussi une défense contre les coraux avoisinants comme *Fungia scutaria* capable de se protéger en produisant un mucus de 15 mm d'épaisseur. Le mucus assure aussi une protection contre les UV (production de mycosporines) et prévient la dessiccation des cellules coralliennes lors de situations exposées (marées basses). En plus de combattre les agresseurs, un mucus dense permettra d'éliminer les

déchets à la surface de l'ectoderme (Brown et Bythell, 2005). Enfin, chez certaines espèces comme *Aiptasia pallida*, l'abondance en mucocytes dans la couche ectodermique peut être augmentée en situation de stress et notamment après une exposition à des températures de 33 °C induisant un phénomène de bleaching. Cette abondance après blanchissement serait spécifique aux taxa (Fransolet *et al.*, 2013).

- un support microbien : si le mucus est capable de limiter la prolifération de certaines bactéries, il est aussi susceptible de servir de support au développement de bactéries potentiellement pathogènes et responsables de maladies coralliennes. Il est désormais admis que le mucus constitue un substrat pour la prolifération d'une communauté bactérienne établie à l'image d'un biofilm (Brown et Bythell, 2005 ; Ritchie, 2006). Une stratification du mucus permettrait même de distinguer une répartition microbienne selon les situations d'aérobiose et d'anaérobiose (Fig. 47). La partie centrale du mucus peut être anaérobique (Ritchie, 2006). Des variations dans la composition du mucus ou même le détachement d'une certaine quantité de mucus permettraient au corail de réguler les populations de bactéries et ainsi de limiter le développement de certains pathogènes.

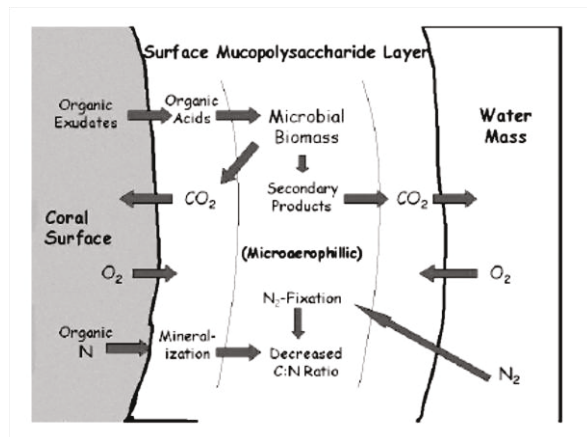


Figure 47 : Symbiose entre le corail et les bactéries dans le mucus.

Source : Brown et Bythell, 2005.

La protection fournie par certaines espèces bactériennes capables de synthétiser des composés antibiotiques n'est pas le seul aspect de la symbiose coraux-bactéries. Le développement d'autres bactéries comme *Vibrio alginolyticus* ou *Alteromonas* sp. permettraient de favoriser l'acquisition de nutriments par les cellules des planulae de *P. damicornis* et notamment de l'azote, élément limitant dans les écosystèmes coralliens avec des concentrations souvent inférieures à 0.2 µM (Fuchinoue *et al.*, 2012 ; Ceh *et al.*, 2013). L'azote atmosphérique converti en ion ammonium NH_4^+ est directement assimilable par les cellules coralliennes ou par les zooxanthelles symbiotiques (Davy *et al.*, 2012 ; Ceh *et al.*, 2013) et ce, jusqu'à des concentrations cellulaires de 50 µM (Fuchinoue *et al.*, 2012).

IV.4.5.12. - Les scléroblastes

Les scléroblastes dérivent des amœbocytes, différenciation cellulaire intervenant directement dans la mésoglyée. Les scléroblastes sont à l'origine des sclérites ou spicules, concrétions calcaire de 20 à 100 nm et comparables à une aiguille. Les sclérites consolident les tissus mous et ont un rôle de défense contre la prédation (Muller *et al.*, 2004). Leur morphologie variable ainsi que les différences de surface sont utilisées pour la détermination des espèces coralliennes.

Partie II

La cryoconservation des Anthozoaires s'est enrichie de plusieurs publications ces trois dernières années. L'année 2012 se distingue essentiellement par la publication de protocoles de congélation des spermatozoïdes de Scléactiniaires. L'année 2014 a été la plus productive pour le nombre d'articles publiés, provenant désormais de quatre équipes de recherche à travers le monde. Ces différents travaux présentent un intérêt tout particulier, aussi bien pour la diversité du biomatériau utilisé que pour les protocoles testés. Ces études laissent entrevoir toute la diversité des approches que propose la cryoconservation, apportant un certain espoir pour la congélation de formes plus complexes d'Anthozoaires.

Le principal objectif de notre travail a été de tester la technique de vitrification sur plusieurs formes pluricellulaires du corail *P. damicornis*. La vitrification est souvent citée comme une alternative à la congélation des espèces délicates à cryoconserver. Cette méthode n'a encore jamais été proposée pour la conservation des Anthozoaires, motivant ainsi ce travail de thèse à développer davantage cette nouvelle approche.

Le Chapitre 1 étudie la tolérance des apex de *P. damicornis* produits par microbouturage à des mélanges binaires de cryoprotecteurs.

Le Chapitre 2 a pour objectif d'étudier la tolérance individuelle aux traitements cryoprotecteurs plutôt que la tolérance d'un ensemble d'individus reliés entre eux comme pour les apex dans le premier chapitre. Trois matériels ont été envisagés dans ce chapitre, les planulae, les polypes primaires et les polypes isolés.

L'utilisation d'agrégats cellulaires dénommés balles tissulaires est testée dans le Chapitre 3. Ces balles tissulaires isolées les unes des autres prolongent notre intérêt pour prospecter à l'échelle individuelle la tolérance aux solutions cryoprotectrices. Elles sont produites selon un procédé mécanique pour éviter les risques d'interactions entre les traitements chimiques de production de ces balles tissulaires et les traitements cryoprotecteurs. La tolérance de ces agrégats a été suivie après exposition à des solutions individuelles de cryoprotecteurs.

Le Chapitre 4 étudie la tolérance des balles tissulaires à des solutions cryoprotectrices binaires et ternaires ainsi qu'à des successions de solutions aux molarités croissantes et décroissantes.

Dans le Chapitre 5, les balles tissulaires sont produites en utilisant un procédé chimique. Par conséquent dans ce chapitre, un agrégat cellulaire correspond au contenu d'un polype. La tolérance des nouvelles balles tissulaires pour des solutions individuelles de cryoprotecteur est testée pour des temps d'exposition beaucoup plus longs. Une étude histologique des balles tissulaires au cours du traitement cryoprotecteur est réalisée.

Dans le Chapitre 6, les balles tissulaires sont soumises à un protocole de vitrification. Une étude histologique a été réalisée.

Chapitre 1

Le microbouturage et la cryoconservation, une équation à deux inconnues

I.1. - Préambule

Les investigations récentes concernant la cryoconservation d'organismes de la classe des Anthozoaires illustrent l'évolution des préoccupations politico-économiques et sociales en matière d'environnement. Si les récifs sont perçus comme un support nourricier et récréatif, ils sont aussi identifiés comme un pilier indispensable du maintien de la biodiversité. Aujourd'hui, la pression anthropique est reconnue comme l'un des principaux catalyseurs du changement climatique depuis la fin de l'Holocène. Ce contexte nouveau pour l'humanité met en lumière l'impensable scénario d'une sixième extinction des espèces annoncée et amorcée. L'évolution déjà perceptible de l'écosystème corallien incite davantage aux initiatives de conservation.

Cette première étude doit être replacée dans son contexte scientifique et chronologique. La réflexion et les expérimentations autour de cette première approche se sont produites en 2011 pour un prologue en début d'année 2012. Les publications disponibles sur la cryoconservation des Anthozoaires mentionnaient alors des tests sur les planulae, les spermatozoïdes et les oocytes. Les travaux de Hagedorn *et al.* (2006a) indiquaient la difficulté de soumettre les planulae de *P. damicornis* et de *F. scutaria* au processus de congélation lente, du fait d'une sensibilité au froid importante. Depuis 2006, aucune autre publication ne laissait apparaître la moindre évolution suite à des essais de cryoconservation d'une forme corallienne pluricellulaire. Parmi le matériel couramment cryoconservé dans le domaine de la biologie végétale, les apex, ces extrémités terminales pluripotentes et croissantes d'un axe végétal (racine, tige,...) ont été l'amorce de notre approche sur *P. damicornis*. Réussir à cryoconserver les apex végétaux ou coralliens, c'est réussir à conserver la partie la plus compétente de l'organisme pour une reprise post-congélation.

Les apex ont donc été choisis pour plusieurs raisons. En plus de leur capacité de croissance, ils constituent un matériel maniable et offrent une facilité de suivi du comportement tissulaire ainsi que l'évolution individuelle (polype) et collective (colonie) après traitement. Cette première démarche avait donc, derrière les objectifs de congélation, le besoin de comprendre les comportements de l'organisme soumis aux diverses manipulations, et aux situations stressantes des solutions successives et du rinçage. Les apex ont été produits selon la technique du microbouturage, procédé éprouvé, rapide et facile à mettre en œuvre.

I.2. - Etude bibliographique : le concept du microbouturage

Les travaux de Yonge en 1931 témoignent dès cette époque de l'intérêt d'utiliser des branches de corail ou des fragments à des fins scientifiques. En 1979, Birkeland *et al.* mentionnent que le phénomène de transplantation utilisé pour la gestion des ressources marines n'est pas nouveau et que nombre d'auteurs se sont déjà intéressés à cette pratique. Cet article nous permet de comprendre que la transplantation est née 10 ans plus tôt avec les premiers efforts de restauration portés sur les récifs endommagés. En revanche, le terme de « nubbin » est lui nouveau et a été introduit en 1976 par ce même Birkeland pour qualifier les petits fragments ainsi produits à partir des branches de *P. damicornis*. Al-Moghrabi *et al.* (1993, 1996) proposent d'isoler individuellement les polypes d'une colonie de *Galaxea fascicularis*, chacun suspendu par un fil nylon dans la colonne d'eau. Cette nouvelle technique apporte des résultats intéressants de croissance dans les trois dimensions, en soustrayant l'influence du substrat sur le développement corallien. Le concept de « micro-colonies » est ainsi créé. Tambutté *et al.* (1995) reproduisent cette technique sur *S. pistillata* en mentionnant l'utilité d'un matériel « cloné » pour l'étude des mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués dans le transport du calcium. Les investigations de Davies pour l'étude de la calcification (Davies, 1989) et le développement de l'écotoxicologie (Davies, 1995) permettront de produire des nubbins sur d'autres Scléactiniaires tels que *Porites porites*, *Acropora humilis* et *Pocillopora verrucosa*. En 2003, Shafir *et al.* utilisent cette technique sur *Seriatopora hystrix* et sur sept autres Scléactiniaires dont des Acroporidés. Ils confirment l'intérêt de ces fragments pour l'écotoxicologie corallienne et désignent les nubbins comme des « minute coral fragments », en insistant sur la facilité de production de ce matériel. Ces mêmes auteurs définissent ainsi un temps de 30 à 40 min nécessaire pour produire jusqu'à 100 nubbins (Shafir *et al.*, 2003, 2006).

La production des nubbins a été d'autant plus développée que l'utilisation entière de la colonie corallienne pouvait perturber par sa taille et sa morphologie les expérimentations. Davies (1995) soulève la difficulté de travailler sur des colonies aux formes larges et variées ainsi que sur des formes sessiles peu propices aux manipulations. Egalement, les quantités importantes de matériel biologique exigées par les expérimentations peuvent générer de lourds dommages sur les colonies ciblées (Shafir *et al.*, 2003). De par leur taille, ces nubbins ne contiennent qu'un nombre très restreint de polypes (Shafir *et al.*, 2003). Ces auteurs mentionnent une surface de 0.25 cm² et les longueurs les plus fréquemment citées vont de 0.5 à 1.0 cm (Tambutté *et al.*, 1995 ; Muscatine *et al.*, 1997), voire jusqu'à 3.0 cm (Davies *et al.*, 1995). En fonction des besoins, ces fragments sont des polypes isolés (Al-Moghrabi *et al.*, 1993) ou ils sont issus de différentes parties de la branche, de la base jusqu'à l'apex (Davies, 1995 ; Tambutté *et al.*, 1995 ; Muscatine *et al.*, 1997 ; Shafir *et al.*, 2003).

L'utilisation des nubbins est recensée dans différentes disciplines dont l'écotoxicologie, et ce à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, organe, organisme entier, comportement de la colonie, ...). L'utilité des nubbins a été

confirmée par d'autres travaux comme l'étude de la calcification, de la symbiose, de la reproduction, du métabolisme du corail, de la génétique et enfin des approches biochimiques. En plus de la diversité des études coralliennes, l'emploi des nubbins présente un certain nombre d'avantages qu'il convient de citer :

- faible variabilité génétique entre les traitements et diminution de l'impact sur le génotype (Davies, 1995 ; Tambutté *et al.*, 1995 ; Shafir *et al.*, 2003),
- très bons taux de survie, excédant les 90 % (Shafir *et al.*, 2003) et faibles pertes de matériel liées à la production (Shafir *et al.*, 2006),
- réduction de la quantité de corail utilisée, permettant aussi le traitement de lots plus importants, la possibilité de répliques et/ou la réalisation de tests simultanés (Davies, 1995 ; Shafir *et al.*, 2003),
- facilité de production en comparaison avec la production des planulae, branches, colonies (Shafir *et al.*, 2003), facilité de nourrissage et de manipulation (Al-Moghrabi *et al.*, 1993),
- production d'explants de tailles et de formes similaires (Tambutté *et al.*, 1995 ; Shafir *et al.*, 2006),
- fixation aisée à n'importe quel type de substrat (Shafir *et al.*, 2003) et utilisation d'un faible espace de culture (Shafir *et al.*, 2003),
- absence d'organismes endolithiques (Al-Moghrabi *et al.*, 1993 ; Tambutté *et al.*, 1995),
- faibles coûts de productions (Shafir *et al.*, 2003),
- restauration des récifs endommagés (Shafir *et al.*, 2006),
- utilisation pour le commerce aquariophile (Rinkevich et Shafir, 2000).

Plusieurs étapes ont été décrites pour la production et l'utilisation des nubbins :

Etape 1 (14 - 21 jours) : régénération et croissance tissulaire sur la zone squelettique exposée après fragmentation. Cette étape de cicatrisation a pour objectif d'éviter toute absorption et/ou adsorption entre le traitement et le squelette (Tambutté *et al.*, 1995 ; Shafir *et al.*, 2003).

Etape 2 (1 - 3 mois) : croissance horizontale squelettique et tissulaire en position basale, recouvrant finement le substrat. Permet de mesurer la vitesse de croissance (Tambutté *et al.*, 1995 ; Muscatine *et al.*, 1997 ; Shafir *et al.*, 2003).

Etape 3 (4 - 6 mois) : Début de la croissance verticale du nubbin et de formation des branches de la colonie.

I.3. - Le choix des traitements

Le faible nombre de publications concernant la cryoconservation des Anthozoaires nous a orienté vers l'examen des techniques utilisées sur d'autres invertébrés marins. La conchyliculture et la pénéculture ont permis de dessiner les contours de notre démarche expérimentale. Les cryoprotecteurs employés par Hagedorn *et al.* (2006) sur les planulae étaient communs à ceux mentionnés comme efficaces sur les autres phyla d'invertébrés marins. Néanmoins, de nombreux auteurs ont fait état de l'intérêt d'associer les dissacharides aux cryoprotecteurs pénétrants.

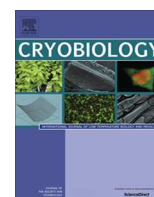
Dans ce contexte, nous avons choisi de tester pour cette première étude, la tolérance des apex de *P. damicornis* aux solutions cryoprotectrices suivantes : éthylène glycol + saccharose, glycérol + saccharose, méthanol + saccharose et DMSO + saccharose, à différentes concentrations et pendant différents temps d'exposition. Le microbouturage des apex a été réalisé en utilisant un scalpel préalablement nettoyé à l'alcool à 70° (Fig. 48).



Figure 48 : Les différentes étapes du microbouturage au traitement cryoprotecteur.
A : Acclimatation des branches de *Pocillopora damicornis*, B : Microbouturage des apex, C : Mise en culture des apex isolés, D : Exposition des apex aux solutions cryoprotectrices, E et F : Suivi post-traitement.

I.4. - Quelle tolérance des apex de *P. damicornis* exposés aux cryoprotecteurs ?

Feuillassier, L., Romans, P., Engelmann-Sylvestre, I., Masanet, P., Barthélémy, D., & Engelmann, F. (2014). Tolerance of apexes of coral *Pocillopora damicornis* L. to cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, 68 (1), 96-106.



Tolerance of apexes of coral *Pocillopora damicornis* L. to cryoprotectant solutions [☆]



Lionel Feuillassier^a, Pascal Romans^a, Isabelle Engelmann-Sylvestre^b, Patrick Masanet^c,
Dominique Barthélémy^d, Florent Engelmann^{b,*}

^aSorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMS 2348, Centre de Ressources Biologiques Marines, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, F-75005 Paris, France

^bIRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^cAquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France

^dOcéanopolis, Port de plaisance du Moulin Blanc, BP 91039, 29210 Brest Cedex 1, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2013

Accepted 7 January 2014

Available online 16 January 2014

Keywords:

Coral

Pocillopora damicornis

Cryopreservation

Apex

Cryoprotectant solutions

ABSTRACT

In this study, we investigated the tolerance of *Pocillopora damicornis* apexes to treatments with solutions containing penetrating and non-penetrating cryoprotective agents (CPAs). CPAs were employed individually or in binary, tertiary or quaternary solutions. In some experiments apexes were treated successively with two CPA solutions with increasing total concentration. *P. damicornis* apexes withstood exposure for up to 30 min to solutions containing 0.6–0.8 M sucrose (Suc) or trehalose (Tre). When apexes were treated with binary cryoprotectant solutions containing Suc and ethylene glycol (EG), methanol (Meth), dimethyl sulfoxide (Me₂SO) or glycerol (Gly), the CPAs employed in combination with Suc could be ranked in the following order of decreasing tolerance: EG > Meth > Me₂SO > Gly. *P. damicornis* apexes tolerated exposure to complex CPA solutions containing Suc, Me₂SO, EG and/or Meth with a total molarity of 2.45 M. In experiments where two successive CPA solutions were employed, apexes withstood treatment with the second, more concentrated solution at 0 °C for up to 10 min. These preliminary results pave the way to the development of a cryopreservation protocol for *P. damicornis* apexes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

During the 12th International Coral Reef Symposium in Cairns, Australia, an emergency call was launched by the scientific community, aiming at urgently safeguarding coral ecosystems. Indeed, human activities such as pollution (pesticides, herbicides, fertilizers, oils), ore mining, degradations, sampling, over-fishing, tourism and natural aggressions including storms, earthquakes, predation from the crown-of-thorns starfish (COTS) *Acanthaster planci*, global warming and ocean acidification have led to an important reduction of the world's coral cover [5,9,23]. This loss of coral abundance has also had a negative impact on vertebrate and invertebrate species restricted to coral ecosystems. Corals constitute food zones, refuges, reproduction areas and nurseries for numerous marine species [14,25,27]. For local human populations, coral reefs have a high socio-economic importance and they also provide a natural protection against insular erosion.

The inclusion, in 1981, of the Great Coral Reef in the UNESCO World Heritage raised awareness of human populations on the

fragility of coral reefs. However, the measures taken to date to protect and restore coral ecosystems have proved insufficient to stop reef degradation, which still takes place at an alarming rate, thus threatening the sustainability of coral ecosystems [23,31,32].

Cryopreservation provides a safe and cost-effective option for long-term conservation of animal, plant and micro-organism biodiversity [12,22]. For marine invertebrate organisms, cryopreservation was first employed to manage the production of commercially important Mollusc and Arthropod species, using larvae and reproduction products [11,33,48]. In a second stage, it was targeted towards marine biodiversity conservation purposes and was applied to various Sponge, Echinoderm and Arthropod species [33,47]. Compared to other phyla of marine invertebrates, cryopreservation of biological forms of Anthozoa species has been little studied.

For a cryopreservation protocol to be successful, the parameters of all its successive steps including conditioning of explants, application of cryoprotective agents (CPAs), cooling and warming rates, removal of CPAs, must be optimised. Another parameter of paramount importance is the selection of the developmental stage of the organisms to be cryopreserved [6,12,34,47].

A broad range of CPAs, including penetrating and non-penetrating molecules, are available for cryopreservation. In

[☆] Statement of funding: Funding for the implementation of this research work was provided by IRD and UPMC.

* Corresponding author. Fax: +33 (0)4 67 41 62 22.

E-mail address: florent.engelmann@ird.fr (F. Engelmann).

cryopreservation studies of marine invertebrates, permeating CPAs such as glycerol (Gly), dimethyl sulfoxide (Me₂SO) and propylene glycol (PG) have been the most commonly employed [33,45,47]. These compounds can be used separately [2,38] or in combination with non permeating CPAs including sugars such as trehalose (Tre) and glucose [1,24,29,35,37] or Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (HI-FBS) [19].

In most cases, gametes, embryos and larvae from marine invertebrates have been cryopreserved using a slow cooling procedure [33,45]. However, some authors suggested using the vitrification technique for cryopreservation of sensitive species [15,21]. This technique requires high concentrations of CPAs (up to 7 M) to induce the vitrification (formation of an amorphous glassy state) of intracellular solutes during cooling of explants. A vitrification procedure comprises the following successive steps. During the first step, termed loading treatment, partial cell dehydration is induced by exposing cells to a moderately concentrated CPA solution, the loading solution (LS). The application of a concentrated vitrification solution (VS) is the second step of the protocol. Exposure of explants to VSs leads to the removal of most or all intracellular crystallisable water. As a result, intracellular vitrification is achieved during rapid cooling of explants in liquid nitrogen (LN). After rapid rewarming, explants are partially rehydrated in an unloading solution (ULS), which contains an intermediate CPA concentration, before their transfer to standard culture conditions.

The first report of successful cryopreservation for corals was published by Franks et al. [13] who froze dissociated cells from 10 Anthozoan taxa. Two cryoprotectant solutions were used in this work, including a combination of 80% phosphate buffered saline (PBS adjusted to the pH of the seawater) with 2.5 M Me₂SO and a mixture of 80% Leibovitz cell medium (L15), 10% HIFBS and 1 M Gly. Cells suspended in the CPA medium were placed for 2 h at 4 °C, transferred at –70 °C for 24 h and then immersed in LN. After rewarming, cells were resuspended in culture medium according to Franks et al. (1994) and their proliferation started within 7 days.

More recently, Hagedorn et al. [18,19] cryopreserved sperm cells of *Fungia scutaria*, *Acropora tenuis*, *Acropora palmata* and *Acropora millepora* and dissociated embryonic cells of *F. scutaria*, *A. tenuis* and *Acropora millepora* using a slow cooling protocol. With *F. scutaria* and *A. palmata* sperm cells, the highest survival was achieved using a CPA solution containing 1.5 M Me₂SO and cooling rates of 20–30 °C/min [18]. The same protocol was used for *A. tenuis* sperm cells with an exposure to 1.5 M Me₂SO for 20 min before cooling (18 °C/min from 25 to –80 °C) [19]. The highest post-rewarming viability of *F. scutaria* embryonic cells was obtained following treatment with 1.5 M Me₂SO for 20 min and cooling at 0.5 °C/min. For *A. tenuis* and *A. millepora*, embryonic cells were exposed to 1.5 M Me₂SO with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) for 20 min and then cooled at 0.5 °C/min from 25 to –80 °C [18,19]. Samples were rewarmed at 30 °C.

In case of *Pocillopora damicornis*, preliminary studies have been performed using planulae and nubbins [15–17]. These studies evaluated the toxicity of CPA solutions, the protective effect of CPA solutions against chilling and the chilling sensitivity of zooxanthellae. Symbionts appeared very sensitive to cryopreservation, which may increase the difficulty to cryopreserve coral planulae. Slow cooling (0.1–4 °C/min) was not efficient for cryopreservation of *P. damicornis* and *F. scutaria* larvae. Using the vitrification technique may therefore offer an interesting alternative [16].

In this study, we investigated the tolerance of *P. damicornis* apexes to exposure to solutions containing mixtures of penetrating and non-penetrating CPAs, which have been employed for cryopreservation of plant [12] and animal [34] tissues and organs. Apexes were chosen for the following reasons: they could be easily and regularly sampled from coral branches raised in captivity, thus avoiding the dependence on random production of reproductive

material; apexes represented an homogeneous material in terms of size, developmental stage and genetic makeup; finally, apexes could regrow directly after the treatments, without passing through a larval settlement stage. After exposure to the different CPA solutions, apex survival was evaluated by polyp redeployment, tissue necrosis and expulsion of zooxanthellae.

Materials and methods

Biological material

Experiments were performed using the Scleractinian species *P. damicornis* (Linnaeus 1758) from Océanopolis, Brest Aquarium, France (branches resulting from spontaneous reproduction on CITES n IOX 01448/01450). The colonies were stalled for 2 months before the start of experiments at the Oceanological Observatory Arago, Pierre and Marie Curie University, Banyuls/mer, France.

Branch tips were cut in small fragments (maximal length: 0.5–1.0 cm) with a scalpel blade (cleaned with 96% alcohol) and immersed in Artificial Sea Water (ASW: temperature 25 °C, salinity: 35, pH: 8.4). The size of apexes was selected to allow their introduction in 2 ml cryovials. Apexes were placed equidistantly in square sterile plastic Petri dishes ($N = 16$ apexes/Petri dish) to avoid disrupting healing of apexes. To prevent their adhesion on the Petri dishes, these small coral pieces were moved weekly and the plastic dishes were cleaned. Apexes were maintained in these conditions for 2–3 weeks prior to trials to allow tissue colonisation on the exposed skeleton and fresh cuts [43]. Only healthy apexes were used for experiments.

Captivity conditions

Corals branches and apexes were maintained in the same culture conditions (water temperature: 25 °C; salinity: 35; pH 8.3; water exchange rate: 90 L/week) in a 230 L aquarium with ASW mixed with osmolated water (Reef Crystal salt, Aquarium System label; Ca: 450 ppm; Mg: 1300 ppm; KH \approx 7). Corals were illuminated with a constant irradiance of 170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with two 10,000 K metal halide lamps (VENTURE® LIGHTING, 250 W) with a 12 h light: 12 h dark photoperiod and a natural radiance from windows in the roof. The aquarium filter system was composed of a biological filter, UV-C 11 W clarifier (BOYU®) to sterilise the water and a protein skimmer (Aquarium systems NEWA400). Water circulation was maintained with two circulation pumps (Aquarium systems NEWA2000 – 2200 L/h). On a daily basis, a large quantity of *Artemia salina* (EG type) nauplii was distributed to corals and apexes to ensure a permanent state of satiety.

Treatments with cryoprotectant solutions

Apexes were treated with different CPA solutions following various experimental procedures (see below – Experiments 1–6). Biological samples ($N = 16$ apexes/experimental condition) were placed in a sterile plastic Petri dish and washed several times with ASW. Apexes were placed in a 200 μm cell-straining basket to facilitate their manipulation. After treatment with a CPA solution, apexes were drained on absorbent paper to eliminate any remaining solution. Apexes were rinsed five times for 1 min each with ASW (25 °C – Salinity: 35), then placed equidistantly on a new sterile Petri dish. Apexes were maintained for 48 h in a 2 L ASW aquarium at 25 °C. During stalling, apexes were not illuminated to avoid stressing the animals and to prevent coral bleaching [39].

Experimental solutions

In our experiments, CPAs were employed individually or in binary, tertiary or quaternary solutions. The following CPAs were used: sucrose (Suc) (D (+) – Saccharose, VWR, AnalaR NORMAPUR), trehalose (Tre) (D (+) – Trehalose dihydrate Biochemica, Appli-Chem), dimethyl sulfoxide (Me₂SO) (VWR, Analytical reagent, Assay: 99.7%), methanol (Meth) (SIGMA–ALDRICH, ACS-reagent, Assay: 99.8%), ethylene glycol (EG) (VWR, AnalaR NORMAPUR, Assay: 100%) and glycerol (Gly) (CARLO ERBA, ACS-For Analysis, Assay: 99.5%). CPA stock solutions were diluted by adding ASW (pH: 8.4) to obtain the final concentrations tested in each experiment.

Experiment 1

In this experiment, apices were exposed to CPA solutions containing 0.6–1.2 M Suc or Tre for 15–60 min at room temperature (22 °C).

Experiment 2

In this experiment, apices were exposed for 20, 30, 45 or 60 min to CPA solutions containing 1.0 or 1.5 M Me₂SO, Meth, EG or Gly + 0.5 M Suc or 2 M Me₂SO, Meth, EG or Gly + 0.4 M Suc at room temperature (22 °C). Apices were then transferred to a 0.6 M Suc solution for 20 min before rinsing in ASW as described above.

Experiment 3

In this experiment, apices were treated for 20 min with a CPA solution M1–M10 containing 0.6 M Suc, 0.25 M Me₂SO and Meth and/or EG at various concentrations at room temperature (22 °C) (Table 1). Apices were then transferred to a 0.6 M Suc solution for 20 min before rinsing in ASW as described above.

Table 1

CPA solutions used in Experiments 3–6. Me₂SO, Dimethyl sulfoxide; Meth, Methanol; EG, Ethylene glycol.

CPA solution	Total CPA concentration (M)	Composition
M1	2.10	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1.25 M Meth
M2	2.35	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1.5 M Meth
M3	2.85	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 2 M Meth
M4	2.10	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1.25 M EG
M5	2.35	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1.5 M EG
M6	2.85	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 2 M EG
M7	2.35	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 0.75 M Meth, 0.75 M EG
M8	2.85	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1 M Meth, 1 M EG
M9	3.85	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1.5 M Meth, 1.5 M EG
M10	4.85	0.6 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 2 M Meth, 2 M EG
S1	4.90	0.4 M Suc, 1.5 M Me ₂ SO, 1.5 M Meth, 1.5 M EG
S2	2.45	0.2 M Suc, 0.75 M Me ₂ SO, 0.75 M Meth, 0.75 M EG
S3	2.45	0.2 M Suc, 1.5 M Meth, 0.75 M EG
S4	2.45	0.2 M Suc, 0.75 M Meth, 1.5 M EG
S5	2.45	0.2 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 1.25 M Meth, 0.75 M EG
S6	2.45	0.2 M Suc, 0.25 M Me ₂ SO, 0.75 M Meth, 1.25 M EG

Experiment 4

In this experiment, apices were first treated for 20 min at room temperature (22 °C) with a CPA solution containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc. They were then immersed for 5 min at 0 °C in more concentrated CPA solutions S1–S6 (Table 1). Apices were then transferred to a 0.6 M Suc solution for 20 min before rinsing in ASW as described above.

Experiment 5

In this experiment, apices were first treated for 15, 30, 45 or 60 min at room temperature (22 °C) with a CPA solution containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc, then held for 5 min at 0 °C in solutions S2, S5 or S6 (Table 1) before transfer to a 0.6 M Suc solution for 20 min followed by rinsing in ASW as described above.

Experiment 6

In this experiment, apices were first treated for 20 min at room temperature (22 °C) with a CPA solution containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc, then exposed to solutions S2, S5 or S6 (Table 1) for 10 min at 0 °C before transfer to a 0.6 M Suc solution for 20 min followed by rinsing in ASW as described above.

Evaluation of polyp viability

Apices were identified using photographic monitoring (MOTIC SMZ-168-TLED) before and after treatments to estimate the impact of CPA treatments. Survival was followed and physical integrity of apices was examined based on non-degradation of the apex membrane, expulsion of zooxanthellae, tissular necrosis and polyp deployment. Zooxanthellae expulsion was evaluated using four classes following an increasing gradient of zooxanthellae eviction (Fig. 1). These four classes were used to evaluate apex viability (termed “apex degradation”, AD) 24 h after the cryoprotectant treatment:

- Class 1: very low zooxanthellae expulsion. Apices keep their brown colour. Polyp tentacles are deployed and they keep their zooxanthellae. The coenosarc shows no necrosis. Good retraction of polyp tentacles is observed. Apices are viable.
- Class 2: moderate zooxanthellae expulsion. Some bleaching of apices is observed. Apices display a pale brown colour due to slightly more intense symbiont eviction. The tentacles spread and retract quickly. The coenosarc shows no necrosis. Apices are viable.
- Class 3: large zooxanthellae expulsion. The apex coenosarc and polyp tentacles are transparent. Apices have lost their colour due to very important loss of zooxanthellae. Some zooxanthellae have colonised the apex tissues. Polyp tentacles are deployed but retraction is slow. Apices show no tissular necrosis. Survival of apices is uncertain.
- Class 4: very large zooxanthellae expulsion and localised tissular necrosis. As for class 3, coral bleaching is important, resulting in coenosarc and polyp transparency. Polyp tentacles are spread, little spread or retracted. Some parts of the apices are intact (polyps and coenosarcs transparent but entire) next to degraded zones. Survival of apices is uncertain.

Data analysis

All statistical analyses were carried out using the R software (R Foundation for Statistical Computing, 2007). Graphs were con-

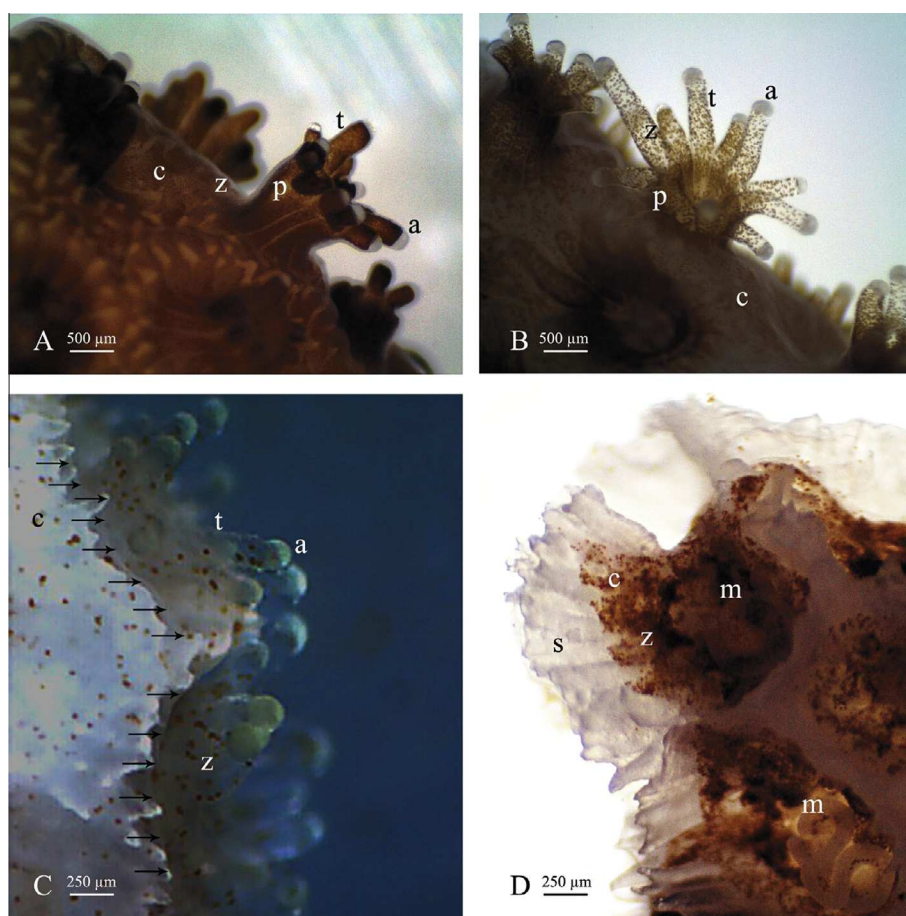


Fig. 1. Illustration of the four classes defined to evaluate *P. damicornis* apex viability 24 h after the cryoprotectant treatment. A (class 1): intact apex, B (class 2): moderate zooxanthellae expulsion (moderate damage), C (class 3): large zooxanthellae expulsion (arrows = transparent coenosarc). D (class 4): very large zooxanthellae expulsion and localized tissular necrosis (skeleton apparent). a, acrosphere; c, ceenosarc; m, mesenteric capsizing; p, polyp; s, skeleton; t, tentacle; z: zooxanthellae.

structured using the R software (experiments 1–4 and 6), and Microsoft Excel (version 2007) for experiment 5. Differences in living apex percentages (LA) between samples were evaluated by Fisher's Exact Test and AD comparisons were performed by one-way analysis of variance with the Kruskal–Wallis test (non parametric analyses). When groups were limited to two qualitative classes versus numeric variables with no equal variances and lack of normality distribution, the Wilcoxon test was used. Differences were considered statistically significant with a 95% confidence level (p values < 0.05).

Results

Experiment 1

Apexes did not withstand exposure to CPA solutions containing Suc or Tre at concentrations equal to or above 1.0 M, whatever the treatment duration (Fig. 2). Response to cryoprotectant treatment was either 100% survival or 100% mortality.

The response of apexes to the various CPA solutions tested was similar, resulting in either rapid degradation of the biological material or in tolerance with various intensities of zooxanthellae expulsion and extrusion of mesenteric filaments. Dead apexes were identified by a strong zooxanthellae expulsion and an important tissue loss.

For exposure times up to 60 min and for concentrations of 0.6 and 0.7 M Suc and Tre, apexes showed 100% survival but zooxan-

thellae expulsion (shown by the AD classes of apexes in Fig. 2) increased in line with increasing sugar concentration.

For Suc and Tre solutions, exposure times and concentrations values had separately a significant impact on LA percentage ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) and on AD ($p < 0.05$, Kruskal-test). These two qualitative variables (exposure time and concentration) had also a significant combined effect on AD ($p < 0.05$, Kruskal-test). AD increased significantly with the combination of variables, exposure times and concentration, for both disaccharides ($p < 0.05$, Kruskal-test), resulting in an increase in the quantity of expelled zooxanthellae and in the decrease of LA.

LA and AD were not significantly different for exposure times of 15, 20 and 30 min and sugar concentrations of 0.6, 0.7 and 0.8 M ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test and $p > 0.05$, Kruskal-test, respectively). For exposure durations of 45 and 60 min to sugar concentrations of 0.6–0.8 M, Tre induced higher AD compared to Suc ($p < 0.05$, Wilcoxon-test). When sugars were employed at concentrations of 0.9 and 1.0 M, for exposure times of 15 and 20 min, Suc produced higher AD compared to Tre ($p < 0.05$, Wilcoxon-test).

Based on the results of this first experiment, it could be concluded that *P. damicornis* apexes could be treated with Suc and Tre solutions at concentrations of 0.6–0.8 M and for exposure times up to 30 min.

Experiment 2

AD and LA were significantly correlated ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) in Experiment 2. CPA concentration and exposure time had

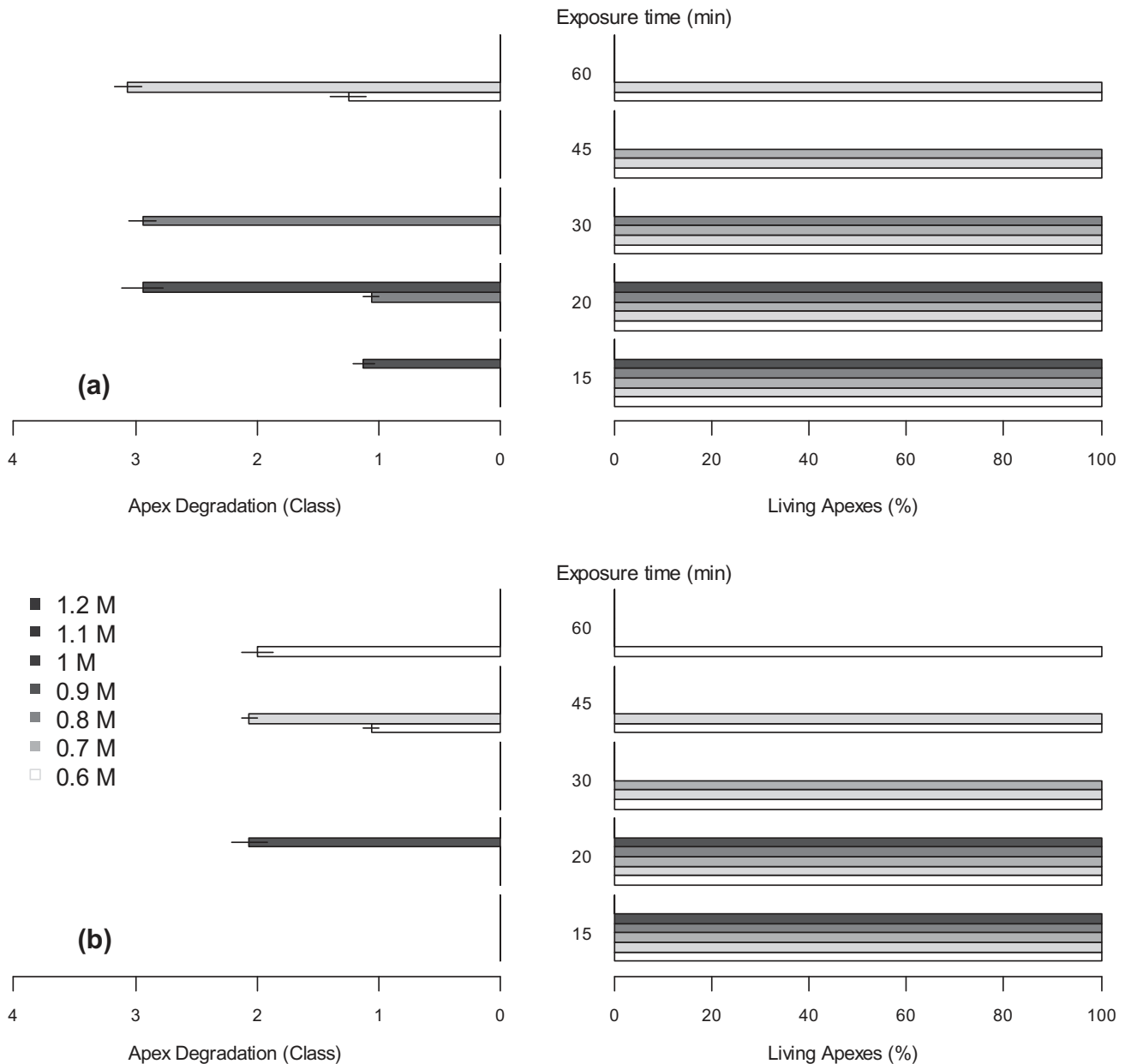


Fig. 2. *P. damicomis* apex degradation (AD) and percentage of living apices (LA) following exposure for 15, 20, 30, 45 or 60 min to a CPA solution containing (a) sucrose (Suc) or (b) trehalose (TRE) at various concentrations (0.6–1.2 M), at room temperature. AD (classes 1, 2, 3 or 4) was determined only for LAs.

a significant impact on AD and LA ($p < 0.05$, Kruskal-test and $p < 0.05$, χ^2 -test, respectively). The combination of these two qualitative variables had a significant effect on AD ($p < 0.05$, Kruskal-test).

CPA solutions containing Gly + Suc were lethal in all experimental conditions tested (Fig. 3a). CPA solutions containing Me₂SO + Suc were also lethal for treatment durations of 45 and 60 min and for a 30 min treatment duration when a 2.0 M Me₂SO concentration was employed (Fig. 3b). However, apices tolerated exposure to CPA solutions containing 1.0 M and 1.5 M Me₂SO for 20 and 30 min. CPA solutions containing Meth + Suc were lethal for 60 min exposure durations and for a 45 min treatment when a 2.0 M Meth concentration was employed (Fig. 3c). For shorter treatment durations (20 and 30 min), AD was high when the CPA solution contained 2 M Meth but 100% LA and no AD were noted with CPA solutions containing 1 or 1.5 M Meth. No survival was obtained when apices were treated for 45 or 60 min with a CPA solution containing 2 M EG + Suc (Fig. 3d). In all other treatments with

CPA solutions containing EG + Suc, 100% LA and no AD were obtained (except after a 30 min treatment with a CPA containing 2 M EG + 0.4 M Suc, in which case a class 2 AD was noted).

Experiment 2 showed that EG was the less toxic of the four CPAs tested ($p < 0.05$, χ^2 -test), ensuring 100% LA after exposure times up to 60 min at 1.0 and 1.5 M concentrations. No significant differences were noted for AD and LA between these two concentrations ($p > 0.05$, χ^2 -test). Unlike the other CPAs tested, a 2 M EG concentration for 20 min was tolerated by the apices without occurrence of AD.

Experiment 3

In Experiment 3, CPA concentration was correlated with LA ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test) and the combination of CPAs was correlated with zooxanthellae expulsion ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test). When the CPA solutions contained 1.25–2.0 M Meth (M1–M3) or 1.25 M EG (M4), 100% LA was observed, without any zooxanthellae

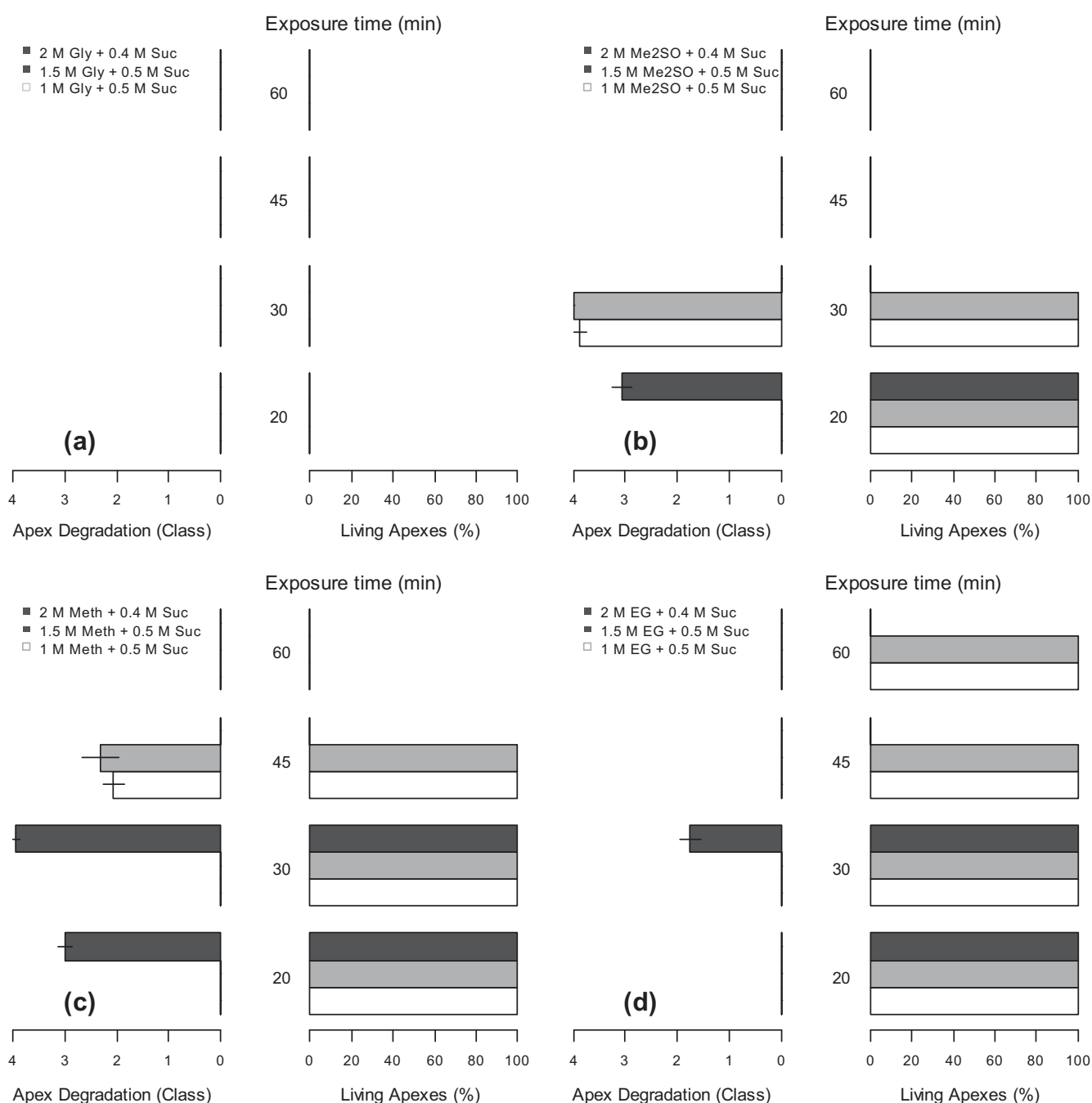


Fig. 3. *P. damicornis* apex degradation (AD) and living apices (LA) 24 h after treatment with four CPA solutions ($N = 16$ apices/treatment). Four CPA solutions: (a) glycerol (Gly) + sucrose (Suc); (b) dimethyl sulfoxide (Me_2SO) + Suc; (c) methanol (Meth) + Suc; and (d) ethylene glycol (EG) + Suc at different concentrations (2 M Gly/ Me_2SO /Meth/EG + 0.4 M Suc, 1.5 M Gly/ Me_2SO /Meth/EG + 0.5 M Suc and 1 M Gly/ Me_2SO /Meth/EG + 0.5 M Suc) were employed for different exposure times (20, 30, 45 or 60 min) at room temperature. AD classes (1, 2, 3 and 4) were determined only on living apices.

expulsion (Fig. 4). When CPA solutions contained 1.5 (M5) or 2.0 M (M6) EG, 100% LA was achieved but zooxanthellae expulsion occurred. This showed that exposure of apices to Meth was better tolerated compared to EG at the highest concentrations tested. When Meth and EG were used together, 100% LA with zooxanthellae expulsion and tissular damage was observed for the lower CPA concentrations of 0.75 M (M7) and 1.0 M (M8). Higher Meth and EG concentrations of 1.5 M (M9) and 2.0 M (M10) led to apex death.

Experiment 3 demonstrated the ability of *P. damicornis* apices to tolerate exposure to complex CPA solutions containing Suc, Me_2SO ,

SO, EG and/or Meth and showed that Meth was better tolerated than EG when combined with other penetrating CPAs (alcohols, Me_2SO).

Experiment 4

The composition of the S solution employed was correlated with AD ($p < 0.05$, Kruskal-Test) and LA ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test).

Treatment of apices with solution S1 was lethal but LAs were obtained with solutions S2–S6 (Fig. 5). Exposure to solution S2,

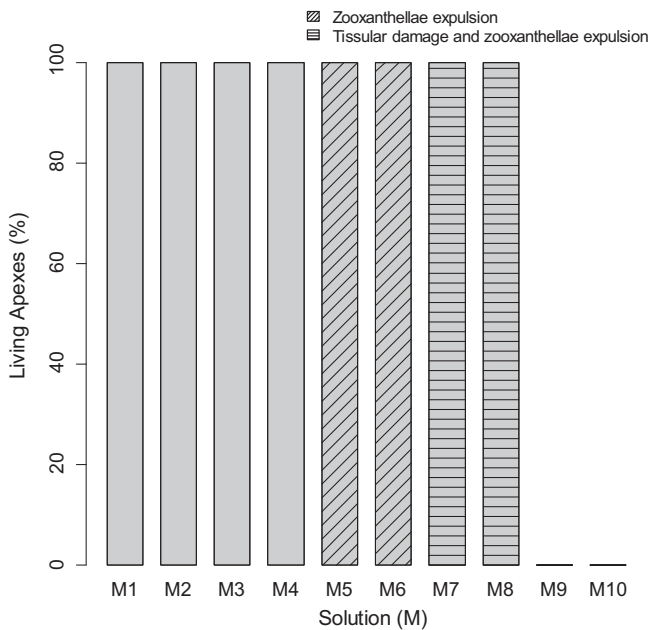


Fig. 4. Effect of a 20 min treatment at room temperature with different CPA solutions on percentage of *P. damicornis* living apices (LA), zooxanthellae expulsion and tissular damage ($N = 16$ apices/treatment). CPA solutions contained 0.6 M sucrose (Suc) + 0.25 M dimethyl sulfoxide (Me_2SO) + ethylene glycol (EG) and/or methanol (Meth) at different concentrations (M1, 1.25 M Meth; M2, 1.5 M Meth; M3, 2 M Meth; M4, 1.25 M EG; M5, 1.5 M EG; M6, 2 M EG; M7, 0.75 M Meth + 0.75 M EG; M8, 1 M Meth + 1 M EG; M9, 1.5 M Meth + 1.5 M EG, M10, 2 M Meth + 2 M EG).

which included the same CPAs as S1 at half their molarity, led to 100% LA. Treatment of apices with EG + Suc or Meth + Suc followed by exposure to solution S2 did not induce any difference in LA ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) but higher AD was produced following treatment with Meth + Suc compared with EG + Suc ($p < 0.05$, Kruskal-test).

Solutions S3 and S4 contained Meth and EG but with inverted concentrations between the two S solutions. Treatment of apices with a CPA solution containing EG + Suc or Meth + Suc did not induce any significant difference in their response to exposure to solutions S3 and S4 (LA: $p > 0.05$, Fisher's Exact-test and AD: $p > 0.05$, Kruskal-test). Treatment with solution S3 induced significantly lower LA ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test) and higher AD ($p < 0.05$, Kruskal-test) compared to solution S4.

With Solution S5, both LA and AD were significantly higher and lower, respectively when the first CPA solution employed contained Meth + Suc compared to EG + Suc ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test and $p < 0.05$, Kruskal-test, respectively). By contrast, with Solution S6, the LA percentage was significantly lower and AD significantly higher when the first CPA solution employed contained Meth + Suc compared to EG + Suc ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test and $p < 0.05$, Kruskal-test, respectively).

This comparison between solutions S5 and S6 showed that higher LA and lower AD were obtained when the first CPA solution to which apices were exposed contained the most concentrated alcohol present in the S solution employed.

Experiment 4 showed that *P. damicornis* apices could be treated with a succession of two CPA solutions with progressively increased concentration. As was observed in Experiment 2, Meth was less tolerated by apices compared to EG at high concentrations. This experiment also demonstrated that *P. damicornis* apices withstood the thermal shock of exposure to S2–S6 at 0 °C.

Experiment 5

In Experiment 5, there was no significant difference in LA between the three S solutions tested but solution S2 induced a significantly different AD compared with solutions S5 and S6 ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test and $p < 0.05$, Kruskal-test, respectively). No significant differences in AD ($p > 0.05$, Wilcoxon-test) and LA ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) were noted between the two CPA solutions containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc. Hundred% LA and no AD were obtained after 15 min exposure to CPA solutions containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc followed by 5 min exposure to S2, S5 or S6 at 0 °C (Fig. 6). When exposure durations to CPA solutions containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc increased, LA decreased and AD increased significantly ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test and $p < 0.05$, Kruskal-test).

Experiment 5 showed that apices could be exposed to S solutions only if treatment with CPA solutions containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc was shorter than or equal to 20 min. Higher LA and lower AD were obtained with solution S2, compared to solutions S5 and S6.

Experiment 6

Treating apices for 10 min at 0 °C with solutions S2, S5 or S6 was detrimental to LA percentage (Table 2). Indeed, LAs were obtained only after treatment with a CPA solution containing 1.5 M Meth + 0.5 M Suc followed by solution S5, and after treatment with a CPA solution containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc followed by solution S6. However, higher zooxanthellae expulsion was noted in both cases.

Experiment 6 showed the detrimental effect on LA percentage of increasing the duration of treatment with S solutions at 0 °C.

Discussion

This work is the first report on the response of coral apex exposure to CPA solutions, as a preliminary study to cryopreservation trials. In our experiments, we tested a range of penetrating and non-penetrating CPAs including Suc, Tre, EG, Meth, Me_2SO and Gly. They were employed alone or in binary, ternary or quaternary solutions. We also tested the successive application of CPA solutions with progressively increasing concentration.

Tolerance of biological materials to CPAs depends on their nature, concentration, duration and temperature of exposure and on their utilisation, individually or in mixtures [2,7,8,24,49]. In our experiments, *P. damicornis* apices withstood treatment with 0.6–0.8 M and 0.9 M Suc and Tre solutions for up to 30 and 20 min, respectively without any effect on LA and zooxanthellae expulsion. Exposure durations of 45 min and sugar concentrations of 0.9 M caused an increase in AD and LA. *P. damicornis* apices did not withstand 1.0 M Suc and Tre concentrations.

Only few experiments have been performed with other marine organisms to test the toxicity of Suc or Tre in single solutions. Survival of post-hatch *A. salina* nauplii decreased to 60% and 35% following exposure to 0.25 and 2.0 M Suc solutions, respectively [4]. Embryos and nauplius larvae of the penaeid shrimp *Trachypenaeus byrdi* did not tolerate exposure to 0.25 M Suc solutions for more than 20 min and a 1.0 M Suc solution was lethal [3]. Robertson et al. [41] showed that *Sciaenops ocellatus* embryos and tail-bud-stage embryos withstood treatment with 0.5 M Suc for 20 min. The marine alga *Attheya ussurensis* was successfully cryopreserved following treatment with 0.04 M Tre [33]. *P. damicornis* apices tol-

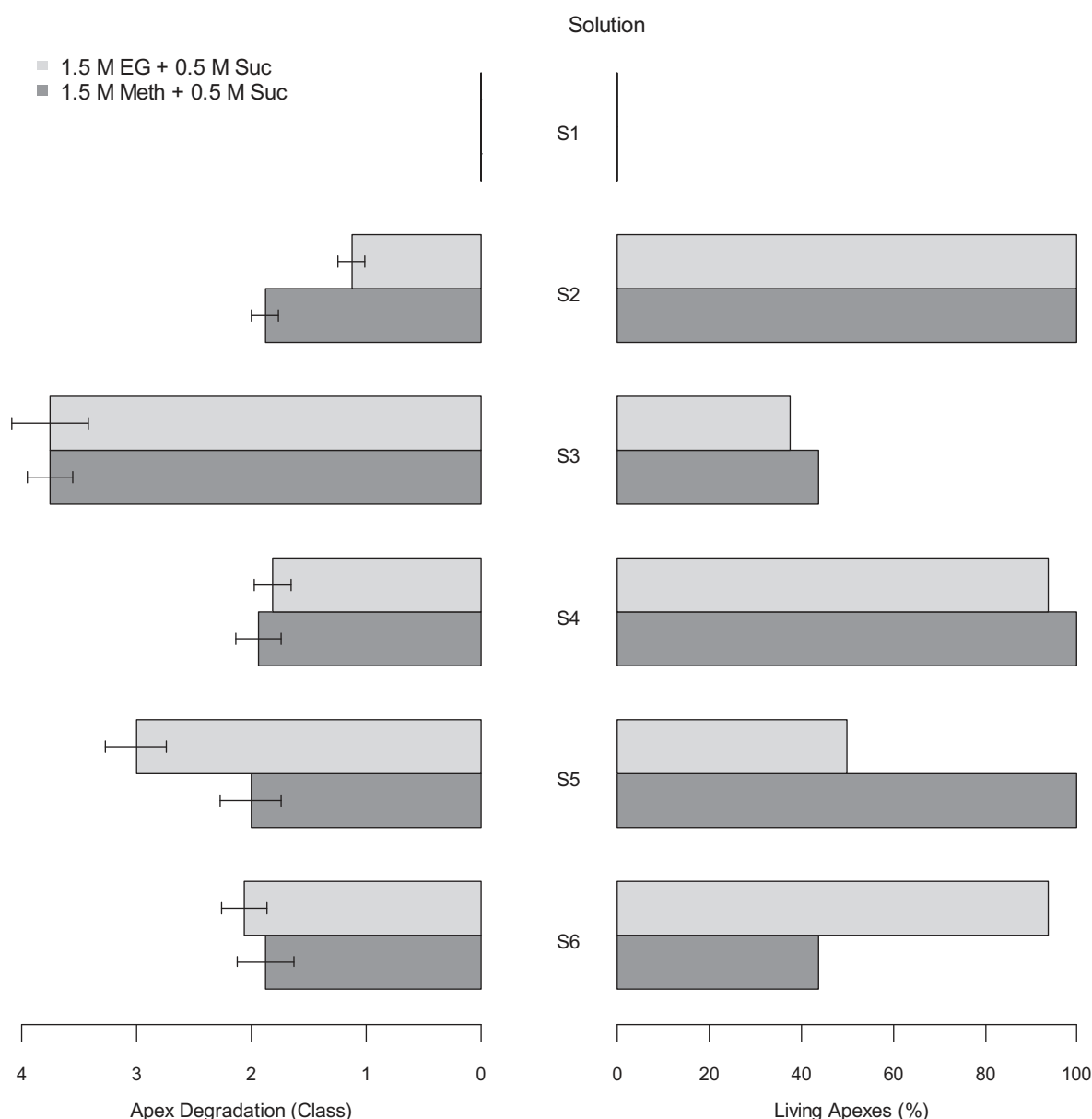


Fig. 5. *P. damicornis* apex degradation (AD) and living apices (LA) 24 h after treatment for 20 min at room temperature to a CPA solution containing ethylene glycol (EG) + sucrose (Suc) or methanol (Meth) + Suc at (1.5 M EG/Meth + 0.5 M Suc), followed by treatment with CPA solutions S1–S6 for 5 min at 0 °C ($N = 16$ apices/treatment). AD classes (1, 2, 3 and 4) were determined only for LAs. S1, 0.4 M Suc + 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Meth + 1.5 M EG; S2, 0.2 M Suc + 0.75 M Me₂SO + 0.75 M Meth + 0.75 M EG; S3, 0.2 M Suc + 1.5 M Meth + 0.75 M EG; S4, 0.2 M Suc + 0.75 M Meth + 1.5 M EG; S5, 0.2 M Suc + 0.25 M Me₂SO + 1.25 M Meth + 0.75 M EG; S6, 0.2 M Suc + 0.25 M Me₂SO + 0.75 M Meth + 1.25 M EG.

erated exposure to Suc and Tre solutions in a range of concentrations similar to those employed with species of other phyla.

Cryopreservation studies performed with marine invertebrate cells have demonstrated that when binary CPA solutions consisting of one alcohol and one sugar were employed, the presence of the sugar reduced the toxicity of the alcohol and limited cell damage [21,26,40]. In our experiments, no survival was obtained after treatments with CPA solutions containing Gly and Suc, for exposure periods of 20 min and above. By contrast, *P. damicornis* tissular explants withstood treatment with a CPA solution containing Gly and Suc (unpublished results). *P. damicornis* and *F. scutaria* planulae withstood exposure to 0.5 and 1.0 M Gly for 15 min [15]. Less developed states (tissular explants) appeared more tolerant to Gly than fixed forms (apexes).

Gly tolerance has been tested with other marine invertebrates. Treatment with CPA solutions including Gly was toxic to *Ostrea*

edulis sperm cells [50] and *Haliotis midae* embryos [42]. By contrast, Gly employed alone had a positive effect for cryopreservation of dissociated cells of the abalone *Haliotis tuberculata* [38] and of *C. gigas* embryos [28]. Baust and Lawrence [4] demonstrated that treatment of larvae of the crustacean *A. salina* with CPA solutions including 1–4 M Gly increased their chilling tolerance. Survival of spermatozoa of the scallop *Chlamys farreri* was high when Gly was used alone but it decreased when Gly was employed in combination with glucose or lactose [51].

Me₂SO is one of the CPAs most widely used for cryopreservation of animal and plant tissues and organs, as it is generally toxic only when employed at high concentrations [33,48]. For cryopreservation of spermatozoa, embryos and larvae of several invertebrate marine organisms, Me₂SO was effective at concentrations between 0.7 and 2.0 M in combination with 0.45–1.0 M Tre [1,8,21,26,29,49], 0.2 M Suc [7] or 0.15–0.3 M glucose [6,7,30]. Via-

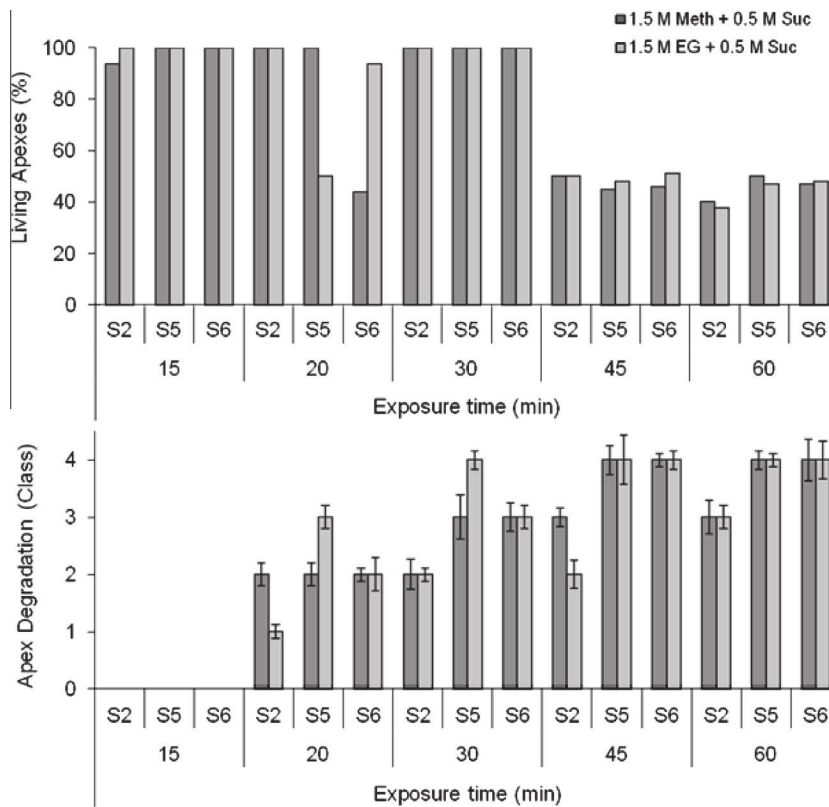


Fig. 6. *P. damicornis* apex degradation (AD) and living apices (LA) 24 h after treatment for 20 min at room temperature with a CPA solution containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc for 15–60 min, followed by treatment with solutions S2, S5 or S6 for 5 min at 0 °C ($N = 16$ apices/treatment). AD classes (1, 2, 3 and 4) were determined only on LAs. S2, 0.2 M Suc + 0.75 M Me_2SO + 0.75 M Meth + 0.75 M EG; S5, 0.2 M Suc + 0.25 M Me_2SO + 1.25 M Meth + 0.75 M EG; S6, 0.2 M Suc + 0.25 M Me_2SO + 0.75 M Meth + 1.25 M EG.

Table 2

P. damicornis living apices (LA) and zooxanthellae expulsion 24 h after treatment for 20 min at room temperature with a CPA solution containing 1.5 M EG + 0.5 M Suc or 1.5 M Meth + 0.5 M Suc followed by treatment for 10 min at 0 °C with solutions S2, S5 or S6 ($N = 16$ apices/treatment). AD classes (1, 2, 3 and 4) were determined only on LAs. S2, 0.2 M Suc + 0.75 M Me_2SO + 0.75 M Meth + 0.75 M EG; S5, 0.2 M Suc + 0.25 M Me_2SO + 1.25 M Meth + 0.75 M EG; S6, 0.2 M Suc + 0.25 M Me_2SO + 0.75 M Meth + 1.25 M EG.

CPA solution	Solution	Living apices (%)	Zooxanthellae expulsion
1.5 M EG + 0.5 M Suc	S2	0	–
	S5	81.25	Class 4
	S6	0	–
1.5 M Meth + 0.5 M Suc	S2	0	–
	S5	0	–
	S6	100	Class 4

bility of larvae of the sea urchin *Evechinus chloroticus* was achieved with a CPA solution containing 1–2 M Me_2SO and 0.03 M Tre [2]. Paredes et al. [36] obtained high survival after cryopreservation of *Paracentrotus lividus* eggs following treatment with 1.0–1.5 M Me_2SO + 0.03–0.04 M Tre, but only when using last blastula stages. By contrast, Acosta-Salmon et al. [1] demonstrated the cytotoxic effect on *C. gigas* sperm cells of a CPA solution containing 2.0 M Me_2SO and 0.2 M glucose.

In case of corals, Hagedorn et al. [15,18,19] successfully cryopreserved *F. scutaria*, *A. palmata*, *A. tenuis* and *A. millepora* spermatozoa cells and *F. scutaria*, *A. tenuis* and *A. millepora* dissociated embryonic cells following treatment with 1.5 M Me_2SO . *P. damicornis* fragments withstood treatment with 1–2 M Me_2SO [20].

In the present study, *P. damicornis* apex survival was obtained after treatment for 20 and 30 min with CPA solutions containing

1.0 and 1.5 M Me_2SO and 0.5 M of Suc. *P. damicornis* apices thus tolerated treatment with Me_2SO at concentrations similar to those employed with other invertebrate marine organisms.

In our experiments, EG and Meth employed in combination with Suc were well tolerated by *P. damicornis* apices, as they withstood exposure to 1.0–1.5 M alcohol for 20–30 min. EG could be applied for up to 20 min at 2 M concentration, resulting in low AD, while treatment with Meth at the same concentration resulted in an increase in zooxanthellae expulsion. For some marine invertebrates, EG, used alone or in combination with Suc or Tre, ensured good survival after cryopreservation [8,10,11,21,37]. Adams et al. [2] observed that sea urchin larvae tolerated treatment with EG at 1–2 M for 30 min but no survival was achieved after cryopreservation. By contrast, high toxicity to EG was noted with oocytes of the hard coral *Echinopora* sp. for concentrations between 0.25 and 2.0 M [46]. Using embryos of the sea urchin *P. lividus*, Paredes et al. [36] demonstrated that EG toxicity varied, depending on the addition of Tre in the CPA solution and on the embryo development stage. As regards Meth, Dong et al. [11], Roux et al. [42] and Tsai et al. [46] indicated that it should be used at low concentration. Tervit et al. [44] did not get any post-cryopreservation survival of *C. gigas* oocytes after cryoprotective treatment with Meth. The use of 3 M Meth was toxic for *P. damicornis* zooxanthellae [20].

Based on our experiments, it was possible to rank the CPAs employed in combination with Suc in the following order of decreasing tolerance: EG > Meth > Me_2SO > Gly. A similar ranking was observed with *C. gigas* [40] and *H. midae* embryos [42]. In case of Anthozoan *Echinopora* spp. oocytes Tsai et al. [46] noted the following order of decreasing tolerance: Meth > Me_2SO > Propylene glycol (PG) > EG. Xue et al. [51] observed the higher toxicity of Gly compared to Me_2SO , EG or Meth on *C. farreri* spermatozoa. In

our experiments, at the same concentration, non-penetrating CPAs (Suc or Tre) were more toxic to *P. damicornis* apexes compared to penetrating ones (Me₂SO, EG or Meth). Renard [40] demonstrated the lower tolerance of *C. gigas* embryos to Suc compared to penetrating CPAs. Xue et al. [51] noted that adding Suc to the CPA solution had no positive effect on viability of *C. farreri* spermatozoa.

This study demonstrated that *P. damicornis* apexes could tolerate treatment with ternary or quaternary CPA solutions including sugar, Me₂SO and alcohol(s). Meth was generally less toxic than EG and Me₂SO was well tolerated when employed at low concentration. Several reports [4,7,36] indicated that mixtures of CPAs were generally more efficient than a single CPA employed at the same total molarity. Apexes could also tolerate exposure to two successive CPA solutions with progressively increased concentration. Such a step-wise treatment may allow reducing osmotic shock, as demonstrated with other marine invertebrates [2,36,44] and also reaching a higher final CPA concentration.

During this study, zooxanthellae expulsion was the first sign of CPA toxicity. This confirms the sensibility of zooxanthellae to CPA treatments and indicates that zooxanthellae expulsion constituted a good biological indicator of stress incurred by exposure of coral to CPA solutions. Hagedorn et al. [16,17] showed that symbiotic algae of three *Symbiodinium* subtypes were sensitive to CPA treatments. It should be noted that zooxanthellae expulsion does not necessarily generate the death of the symbionts. Indeed, Ralph et al. [39] observed that expelled zooxanthellae maintained their photosynthetic activity.

The culture environment of coral is an important parameter to increase their tolerance to CPA treatment and cryopreservation. Adams et al. [2] suggested that the diet of sea urchins *E. chloroticus* adults could influence gamete chilling sensitivity and ability to withstand cryopreservation. With corals, adequate nutrient supplements such as dissolved elements (amino acids, zooxanthellae free) may increase recovery of apexes after CPA treatment. Lastly, when investigating coral calcification using a ⁴⁵Ca solution, Tambutté et al. [43] highlighted the importance of rinsing apexes to expel the ⁴⁵Ca solution from the coelenteron and extracellular space. In a similar manner, in CPA toxicity experiments with coral apexes, extensive rinsing of treated explants should be performed, as insufficient rinsing may induce CPA retention in explants, thus allowing the extension of CPA action and leading to a toxic effect.

In conclusion, this study demonstrated that *P. damicornis* apexes withstood exposure to complex CPA solutions containing penetrating and non-penetrating CPAs. A decrease in apex survival was observed when the total molarity of the CPA solution was above 3 M. It also showed the necessity to follow a systematic approach for the elaboration of the optimal CPA solution and for the establishment of the optimal cryoprotective treatment. This work paves the way to the future utilisation of the vitrification technique for cryopreserving *P. damicornis* apexes.

Acknowledgments

The authors acknowledge the continuous support of the Océanopolis team. They also thank Karine Nedoncelle and Sandrine Bodin for their help in the preparation of this manuscript and Nancy Trouillard and Valérie Bayo for their assistance in the experiments.

References

- [1] H. Acosta-Salmón, D.R. Jerry, P.C. Southgate, Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa, *Cryobiology* 54 (2007) 13–18.
- [2] S.L. Adams, P.A. Hessian, P.V. Mladenov, The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin, *Evechinus chloroticus*, *Cryobiology* 52 (2006) 139–145.
- [3] J. Alfaro, J. Komen, E.A. Huisman, Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae, *Aquaculture* 195 (2001) 353–366.
- [4] J.G. Baust, A.L. Lawrence, Enhancement of chill tolerance in larval *Artemia salina*: cooling regimens and multiple type cryoprotectant exposure, *Proc. World Maricul. Soc.* 10 (1979) 421–428.
- [5] K.E. Carpenter, M. Abrar, G. Aeby, R.B. Aronson, S. Banks, A. Bruckner, A. Chiriboga, J. Cortés, J.C. Delbeek, L. DeVantier, G.J. Edgar, A.J. Edwards, D. Fenner, H.M. Guzmán, B.W. Hoeksema, G. Hodgson, O. Johan, W.Y. Licuanan, S.R. Livingstone, E.R. Lovell, J.A. Moore, D.O. Obura, D. Ochavillo, B.A. Polidoro, W.F. Precht, M.C. Quibilan, C. Reboton, Z.T. Richards, A.D. Rogers, J. Sanciangco, A. Sheppard, C. Sheppard, J. Smith, S. Stuart, E. Turak, J.E.N. Veron, C. Wallace, E. Weil, E. Wood, One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts, *Science* 321 (2008) 560–563.
- [6] N.H. Chao, C. Liao, Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos, *Aquaculture* 197 (2001) 161–189.
- [7] Y.H. Choi, Y.J. Chang, The influence of cooling rate, developmental stage, and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*, *Cryobiology* 46 (2003) 190–193.
- [8] Y.H. Choi, J.Y. Lee, Y.J. Chang, The influence of developmental stages and protective additives on cryopreservation of surf clam (*Spisula sachalinensis*) larvae, *J. Environ. Biol.* 29 (4) (2008) 461–463.
- [9] G. De'ath, K.E. Fabricius, H. Sweatman, M. Puotinen, The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes, *PNAS* 109 (44) (2012) 17995–17999.
- [10] A.D. Diwan, S. Joseph, Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards, *Indian J. Fish.* 46 (2) (1999) 159–166.
- [11] Q. Dong, C. Huang, B. Eudeline, T.R. Tiersch, Cryoprotectant optimization for sperm of diploid Pacific oysters by use of commercial dairy sperm freezing facilities, *Aquaculture* 271 (2007) 537–545.
- [12] F. Engelmann, Plant cryopreservation: progress and prospects, *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 40 (2004) 427–433.
- [13] U. Frank, C. Rabinowitz, B. Rinkevich, In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians, *Mar. Biol.* 120 (1994) 491–499.
- [14] N.A.J. Graham, S.K. Wilson, S. Jennings, N.V.C. Polunin, J.P. Bijoux, J. Robinson, Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems, *PNAS* 103 (22) (2006) 8425–8429.
- [15] M. Hagedorn, V.L. Carter, R.A. Steyn, D. Krupp, J.C. Leong, R.P. Lang, T.R. Tiersch, Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*, *Cryobiology* 52 (2006) 454–458.
- [16] M. Hagedorn, R. Pan, E.F. Cox, L. Hollingsworth, D. Krupp, T.D. Lewis, J.C. Leong, P. Mazur, W.F. Rall, D.R. MacFarlane, G. Fahy, F.W. Kleinhaus, Coral larvae conservation: physiology and reproduction, *Cryobiology* 52 (2006) 33–47.
- [17] M. Hagedorn, V.L. Carter, J.C. Leong, F.W. Kleinhaus, Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*), *Cryobiology* 60 (2010) 147–158.
- [18] M. Hagedorn, V. Carter, K. Martorana, M.K. Paresa, J. Acker, I.B. Baums, E. Borneman, M. Brittsan, M. Byers, M. Henley, M. Laterveer, J.A. Leong, M. McCarthy, S. Meyers, B.D. Nelson, D. Petersen, T.R. Tiersch, R.C. Uribe, E. Woods, D. Wildt, Preserving and using germplasm and dissociated embryonic cells for conserving Caribbean and Pacific Coral, *PLoS ONE* 7 (3) (2012) e33354, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033354>.
- [19] M. Hagedorn, M.J.H. Van Oppen, V. Carter, M. Henley, D. Abrego, E. Puill-Stephan, A. Negri, A. Heyward, D.R. MacFarlane, R. Spindler, First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created, *Cryobiology* 65 (2012) 157–158.
- [20] M. Hagedorn, A. Farrell, V.L. Carter, *Cryobiology of coral fragments*, *Cryobiology* 66 (2013) 17–23.
- [21] F. Hamaratoglu, A. Eroglu, M. Toner, K.C. Sadler, Cryopreservation of starfish oocytes, *Cryobiology* 50 (2005) 38–47.
- [22] S.J. Hiemstra, T. Van Der Lende, H. Woelders, The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies, in: FAO (Ed.), *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*, FAO, Rome, 2006, pp. 45–59.
- [23] O. Hoegh-Guldberg, P.J. Mumby, A.J. Hooten, R.S. Steneck, P. Greenfield, E. Gomez, C.D. Harvell, P.F. Sale, A.J. Edwards, K. Caldeira, N. Knowlton, C.M. Eakin, R. Iglesias-Prieto, N. Muthiga, R.H. Bradbury, A. Dubi, M.E. Hatzioiols, Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification, *Science* 318 (2007) 1737–1742.
- [24] Á. Horváth, A. Bubalo, A. Čučević, V. Bartulović, L. Kotrik, B. Urbányi, B. Glamuzina, Cryopreservation of sperm and larvae of the european flat oyster (*Ostrea edulis*), *J. Appl. Ichthyol.* 28 (2012) 948–951.
- [25] T.P. Hughes, A.H. Baird, D.R. Bellwood, M. Card, S.R. Connolly, C. Folke, R. Grosberg, O. Hoegh-Guldberg, J.B.C. Jackson, J. Kleypas, J.M. Lough, P. Marshall, M. Nyström, S.R. Palumbi, J.M. Pandolfi, B. Rosen, J. Roughgarden, Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs, *Science* 301 (2003) 929–933.
- [26] C. Jeyalectumie, T. Subramoniam, Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*, *Biol. Bull.* 177 (1989) 247–253.
- [27] J.A. Kleypas, R.W. Buddemeier, D. Archer, J.P. Gattuso, C. Langdon, B.N. Opdyke, Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs, *Science* 284 (1999) 118–120.
- [28] T.T. Lin, N.H. Chao, H.T. Tung, Factors affecting survival of cryopreserved oyster (*Crassostrea gigas*) embryos, *Cryobiology* 39 (1999) 192–196.

- [29] L. Lyons, D.R. Jerry, P.C. Southgate, Cryopreservation of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) spermatozoa: effects of cryoprotectants on spermatozoa motility, *J. Shellfish Res.* 24 (4) (2005) 1187–1190.
- [30] J.G. Martínez, A.M. Tarazona-Morales, S.C. Pardo-Carrasco, Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency, *Anim. Reprod. Sci.* 9 (1) (2012) 19–26.
- [31] F. Moberg, C. Folke, Ecological goods and services of coral reef ecosystems, *Ecol. Econ.* 29 (1999) 215–233.
- [32] C. Mora, S. Andréfouët, M.J. Costello, C. Kranenburg, A. Rollo, J. Veron, K.J. Gaston, R.A. Myers, Coral reefs and the global network of marine protected areas, *Science* 312 (2006) 1750–1751.
- [33] N.A. Odintsova, A.V. Boroda, Cryopreservation of the cells and larvae of marine organisms, *Russ. J. Mar. Biol.* 38 (2) (2012) 101–111.
- [34] A.T. Palasz, R.J. Mapletoft, Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances, *Biotechnol. Adv.* 14 (2) (1996) 127–149.
- [35] C.G. Paniagua-Chavez, T.R. Tiersch, Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster, *Cryobiology* 43 (2001) 211–223.
- [36] E. Paredes, J. Bellas, Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies, *Cryobiology* 59 (2009) 344–350.
- [37] E. Paredes, J. Bellas, S.L. Adams, Comparative cryopreservation study of trochophore larvae from two species of bivalves: pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*), *Cryobiology* 65 (2012) 339–366.
- [38] J.M. Poncet, A. Serpentine, E. Boucaud-Camou, J.M. Lebel, Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliotis tuberculata* (Gastropoda) and postthawed primary cell cultures, *Cryobiology* 44 (2002) 38–45.
- [39] P.J. Ralph, R. Gademann, A.W.D. Larkum, Zooxanthellae expelled from bleached corals at 33 °C are photosynthetically competent, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220 (2001) 163–168.
- [40] P. Renard, Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects, *Aquaculture* 92 (1991) 43–57.
- [41] S.M. Robertson, A.L. Lawrence, Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum, *Prog. Fish Cult.* 50 (1988) 148–154.
- [42] A. Roux, L. Sandenbergh, R. Roodt-Wilding, Preliminary investigation to determine the cytotoxicity of various cryoprotectants on southern african abalone (*Haliotis midae*) embryos, *Cryobiology* 57 (2008) 308–311.
- [43] E. Tambutté, D. Allemand, I. Bourge, J.R. Gattuso, J. Jaubert, An improved ⁴⁵Ca protocol for investigating physiological mechanisms in coral calcification, *Mar. Biol.* 122 (1995) 453–459.
- [44] H.R. Tervit, S.L. Adams, R.D. Roberts, L.T. McGowan, P.A. Pugh, J.F. Smith, A.R. Janke, Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes, *Cryobiology* 51 (2005) 142–151.
- [45] T.R. Tiersch, H. Yang, J.A. Jenkins, Q. Dong, Sperm cryopreservation in fish and shellfish, *Spermatology* 65 (2007) 493–508.
- [46] S. Tsai, E. Spikings, F.W. Kuo, N.C. Lin, C. Lin, Use of an adenosine triphosphate assay, and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes, *Theriogenology* 73 (2010) 605–611.
- [47] S. Tsai, C. Lin, Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (3) (2012) 425–433.
- [48] W.H. Tsang, K.L. Chow, Cryopreservation of embryos from model animals and human, in: P.I. Katkov (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology*, 2012, pp. 259–290.
- [49] H. Usuki, M. Hamaguchi, H. Ishioka, Effects of developmental stage, seawater concentration and rearing temperature on cryopreservation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae, *Fish. Sci.* 68 (2002) 757–762.
- [50] V. Vitiello, P.A. Carlino, F. Del Prete, A.L. Langellotti, G. Sansone, Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing, *Cryobiology* 63 (2) (2011) 118–124.
- [51] Q.Z. Xue, J.H. Xiang, Effects of different combinations of cryoprotectants on spermatozoon vitality of chinese scallop, *Chlamys farreri*, during low temperature equilibrium, *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 13 (4) (1995) 354–361.

Synthèse

Cette première étude apporte une base solide sur laquelle nous nous appuierons pour nos prochaines investigations. Les apex de *P. damicornis* tolèrent de façon similaire l'exposition à des solutions de saccharose et de tréhalose. Utilisés seuls, ces deux dissaccharides apparaissent rapidement toxiques à des concentrations dépassant 0.9 M. Ces observations rejoignent les valeurs régulièrement mentionnées dans les protocoles de cryoconservation d'autres invertébrés marins. Si, pour la suite des tests, le saccharose a été préféré au tréhalose, on ne doit pas pour autant sous-estimer l'intérêt de ce dernier. Le tréhalose est très souvent cité comme composant de solutions cryoprotectrices et Hagedorn *et al.* (2015) mentionnent l'importance que le tréhalose semble occuper dans la symbiose *Symbiodinium*-corail. Nos futures investigations devront prendre en compte cette nouvelle information.

Si le choix de combiner les cryoprotecteurs de faibles poids moléculaires au saccharose a permis d'exposer les apex à des concentrations légèrement supérieures à 2.0 M (2.45 M), il laisse néanmoins apparaître la sensibilité des apex aux solutions cryoprotectrices. La publication de Hagedorn *et al.* (2013) confirme la difficulté d'exposer les apex à des solutions avec des concentrations supérieures à 2.0 M. Ces auteurs montrent également la sensibilité au froid des tissus et des zooxanthelles, que nous avons aussi perçue à la suite des traitements à basse température (0 °C). Ce premier travail nous a également permis de mettre en évidence un ordre de tolérance pour les cryoprotecteurs comparable à ce qui a pu être observé par Renard (1991) sur des larves trocophores de *C. gigas*. D'autres auteurs ont observé cette classification : éthylène glycol > méthanol > DMSO > glycérol. Dans notre étude, l'éthylène glycol combiné au saccharose apparaît très bien toléré par les apex. Des molarités jusqu'à 4.0 M ont été tolérées par les apex. A l'inverse, le glycérol associé au saccharose s'est avéré très mal supporté, au point qu'aucune survie n'a été observée, y compris après les traitements testant les plus faibles concentrations.

Si les apex facilitent les manipulations entre les différents traitements, en revanche ils présentent une tolérance limitée aux solutions cryoprotectrices testées. Les faibles concentrations tolérées ne sont pas favorables à l'établissement d'un protocole de vitrification. D'autres investigations doivent être menées sur la composition des solutions cryoprotectrices pour tenter de vitrifier le matériel corallien.

De plus, le temps de croissance tissulaire sur le squelette exposé après le microbouturage est contraignant. Un temps minimum de 1 mois est nécessaire à la cicatrisation et, si la culture des fragments nécessite peu de place selon Shafir *et al.* (2003), les répétitions et les différents traitements réalisés nécessitent cependant une structure importante.

Chapitre 2

Prospection à l'échelle individuelle

Cette seconde phase du travail s'intéresse à l'unité de base, la planula et le polype. Si l'étude précédente nous a permis d'identifier les solutions cryoprotectrices les mieux tolérées par les apex, elle nous a aussi démontré la difficulté de travailler sur les fragments coralliens. Même si le microbouturage isole un nombre limité de polypes, la taille des fragments reste importante ; le squelette calcaire représente un facteur limitant et cette technique est coûteuse en temps et en matériel biologique. La capacité de reprise post-congélation constitue malgré tout le réel avantage des apex. Le microbouturage pourra donc être privilégié sur des protocoles de congélation déjà éprouvés.

II.1. - Les planulae

II.1.1. - Preambule

« *Il est possible que ces banques de ressources génétiques puissent éviter l'extinction de nombreuses espèces de coraux* ». Ainsi Hagedorn *et al.* (2006a) résumant-ils l'intérêt de cryoconserver les planulae des Scléactiniaires. Si leurs premiers essais confirment la difficulté de cryoconserver efficacement les larves de *F. scutaria* et *P. damicornis*, cependant, la diversité des protocoles de congélation appliqués sur les stades embryo-larvaires des autres invertébrés marins illustre bien toutes les alternatives techniques encore non exploitées.

Les larves représentent un modèle de choix et ont donc été utilisées pour tester les solutions cryoprotectrices. Leur utilisation a aussi pour objectif de limiter la consommation de biomatériau, de permettre l'obtention de quantités importantes de matériel biologique sur des temps définis, de réduire les volumes de cryoprotecteurs et de profiter d'une morphométrie larvaire davantage adaptée à la cryoconservation.

II.1.2. - Etude bibliographique : la production larvaire de *P. damicornis*

Le cycle de vie benthopélagique constitue l'un des critères de différenciation entre les classes de Cnidaires. Les Scléactiniaires se caractérisent par une phase larvaire mobile et pélagique avant leur métamorphose et leur fixation définitive en un polype primaire sessile et

benthique. Si, pour la majorité des Scléactinaires, les planulae sont planctoniques et nageantes, quelques espèces produisent également des planulae benthiques ou démersales comme *Balanophyllia elegans* (Fadlallah, 1983). Des polypes clones vont être engendrés par reproduction asexuée du polype primaire. L'ensemble de ces individus ainsi reliés par le coenosarque va former une colonie corallienne. A maturité sexuelle, les Scléactinaires peuvent emprunter plusieurs voies de reproduction, sexuée (hermaphrodite ou gonochorique) ou asexuée (planulae parthénogénétiques). D'autres formes de reproduction asexuée sont également décrites et indépendantes de la maturité sexuelle (bourgeonnement intra- ou extra-tentaculaire, expulsion spontanée de polypes, fragmentation, ...).

Broadcasters versus brooders

En plus de la distinction entre hermaphroditisme et gonochorisme, certaines espèces de Scléactinaires partageant les mêmes conditions de vie sont capables d'élaborer des stratégies de reproduction sexuée différentes. La fécondation externe ou « broadcast spawning » caractérise les espèces libérant les oocytes et les spermatozoïdes dans le milieu ambiant pour une fécondation externe et une embryogénèse planctonique. A l'inverse, les espèces incubatrices ou « brooders » vont favoriser une fécondation interne protégeant l'embryogénèse à l'abri dans le polype jusqu'à la formation d'une planula compétente. Les larves expulsées dans le milieu sont alors prêtes à la métamorphose et à la fixation. Environ 15 % des espèces coralliennes utilisent la fécondation interne (Crowder *et al.*, 2014).

La fertilisation externe est connue pour sa parfaite synchronisation des pontes sur une courte période de l'année. C'est généralement quelques heures après le début de l'obscurité que l'émission des gamètes se produit. Une telle production et périodicité ont l'avantage de pouvoir maximiser la fertilisation, mais aussi le croisement entre les espèces pour l'obtention d'individus plus résistants. La forte production de gamètes permet aussi de limiter la pression des prédateurs. Enfin, les coraux à ponte externe sont présents dans des environnements physiquement stables et moins fréquemment dans des régions instables (Glynn *et al.*, 1991).

La production asexuée écarte quant à elle les croisements interspécifiques. L'exclusion du processus d'hybridation permet une propagation efficace du génotype parental le mieux adapté aux conditions environnementales locales (Richmond, 1997). Ce mode de production est localisé dans toutes les régions avec une couverture corallienne mais elle domine dans les régions marginales, moins propices au développement corallien (Richmond et Hunter, 1990). Chez les coraux incubateurs, la planulation s'effectue au cours de la nuit. Cependant, avec le stress, les larves peuvent être relâchées le jour (Villanueva *et al.*, 2008). Les larves incubées tendent à être plus larges que les larves obtenues par fertilisation externe (Richmond et Jokiel, 1984).

Plusieurs modes de reproduction pour une espèce

Certaines espèces d'Anthozoaires ont la particularité de posséder des modes de reproduction sexués et asexués combinés. Ils ne sont pas exclusivement séparés avec une production possible d'individus des deux origines sur une même période (Richmond, 1997). Une telle combinaison permet une certaine plasticité génétique. Les Pocilloporidés ont ainsi des stratégies de reproduction variées mais sont principalement hermaphrodites, avec une fertilisation interne et une émission par voie externe des larves (Villanueva *et al.*, 2008). Ward (1995) a ainsi identifié chez *P. damicornis* deux patterns différents d'allocation d'énergie à la croissance, à la reproduction et au stockage des lipides. *P. damicornis* est surtout connu pour être un hermaphrodite simultané (Richmond, 1987 ; Glynn *et al.*, 1991 ; Tanner, 1996) avec possibilité de fertilisation externe (Stoddart, 1983) et de reproduction asexuée.

La résorption des sacs spermatiques de *P. damicornis* ainsi que de la diminution des gros oocytes de 100 µm coïncident fortement avec la production des planulae, suggérant une origine sexuelle (Permata *et al.*, 2000). En revanche, des suivis électrophorétiques réalisés sur des planulae de cette même espèce concluent à une parfaite transmission des génotypes parentaux aux planulae incubées (Stoddart, 1983). Des possibilités d'autofertilisation, bien que peu privilégiées, ne sont pas exclues (Permata *et al.*, 2000).

Les autres espèces de Pocilloporidés telles que *S. hystrix* et *S. pistillata* sont aussi hermaphrodites simultanées, bien que les petites colonies de *S. pistillata* soient aussi capables de produire uniquement des gamètes mâles (Tanner, 1996). L'hermaphrodisme est particulièrement favorable à la stabilité des petites populations (Richmond, 1997). Il est avantageux quand la probabilité de trouver un partenaire sexuel est faible (Richmond et Hunter, 1990). Tout comme *P. damicornis*, ces deux espèces libèrent des planulae pourvues de zooxanthelles, illustrant une transmission verticale (Isomura *et al.*, 2001).

Les avantages des reproductions combinées

Les nombreuses stratégies de reproduction peuvent induire des différences de répartitions spatiales et temporelles. Les populations ont ainsi la possibilité d'accéder à des niches écologiques spécifiques (Stoddart, 1983). C'est aussi un réel avantage pour la dynamique de cet écosystème, en permettant d'assurer la survie et le maintien des espèces soumises aux changements des conditions environnementales (Villanueva *et al.*, 2008). Ces différentes stratégies de reproduction évitent une trop forte compétition entre les espèces au moment de la fixation. Elles permettent la cohabitation d'un grand nombre d'espèces sur une faible surface. C'est enfin un moyen rapide de lutter contre les catastrophes naturelles par une colonisation continue des espaces.

P. damicornis a une reproduction qualifiée d'efficace (étroite synchronisation des planulae matures, développement rapide de la larve, compétences de la larve). *S. pistillata* et *S. hystrix* n'ont pas la même rapidité de synchronisation, due à une présence plus longue de la planula dans le polype (Tanner, 1996).

L'embryogenèse

Par fertilisation externe, il faut 1 h après l'émission des oocytes et des spermatozoïdes pour observer une fertilisation des oeufs. Quatre heures après, débutent les premiers stades de la phase blastula (Krupp, 1983). Le développement d'une planula ciliée se fait très rapidement en l'espace de 24 h. Après 39 h, les planulae ont développé un pôle oral leur permettant de se nourrir. Les zooxanthelles sont installées 4 à 5 jours après la ponte. Les larves peuvent devenir compétentes à la fixation passé un délai de 7 jours (Krupp, 1983).

Les larves des coraux incubateurs ont un développement plus rapide. La fécondation interne des oeufs permet l'émission de planulae plus matures. Les larves ont une période de vie pélagique allant de quelques minutes à quelques jours en fonction du stade de développement et de l'espèce (Fan *et al.*, 2006).

La planulation

Les planulae piriformes peuvent être observées mobiles à l'intérieur des polypes la nuit quand ils sont déployés (Hodgson, 1985 ; Szmant-Froelich *et al.*, 1985). Les larves sont libérées 2 h après le début de l'obscurité. Goodbody-Gringley (2010) observe un pic de planulation maximum sur *Favia fragum* entre 4 h et 6 h (Fig. 49). Juste pondues, les planulae ont un phototactisme positif et un géotactisme négatif favorisant le phénomène de dispersion (Fadlallah, 1983). Elles nagent près de la surface et explorent par la suite le fond et le substrat pour une fixation rapide à l'approche de l'aurore (Szmant-Froelich *et al.*, 1985). Le stress peut induire des planulations. Des différences physiologiques ont été constatées entre les larves en fonction des dates de ponte (Edmunds *et al.*, 2001). Lewis (1974) observe aussi des qualités de larves différentes, ayant des répercussions sur la métamorphose et la fixation aussi bien pour *F. fragum* que pour *P. damicornis*.

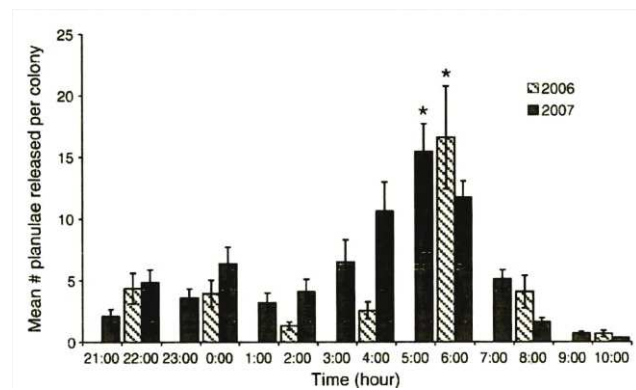


Figure 49 : Production larvaire au cours d'une nuit de planulation pour *Favia fragum*.
Source : Goodbody-Gringley, 2010.

Considérées comme du méroplancton passif, les planulae montrent une grande variabilité de taille surtout pendant les pics de planulation (Isomura *et al.*, 2001). Fan *et al.* (2006) donnent une estimation de tailles comprises entre 500 et 1 500 μm . La taille larvaire dépend de l'espèce et peut présenter une variabilité importante en fonction des conditions de vie. La variance de la taille des planulae augmente avec le nombre de planulae libérées mais pour autant, il n'existe pas de corrélation significative entre la taille moyenne des planulae et la variabilité en planulae (Isomura *et al.*, 2001). Les planulae émises juste avant ou après la nouvelle lune tendent à être plus petites que celles produites quelques jours après (Lewis, 1974).

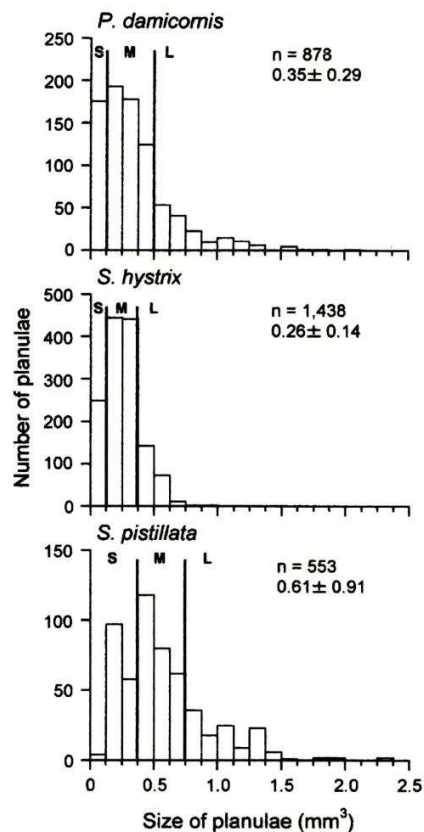


Figure 50 : Echantillon de taille de trois Pocilloporidés répartis en trois classes ; S : small, M : medium, L : Large. Source : Isomura *et al.*, 2001.

Ainsi, *S. pistillata* libère des planulae de petite taille ($556 \mu\text{m} \pm 11 \mu\text{m}$) par rapport à *P. damicornis* ($879 \pm 21 \mu\text{m}$) et *S. hystrix* ($633 \pm 15 \mu\text{m}$) (Tanner, 1996). Les larves de *P. damicornis* obtenues à Océanopolis affichent une taille moyenne de 2 mm (Barthélémy, 2008).

Voici un exemple de classification volumique par Isomura *et al.* (2001) avec trois tailles (petites, moyennes, grandes) ainsi déterminées avec des volumes moyens obtenus (Fig. 50) :

- *P. damicornis* : $0.35 \pm 0.29 \text{ mm}^3$
- *S. hystrix* : $0.26 \pm 0.14 \text{ mm}^3$
- *S. pistillata* : $0.61 \pm 0.91 \text{ mm}^3$

Malgré la capacité des larves de *P. damicornis* à changer rapidement de forme, Hagedorn *et al.* (2006a) réussissent à donner une mesure assez précise des planulae avec une longueur moyenne de $2.5 \pm 0.1 \text{ mm}$ et une largeur de $1.31 \pm 0.04 \text{ mm}$ (N=17). Les mesures avec une autre espèce, *F. scutaria* (0.205 ± 0.001 et $0.130 \pm 0.002 \text{ mm}$ longueur et largeur, respectivement) permettent d'apprécier les différences biométriques entre les planulae des deux espèces provenant de deux modes de reproduction différents (fertilisation externe des gamètes de *F. scutaria*).

II.1.3. - Démarche expérimentale

Matériel et Méthode

Matériel biologique

Les branches provenant toutes d'une même colonie de *P. damicornis* d'une circonférence minimale de 15 cm ont été collectées à Océanopolis, France (issue de fragmentation, numéro CITES : IOX 01448/01450). La même démarche a été réalisée auprès de l'Aquarium de Canet en Roussillon, France (numéro CITES : O3584). Les branches des deux provenances ont été acclimatées, débarassées des organismes associés et conditionnées pendant 1 mois à l'Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, France, avant le début des expérimentations. Les branches coralliennes ont été maintenues selon les conditions présentées par Feuillassier *et al.* (2014a).

Suivi des pontes

Les branches ont été chacune identifiées en fonction de leur provenance (O : Océanopolis, C : Canet) à laquelle un numéro propre à chaque branche a été attribué (O1, O2, C3, C4, ...). Ce sont au total sept branches de chacune des deux provenances qui ont été identifiées et isolées dans des collecteurs larvaires inspirés de la technique employée par Barthélémy (2008). Chaque branche a été isolée dans un contenant de 0.9 L, pourvu d'un maillage de 200 μm (Fig. 51B).

Les collecteurs ont permis de maintenir les branches immergées toujours exposées au brassage et au flux lumineux de l'aquarium, tout en permettant la récupération des planulae émises. Ces collecteurs ont été inspectés tous les matins à 8 h avec l'allumage des HQI (10 000K + 20 000K) pour la récolte des larves. Ces pièges larvaires ont été abondamment rincés à l'eau douce puis séchés pour limiter les proliférations algales, bactériennes et de la faune associée. L'objectif était de conserver un flux d'eau important pour que la colonie ne souffre pas de ses nouvelles conditions de captivité. Les branches identifiées ont été replacées dans les collecteurs en fin de journée. Des branches témoins de chaque provenance ont été cultivées en parallèle hors collecteurs, afin de s'assurer de la bonne évolution du corail isolé malgré les manipulations récurrentes.

Les branches de *P. damicornis* ont été nourries quotidiennement avec des nauplii d'*A. salina* (type EG) juste écloses, dans l'objectif de soutenir l'hétérotrophie en plus de l'autotrophie pour obtenir un état nutritionnel non limitant à l'énergie allouée pour la reproduction.

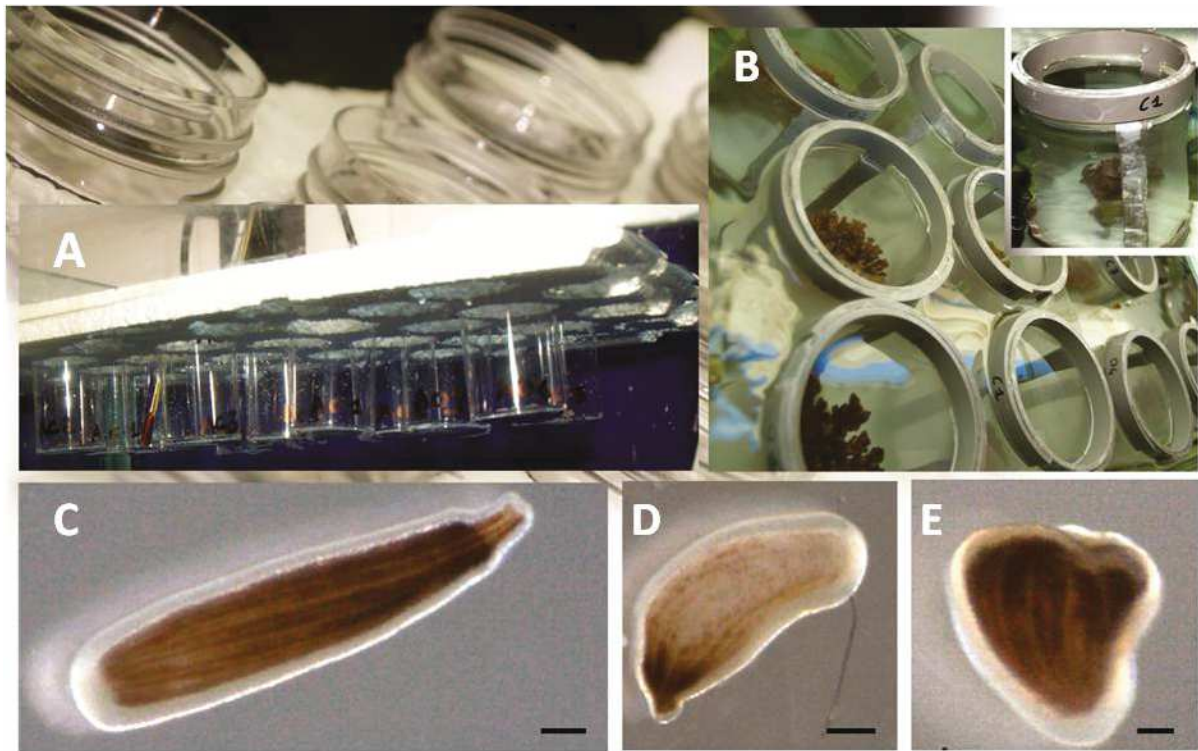


Figure 51 : Collecte des planulae de *Pocillopora damicornis*. A : Flacons isolant les planulae pour la fixation, B : Collecteurs, C : Larve de *P. damicornis*, D : Larve de *P. damicornis* après exposition au glycérol, E : Larve en cours de métamorphose et de fixation. Echelle = 100 μ m.

Traitement des planulae

Les solutions cryoprotectrices testées ont été choisies suite aux résultats obtenus sur les apex de *P. damicornis* (Feuillassier *et al.*, 2014a). Les solutions ont été concentrées pour une molarité totale de 2.0 M avec les combinaisons suivantes : 1.5 M EG + 0.5 M Suc, 1.5 M Met + 0.5 M Suc, 1.5 M Gly + 0.5 M Suc et 1.5 M DMSO + 0.5 M Suc.

Les solutions suivantes ont été utilisées : sucrose (D (+) – Saccharose, VWR, AnalaR NORMAPUR), tréhalose (D (+) – Trehalose dihydrate Biochemica, AppliChem), DMSO (VWR, Analytical reagent, Assay: 99.7 %), méthanol (SIGMA–ALDRICH, ACS-reagent, Assay: 99.8 %), éthylène glycol (VWR, AnalaR NORMAPUR, Assay: 100 %) et glycérol (CARLO ERBA, ACS-For Analysis, Assay: 99.5 %). Les solutions ont été préparées avec du 24h-ASW (pH : 8.4).

Les planulae nageantes ont été aspirées à l'aide d'une canne de verre, rincées dans trois bains différents d'eau de mer artificielle vieillie de 24 h (24h-ASW, Température : 25 °C ; Salinité : 35 ; pH : 8.4). Des lots de 15 planulae ont été définis pour chacune des provenances avec un objectif de deux répétitions par traitement auxquelles s'ajoutent les témoins (Ot : témoin Océanopolis et Ct : témoin Canet). Un temps d'exposition de 20 min a

été choisi pour permettre une comparaison avec les résultats obtenus dans la première publication et les travaux de Hagedorn *et al.* (2006a). Après l'exposition aux CPA, les larves ont été placées pendant 10 min dans un premier bain dilué à moitié de la solution de CPA testée avec 24h-ASW (25 °C). Les planulae ont ensuite été rincées pendant 5 min dans deux bains successifs avec 24h-ASW (25 °C) puis isolées individuellement dans des flacons à échantillons biologiques (VWR-216-8203) remplis de 5 ml 24h-ASW et placés dans un bain-marie à 25 °C. Les échantillons témoins Ot et Ct ont été soumis aux mêmes manipulations uniquement avec 24h-ASW (25 °C).

Observations post-traitements

Les planulae traitées et non traitées ont été suivies quotidiennement à l'occasion du renouvellement des 5 ml 24h-ASW. Les paramètres permettant d'évaluer la viabilité des larves après traitement ont été uniquement basés sur des observations macroscopiques (quatre variables qualitatives et une variable quantitative) :

- mobilité des planulae,
- déformations des planulae (compressions latérales),
- intégrité membranaire,
- dépigmentation (expulsion des zooxanthelles),
- durée de survie post-traitement.

Résultats et Discussion

Les cycles de planulation

Le recensement quotidien des larves produites pour chaque branche de *P. damicornis* a permis d'observer les périodes de planulation corrélées avec le cycle lunaire, en particulier pour les larves provenant d'Océanopolis. La faible quantité de larves obtenues avec les branches de l'Aquarium de Canet en Roussillon n'a pas permis de distinguer une périodicité des planulations (Fig. 52). Pour les branches d'Océanopolis, un pic de planulation a précédé la nouvelle lune au 8^{ème} et 9^{ème} jour respectivement pour les mois de février et mars (Fig. 52).

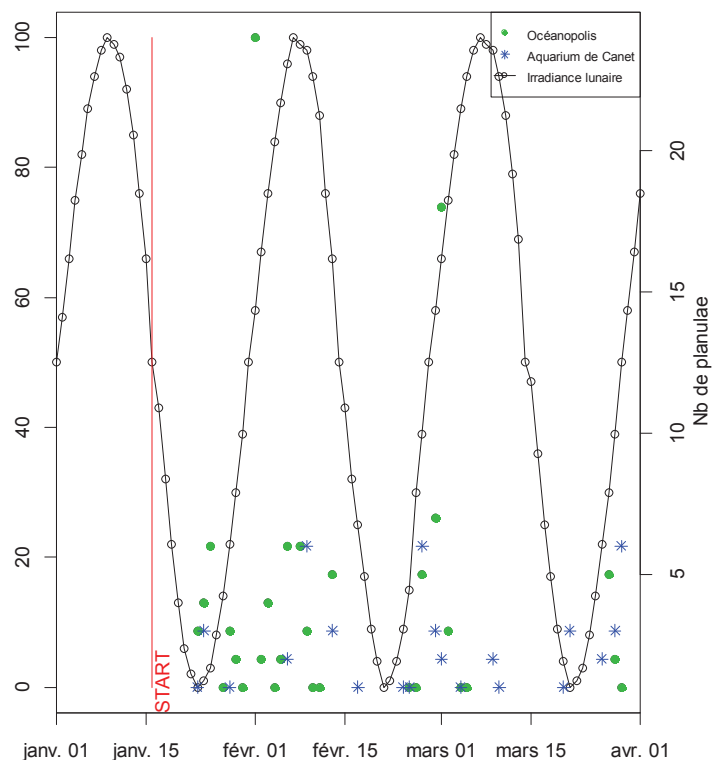


Figure 52 : Cycle de planulation de *Pocillopora damicornis* en fonction du temps et du calendrier lunaire.

L'irradiance lunaire est connue pour jouer un rôle important sur *P. damicornis*, avec une sensibilité surprenante de cette espèce pourtant dotée d'une organisation systémique simple mais capable de détecter et de répondre aux faibles niveaux d'irradiance nocturne (nuit : $0.01 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ contre en journée $2\,000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Bien que les Scléactiniaires soient dénués d'organes de sens spécialisés, ils sont en revanche pourvus de cryptochromes (CRY) qui ont un rôle proche des protéines photoréceptrices (DNA photolyase) (Goodbody-Gringley, 2010). Le moindre pic de ponte est directement influencé par les phases nocturnes (Fan *et al.*, 2006 ; Zakai *et al.*, 2006). Selon Fan *et al.* (2006), *P. damicornis* développe des gamètes et émet des planulae en fonction du cycle lunaire tout au long de l'année. Cette production se fait à des taux variables tout au long du cycle de planulation (Stoddart, 1983 ; Barthélémy, 2008). Fan *et al.* (2006) ont observé des pontes de *P. damicornis* à l'aurore mais aussi pendant la nuit. Goodbody-Gringley (2010) avance l'hypothèse que l'exposition aux longueurs d'ondes lunaires est similaire peu après le coucher du soleil aux longueurs d'ondes appropriées pour le déclenchement de la ponte. Cette théorie pourrait expliquer les pics de pontes obtenues juste après le coucher du soleil mais aussi juste avant l'aube.

De nombreuses publications relatent des différences de ponte des gamètes et des planulae de coraux hermaphrodites en fonction des conditions géographiques, révélant ainsi l'impact des facteurs environnementaux (Richmond et Jokiel, 1984 ; Permata *et al.*, 2000 ; Zakai *et al.*, 2006). Il s'agit très souvent du décalage des cycles lunaires en fonction des localisations (Zakai *et al.*, 2006). A Océanopolis (Brest), *F. fragum* a produit des larves en captivité entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour après la nouvelle lune (Fig. 53). Szmant-Froelich *et al.*

(1985) obtiennent des pontes de cette même espèce en captivité entre le 6^{ème} et le 15^{ème} jour après la nouvelle lune, mais avec une production plus prononcée entre le 8^{ème} et le 11^{ème} jour. Petersen *et al.* (2005) observent quant à eux des pontes comprises entre le 10^{ème} et le 13^{ème} jour après la nouvelle lune.

P. damicornis montre aussi en captivité une période de ponte comprise entre le 4^{ème} et le 12^{ème} jour après la nouvelle lune (Barthélémy, 2008). Fan *et al.* (2002) observent des pontes de *P. damicornis* et *S. hystrix* étalées entre la nouvelle lune et le 1^{er} quartier (Fig. 53). En revanche, en Australie (Lizard Island), les pontes de *P. damicornis* ont été constatées lors de la pleine lune (Jokiel *et al.*, 1985).

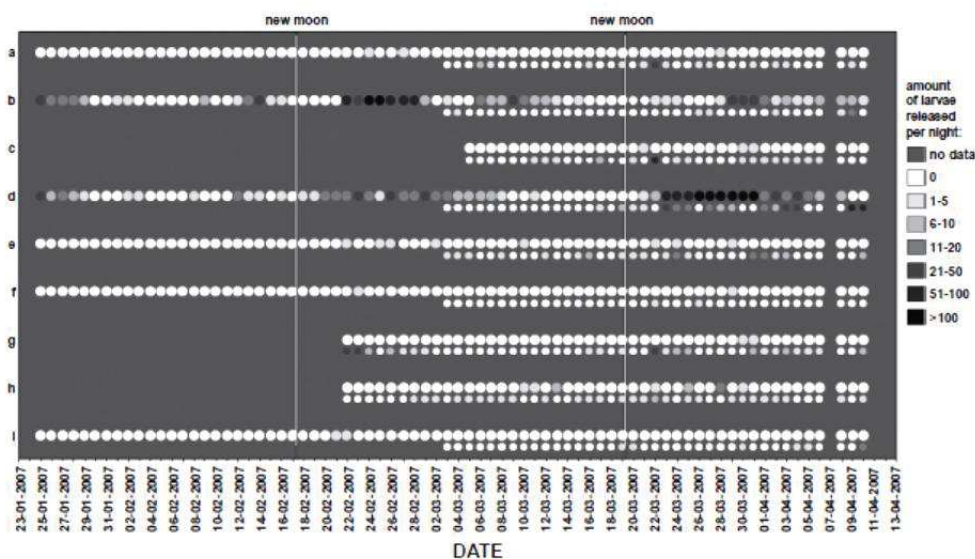


Figure 53 : Cycle de ponte des planulae (gros spots : planulae, petits spots : pré-planulae). a : *Euphyllia paradivisa*, b : *Favia fragum*, c : *Pavona cactus*, d : *Pocillopora damicornis*, e : *Pocillopora verrucosa*, f : *Porites sp.*, g : *Seriatopora hystrix*, h : *Stylocoeniella guentheri*, i : *Stylophora pistillata*.
Source : Barthélémy, 2008.

La production larvaire obtenue à l’occasion de cet essai est très faible, comparée aux résultats obtenus par Barthélémy (2008) sur *P. damicornis*. Des planulations ont permis d’obtenir plus de 100 larves par nuit contre 24 planulae obtenues lors de la première planulation et 18 larves le mois suivant, dans nos conditions. En l’espace de 2½ mois, ce sont 120 planulae qui ont été obtenues à partir des branches d’Océanopolis et 49 obtenues avec celles de Canet. Malgré le contrôle des paramètres abiotiques tels que la température, la salinité, la photopériode, l’irradiance solaire et lunaire, le brassage, on peut raisonnablement avancer que les conditions physico-chimiques différentes des paramètres initiaux ont été limitantes pour la production larvaire. La fécondité peut diminuer très rapidement pour des différences de température de ± 1 °C (Edmunds *et al.*, 2001). Le stress thermique diminue le potentiel autotrophe, impactant de ce fait l’apport énergétique (Edmunds *et al.*, 2001). L’une des hypothèses expliquant les faibles planulations serait donc une réduction de l’allocation d’énergie nécessaire à la gamétogénèse. Durant les premières semaines avant la reproduction, le corail concentre beaucoup de lipides essentiels à la larve (Ward, 1995). Les planulae contiennent une grande quantité de lipides, qui est estimée entre 50 et 70 % de leur composition. La concentration lipidique évolue en fonction de l’exposition en nutriments dissous, de la quantité de lumière et de la turbidité. Les variations de la qualité d’eau, donc de

l'état de stress de l'organisme, entraînent une limitation des teneurs en lipides (Cooper *et al.*, 2009).

La tolérance des planulae aux solutions cryoprotectrices

La faible quantité de larves produites a été limitante pour la réalisation des différents traitements prévus. Seules les solutions EG + Suc, Met + Suc et Gly + Suc ont pu être testées à raison de 15 planulae/traitement et sans réplication.

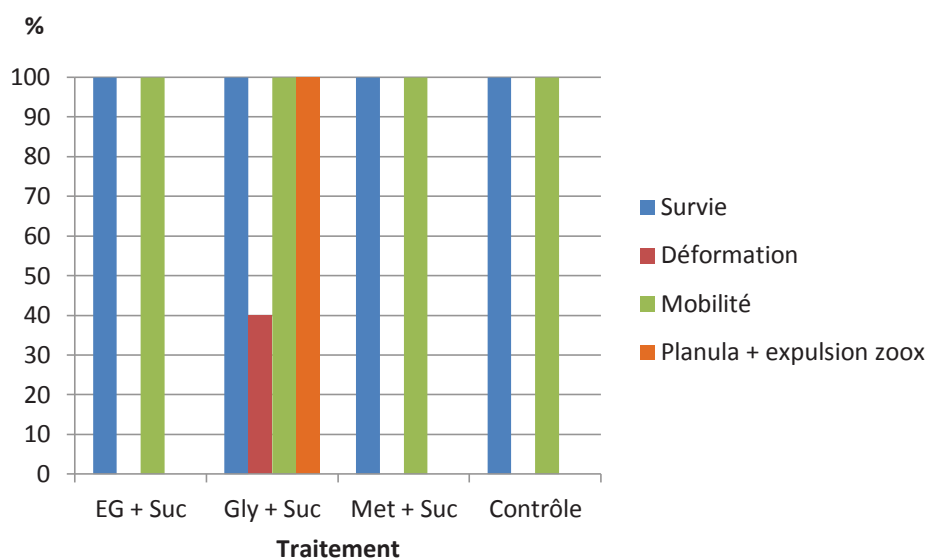


Figure 54 : Tolérance des planulae de *Pocillopora damicornis* aux solutions cryoprotectrices binaires contenant 1.5 M EG, Gly ou Met + 0.5 M Sucrose (15 planulae/traitement) pendant 20 min à température ambiante.

Aucune mortalité après traitement n'a été obtenue pour les trois solutions testées (Fig 54). Un phénomène de blanchissement a été observé sur les planulae après exposition au Gly + Suc. Six larves sur 15 (40 %) exposées au traitement Gly + Suc ont présenté une forme davantage retractée, non changeante et incurvée. Les larves exposées aux traitements EG + Suc et Met + Suc n'ont quant à elles pas présenté de différences, ni de forme ni de blanchissement, par rapport aux témoins. Malgré le blanchissement observé après le test Gly + Suc, l'ectoderme n'a pas présenté de traumatismes pour l'ensemble des larves soumises aux trois solutions de CPA. De plus, les larves ont conservé une mobilité et une flottabilité négative comparable à l'échantillon contrôle. Cependant, les planulae n'ont pas évolué vers la métamorphose et la fixation.

Ces observations préliminaires nécessitent d'autres répétitions afin de valider les tendances observées. On remarque malgré tout que les planulae ont été plus susceptibles à l'exposition Gly + Suc par comparaison avec les solutions EG + Suc et Met + Suc. Les apex ont très mal toléré l'exposition au Gly + Suc (Feuillassier *et al.*, 2014a). Hagedorn *et al.* (2006a) ont soumis les planulae de *P. damicornis* à des solutions de Gly concentrées de 0.69 M, 1.37 M et 2.0 M pendant 15 min. Ces auteurs ont obtenu 100 % de mortalité après l'exposition des larves à la solution concentrée à 2.0 M. Dans notre essai, malgré le

blanchissement et une déformation des larves, pour la même molarité, nous avons obtenu 100 % de survie. Il apparaît que le mélange Gly + Suc est mal toléré par le matériel biologique, très certainement à cause de sa viscosité bien supérieure aux solutions EG + Suc et Met + Suc. Des investigations supplémentaires s'avèrent donc nécessaires.

Synthèse

La difficulté d'obtention des planulae a fortement limité les investigations sur leur tolérance aux solutions cryoprotectrices. Cette étude nous a malgré tout apporté un certain nombre d'enseignements :

- la zootechnie :

- Maximiser les conditions de captivité en privilégiant l'enrichissement nutritionnel des organismes,
- S'appuyer sur des techniques appropriées permettant d'apprécier la qualité biomoléculaire des organismes avant traitement.

- les tests de tolérance aux CPA :

- Des molarités totales de 2.0 M obtenues par des mélanges de CPA permettent de dépasser les faibles survies obtenues par Hagedorn *et al.*, (2006a) pour de telles concentrations,
- L'addition de saccharose semble augmenter la tolérance des larves aux CPA pénétrants,
- La tolérance du stade larvaire aux techniques de cryoconservation a été beaucoup étudiée sur les invertébrés marins. Dans nos essais, nous avons voulu tester des larves justes écloses, depuis moins de 12 h. Des investigations supplémentaires devront comparer la tolérance des larves en fonction de leur temps d'émission et de leur qualité biomoléculaire. Les larves de *P. damicornis* sont naturellement riches en lipides. Une diminution de leur teneur lipidique peut-elle influencer leur tolérance aux CPA ?

II.2. - Les polypes primaires

II.2.1. - Preamble

De nombreux arguments viennent étayer la nécessité de cryoconserver les planulae de Scléactiniaires. Parmi ceux-ci, la conservation des larves permettrait de préserver la diversité génétique en stockant des génomes entiers connus et inconnus ainsi que des épigénomes qui pourraient s'avérer très utiles (Hagedorn et Spindler, 2014). Les larves offrent également un potentiel de cellules différenciées et indifférenciées très intéressant pour la culture cellulaire. Elles constituent enfin un support à la compréhension de la symbiose, pour l'écotoxicologie, pour des actions de restauration,

Dans cette partie, nous avons voulu poursuivre notre travail ciblé sur l'individu. En plus des planulae, les polypes offrent également une approche intéressante pour la cryoconservation en évitant les étapes sensibles de la métamorphose et de la fixation des larves. Richmond (1987) observe d'ailleurs dans le milieu naturel que ces deux étapes larvaires deviendront impossibles du fait d'une réduction trop importante du niveau énergétique larvaire. Ces phases sont pourtant indispensables à la survie et au développement du jeune corail.

Nous avons donc choisi de tester les polypes primaires de *P. damicornis* pour leur tolérance à l'exposition aux CPA en vue de leur cryoconservation.

II.2.2. - Etude bibliographique : La métamorphose et la fixation

La métamorphose

La métamorphose est un processus qui réclame une dépense énergétique importante, durant laquelle les planulae sont incapables de se nourrir. Elles sont dites lecithotrophes (Harrigan, 1972). La métamorphose et la fixation sont généralement étroitement liées, à tel point que l'ordre de ces processus évolue en fonction des auteurs (Heyward et Negri, 1999). Elles constituent chez les Scléactiniaires l'ultime passage de la forme pélagique et mobile à la forme benthique et sessile. L'obtention d'un polype compétent avec des tentacules déployés et un pôle oral ouvert est la résultante de la métamorphose.

Pour Heyward et Negri (1999), le début de la métamorphose correspond au moment où les planulae, alors à l'état libre et nageantes, attachées grossièrement ou en forme de poire (Fig. 51E), prennent l'apparence d'un disque avec un aplatissement prononcé de l'axe bucco-

aboral et la présence des mésentéries septales rayonnant autour de l'orifice oral en position centrale. L'induction de la métamorphose est souvent rapide.

La fixation

Les planulae possèdent des organes sensoriels spécialisés améliorant leur capacité à sélectionner des sites de fixation adaptés (Maida *et al.*, 1994). Les larves issues de coraux incubateurs sont capables de se fixer quelques heures après leur émission. En fonction des espèces et des conditions environnementales, la plus courte période de fixation des larves est estimée à 2 h (Richmond, 1987) et peut s'étaler jusqu'à 12 ou, 48 h (Stoddart, 1983) voire même 96 h (Isomura *et al.*, 2001). Le taux de fixation n'est pas significativement différent entre les classes de taille des planulae et le temps (Isomura *et al.*, 2001). A l'inverse, Goodbody-Gringley (2010) constate que le comportement de fixation prédomine pour les larves pondues entre 4 et 6 h par rapport à des larves émises entre 22 et 24 h.

La fixation est directement influencée par l'orientation du substrat et l'intensité lumineuse à une profondeur donnée (Lewis, 1974 ; Maida *et al.*, 1994 ; Richmond, 1997 ; Mundy *et al.*, 1998 ; Goodbody-Gringley, 2010 ; Green *et al.*, 2010). Les larves apparaissent plus efficaces pour une fixation en période d'obscurité et sont davantage attirées par un substrat foncé (Lewis, 1974 ; Ettinger-Epstein *et al.*, 2008). Une ponte juste avant l'aube semble être favorisée par une exposition à la lumière. En effet, l'activité photosynthétique des symbiotes s'en trouve renforcée, permettant un apport énergétique plus important chez la larve (Goodbody-Gringley, 2010). Le succès de la métamorphose est plus élevé pour les larves pondues juste avant l'aube. En captivité, un substrat orienté horizontalement permet un meilleur développement de la larve grâce à l'abondance de la lumière et du brassage (Petersen *et al.*, 2007). En revanche, en milieu naturel, la fixation des larves sous des surplombs assure un meilleur taux de survie que celles se développant vers la surface. Les larves sont moins exposées à la lumière mais aussi moins soumises aux organismes brouteurs susceptibles de les endommager. Elles sont aussi protégées de la sédimentation et la croissance des algues filamenteuses s'en trouve ralentie (Sato, 1985 ; Maida *et al.*, 1994 ; Tioho *et al.*, 2001).

La texture du substrat a aussi une forte influence sur la fixation des larves (Lewis, 1974 ; Heyward et Negri, 1999). Elles sont capables de se fixer sur des supports variés comme sur des fragments de coraux (Lewis, 1974) avec ou sans bio-film comme une colonisation préalable de coralline (Crustose Coralline Algae : CCA) ou d'un film microbien (Richmond, 1997 ; Heyward et Negri, 1999 ; Petersen *et al.*, 2005 ; Barthélémy, 2008 ; Putnam *et al.*, 2008 ; Green *et al.*, 2010). Kuo et Soong (2010) ont ainsi obtenu la fixation de 87 % des planulae de *Porites* sp. sur des tuiles déjà colonisées. Les larves de *Porites* sp. se fixent sur l'algue calcaire ou à proximité immédiate. La production de stimuli chimiques propres à l'espèce influence le taux de fixation. La coralline regroupe plusieurs espèces dont certaines sont plus propices à la fixation comme *Titanoderma* sp. ou *Hydrolithon* sp. à l'inverse de *Neogoniolithon* sp. (Putnam *et al.*, 2008). Enfin, des températures élevées (29 °C) augmentent le taux de fixation larvaire de cette dernière espèce (Putnam *et al.*, 2008).

Heyward et Negri (1999) ont démontré que l'induction de la métamorphose et de la fixation ne sont pas nécessairement propre à l'espèce et qu'une diversité de supports peut être utilisée par les larves sans réelle préférence pour la CCA.

Quelques contradictions existent autour des supports de fixation pour *P. damicornis*. En général, les larves de Pocilloporidés semblent privilégier des substrats d'ancrage « propres » ou faiblement colonisés (Kuo et Soong, 2010). Hodgson (1990) a observé que les supports couverts par une fine couche de sédiment inhibent la fixation des planulae. Le développement des larves sur des supports récemment immergés a permis à Kuo et Soong (2010) d'obtenir de meilleurs taux de survie que sur des tuiles vieilles. Pour autant, Fan *et al.* (2002) n'ont pas obtenu de bons résultats de fixation de *P. damicornis* avec l'emploi de boîtes de Petri vierges de colonisation. Harrigan (1972) a démontré que les larves de cette même espèce se sont davantage fixées sur des supports ayant une couverture d'algues, de diatomées et de bactéries. Les différences de fixation pourraient être dépendantes de l'espèce, voire même du génotype (Hodgson, 1990). Le type de substrat influence la croissance des larves. Sa conductivité thermique et sa porosité peuvent avoir un effet sur les performances de croissance selon la sensibilité thermique de la larve (Green *et al.*, 2010).

Les techniques de fixation

Plusieurs techniques ont été développées afin de récupérer et de manipuler facilement les polypes primaires de Scléactiniaires. Parmi les techniques utilisées, Hidaka (1985) a employé une feuille de plastique légèrement érodée avec du papier de verre, placée dans le collecteur. Les planulae de *P. damicornis* ainsi fixées ont été récupérées et isolées en découpant la feuille plastique (Fig. 55).

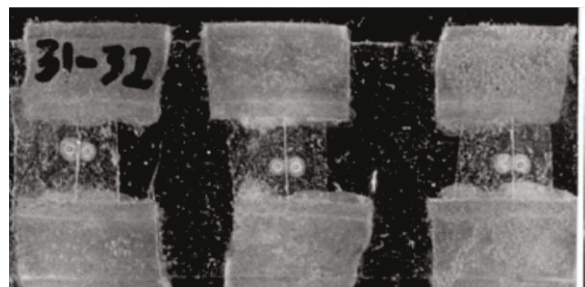


Figure 55 : Larves métamorphosées et fixées de *Pocillopora damicornis* sur feuille plastique érodée.
Source : Hidaka, 1985.

Des lames microscopiques préalablement colonisées (biofilms bactériens, algues, ...) ont permis la fixation des larves de plusieurs espèces (Wyers *et al.*, 1991) (Fig. 56). Ces deux premières techniques ont été utilisées pour suivre la fusion tissulaire entre des recrues d'une même ou de différentes espèces. Le développement des polypes primaires sur des lames en verre a permis en outre d'observer la formation des premières structures calcaires.

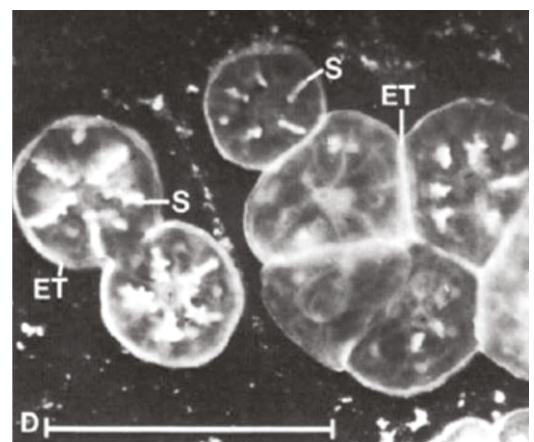


Figure 56 : Lames microscopiques en verre permettant la métamorphose et la fixation des larves de plusieurs Scléactiniaires.
Source : Wyers *et al.*, 1991.

Parmi les autres supports utilisés, Randall et Szmant (2009) ont placé des larves de *F. fragum* dans des tubes plastiques pour suivre leur métamorphose et leur fixation, Yacobovitch *et al.* (2003) ont utilisé du gravier granitique pour la fixation d'*Heteroxenia fuscescens*. On peut aussi rapporter l'usage des tuiles et plots en céramique (Fig. 57) colonisés pendant 4 à 6 semaines (Petersen *et al.*, 2005 ; Barthélémy, 2008 ; Cohen *et al.*, 2009), des tuiles cuites non vernies conditionnées depuis 3 à 4 mois (Wilson et Harrison, 1998 ; Nozawa et Harrison, 2007), des boîtes de Pétri (Gilmour, 1999), des contenants en verre,

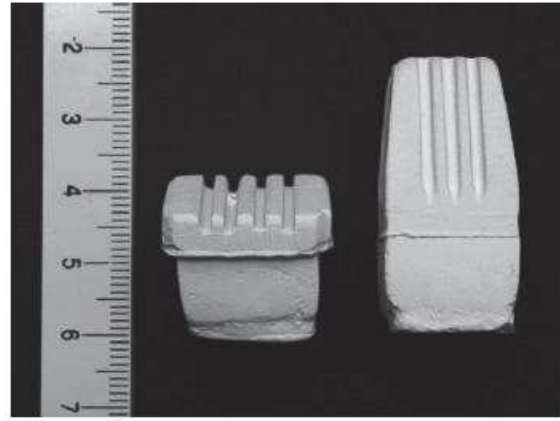


Figure 57 : Tuiles céramiques. Source : Petersen *et al.*, 2005.

La méthode OozoFix

Les facilités de fixation des planulae des Scléactiniaires pour les différentes matières ont ainsi été exploitées pour des usages très spécifiques. Dans le cadre de cette thèse, différents types de supports ont été envisagés afin de permettre l'immersion des polypes primaires dans différentes solutions cryoprotectrices et jusqu'à l'exposition à l'azote liquide. Le choix du support a donc été primordial afin d'éviter les phénomènes d'imprégnation puis de relargage des solutions de cryoprotecteurs. Le support doit aussi supporter la congélation à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la décongélation rapide, tout en privilégiant la fixation du polype primaire. Enfin, la taille et le poids du support devaient être adaptés à la technique de cryoconservation.

Les processus de métamorphose et de fixation sont les points clés sur lesquels repose cette méthode. Parmi les supports possibles, le verre, utilisé sous la forme de lames microscopiques ou de béchers, représentait une matière lourde, des matériels de taille conséquente présentant des difficultés de manipulations. De plus, l'ancrage des polypes primaires sur le verre ne nous a pas paru suffisant pour résister aux contraintes physiques qu'impose la cryoconservation. Les tuiles de différentes matières présentaient des risques d'absorption et de diffusion des solutions cryoprotectrices après traitement, sans oublier des dimensions inadaptées aux volumes utilisés pour la cryoconservation. Enfin le plastique, utilisé soit sous forme de feuille, de tube, de morceaux, *etc* apportait une alternative possible mais néanmoins contraignante. L'adhésion des planulae sur les feuilles plastiques nécessitait une abrasion préalable de la surface. Le doute était donc permis sur la capacité d'ancrage des polypes primaires durant les traitements. Les tubes et les pièces plastiques présentaient l'inconvénient de ne pouvoir grouper les individus ensemble pour les soumettre en même temps à un traitement donné. Les nombreuses manipulations fines risquaient ainsi d'augmenter les contraintes pendant les expérimentations. Face à cette rapide étude, nous avons choisi de tester l'utilisation des filets nylon de maillage $200\text{ }\mu\text{m}$.

Ce support présente plusieurs avantages :

- des carrés de nylon de faible dimension (1 cm x 1 cm), de taille adaptée à la cryoconservation,
- un matériel supportant les contraintes thermiques et physiques de la cryoconservation (congélation, décongélation, choc thermique, ...),
- un support sur lequel il est possible de grouper jusqu'à cinq polypes primaires sur 1 cm² (Fig. 58),
- l'absence d'absorption et de diffusion des solutions cryoprotectrices post-traitement,
- la possibilité de déposer le support nylon et les polypes primaires sur du papier absorbant pour évacuer le maximum de solution entre deux traitements,
- la facilité de manipulation avec des pinces de laboratoire (type pince courbée),
- la facilité de remise en culture après traitement avec une exposition favorisée au brassage,
- la possibilité d'isoler un polype primaire des autres polypes fixés en découpant la zone d'intérêt sans nuire aux autres individus,
- l'ancrage important du polype primaire puis de la future colonie, produisant le tissu et le squelette autour des fils constituant le maillage,
- l'entretien aisé lors de la culture à l'aide d'une pince et d'une brosse adaptées, permettant d'évacuer les algues.

Méthode :

- Placer les branches de *P. damicornis* dans les collecteurs de planulae,
- Récupérer les larves nageantes avec une canne de verre,
- Placer les larves dans un contenant dont le fond est pourvu d'une surface siliconée,
- Le contenant doit être placé dans les mêmes conditions de culture que les collecteurs,
- Suivre la métamorphose. Après une évolution de la larve dans le contenant, celle-ci va concentrer ses rotations en un point donné. L'appatissement de son axe dorso-ventral va être visible ainsi que la distribution radiaire des couples de mésentéries.
- Suivre la fixation et l'arrêt de la rotation de la planula. Ne prélever la larve que dans les 30 à 45 min suivant la fixation (Fig. 58). Un temps inférieur remettra la larve en rotation et un temps supérieur s'accompagnera d'un risque accru d'abîmer la planula,

- Utiliser le bord plat d'une pince coudée et pousser délicatement la larve métamorphosée. Si l'intervention est trop tardive, la fixation en cours va augmenter les difficultés,

- Prélever la larve métamorphosée à l'aide d'une canne de verre et la déposer sur un carré de nylon (BUISINE SA - 200 μm) contenu dans un flacon d'échantillonnage préalablement rempli de 24h-ASW,

- Plusieurs larves peuvent être placées sur ce même carré à une distance de 0.5 cm,

- Placer le flacon dans un bain-marie à 25 °C, sous le même éclairage que dans les conditions de culture des colonies mères,

- Veiller à l'absence de rotations, observer le déploiement du polype primaire (Fig. 58),

- 24 h après, s'assurer de la fixation du polype primaire en retournant le carré de nylon à l'aide d'une pince courbée et en agitant doucement ; renouveler avec 24h-ASW la moitié du flacon sans sortir le carré de nylon et son polype primaire (méthode OozoFix : Oozoïte Fixé) et laisser en culture 24 h supplémentaires,

- Si le polype n'est pas encore fixé, le replacer à l'aide d'une canne de verre sur le carré de nylon, renouveler la moitié de 24h-ASW et attendre 24 h avant de vérifier la fixation du polype. Renouveler autant que nécessaire la procédure,

- Le polype primaire ainsi obtenu, sortir le carré de nylon hors de l'eau à l'aide d'une pince courbée, sécher le nylon sur un papier absorbant en prenant soin de ne pas toucher le ou les polypes, identifier le carré de nylon à l'aide d'un marqueur permanent, percer le carré de nylon d'un fil nylon lesté à une extrémité et placer l'ensemble en suspension dans un aquarium au brassage modéré,

- Eviter un éclairage surpuissant le premier mois pour ralentir la prolifération algale sur le carré de nylon (possibilité de retirer les algues avec une pince ou une brosse à dent), puis placer l'ensemble sous un éclairage adapté en présence de poissons algivores, nourrir de nauplii d'*A. salina*.

Des essais :

Un échantillon de 15 polypes primaires a été exposé à un mélange 1.5 M EG + 0.5 M Suc pendant 10 min à température ambiante (RT) puis séché sur papier absorbant et immergé dans une solution de saccharose à 0.6 M pendant 5 min (RT). L'échantillon a ensuite été de nouveau essoré puis transvasé dans du 24h-ASW pendant 15 min (RT). Les polypes primaires ont été mis en suspension dans du 24h-ASW pendant 12 h sans éclairage. Ils ont enfin été remis en suspension dans leurs conditions de culture après avoir constaté la survie de l'ensemble des polypes primaires. Un second essai a été réalisé de la même façon avec 15 autres polypes primaires.

D'autres essais ont été réalisés tels que l'exposition à des solutions de molarités plus élevées (3.4 M : 0.4 Suc + 1.5 M EG + 1.5 M Met) pendant 5 min (RT), succédant à une exposition de 5 min à 0.6 M Suc (RT), qui a permis d'obtenir 100 % de survie après 24 h. Un traitement identique mais avec une exposition de 10 min à la première solution a provoqué 100 % de mortalité post-traitement.

Enfin, des tests d'exposition à l'azote liquide ont été réalisés afin d'observer le comportement du carré de nylon et la fixation du polype primaire. Après une immersion rapide dans l'azote liquide, suivie immédiatement d'un réchauffement rapide sur le modèle de la vitrification, seulement deux polypes sur les 15 testés se sont détachés dans la solution d'unloading.

Le faible nombre de planulae disponible ne nous a pas permis de proposer une démarche expérimentale mieux définie. Malgré tout, cette approche aura été l'occasion d'adapter la méthode de culture des polypes primaires à la technique de cryoconservation. L'utilisation de la méthode OozoFix permet de réaliser rapidement la technique de cryoconservation et apparaît adaptée à une démarche de vitrification.

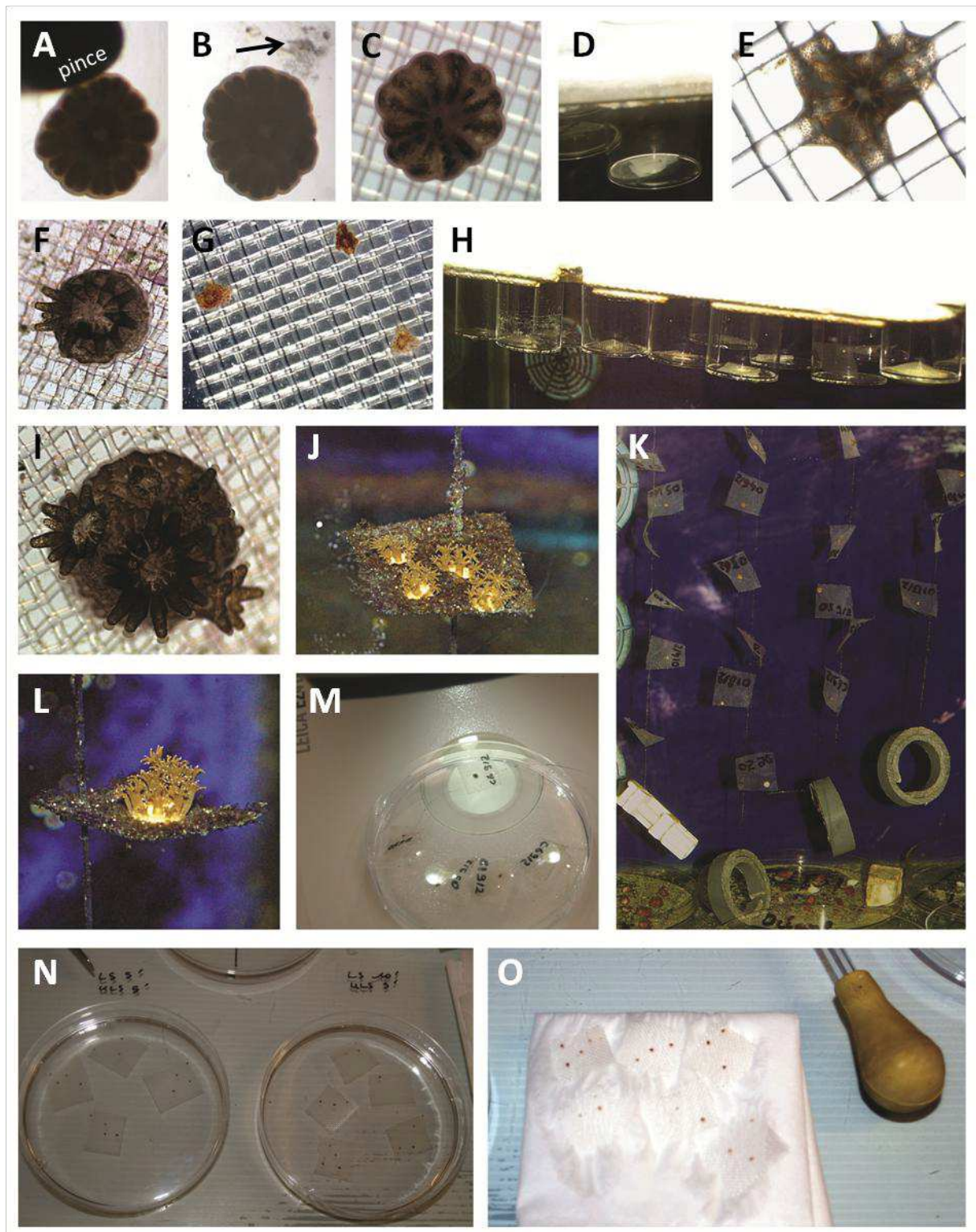


Figure 58 : Application de la méthode OozoFix pour tester la tolérance des polypes primaires de *Pocillopora damicornis* aux solutions cryoprotectrices. A : Collecte d'une larve métamorphosée de moins de 1 h, B : Métamorphe détaché laissant une empreinte cristalline, C : Larve métamorphosée déposée sur un carré nylon, D-H : Fixation des larves en moins de 24 h, E-F : Polypes primaires de 3 jours fixés, G : Trois polypes primaires fixés sur le même carré nylon, I : Colonie de *P. damicornis*, J : Quatre colonies sur un seul carré nylon, K : Polypes primaires en culture, L : Colonie après 1 mois de culture, M : Observations des polypes primaires sous binoculaire, N : Exposition des polypes primaires aux cryoprotecteurs, O : Séchage sur papier absorbant.

II.3. - Les polypes isolés

II.3.1. - Préambule

En 1981 - 1982, Sammarco introduit un nouveau terme, le « polyp bail-out » utilisé sur *S. hystrix* pour décrire « un processus de détachement actif induit par des conditions défavorables » (Sammarco, 1981, 1982). Ce phénomène se décompose en trois étapes, de l'isolation du polype avec une rétractation du coenosarque, s'accompagnant ensuite de son détachement et d'une libération du squelette (Fig. 59) pour s'achever enfin par une fixation et une calcification du nouveau polype.

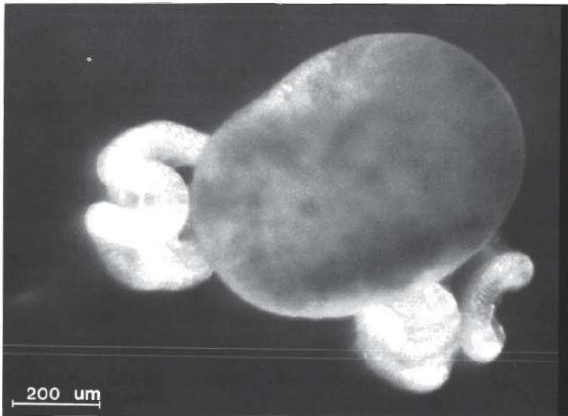


Figure 59 : Balle tissulaire de *Seriatopora hystrix*.
Source : Sammarco, 1982.

Dans un objectif de cryoconservation, ce processus peut s'avérer très intéressant. L'utilisation de polypes isolés, pourvus de zooxanthelles, capables se fixer et de calcifier à nouveau pourrait être plus intéressante que celle des planulae dont la métamorphose et la fixation restent difficiles à maîtriser en captivité. L'utilisation de polypes issus d'une même branche permettrait en outre de s'affranchir de la variabilité génétique et d'obtenir des quantités importantes de matériel biologique.

II.3.2. - Mise en application

Trois branches de *P. damicornis* ont été collectées à l'Aquarium de Canet en Roussillon. Les organismes associés (ophiures, ...) ont été retirés des branches, lesquelles ont ensuite été rincées trois fois avec du 24h-ASW et isolées dans trois béciers contenant 200 ml de 24h-ASW. Les béciers ont été placés au bain-marie à 25 °C, sous un éclairage et une photopériode identiques aux expérimentations précédentes (Feuillassier *et al.*, 2014a). L'alimentation en air et le brassage ont été proscrits afin de développer une situation d'anaérobiose, sinon d'hypoxie (Sammarco, 1982). Comme mentionné par Sammarco (1982), le stress anaérobique s'est d'abord manifesté par une planulation des branches. Les larves récupérées ont pu être testées avec la méthode OozoFix.

Une attention particulière a été portée par la suite afin de prélever le plus tôt possible les polypes expulsés. Comme dans les travaux de Sammarco (1982), la rétractation du coenosarque a été bien visible, tout comme la dégradation de la qualité de l'eau. Trois jours

après le début du test, trois polypes du même béccher ont été observés mobiles et en suspension dans l'eau. Une réplication a permis d'obtenir deux autres polypes expulsés. Contrairement à Sammarco (1982), ils ne présentaient pas de flottabilité négative, n'avaient pas une apparence sphéroïde et étaient dépourvus des deux filaments adhésifs décrits par cet auteur. Après comparaison, ces polypes sont l'illustration d'une forme de reproduction asexuée uniquement décrite à ce jour par Kramarsky-Winter *et al.* (1997). Ces auteurs ont en effet observé ce phénomène sur deux espèces massives et encroûtantes, *F. favus* et *Oculina patagonica*.

Nous avons grâce à cette approche la démonstration qu'une espèce branchue comme *P. damicornis* est aussi susceptible d'expulser des polypes ainsi préservés dans leur morphométrie (Fig. 60). Les polypes libres de *P. damicornis* sont caractéristiques par leur forme. Ils se présentent avec une partie inférieure assimilable à la partie pédieuse et une partie supérieure constituée du disque oral. Avec une configuration digitée, la partie pédieuse est allongée et étroite. La sole pédieuse se présente comme une extrémité aborale arrondie. L'épaisseur de l'ectoderme sur la zone apicale apparaît plus prononcée que sur les parties latérales (Fig. 60). Si la partie pédieuse du polype est légèrement plus longue que la partie distale, en revanche cette dernière est constituée d'un large renflement modelé par les couples de mésentéries qui lui confèrent une surface ondulée. Ce bourgeonnement proéminent, que l'on peut désigner comme la cavité gastro-vasculaire, est coiffé en son centre par l'orifice oral faiblement ouvert et entouré par les tentacules rétractés mais bien visibles. Les acrosphères bordent l'ouverture orale. Les zooxanthelles colorent fortement l'endoderme de la partie pédieuse et sont également disséminées sur le disque oral mais de façon moins concentrée.

Ces polypes ont été récupérés à l'aide d'une canne de verre, rincés à cinq reprises dans du 24h-ASW avant d'être chacun isolés dans un flacon d'échantillonnage préalablement rempli de 24h-ASW. Comme pour la méthode OozoFix, les polypes libres ont été déposés sur un carré de nylon. Leur fixation a été effective en moins de 24 h, bien plus rapide que pour celle observée avec les planulae métamorphosées. Les polypes primaires ainsi formés ont été mis en culture comme avec la méthode OozoFix. A noter cependant une différence avec les planulae métamorphosées : nous n'avons pas attendu la métamorphose des polypes pour les placer directement en contact du carré nylon et ce, malgré leur flotabilité positive. Le changement de la qualité d'eau a suffi à induire une métamorphose très rapide, venant conforter le rôle de ces polypes expulsés. Kramarsky-Winter *et al.* (1997) ont en effet mentionné la production de tels polypes comme une stratégie de reproduction des Scléactiniaires confrontés à des environnements perturbés. Ces polypes ainsi dispersés seraient en quête de conditions environnementales meilleures pour la survie de l'espèce.

Si l'observation de ces polypes a été une expérience enrichissante, cependant cette technique ne nous a pas permis d'obtenir les polyp-balls et leurs filaments décrits par Sammarco (1982). Après la récupération des polypes, une dégradation rapide des tissus de la branche a été observée. De plus, cette méthode présente l'inconvénient de favoriser une prolifération bactérienne qui, en plus de provoquer au Scléactinaire un état de stress anaérobique, présente le risque sérieux d'une bactériose. Bien que la cryoconservation soit aussi utilisée pour éliminer les pathogènes (par le processus de cryothérapie), la qualité

biologique du corail risque cependant d'être affectée, engendrant une plus grande sensibilité du bio-matériel lors des manipulations.

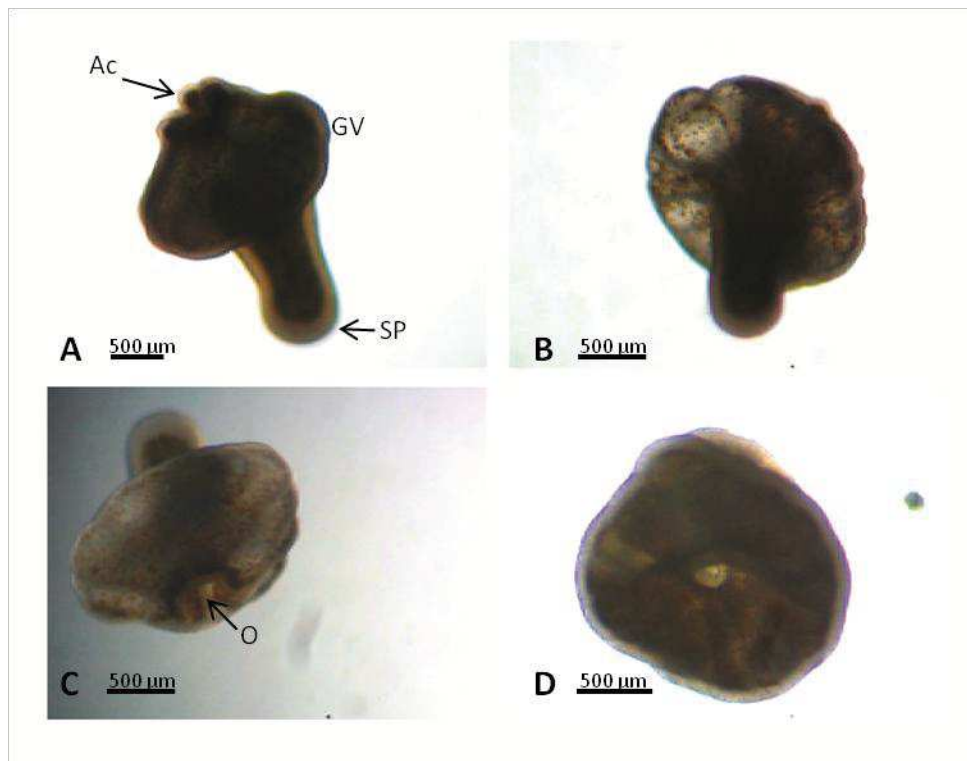


Figure 60 : Polypes mobiles expulsés de *Pocillopora damicornis*. A : Vue de profil, B : Vue de dessous, C-D : Disque oral. Ac : Acrosphères, GV : cavité gastro-vasculaire, O : orifice oral, SP : sole pédieuse.

Synthèse

Les essais conduits sur les planulae et les polypes isolés nous ont amenés à recentrer notre démarche autour de considérations davantage zootechniques. L'exemple de la méthode OozoFix qui a été conçue dans ce travail de thèse, illustre le besoin d'adapter le matériel testé aux contraintes imposées par les techniques de cryoconservation. Avant de s'atteler à concevoir un protocole de cryoconservation, le matériel corallien doit présenter une qualité constante ainsi qu'une production qui ne doit pas contraindre l'avancée des essais. Le matériel biologique doit pouvoir être produit en quantité importante dans des temps de production limités. Notre travail doit aussi tenir compte de la variabilité individuelle du vivant et de la réponse propre à chaque entité face aux situations stressantes.

Les planulae, les polypes primaires et les polypes isolés ont été testés dans l'objectif de travailler à l'échelle individuelle. Il est désormais établi que l'utilisation des micro-colonies n'est pas envisageable, au regard des connaissances actuelles sur la cryoconservation des Anthozoaires. A l'image des planulae et des polypes isolés, nous devons d'abord

comprendre les réponses de l'unité de base avant de nous intéresser à des associations plus complexes.

Chapitre 3

La micropropagation et la cryoconservation, une équation simplifiée

III.1. - Préambule

Explantation, polyp bail-out, tissue-balls, ... c'est autour de ces termes nouveaux que s'articule ce nouveau chapitre. L'embranchement des Cnidaires se caractérise entre autre par sa forte capacité d'auto-régénération tissulaire. Ce phénomène est également observable chez d'autres invertébrés marins tels que les Spongiaires, les Arthropodes, les Echinodermes et certaines classes de Mollusques. La production d'explants tissulaires a fait l'objet d'importants travaux chez les Spongiaires, phénomène identifié sous le terme de « gemmulation ». Les gemmules sont des agrégats cellulaires ayant la capacité de se re-métamorphoser en un organisme doté des mêmes compétences que l'individu initial. Les travaux récents rapportés par les Israéliens Maya Vizel, Esti Kramarsky-Winter, Yossi Loya mais aussi par Isabelle Domart-Coulon ont définitivement marqué la micropropagation des Scléractiniaires. Notre démarche a été conduite sur la base de ces différentes lectures.

III.2. - Etude bibliographique : Les Cnidaires à l'épreuve de la dissociation tissulaire et cellulaire

III.2.1. - Historique

Parmi les Cnidaires, la classe des Médusoaires a concentré d'importants efforts scientifiques sur le thème de la régénération et de la dissociation cellulaire. Les formes polypes et méduses ont toutes été dissociées. Les premiers essais sur les Anthozoaires s'attachant à isoler l'individu à partir d'une colonie ont été réalisés dès les années 1960 avec les investigations de Scheer (1959, 1960) puis de Rosen et Taylos (1969). Il faudra attendre 10 années supplémentaires avant que les travaux de Sammarco (1981 - 1982) et les observations de Richmond (1985) ne révèlent les phénomènes de Polyp Bail-Out ou de métamorphose inversée, aussi bien sur des colonies matures (Sammarco, 1982) que sur des planulae fixées et métamorphosées en polypes primaires (Richmond, 1985). Ces processus sont des réponses à un stress et se manifestent surtout par une rétractation tissulaire sous la forme d'une expulsion des polypes et/ou d'agrégats tissulaires. Un temps de 10 jours semble nécessaire pour observer la perte des tissus (Te, 1992). Ces premières études ont permis de mettre en évidence un effet d'autolyse ou de dé-métamorphose (Richmond, 1985), conduisant

à l'obtention de polypes individualisés dépourvus de structures calcaires. En conditions optimales, une phase de re-métamorphose se traduit par une activité de recalcification des polypes isolés en nouvelles colonies. Ce principe de métamorphose réversible (Richmond, 1985) a permis d'attirer l'attention de la communauté scientifique sur la capacité de régénération des coraux. Les années 1990 ont ainsi été illustrées par une série de publications exploitant le phénomène de dissociation tissulaire et cellulaire. Avec les techniques de dissociation, ce sont aussi les techniques de culture cellulaire des Anthozoaires qui ont été développées.

A l'image des Méduzoaires, Gates et Muscatine (1992) ont utilisé des techniques dites de macération (Schmid *et al.*, 1991) qui ont été reprises par de nombreux auteurs sous le terme de « dissociation cellulaire ». Si Schmid *et al.* (1991) ont utilisé la température (30 à 35 °C) et la dissociation mécanique (pipettages successifs) pour obtenir des suspensions de cellules, Gates et Muscatine (1992) ont choisi une technique de séparation chimique et enzymatique. Pour les coraux mous tels que les Zoanthidés et les Aiptasidés comme *Aiptasia pulchella*, l'exposition à une enzyme, la collagénase ou la trypsine, additionnée à du Ca-FSW (Calcium-Free Sea Water), permet la production de cellules endodermiques viables (Gates et Muscatine, 1992). Pour les coraux SPS (Small-Polyped Stony coral), représentatifs d'une majorité de Scléactiniaires, une technique de macération dans du Ca-FSW a été employée. Après une exposition des branches pendant 3 - 4 h à la solution Ca-FSW, les polypes ont été retirés par dissociation mécanique à l'aide d'une lame de scalpel (Gates et Muscatine, 1992). La même année, Te (1992), a testé le phénomène de polyp bail-out sur les planulae de *P. damicornis* en fonction du taux de sédimentation. Selon ses travaux, la fixation larvaire n'est pas significativement perturbée en fonction des différentes turbidités testées. En revanche, des teneurs élevées en particules en suspension (de 100 à 1 000 mg/L) engendrent des phénomènes significatifs de polyp bail-out.

Ces phénomènes de rétractation apparaissent comme des réactions naturelles pour certains auteurs et comme des réponses à des perturbations induites pour d'autres. Ainsi, chez le Scléactiniaire *Coeloseris mayeri*, la rétractation tissulaire est une réponse à une exposition sub-aérienne au moment des marées basses printanières (Brown *et al.*, 1994). Ce mécanisme apparaît comme une adaptation du corail pour se protéger de l'intensité du soleil et de la dessiccation. Brown *et al.* (1991) ont mis en évidence que ce processus de rétractation est aussi observable lors de période d'exposition à des polluants tels que les métaux lourds comme le fer et d'autres agents tels que les pesticides, herbicides, ... (Owen *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2003a, 2003b ; Negri *et al.*, 2005 ; Watanabe *et al.*, 2006). Ces derniers auteurs ne s'arrêteront pas au phénomène de rétractation, ils observeront aussi des réactions plus sévères telles que le polyp bail-out pour des fortes concentrations en pesticides.

En 1997, Kramarsky-Winter *et al.* ont mis en évidence un mode de reproduction asexuée jusque là inconnu, l'expulsion des quelques polypes composant la colonie. Si ce mode de reproduction semble très proche du phénomène de polyp bail-out, il n'en reste pas moins différent quant à la viabilité de la colonie-mère. Le polyp bail-out est un processus

induit en situation de stress qui s'accompagne très souvent de la mort de la colonie. C'est une ultime réaction de la colonie corallienne avant sa disparition. A l'inverse, le phénomène d'expulsion du polype est une stratégie de reproduction d'un corail en bonne santé. Les polypes expulsés sont aptes à des croissances tissulaires rapides. Ils participeront ainsi au phénomène de dispersion (Kramarsky-Winter *et al.*, 1997).

De telles capacités d'isolement et de régénération des polypes sont apparues très rapidement intéressantes à des fins de recherche. En 2004, Marshall et Clode s'inspirent du protocole de Krishnaveni *et al.* (1989) leur permettant d'isoler les polypes de *Galaxea fascicularis* après immersion dans une solution de Ca-FSW. Fine et Tchernov (2007) parviennent à obtenir des polypes isolés de cinq espèces de Scléactiniaires après un mois de culture dans une eau de mer acidifiée (pH ~ 7.3 – 7.6). Ces stratégies d'isolement de polypes sont aussi basées sur une dégradation des conditions environnementales, inspirée du polyp bail-out. Parallèlement à l'isolement des polypes, l'obtention même de fragments tissulaires devient une technique d'étude pour de nombreux suivis aux objectifs variés. On ne s'intéresse plus à l'unité de base mais au stade cellulaire, toujours dans l'optique de s'appuyer sur la capacité de régénération des Anthozoaires pour redonner un individu compétent. Cette forme biologique appelée « explant » est décrite comme une balle tissulaire hétérotypique sphéroïde (Kramarsky-Winter *et al.*, 2008). Cette balle tissulaire est ainsi exploitée pour différents aspects tels que la remorphogénèse et la culture cellulaire (Kopecky et Ostrander, 1999 ; Domart-Coulon *et al.*, 2001, 2004 ; Helman *et al.*, 2008 ; Kramarsky-Winter *et al.*, 2008 ; Vizel *et al.*, 2011 ; Barnay-Verdier *et al.*, 2013), la calcification (Helman *et al.*, 2008 ; Mass *et al.*, 2012), les stress thermiques (Nesa et Hidaka, 2009) ou encore l'étude des zooxanthelles (Richier *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005 ; Nesa et Hidaka, 2009 ; Gardner *et al.*, 2014).

III.2.2. - Identification des balles tissulaires

Les multiples études menées sur les explants tissulaires ont aussi apporté une certaine diversité lexicale. Ainsi, les explants tissulaires (Kramarsky-Winter *et al.*, 2008 ; Vizel *et al.*, 2011 ; Barnay-Verdier *et al.*, 2013) sont aussi mentionnés sous les termes de fragments de tissus dissociés, d'agrégations cellulaires homotypiques (Marshall *et al.*, 2004), d'agrégats tissulaires et de balles tissulaires (TB) (Nesa et Hidaka, 2009 ; Lecoïnte *et al.*, 2013), de proto-polypes (Mass *et al.*, 2012), d'isolats endothéliaux multicellulaires (MEI) ou simplement d'isolats et de balles tissulaires (Kopecky et Ostrander, 1999 ; Domart-Coulon *et al.*, 2001, 2004).

Ces balles tissulaires diffèrent dans leur organisation selon les espèces et le mode de production. Ainsi, la dissociation mécanique testée sur *F. granulosa* permet aux auteurs d'observer une balle tissulaire organisée en un ectoderme et un endoderme séparés par une mésoglée (Kramarsky-Winter *et al.*, 2008 ; Vizel *et al.*, 2011 ; Gardner *et al.*, 2014). En

revanche, l'approche enzymatique testée par Lecointe *et al.* (2013) met en évidence une couche supérieure dite cortex et une masse centrale, dénuée de mésoglée (Lecointe *et al.*, 2013). Pour l'ensemble des auteurs, les explants tissulaires obtenus présentent tous une surface externe lisse, constituée d'un épithélium pourvu d'une abondante ciliature. L'activité ciliaire intense de ces agrégats leur confère une activité rotatoire importante. La masse centrale concentre les zooxanthelles, les cellules gastrodermiques et les mucocytes (Domart-Coulon *et al.*, 2004 ; Lecointe *et al.*, 2013). Chez *P. damicornis*, la biomasse des balles tissulaires n'augmente pas dans le temps, signifiant l'absence de division cellulaire (Lecointe *et al.*, 2013). Ces auteurs mettent même en évidence l'autophagie qui s'opère dans la masse centrale.

III.2.3. - Méthodes de préparation des balles tissulaires

L'explantation se définit comme la production de petits fragments tissulaires ou d'organes (Vizel *et al.*, 2011). Il existe un certain nombre de techniques permettant l'obtention d'explants tissulaires. Ces différentes méthodes ont pour objectif de produire une dissociation tissulaire et/ou cellulaire, soit par procédés mécaniques (Frank *et al.*, 1994 ; Richier *et al.*, 2003 ; Kramarsky-Winter *et al.*, 2008 ; Nesa et Hidaka, 2009 ; Vizel *et al.*, 2011), chimiques/enzymatiques (Gates et Muscatine, 1992 ; Frank *et al.*, 1994 ; Kopecky et Ostrander, 1999 ; Domart-Coulon *et al.*, 2001, 2004 ; Helman *et al.*, 2008 ; Barnay-Verdier *et al.*, 2013) ou par dissociation spontanée (Frank *et al.*, 1994 ; Domart-Coulon *et al.*, 2001, 2004 ; Mass *et al.*, 2012).

III.2.3.1. - Les types de dissociation

Chaque méthode de dissociation présente ses avantages et ses inconvénients qu'il convient d'appréhender et d'adapter aux besoins des futures expérimentations.

La dissociation mécanique consiste à effectuer des prélèvements tissulaires et cellulaires par grattage, excision au scalpel, isolement par jet sous pression au moyen d'un hydropulseur, lyse par action d'un agitateur en verre, ... (Kramarsky-Winter et Loya 1996 ; Nesa et Hidaka 2009 ; Vizel *et al.*, 2011, Gardner *et al.*, 2014) permettant de récupérer très rapidement des morceaux de tissus. Elle a l'avantage d'éviter toute exposition chimique ou enzymatique des tissus et des cellules. La production des explants tissulaires se révèle très rapide, avec la possibilité d'en obtenir sur une période courte de moins de 12 h.

En revanche, cette technique réclame une quantité de matériel biologique importante, du fait d'une consommation élevée en matériel tissulaire et pas toujours optimisée.

La dissociation chimique/enzymatique est une technique très proche de la dissociation spontanée. Elle consiste en une lyse active des liaisons cellulaires par l'utilisation d'enzymes telles que la collagénase, la trypsine (Gates et Muscatine, 1992 ; Frank *et al.*, 1994 ; Kopecky et Ostrander, 1999 ; Domart-Coulon *et al.*, 2001, 2004 ; Helman *et al.*, 2008 ; Barnay-Verdier *et al.*, 2013 ; Lecointe *et al.*, 2013) ou la pronase sur le stade planula (Frank *et al.*, 1994 ; Hagedorn *et al.*, 2012). C'est une méthode efficace pour isoler les cellules mais qui n'en demeure pas moins coûteuse et complexe, du fait de l'exposition du matériel biologique aux différentes solutions. L'activité intense de certaines enzymes peut provoquer des lésions difficilement contrôlables sur le matériel cellulaire, risque également encouru avec la dissociation mécanique (Gate et Muscatine, 1992 ; Frank *et al.*, 1994). Des temps d'incubations trop courts ou des solutions peu concentrées ne s'avèrent pas assez efficaces pour la dissociation tissulaire, mais, à l'inverse, une augmentation des temps d'exposition et des concentrations peut être létale. Enfin, Domart-Coulon *et al.* (2004) testent également l'expulsion des explants tissulaires sur des branches de *P. damicornis* et *S. pistillata* exposées à une solution d'eau de mer supplémentée avec du chlorure de potassium (10 - 24 mM).

La dissociation spontanée est ainsi qualifiée en référence à une dissociation apparente des tissus en cellules séparées, sans l'emploi de traitements chimiques ou mécaniques (Frank *et al.*, 1994). Ce procédé se révèle être la technique la plus performante pour la production des explants tissulaires chez les Scléractiniaires. Cette technique a l'avantage de ne pas abîmer le matériel biologique et de permettre de récupérer un grand potentiel tissulaire/cellulaire.

Ce procédé de dissociation passe par l'utilisation de nombreux mélanges et solutions qui peuvent gêner certaines expérimentations. Le temps d'obtention des isolats est plus long que pour les dissociations mécanique et chimique (Frank *et al.*, 1994) avec un début de production entre 2 et 4 jours pour la dissociation spontanée, permettant d'obtenir un mélange de cellules isolées et de fragments tissulaires dissociés de façon incomplète (Domart-Coulon *et al.*, 2001). Egalement, le risque de contamination est plus important.

III.2.3.2. - Les milieux de dissociation

Si la méthode de dissociation mécanique est un procédé simple à mettre en œuvre, les milieux de culture et les techniques de dissociation chimique/enzymatique et spontanée nécessitent davantage de précision.

De nombreux auteurs relatent la difficulté de maintien et d'entretien des explants tissulaires de par les risques de contaminations bactériennes et fongiques. Kramarsky-Winter *et al.* (2008) ont pu obtenir des résultats intéressants de re-morphogénèse sur des explants de *F. granulosa* jusqu'à l'obtention de polypes primaires. Cependant, un tel processus n'est pas

facilement reproductible sur toutes les espèces d'Anthozoaires. Chaque espèce, voire chaque individu, a des réactions propres au stress des manipulations ; un affaiblissement qui peut être favorable au développement microbien. Rinkevich (2005) observe que, malgré les résultats encourageant valorisés dans les publications, la culture cellulaire corallienne n'est aujourd'hui toujours pas maîtrisée sur le long terme. Toutes les précautions d'aseptie et l'optimisation des conditions de culture (température, photopériode, milieu nutritif,...) doivent donc être respectées afin de maximiser les taux et les temps de survie et de développement.

L'ensemble des publications mentionne l'importance de travailler sur un support sain, tel que des plaques de culture stériles ou considérées comme propres. L'usage d'eau de mer dépourvue d'organismes apparaît aussi indispensable. Ainsi, il peut s'agir d'eau de mer rendue stérile par filtration sur membrane de 0.2 μm (SSW : Sterile SeaWater) (Frank *et al.*, 1994), également qualifiée de FSW : Filter SeaWater (Nesa et Hidaka, 2009 ; Hagedorn *et al.*, 2012). D'autres emploient de l'eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water) (Domart-Coulon *et al.*, 2001, 2004), aussi appelée SSW : Synthetic SeaWater (Gattuso *et al.*, 2000). Enfin, Kopecky et Ostrander (1999) utilisent de l'eau de mer artificielle stérilisée par filtration sur membrane de 0.2 μm , technique aussi mentionnée sous l'abréviation SASW (Sterile Artificial SeaWater) (Barnay-Verdier *et al.*, 2013).

III.2.3.3. - La place du calcium dans l'eau de mer

Nombreux sont les auteurs s'inspirant du protocole original de Rice (1956) repris par Gates et Muscatine (1992). Cette méthode de culture repose sur l'emploi d'une solution d'eau de mer artificielle proposée par McClendon (1917) et carencée en calcium (Ca-FSW) et en strontium par Rice (1956) (Fig. 61). Rice (1956) s'intéresse à l'absorption du strontium et de l'yttrium chez 12 microalgues. Il met notamment en évidence que l'absence de calcium dans le milieu de culture provoque l'absence de division cellulaire de *Carteria* sp.

Gattuso *et al.* (2000) proposent une eau de mer appauvrie avec une concentration en chlorure de calcium à 2.8 mM. L'utilisation d'eau de mer dépourvue ou faiblement concentrée en calcium à des fins de dissociation cellulaire est connue dès les années 1900 avec les premiers travaux de Ringer (1890). Cet auteur indique une desquamation facile de l'épithélium des têtards de grenouilles après 24h d'exposition à une eau distillée enrichie en chlorure de calcium.

FORMULAE FOR ARTIFICIAL SEA WATER (Cl = 19.00 ‰) 33,53							
McClendon <i>et al</i> (1917)		Brujewicz (Subow, 1931)		Lyman and Fleming (1940)		Rice (1956)	
Salt	g/kg	Salt	g/kg	Salt	g/kg	Salt	g/kg
NaCl	26.726	NaCl	26.518	NaCl	23.476	NaCl	26.5
MgCl ₂	2.260	MgCl ₂	2.447	MgCl ₂	4.981	MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.5
MgSO ₄	3.248	MgSO ₄	3.305	Na ₂ SO ₄	3.917	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.3
CaCl ₂	1.153	CaCl ₂	1.141	CaCl ₂	1.102	CaCl ₂ ·2H ₂ O	
KCl	0.721	KCl	0.725	KCl	0.664	KCl	0.7
NaHCO ₃	0.198	NaHCO ₃	0.202	NaHCO ₃	0.192	NaHCO ₃	0.2
NaBr	0.058	NaBr	0.083	KBr	0.096	KNO ₃	0.1
H ₃ BO ₃	0.058			H ₃ BO ₃	0.026	SrCl ₂ ·6H ₂ O	
Na ₂ SiO ₃	0.0024			SrCl ₂	0.024	NaSiO ₃ ·9H ₂ O	0.023
Na ₂ Si ₄ O ₉	0.0015			SrF ₂	0.003	KH ₂ PO ₄	0.0075
H ₃ PO ₄	0.0002					MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0033
Al ₂ Cl ₆	0.013					ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00001
NH ₃	0.002						
LiNO ₃	0.0013						
Total	34.4406		34.421		34.481		33.333
Water to 1,000.0000		Water to 1,000.000		Water to 1,000.000		Water to 1,000.000	

Figure 61 : Différentes compositions d'eau de mer artificielle.
Sources : Sverdrup *et al.*, 1942 ; Rice, 1956.

Parmi les nombreuses propriétés du calcium, il est reconnu que cet ion augmente la rigidité de la membrane cytoplasmique. Il joue également un rôle dans la diminution de la perméabilité membranaire sans altérer pour autant les fonctions cellulaires. L'ion calcium a aussi une action de déshydratation des surfaces plasmiques (Manery, 1966). Enfin, l'absence de calcium entraîne des perturbations importantes d'adhésion cellulaire (Manery, 1966), mises en évidence lors de l'emploi de Ca-FSW.

Cette méthode apparaît adaptée pour la dissociation tissulaire des coraux durs (Gates et Muscatine, 1992). Cependant si cette technique permet la dissociation cellulaire, elle s'avère irréversible en altérant les capacités d'adhésion cellulaire (Manery, 1966 ; Domart-Coulon *et al.*, 2004 ; Lecoinge *et al.*, 2013).

III.2.3.4. - Le recours aux enzymes

La digestion enzymatique est une méthode de dissociation devenue courante dans la culture cellulaire des invertébrés marins. Malgré tout, cette méthode affecte la survie et les fonctionnalités des cellules après traitement.

Frank *et al.* (1994) testent plusieurs traitements enzymatiques par l'immersion de planulae et/ou de fragments de différentes colonies dans les milieux suivants (avec agitation à 60 rpm) :

- Trypsine-EDTA (0.05 % dans SSW, 20 min),
- Pronase (0.1 % dans SSW, 60 min),
- Collagénase (0.05 % dans SSW, 4 h),

- EDTA (0.02 % dans NaCl, 2 h).

Associé à ce procédé de dissociation, le détachement des tissus est amélioré par l'emploi d'un jet de SSW à l'aide d'une pipette. L'emploi de trypsine ne permet pas d'obtenir un bon rendement en cellules viables, les trois autres traitements apparaissant moins agressifs pour le matériel cellulaire (Frank *et al.*, 1994). Les classes de taille des cellules viables obtenues par ces procédés enzymatiques sont similaires à celles obtenues par dissociation mécanique.

Gates et Muscatine (1992) ainsi que Barnay-Verdier *et al.* (2013) réalisent un rinçage préalable au Ca-FSW des tentacules d'*Aiptasia pulchella* et d'*Anemonia viridis* pendant 1 h. La dissociation des tissus est ensuite conduite par une exposition à une solution de collagénase de Type I à 0.05 % (dans 0.1 M de tampon de phosphate de sodium contenant 3 % de chlorure de sodium et 0.004 % de chlorure de calcium), pH 7.4, pendant 1 h et sous agitation à 25 °C. Gates et Muscatine (1992) réalisent aussi un traitement avec une solution de trypsine à 0.05 % de Type III dans Ca-FSW et selon les mêmes conditions. La trypsine apparaît plus efficace que la collagénase avec l'obtention plus rapide de cellules isolées.

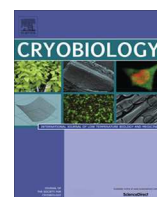
Lecoite *et al.* (2013) utilisent sur des fragments de *P. damicornis* une solution enzymatique à base de collagénase de type IV (Sigma) ajustée à 5 - 15 CDUs (collagen-degrading units) par mg de tissu humide (24 °C, 10 - 30 min, 75 rpm). Un rinçage préalable des fragments dans FSW + 3 % Antibiotique - Antimycosique est effectué. La dissociation par la collagénase permet la formation d'agrégats cellulaires adhérents après le traitement de *P. damicornis* avec la collagénase de type IV (15 min).

III.3. - Le choix de la dissociation et des traitements

Notre choix de la technique de dissociation a été guidé par l'observation ou non d'une métamorphose obtenue par les différents auteurs, par la complexité du traitement, le temps de production ainsi que par l'élimination de tous risques d'interactions moléculaires entre les solutions de dissociation et les solutions cryoprotectrices, qui pourraient interférer sur les résultats post-traitement. Pour les premiers essais, nous avons utilisé une dissociation mécanique telle que réalisée sur *F. granulosa* (Kramarsky-Winter *et al.*, 2008 ; Vizel *et al.*, 2011) tout en conservant l'idée de la réagglomération cellulaire testée sur *P. damicornis* par Lecoite *et al.* (2013). La réagglomération a ainsi permis d'obtenir de nouveaux polypes, en particulier chez les hydres (Gierer *et al.*, 1972 ; Campbell et David, 1974 ; Bosch, 2007).

III.4. - L'exposition des balles tissulaires de *P. damicornis* aux solutions cryoprotectrices

Feuillassier, L., Martinez, L., Romans, P., Engelmann-Sylvestre, I., Masanet, P., Barthélémy, D., & Engelmann, F. (2014). Survival of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* L. exposed to cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, 69 (3), 376-385.



Survival of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* L. exposed to cryoprotectant solutions [☆]



Lionel Feuillassier ^{a,b}, Lucie Martinez ^a, Pascal Romans ^a, Isabelle Engelmann-Sylvestre ^b, Patrick Masanet ^c, Dominique Barthélémy ^d, Florent Engelmann ^{b,*}

^aSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Centre de Ressources Biologiques Marines, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, F-75005 Paris, France

^bIRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^cAquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France

^dOcéanopolis, Port de plaisance du Moulin Blanc, BP91039, 29210 Brest Cedex 1, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2014

Accepted 12 August 2014

Available online 18 September 2014

Keywords:

Tissue ball

Cryoprotectant

Coral

Cryopreservation

Pocillopora damicornis

ABSTRACT

In this study, the tolerance of tissue balls (TBs, 100–300 μm in diameter) from the coral *Pocillopora damicornis* produced using mechanical excision to exposure to cryoprotectant (CPA) solutions was tested. TBs were treated for 20 min at room temperature with solutions of ethylene glycol (EG), methanol (Met), glycerol (Gly) or dimethyl sulfoxide (Me_2SO) at concentrations between 1.0 and 4.5 M. Two parameters were used to evaluate the survival of TBs following CPA treatment. The Undamaged Duration of Tissue Balls (expressed in h) corresponded to the time period during which the membrane surface of TBs remained smooth and their motility was preserved. Tissue Ball Regression (expressed in $\mu\text{m}/\text{h}$) corresponded to the size reduction of TBs over time. TBs tolerated exposure to all CPAs tested at the three lower concentrations employed (1.0 M, 1.5 M and 2.0 M). No survival was achieved following exposure to a 4.5 M CPA solution. At concentrations of 3.0 and 4.0 M, higher Undamaged Duration of Tissue Balls and lower Tissue Ball Regression were obtained following treatment with EG compared to the other three CPAs. Our experiments show that TBs constitute a good experimental material to evaluate CPA toxicity on corals using large numbers of samples. Performing preliminary experiments with TBs may allow reducing the number of tests carried out with less easily available coral forms such as planulae, thereby preserving larval stocks.

© 2014 Published by Elsevier Inc.

Introduction

Coral reefs contain a remarkable diversity of species restricted on limited surfaces. They are known as being among the world's most productive ecosystems. Over the last decades, the sustainability of coral reefs has been threatened by environmental and anthropogenic aggressions [13,15]. Coral reefs are among the most sensitive and most severely impacted ecosystems. Urgent safeguard measures must thus be taken to protect them. Cryopreservation (liquid nitrogen, $-196\text{ }^\circ\text{C}$) can constitute a good strategy to ensure the long-term *ex situ* conservation of this exceptional biodiversity.

The first attempts to cryopreserve Anthozoa species were initiated by Frank et al. in 1994 [24], followed by Hagedorn et al.

[☆] Statement of funding: Funding for the implementation of this research work was provided by IRD and UPMC.

* Corresponding author. Fax: +33 (0)4 67 41 62 52.

E-mail address: florent.engelmann@ird.fr (F. Engelmann).

[27–33] from 2006 onwards, by Tsai et al. in 2010 and 2014 [62,63] and by Lin et al., in 2011–2014 [44–46]. Today, cryopreservation has been successfully applied only to cell suspensions [30,31] and spermatozoa [30–32] of several Scleractinian species using the same cryopreservation protocol. The symbiosis between coral and zooxanthellae and the lipid composition of cells have been identified as the two main obstacles to the successful cryopreservation of coral oocytes and larvae [28,62]. In addition, the calcite structure of apices makes coral cryopreservation more difficult [22,33].

A range of coral biological forms may be employed for cryopreservation, including larvae, isolated polyps or cell aggregates. Corals are among the marine invertebrates, which are the most sensitive to cryopreservation. In this context, new approaches to coral cryopreservation must be explored.

Cnidarians have high regenerative properties. This faculty has been more thoroughly investigated on others marine invertebrates such as Sponges, Arthropods, Echinoderms and some Shellfish classes [56]. With Anthozoa species, the first regeneration tests were

performed in the 80s with the pioneering work of Sammarco [59] and Richmond [55]. These authors uncovered the Polyp Bail Out phenomenon or inverted metamorphosis for mature colonies [59] and primary polyps from settled planulae [55]. This reverse metamorphosis improved our knowledge of coral regeneration ability. From the 90s onwards, several publications were produced on tissue and cellular dissociation on Cnidarians [25,60,61]. Spherical aggregates expelled from the skeleton were generated after stressing corals by exposing them to degraded environmental conditions [11,12,68]. In 1997, Kramarsky-Winter et al. [38] identified a new mode of asexual reproduction, polyp expulsion from colonies.

Such separation abilities and polyp regeneration properties offer numerous possibilities for research purposes. In 2004, successful polyp separation from a *Galaxea fascicularis* colony was achieved by Marshall and Clode [48]. These authors used a calcium-free seawater solution based on Krishnaveni's protocol (1989) [40]. Fine and Tchernov [23] isolated polyps from two Scleractinian species after treating corals with decreasing pH seawater (pH ~7.3–7.6) for 1 month [23]. More recently, polyps or tissue cultures could be obtained from small tissue explants [39,65]. These tissue explants were described as spheroid and heterotypic tissue balls [18,39,50,65]. This biological form was identified under several denominations including tissue balls (TBs) [41,50], multicellular endothelial isolates (MEIs) or tissue isolates [18,17,37]. TBs are divided in two distinct zones, a cortex and a central mass [41]. A specific cell type distribution was observed between these two zones, with the central mass containing mucocytes, autophagosomes and zooxanthellae and the cortex containing ciliated cells, cells with vesicles and cnidocytes [41]. TBs are characterized by their smooth surface and rotation activity [18,37,41,50]. Motility is induced by ciliated cells of the cortex [41] and this rotary motion process may be used to follow survival of TBs after experimental treatments [50]. Polyp tissue dissociation to form TBs could be obtained using mechanical [24,39,50,54,65] and chemical/enzymatic [6,18,17,24,25,34,37] techniques or it could occur spontaneously [18,17,24,49].

The experiments performed with coral till today showed that individual propagules such as spermatozoa or isolated cells could withstand LN exposure, whereas cryopreservation of more complex structures including planulae, metamorphosed primary polyps, isolated polyps or apexes has not yet been achieved. TBs represent propagules of intermediate complexity between these two categories of explants. They offer an alternative to the use of more complex structures such as apexes, which comprise a calcareous skeleton. Apexes are not a very convenient material because, after excision, they need a minimal period of recovery to allow for tissue colonization on exposed skeleton before they can be used for cryopreservation experiments. Moreover, coral species present different skeleton organizations and may thus require different cryopreservation protocols. Finally, as TBs can be produced in large quantities, they can be used to test numerous experimental conditions. The best treatments selected can then be applied to less easily available forms such as isolated polyps or larvae from periodic releases. Finally, TBs have the same genetic origin and stable biological quality.

In this work, we investigated the tolerance of TBs from the coral *Pocillopora damicornis* to solutions containing individual cryoprotective agents (CPAs), as a preliminary study before performing cryopreservation experiments. Two parameters were used to evaluate the survival of TBs following CPA treatment. The Undamaged Duration of Tissue Balls corresponded to the time period during which the membrane surface of TBs remained smooth and their motility was preserved. Tissue Ball Regression corresponded to the size reduction of TBs over time. In order to avoid any interaction between chemical reactions, we used mechanical excision according to Kramarsky-Winter et al. [39] and Vizel et al. [65] for TB production.

Materials and methods

Biological material

Experiments were performed with coral colonies of the Scleractinian *P. damicornis* originating from the Aquarium de Canet en Roussillon, France (branches resulting from spontaneous reproduction on CITES number: O3584). Animals were maintained for 1 month prior to experiments at the Oceanological Observatory, Pierre and Marie Curie University, Banyuls/mer, France, using the captivity conditions described by Feuillassier et al. [22].

Tissue dissociation

Tissues were excised from coenosarc areas of coral branches using a No. 24 scalpel blade (cleaned with 96% alcohol) at room temperature (RT: 22 °C). Sampling of coenosarc was preferred to sampling of polyps because new tissues could be regenerated from the excised areas. Small tissue fragments were sampled without scraping to preserve ectoderm and endoderm cells. Samples were immersed in 3 ml wells of multiple well cluster plates for cell culture (CORNING, TC-Treated, Sterile) filled with 24 h-aged Artificial Sea Water (ASW: temperature 25 °C, salinity: 35, pH: 8.4). ASW was prepared with osmolated water mixed with Reef Crystal Salt (Aquarium System label; PO₄³⁻ and NO₃⁻ free; Ca²⁺: 400 mg/L; Mg²⁺: 1200 mg/L; KH ≈ 7). As already observed by Vizel et al. [65], a large amount of mucus covered these tissue fragments and incubation for 24 h was necessary to obtain moving TBs. Incubation was performed in an incubator (temperature: 25 ± 1 °C, hygrometry: 100%; light intensity: 20 μmol m⁻² s⁻¹). After 24 h incubation, rotating TBs were rinsed five times with fresh 24 h-ASW and transferred individually in wells of multiple well cluster plates containing 3 ml fresh 24 h-ASW. TBs were isolated individually in wells to avoid the occurrence of fusion events.

Experimental procedures

Effect of TB size

Several branches from the *P. damicornis* colonies were used during the CPA tests. To estimate the effect of size, TBs were divided in three classes:

- Class 1 (C1): TB diameter < 200 μm.
- Class 2 (C2): 200 ≤ TB diameter < 400 μm.
- Class 3 (C3): 400 μm ≤ TB diameter.

Effect of CPA treatment

TBs with a diameter larger than 100 μm (Fig. 1) were used immediately after rinsing. Samples of 30 treated TBs and 30 control TBs were used for each experimental condition. TBs were exposed for 20 min at RT (1.5 ml CPA/TB) to solutions of dimethyl sulfoxide (Me₂SO, VWR, analytical reagent, assay: 99.7%), glycerol (Gly, CARLO ERBA, ACS-for analysis, assay: 99.5%), ethylene glycol (EG, VWR, AnalaR NORMAPUR, assay: 100%) or methanol (Met, SIGMA-ALDRICH, ACS-reagent, assay: 99.8%) at concentrations between 1.0 and 4.5 M.

After the CPA treatment, TBs were rinsed three times with 24 h-ASW and placed in an incubator in the conditions employed for tissue dissociation. Control TBs were exposed to 24 h-ASW. Water was replaced daily with fresh 24 h-ASW.

Observations and measurements performed

Photographs of all TBs were taken before the CPA treatment using a photographic monitoring device (MOTIC 257 SMZ-168-TLED coupled with a numeric camera MOTICAM 580

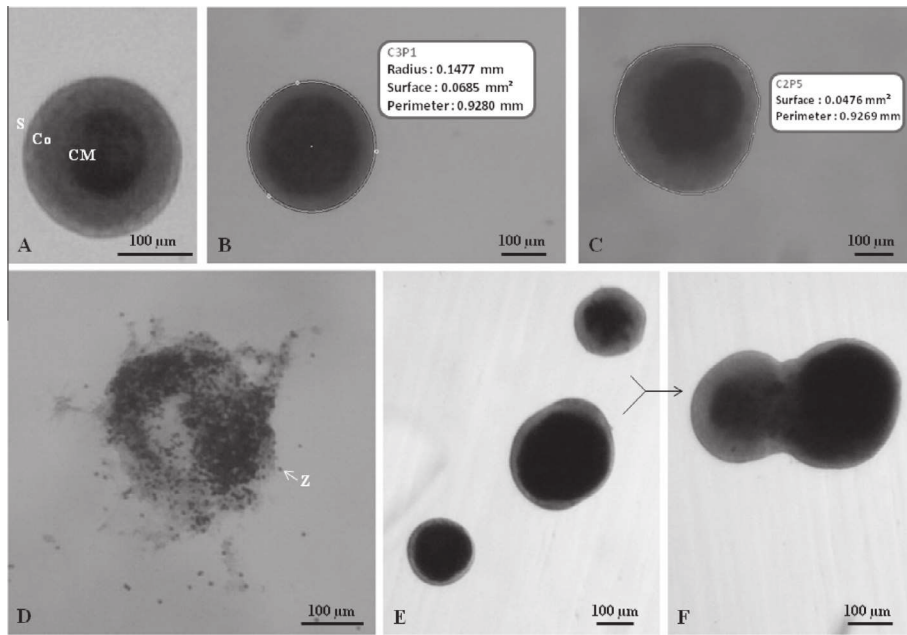


Fig. 1. In vitro production of tissue balls (TBs) from *P. damicornis* incubated 24 h after mechanical excision. (A) TB organization with S, smooth surface; Co, cortex and CM, central mass containing the most of zooxanthellae. (B) Spheroid TB's values identified with Motic software. (C) TB's values with irregular form. (D) TB disruption with unidentified coral cells and brown zooxanthellae (Z). (E) Size heterogeneity in TB sample. (F) Fusion between two TBs.

SM7619-MG4EX-RPFWFT). After the CPA treatment, photographs were taken daily until TB disruption, to measure the evolution of TB size and to assess their survival. The size of TBs decreased gradually until rapid TB disruption occurred, resulting in cell dispersion (Fig. 1). Rotation of TBs was observed until their disruption. TBs were thus considered surviving until TB disruption.

Two parameters, the Undamaged Duration of Tissue Balls and the Tissue Ball Regression were measured after different Durations Following Treatment (24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h) to evaluate the impact of CPA treatment on survival and size evolution of control and treated TBs. The Undamaged Duration of Tissue Balls (expressed in h) corresponded to the time period during which the membrane surface of TBs remained smooth and their motility was preserved. This qualitative variable allowed evaluating the structural integrity of TBs over time. TBs had a spheroid or ovoid shape. The Tissue Ball Regression corresponded to the size reduction of TBs over time. To calculate the cumulative Tissue Ball Regression (expressed in $\mu\text{m}/\text{h}$), the perimeter of TBs was measured daily using the Motic Images (PLUS 2.0) software (Fig. 1). High Tissue Ball Regression values indicated low tolerance of TB to CPA solutions and low Tissue Ball Regression values high tolerance to CPA solutions.

Statistical analysis

Statistical tests were carried out using the R version 3.0.2 free software (The R Foundation for Statistical Computing, 2013). Graphic processing was performed with the R software and Microsoft Excel (version 2007). The treatment effect was determined based on differences between tested samples and their controls. These data allowed to compare CPA impact and to evaluate TB evolution depending on the quality of coral colonies. Tissue Ball Regression differences between treatments were analyzed using the Wilcoxon test. Undamaged Duration of Tissue Balls data were compared with General Linear Models (GLM test) using the complementary binomial logistic link function. Undamaged Duration of Tissue Balls was considered as a logical factor and data were treated for each Duration Following Treatment as a binary outcome (0.0, 1.0). Then, the

significance of tests was checked with the Chisq test. The Spearman test was performed to evaluate the correlation between two numeric and non-parametric variables while the Kruskal–Wallis test was carried out to estimate the correlation between qualitative (classes >2) and numeric variables. The significance of differences was considered with a 95% confidence level (p values <0.05).

Results

Effect of TB size

In this first experiment, TBs were divided in three size classes to investigate the effect of size on TB survival. The Spearman test confirmed the significant correlation ($p < 0.05$) between the average diameter of coral TBs and the cumulative Tissue Ball Regression over time.

Cumulative Tissue Ball Regression was significantly different between size classes ($p < 0.05$, Kruskal-test) (Fig. 2A). Cumulative Tissue Ball Regression for C1 TBs was higher than for C2 and C3. Comparison between samples of the same size class showed significant differences between the cumulative Tissue Ball Regression values and samples ($p < 0.05$, Kruskal-test) (Fig. 2B).

Undamaged Duration of Tissue Balls values were higher for the two higher size classes (C2 and C3) (Fig. 2C). Most Undamaged Duration of Tissue Balls values were comprised between 50 and 100 h for C1 TBs, while they were comprised between 100 and 150 h for C2 TBs. As observed with cumulative Tissue Ball Regression values, Undamaged Duration of Tissue Balls values of C3 TBs had the largest distribution and included both the lowest and highest values measured.

For this experiment, coral branches were cut from the same colonies and maintained under identical culture conditions. Despite these measures, the analysis of the cumulative Tissue Ball Regression and Undamaged Duration of Tissue Balls parameters revealed a heterogeneity between TBs. Tissue Ball Regression and Undamaged Duration of Tissue Balls were higher for TBs with a diameter lower than $200 \mu\text{m}$. TBs with a diameter $\geq 200 \mu\text{m}$ were thus selected for further experiments. These first tests highlighted the

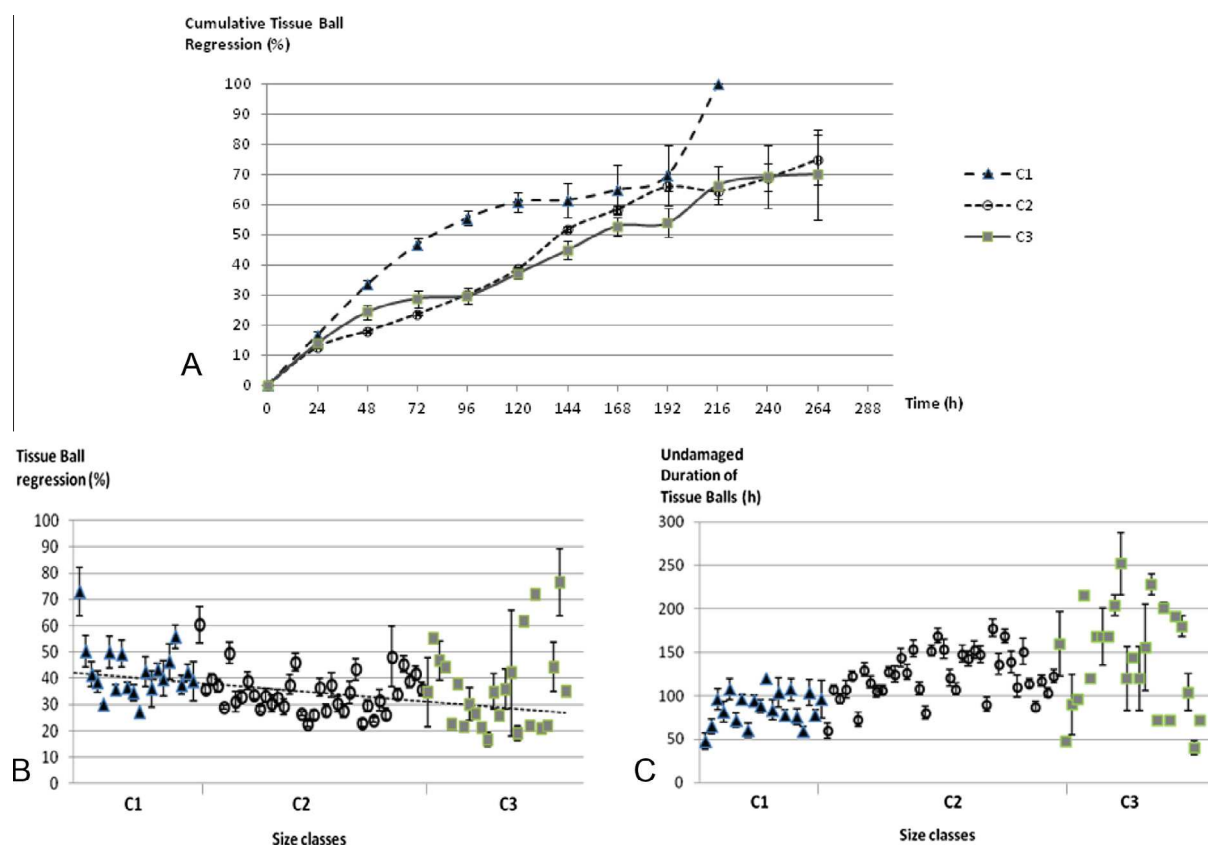


Fig. 2. Effect of TB size. (A) Cumulative regression from *P. damicornis* TBs over time at 25 °C ($N = 1424$ TBs). (B) Cumulative Tissue Ball Regression and (C) Undamaged Duration of Tissue Balls from samples divided in three size classes ($N = 1424$ TBs). TBs were divided in C1, TB diameter < 200 μm; C2, 200 ≤ TB diameter < 400 μm; C3, 400 μm ≤ TB diameter.

importance of analyzing the results obtained with control samples before making comparisons between treated samples. This preliminary analysis allowed taking into account the effect of coral quality fluctuation on the production of TBs.

Effect of CPA treatment

With the four CPA solutions tested, Undamaged Duration of Tissue Balls decreased significantly with increasing CPA concentrations and conversely, Tissue Ball Regression values increased significantly with increasing CPA concentrations up to 3.0 M ($p < 0.05$, Kruskal-test).

Tissue Ball Regression was not significantly different ($p > 0.05$, Wilcoxon-test) between treated and control TBs with the four CPA solutions employed at the three lower CPA concentrations tested (1.0, 1.5 and 2.0 M) (Fig. 3a–d). At these three concentrations and for each CPA solution, no significant differences were observed between Tissue Ball Regression of treated and control samples for each Duration Following Treatment (24–168 h) ($p > 0.05$, Wilcoxon-test). Significant differences were obtained only for 24 h (for 1.0 M Met, 1.0 M Gly and 2.0 M Me₂SO), 48 h (1.0 M Me₂SO) and 72 h (1.5 M Me₂SO) ($p < 0.05$, Wilcoxon-test). Tissue Ball Regression was significantly correlated with Undamaged Duration of Tissue Balls ($p < 0.05$, Kruskal-test). With all CPAs tested, exposure of TBs to a 4.5 M solution was lethal (Fig. 3a–d).

The Tissue Ball Regression values of treated and control TBs were not significantly different after exposure to a CPA solution containing 3.0 M EG ($p > 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 3a). The Undamaged Duration of Tissue Balls values of treated and control TBs were not significantly different after exposure to CPA solutions

containing 1.0–3.0 M EG ($p > 0.05$, GLM-test). Tissue Ball Regression and Undamaged Duration of Tissue Balls of treated TBs were significantly higher and lower, respectively compared to control TBs following treatment with 4.0 M EG ($p < 0.05$, Wilcoxon-test and $p < 0.05$, GLM-test, respectively).

Treatment with 3.0 M and 4.0 M Met solutions induced significantly higher Tissue Ball Regression values for treated samples compared to controls ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 3b). Significantly lower Undamaged Duration of Tissue Balls values were obtained with treated TBs compared to controls following exposure to 1.0, 3.0 and 4.0 M Met ($p < 0.05$, GLM-test) (Fig. 3b).

The Tissue Ball Regression of TBs treated with 3.0 and 4.0 M Me₂SO was significantly higher compared to controls ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 3c). For the two lower Me₂SO concentrations tested (1.0 and 1.5 M), Undamaged Duration of Tissue Balls values were not significantly different between treated and control samples. By contrast, after treatment with CPA solutions containing 2.0, 3.0 and 4.0 M Me₂SO, the Undamaged Duration of Tissue Balls of treated TBs was significantly lower compared to controls ($p < 0.05$, GLM-test) (Fig. 3b).

Following treatment with CPA solutions containing Gly, Tissue Ball Regression and Undamaged Duration of Tissue Balls values were significantly higher and lower, respectively for TBs treated with 3.0 and 4.0 M Gly, compared with control samples ($p < 0.05$, Wilcoxon-test and $p < 0.05$, GLM-test, respectively) (Fig. 3d).

Comparison between the four CPAs tested

Similar cumulative Tissue Ball Regression values were obtained with TBs exposed to CPA solutions containing 1.0, 1.5 M and 2.0 M

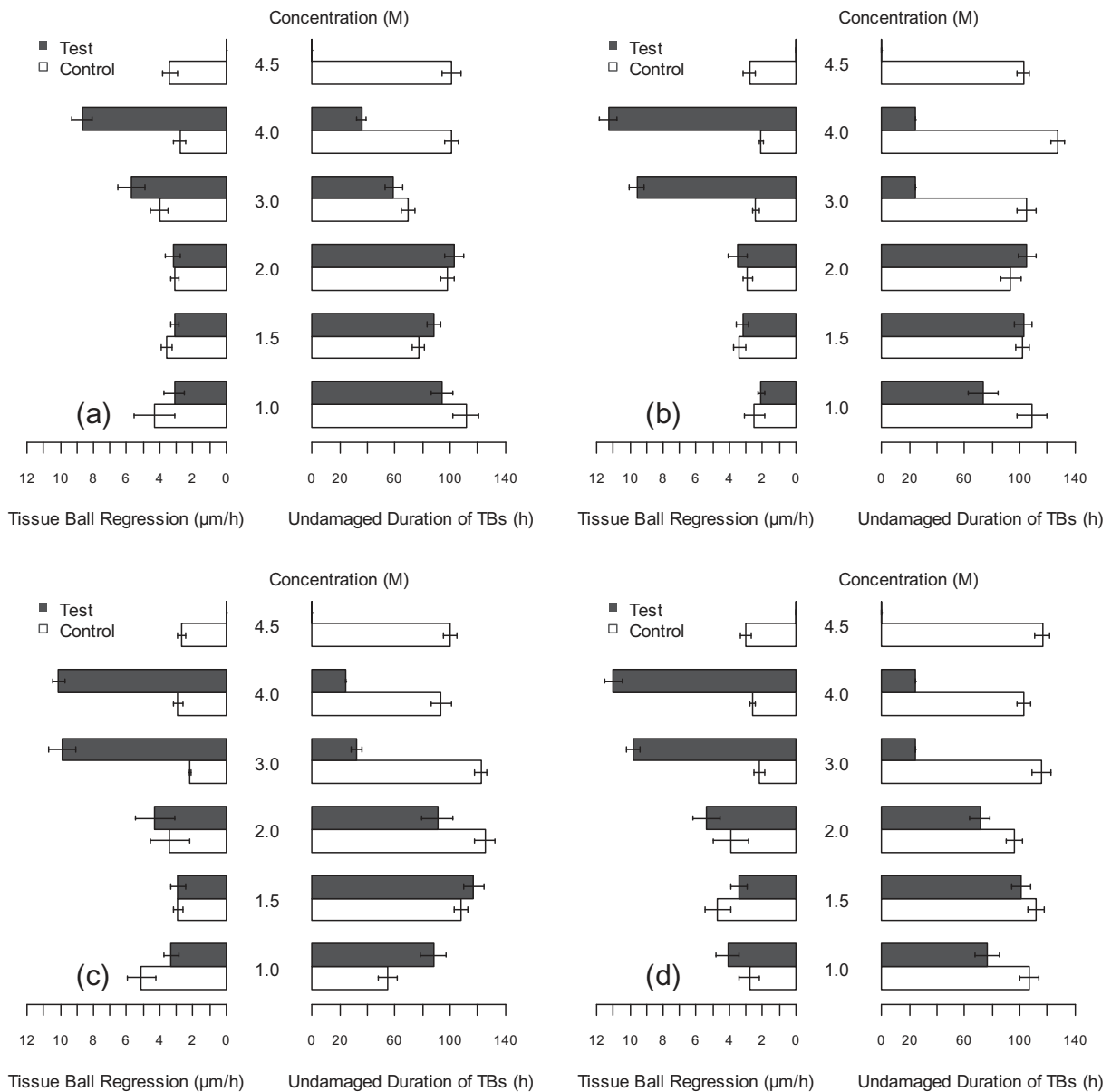


Fig. 3. *P. damicomis* Tissue Ball Regression and Undamaged Duration of Tissue Balls after treatment for 20 min at room temperature with CPA solution ($N = 30$ TBs/treatment). Four CPA solutions containing individually permeant CPA: (a) ethylene glycol (EG); (b) methanol (Met); (c) dimethyl sulfoxide (Me_2SO) and glycerol (Gly) at different concentrations (1, 1.5, 2, 3, 4 or 4.5 M).

EG or Met for all Durations Following Treatment except 144 and 168 h (Fig. 4A and B). Tissue Ball Regression of TBs treated with 3.0 and 4.0 M Met increased more rapidly compared with EG treatments. The Undamaged Duration of Tissue Balls values of TBs treated with EG or Met tested at the three lower concentrations employed (1.0, 1.5 M and 2.0 M) were not significantly different for Durations Following Treatment between 24 and 72 h ($p > 0.05$, GLM-test). However, significant differences in Undamaged Duration of Tissue Balls were observed following treatment with EG and Met at these concentrations for Durations Following Treatment between 96 and 168 h ($p < 0.05$ GLM-test). For Durations Following Treatment up to 72 h, Undamaged Duration of Tissue Balls and Tissue Ball Regression values were higher and lower, respectively following EG treatment compared to Met treatment. For CPA concentrations of 3.0 and 4.0 M and for all Durations Following Treatment tested, Undamaged Duration of Tissue Balls

values were significantly higher following EG treatment compared with Met ($p < 0.05$, GLM-test) (Fig. 4a and b).

Cumulative Tissue Ball Regression values were comparable between TBs treated with 1.0, 1.5 or 2.0 M EG and Me_2SO (Fig. 4A and C). Cumulative Tissue Ball Regression of TBs treated with 3.0 M Me_2SO was lower compared to 3.0 M EG. No significant differences in Undamaged Duration of Tissue Balls were detected between TBs treated with EG or Me_2SO at the four lower concentrations tested (1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 M) for Durations Following Treatment between 24 and 72 h ($p > 0.05$, GLM-test) (Fig. 4a and c). Higher Undamaged Duration of Tissue Balls values were obtained for Durations Following Treatment over 72 h following treatment with EG compared to Me_2SO ($p > 0.05$, GLM-test). For a CPA concentration of 4.0 M, lower cumulative Tissue Ball Regression and higher Undamaged Duration of Tissue Balls were achieved with EG compared to Me_2SO .

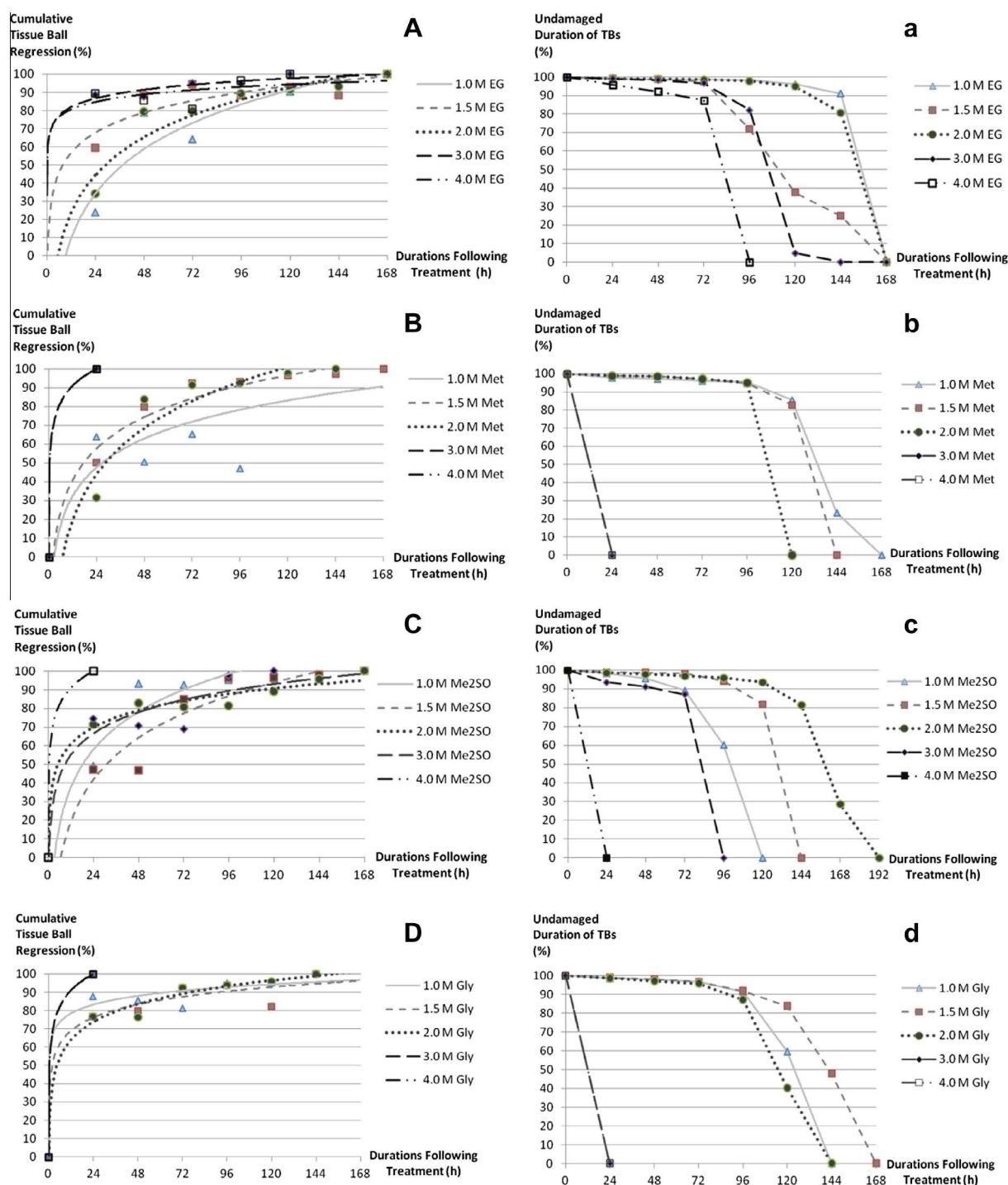


Fig. 4. Cumulative Tissue ball Regression for: (A) ethylene glycol (EG), (B) methanol (Met), (C) dimethyl sulfoxide (Me_2SO) and (D) glycerol (Gly) and Undamaged Duration of Tissue Ball for: (a) ethylene glycol (EG), (b) methanol (Met), (c) dimethyl sulfoxide (Me_2SO) and (d) glycerol (Gly) over Duration Following Treatment (24–264 h) subsequent to exposures for 20 min with four CPA solutions at different concentrations (1, 1.5, 2, 3 and 4 M) at room temperature ($N = 30$ tissue balls/essay).

Cumulative Tissue Ball Regression values of TBs treated with EG were significantly lower at all concentrations tested and for all Durations Following Treatment compared to Gly ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 4A and D). At the three lower concentrations tested and for Durations Following Treatment between 24 and 72 h, no significant differences were obtained in Undamaged Duration of Tissue Balls between TBs treated with EG or Gly ($p > 0.05$, GLM-test) (Fig. 4a and d). For Durations Following Treatment higher than 72 h, significantly higher Undamaged Durations of Tis-

sue Balls were noted following treatment with EG compared to Gly ($p < 0.05$, GLM-test). For CPA concentrations of 3.0 and 4.0 M, Undamaged Duration of Tissue Balls values were significantly higher for all Durations Following Treatment following treatment with EG compared with Gly ($p < 0.05$, GLM-test) (Fig. 4a and d).

At concentrations of 1.0 and 2.0 M, Tissue Ball Regression of TBs treated with Me_2SO was significantly higher compared to Met for all Durations Following Treatment tested ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 4B and C). By contrast, at concentration 3.0 M and for all

Durations Following Treatment tested, Tissue Ball Regression of TBs treated with Me₂SO was lower compared to Met. Equal Tissue Ball Regression values were obtained between Me₂SO and Met treatments concentrated to 4.0 M for all Durations Following Treatment tested. Undamaged Duration of Tissue Balls values were not significantly different following treatment of TBs with 1.0, 1.5 or 2.0 M Me₂SO or Met for Durations Following Treatment of 24 and 48 h ($p > 0.05$, GLM-test) (Fig. 4b and c). For Durations Following Treatment above 48 h, Undamaged Durations of Tissue Balls were significantly higher following treatment with 1.0 M Met compared to 1.0 M Me₂SO ($p < 0.05$, GLM-test), not significantly different following treatment with 1.5 M Met compared to 1.5 M Me₂SO tests, and significantly lower following treatment with 2.0 M Me₂SO compared to 2.0 M Met ($p < 0.05$, GLM-test). Higher Undamaged Duration of Tissue Balls values were recorded following treatment of TBs with 3.0 M Me₂SO compared to 3.0 M Met for Durations Following Treatment between 24 and 72 h ($p < 0.05$, GLM-test) and equivalent Undamaged Duration of Tissue Balls values were noted following treatment of TBs with 4.0 M Me₂SO or Met 4.0 M.

At concentrations of 1.0 and 2.0 M and for all Durations Following Treatment tested, cumulative Tissue Ball Regression of TBs treated with Gly was significantly higher compared to Met ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 4B and D). By contrast, Tissue Ball Regression was not significantly different following treatment of TBs with 3.0 or 4.0 M Met or Gly for all Durations Following Treatment tested. Undamaged Duration of Tissue Balls values were not significantly different following treatment with 1.0, 1.5 or 1.5 M Met and Gly for Durations Following Treatment between 24 and 72 h ($p > 0.05$, GLM-test) (Fig. 4b and d). For Durations Following Treatment between 96 and 168 h, Undamaged Duration of Tissue Balls values were significantly higher following treatment of TBs with 1.0 M Met compared to Gly ($p < 0.05$, GLM-test). Significantly higher Undamaged Duration of Tissue Balls values were obtained following treatment with 1.5 or 2.0 M Gly compared to Met ($p < 0.05$, GLM-test). Undamaged Duration of Tissue Balls values were not significantly different following treatment with 3.0–4.0 M Met or Gly ($p > 0.05$, GLM-test).

Tissue Ball Regression of TBs treated with 1.0 or 1.5 M Me₂SO was significantly higher compared to 1.0 or 1.5 M Gly ($p < 0.05$, Wilcoxon-test). No significant differences in Tissue Ball Regression were recorded between TBs treated with 2.0, 3.0 or 4.0 M Me₂SO or Gly ($p > 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 4C and D). The Undamaged Duration of Tissue Balls of TBs treated with 1.0–2.0 M Me₂SO or Gly for 24–72 h was not significantly different except for 48 h with 1.5 M ($p > 0.05$, GLM-test) (Fig. 4c and d). For Durations Following Treatment higher than 72 h, Undamaged Duration of Tissue Balls was significantly higher for 1.0 M Gly compared to 1.0 M Me₂SO ($p < 0.05$, GLM-test), equal between 1.5 M Gly and 1.5 M Me₂SO until 120 h and significantly higher for 1.5 M Gly compared to 1.5 M Me₂SO for Durations Following Treatment over 120 h ($p < 0.05$, GLM-test). The Undamaged Duration of Tissue Balls was significantly higher following treatment with 2.0 M Me₂SO compared to Gly for Durations Following Treatment up to 96 h ($p < 0.05$, GLM-test) (Fig. 4c and d). The Undamaged Duration of Tissue Balls was significantly higher for 3.0 M Me₂SO compared to Gly ($p < 0.05$, GLM-test) (Fig. 4c and d). No significant differences were recorded between Undamaged Durations of Tissue Balls following treatment with 4.0 M Me₂SO or Gly ($p > 0.05$, GLM-test).

Discussion

This study evaluated the tolerance of TBs to CPA solutions with the objective of establishing a cryopreservation protocol for *P. damicornis*. TBs were selected instead of other biological forms like planulae, apices or cell suspensions for several reasons. Despite

our advanced knowledge on *P. damicornis* planulation cycles in captivity conditions [7,14], the monthly periodicity of larval releases appeared as a limiting factor for our experiments. Moreover, larvae represent a genetically diverse material, which is not appropriate to study the impact of CPA treatments. Also, this study required large quantities of biological material. TBs represented a genetically homogeneous material, which could be produced in large quantities. Preliminary experiments performed with coral apices revealed that their large size and the presence of calcareous skeleton made their cryopreservation difficult [22,33]. By contrast, TBs had a small size, which was a positive parameter for the establishment of a cryopreservation protocol [35].

For TB production, mechanical excision was preferred in our experiments to both chemical and enzymatic disruption. This sampling procedure was chosen to limit chemical interactions with cell compounds prior to CPA tests and to establish a methodology suited for field sampling. Moreover, the impact of mechanical sampling on coral viability was minimal compared with the Polyp Bail Out techniques which use calcium-free seawater or chemical agents.

Despite the beneficial effects of CPA solutions, their toxicity is considered as the main limiting factor in cryobiology and especially in vitrification protocols, which use high CPA concentrations [21,35,51]. In our experiments, TBs were treated for 20 min at room temperature with EG, Met, Gly or Me₂SO solutions at concentrations between 1.0 and 4.5 M. EG was the best tolerated of the CPAs tested. It was the only CPA for which intact TBs were obtained after treatment with a 4.0 M solution and Tissue Ball Regression values after treatment with 3.0 and 4.0 M EG solutions were lower compared to the other CPAs tested. Several studies have shown that cells, embryos or larvae of marine organisms exposed to EG solutions displayed high survival. *Crassostrea gigas* [53] and *Balanus amphitrite* larvae [3] showed higher tolerance to EG compared to Me₂SO and Gly. *Litopenaeus vannamei* embryos and larvae could be treated with 0.7–5.4 M EG solutions with little toxicity [19]. Cryopreservation of *Hemicentrotus pulcherrinus* and *Strongylocentrotus intermedius* embryos was achieved using a 1.5 M EG solution [5]. By contrast, *Evechinus chloroticus* larvae displayed high tolerance to EG treatment but no survival was achieved following LN exposure [1]. Preston [52] demonstrated that EG was not the best CPA compared to Met for cryopreservation of *Penaeus esculentus* embryos and nauplii. With Anthozoan, Tsai et al. [62] demonstrated EG toxicity for *Echinopora* sp. oocytes. Exposure of oocytes to a 3.0 M EG solution was lethal whereas, in our experiments, intact TBs were obtained after treatment with the same EG concentration.

In our experiments, using Met solutions produced similar results to EG at the three lower concentrations tested (1.0, 1.5 and 2.0 M). *P. damicornis* planulae withstood treatment with 1.0 M Met for 15 min but larval survival decreased after exposure to 2.0 M Met [28]. Tsai et al. [62] reported that the highest survival of *Echinopora* sp. oocytes was achieved following treatment with 1.0 M Met compared to Me₂SO, EG and propylene glycol (PG). Other studies performed on invertebrate marine organisms showed good survival with Met solutions. With *P. japonicus* embryos, nauplii and zoea, higher survival was obtained following 10–30 min treatment with 1.6–9.4 M Met solutions compared to Me₂SO, Gly, EG and PG [26]. With *Scylla serrata* spermatozoa, Met was less toxic than Me₂SO, EG and Gly but did not afford significant protection against LN exposure [8]. With *L. vannamei* spermatozoa, viability after cryopreservation was compared between Met, Me₂SO, Gly and EG. Spermatozoa tolerated Met solutions up to 9.4 M. The highest survival post-rewarming was recorded following exposure to 1.6 M Met [42]. Survival of *Haliotis midae* embryos was higher after treatment with a Met solution compared to Gly and Me₂SO [58]. The hatching rate of *P. esculentus* nauplii

was higher following a 20 min treatment with 1.0–2.0 M Met compared to Me₂SO and EG [52].

TBs showed higher tolerance to EG and Met treatments compared to Me₂SO at the same concentration. However, TBs withstood treatment with the three lower Me₂SO concentrations tested (1.0, 1.5 and 2.0 M) and these concentrations may be used in further cryopreservation experiments. Despite the good tolerance of biological material to EG and Met solutions, some authors reported the low efficiency of these two CPAs during a cryopreservation protocol. Hagedorn et al. [28] obtained lower survival of *P. damicornis* larvae after exposure to a 2.0 M Me₂SO solution compared to 1.0 and 1.5 M. However, these authors demonstrated that treatment of *Fungia scutaria* spermatozoa with 1.5 M Me₂SO produced lower osmotic damage compared to other CPAs at the same concentration [27]. Successful cryopreservation of spermatozoa from several Scleractinian species was achieved following treatment with a 1.5 M Me₂SO solution [30–32]. High Me₂SO concentrations appeared more toxic than other CPAs but could be more effective in protecting biological samples during a freeze–thaw cycle. With gorgonian coral, higher tolerance of *Junceella juncea* and *Junceella fragilis* sperm sacs was recorded after 20–40 min treatment with 3.0 M Met or Me₂SO compared to EG, Gly or PG [63]. Adams et al. [1] demonstrated the efficiency of a treatment with a 1.5 M Me₂SO solution for cryopreserving *E. chloroticus* larvae. Jeyalectumie et al. [36] and Bhavanishankar and Subramoniam [9] showed that optimal protection of cryopreserved *S. serrata* spermatozoa was achieved following treatment with a 1.5 M Me₂SO solution. Vitiello et al. [64] noted that Me₂SO solutions with a concentration lower than 2.0 M had no toxic effect on *Ostrea edulis* spermatozoa, whereas more concentrated solutions were lethal [64]. Liu et al. [47] reported the higher protective effect of Me₂SO on *Haliotis laevigata* spermatozoa compared to other CPAs at the same concentration [47]. However, a treatment *P. japonicus* [26], *Penaeus monodom* larvae [4], *Trachypenaeus byrdsi* embryos [2] and *L. vannamei* spermatozoa [42].

In our experiments, Gly solutions were tolerated by TBs at concentrations between 1.0 and 2.0 M but more concentrated Gly solutions showed detrimental effects on TB survival. As for other CPAs, the effect of Gly treatments on marine invertebrates varied depending on the species, exposure duration, Gly concentration and temperature of exposure. *P. damicornis* planulae did not tolerate exposure to a 2.0 M Gly solution [28] and *F. scutaria* spermatozoa were sensitive to 1.5 M Gly [27]. In case of gorgonian coral *J. juncea* and *J. fragilis* sperm sacs, Gly solutions were more toxic compared to other CPA solutions [63]. *P. monodom* embryos were more tolerant to Me₂SO and Gly exposure compared to EG and Met [66]. By contrast, tolerance to Gly treatment was low in case of *T. byrdsi* embryos [2], *H. pulcherrinus* and *S. intermedius* embryos [5], *H. midae* embryos [58] and *O. edulis* spermatozoa [64]. Liu et al. [47] noted the extreme sensitivity of *H. laevigata* spermatozoa to Gly concentrations as low as 0.5 M. However, Arun and Subramoniam [4] showed that Gly toxicity to prawn larvae could be reduced by rinsing them several times with fresh seawater to remove the CPA solution. In our study, survival of TBs treated for 20 min with 2.0 M Gly was higher than survival of *P. damicornis* larvae exposed for 15 min at RT [28]. The lower structural complexity of TBs compared to planulae may explain these differences.

In our experiments, better Tissue Ball Regression and Undamaged Duration of Tissue Balls results were sometimes obtained with treated TBs compared to control TBs, especially after exposure to the two lower CPA concentrations employed (1.0 and 1.5 M). CPA exposure may be beneficial to TB survival by preventing bacterial and viral aggressions. Coral is considered as a holobiont via the mutualism process associating this animal with microbe communities like bacteria and viruses [10,57]. It is considered that microbial partners of corals prevent pathogen aggressions and

modify metabolism intensity. However, coral diseases are caused by several disturbed microbial partners and the Vibrionaceae family represents the main bacterial pathogens impacting coral health [10,69]. The CPA treatment may be considered as an efficient tool against coral diseases caused by microbia.

The higher survival obtained with treated samples compared to control samples may also be due to the selection in TBs of cell types with higher tolerance to CPA exposure. Such a selection phenomenon is well documented in plant cryopreservation, whereby meristematic cells, which are tolerant to desiccation and to LN exposure, remain alive after CPA treatment and cryopreservation, whereas more differentiated cells, which are sensitive to desiccation and LN exposure, are killed by these treatments [20,67]. The occurrence of such a selection process in coral TBs should be confirmed through additional investigations.

In this study, TBs tolerated higher CPA concentrations than those reported for apices [22]. However, the highest concentration tolerated was 4.0 M only, which is not high enough to achieve vitrification upon cooling. Tolerance of *J. juncea* and *J. fragilis* sperm sacs to CPA solutions decreased for concentrations above 4.0 M [63]. Similarly, in case of barnacle larvae, the highest CPA concentrations employed during pretreatment (4.0–10.0 M) were not sufficiently high to achieve vitrification and a slow cooling protocol was thus employed [3]. Similar results were obtained by Preston and Coman [52] for cryopreservation of *P. esculentus* embryos and nauplii after exposition to CPA concentrations above 5.0 M. In case of coral TBs, the high CPA toxicity observed may restrict the application of vitrification protocols. Additional investigations should be performed to decrease the toxicity of CPA solutions. One possibility would be to employ mixtures of CPAs, which are often less toxic than a single CPA solution at the same total molarity [16,35]. In Anthozoan, tolerance of *P. damicornis* apices to CPA solutions increased using mixtures of CPAs [22]. Using associated molecules such as the amide–Me₂SO complex as CPA allowed increasing tolerance during freezing of the rabbit renal cortex [21]. Isachenko [35] demonstrated the possibility to cryopreserve human spermatozoa without conventional CPAs. Odintsova and Boroda [51] related in some cases the use of membrane stabilizing agents, exogenous lipids, and antioxidants to replace Me₂SO for cryopreservation of some molluscan and echinoderms cells. This method may provide an interesting alternative to reduce the sensitivity of tissues and apices from coral to the high CPA concentrations used in vitrification protocols. Finally, decreasing the temperature of CPA treatment may reduce CPA toxicity [62]. Several authors reported that spermatozoa and larval tolerance to CPAs, and especially to Me₂SO, increased when treatment was performed at 0 °C instead of RT [5,8].

As suggested by some authors, TBs constitute an interesting material to investigate coral ecotoxicology [18,37,41,50]. In this study, TBs were produced using a mechanical technique to avoid any chemical or enzymatic impact on cellular cohesion. A period of 24 h was necessary to achieve TB formation, which facilitated experimental planning. Nesa and Hidaka [50] used a similar mechanical technique to generate TBs from *Fungia* sp. and *Pavona divaricata* with the use of a water pick. Thus, survival results may be compared between both studies. The culture conditions employed in our study, with a temperature of 25 °C and the daily renewal of ASW, allowed maintaining TBs in stable condition for an average of 120 h (5 days) before disruption, with a maximal duration of 264 h (11 days). Similar results were reported by Nesa and Hidaka [50] with a survival duration of 100 h. With TBs which were produced using a chemical and enzymatic process, similar survival durations were described with periods between 72 h [18] and 100 h for *P. damicornis* and 200–300 h for *Acropora microphthalmia* [37]. High survival durations were obtained in our study without using a cell culture medium as performed by

Domart-Coulon et al. [18] and Lecointe et al. [41]. Daily renewal of seawater or cell culture medium may play an important role in increasing the duration of TB survival. Coral enrichment before TB production may also increase their tolerance to treatments.

Nesa and Hidaka [50] reported no significant correlations between TB survival duration and size. However, our study showed a correlation between TB diameter and their regression over time. Smaller TBs were less competent over time than larger ones. The cell aggregation process constitutes a cell pool which may be more advantageous for larger TBs. However, the existing TB fusion potential led to the production of larger TBs, with a diameter of up to 600 μm . These large TBs were fragile, showing important disruption events and short survival durations. They were thus excluded from the experiments. Our experiments allowed identifying an optimal TB diameter in the range of 100–300 μm .

Nesa and Hidaka [50] noted that TB disruption started with the arrest of rotation. By contrast, in our experiments, we observed the continuous degradation of TBs despite their positive motility. Differences in TB production techniques and captivity conditions may explain such differences. Domart-Coulon et al. [18] identified this degradation as a time-consuming process and Lecointe et al. [41] described the autophagy process with the occurrence of autophagosomes concentrated into the central mass.

In conclusion, despite their short-term culture, TBs constitute a good experimental material to evaluate CPA toxicity on corals using large numbers of samples. Performing preliminary experiments with TBs may allow reducing the number of tests carried out with less easily available coral forms such as isolated polyps or planulae, thereby preserving larval stocks.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Jérémie Vidal-Dupiol and to Aquarium System France who provided the synthetic salt used for the experiments.

References

- [1] S.L. Adams, P.A. Hessian, P.V. Mladenov, The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin *Evechinus chloroticus*, *Cryobiology* 52 (2006) 139–145.
- [2] J. Alfaro, J. Komen, E.A. Huisman, Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae, *Aquaculture* 195 (2001) 353–366.
- [3] A.C. Anil, A.S. Tulaskar, D.C. Khandeparkar, A.B. Wagh, Cryopreservation of *Balanus amphitrite* nauplii, *Cryobiology* 34 (1997) 131–140.
- [4] R. Arun, T. Subramoniam, Effect of freezing rates on the survival of penaeid prawn larvae: a parameter analysis, *Cryo Letters* 18 (1997) 359–368.
- [5] E. Asahina, T. Takahashi, Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin, *Cryobiology* 15 (1978) 122–127.
- [6] S. Barnay-Verdier, D. Dall'Osso, N. Joli, J. Olivré, F. Priouzeau, T. Zamoum, P.L. Merle, P. Furla, Establishment of primary cell culture from the temperate symbiotic cnidarian *Anemonia viridis*, *Cytotechnology* 65 (2013) 697–704.
- [7] D. Barthelemy, Progress in sexual coral reproduction at Oceanopolis, in: R.J. Leewis, M. Janse (Eds.), *Adv. Coral Husbandry Public Aquariums*, Public Aquarium Husbandry Series, Burgers' Zoo, Arnhem, the Netherlands, 2008, pp. 339–346.
- [8] S. Bhavanishankar, T. Subramoniam, Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.), *J. Exp. Zool.* 277 (1997) 326–336.
- [9] S. Bhavanishankar, T. Subramoniam, Protocol development for the cryopreservation of spermatozoa and spermatozoa of the mud crab *Scylla serrata*, in: E. Cabrita, V. Robles, P. Herráez (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2008, pp. 515–535.
- [10] D.G. Bourne, M. Garren, T.M. Work, E. Rosenberg, G.W. Smith, C.D. Harvell, Microbial disease and the coral holobiont, *Trends Microbiol.* 17 (12) (2009) 554–562.
- [11] B.E. Brown, A.W. Tudhope, M.D.A. Le Tissier, T.P. Scoffin, A novel mechanism for iron incorporation into coral skeletons, *Coral Reefs* 10 (1991) 211–215.
- [12] B.E. Brown, M.D.A. Le Tissier, R.P. Dunne, Tissue retraction in the scleractinian coral *Coeloseris mayeri*, its effect upon coral pigmentation, and preliminary implications for heat balance, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105 (1994) 209–218.
- [13] K.E. Carpenter, M. Abrar, G. Aeby, R.B. Aronson, S. Banks, A. Bruckner, A. Chiriboga, J. Cortés, J.C. Delbeek, L. DeVantier, G.J. Edgar, A.J. Edwards, D. Fenner, H.M. Guzmán, B.W. Hoeksema, G. Hodgson, O. Johan, W.Y. Licuanan, S.R. Livingstone, E.R. Lovell, J.A. Moore, D.O. Obura, D. Ochavillo, B.A. Polidoro, W.F. Precht, M.C. Quibilan, C. Reboton, Z.T. Richards, A.D. Rogers, J. Sanciangco, A. Sheppard, C. Sheppard, J. Smith, S. Stuart, E. Turak, J.E.N. Veron, C. Wallace, E. Weil, E. Wood, One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts, *Science* 321 (2008) 560–563.
- [14] D.J. Combosch, S.V. Vollmer, Mixed asexual and sexual reproduction in the Indo-Pacific reef coral *Pocillopora damicornis*, *Ecol. Evol.* 3 (10) (2013) 3379–3387.
- [15] G. De'ath, K.E. Fabricius, H. Sweatman, M. Puotinen, The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes, *PNAS* 109 (44) (2012) 17995–17999.
- [16] A.D. Diwan, K. Kandasami, Freezing of viable embryos and larvae of marine shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan, *Aquacult. Res.* 28 (1997) 947–950.
- [17] I.J. Domart-Coulon, D.C. Elbert, E.P. Scully, P.S. Calimlim, G.K. Ostrander, Aragonite crystallization in primary cell cultures of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*, *PNAS* 98 (21) (2001) 11885–11890.
- [18] I. Domart-Coulon, S. Tambutté, E. Tambutté, D. Allemand, Short term viability of soft tissue detached from the skeleton of reef-building corals, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309 (2004) 199–217.
- [19] Q. Dong, J. Lin, C. Huang, Effects of cryoprotectant toxicity on the embryos and larvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 242 (2004) 655–670.
- [20] F. Engelmann, Plant cryopreservation: progress and prospects, *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40 (2004) 427–433.
- [21] G.M. Fahy, Cryoprotectant toxicity neutralization, *Cryobiology* 60 (2010) S45–S53.
- [22] L. Feuillassier, P. Romans, I. Engelmann-Sylvestre, P. Masanet, D. Barthélémy, F. Engelmann, Tolerance of apexes of coral *Pocillopora damicornis* L. to cryoprotectant solutions, *Cryobiology* 68 (2014) 96–106.
- [23] M. Fine, D. Tchernov, Scleractinian coral species survive and recover from decalcification, *Science* 315 (2007) 1811.
- [24] U. Frank, C. Rabinowitz, B. Rinkevich, In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians, *Mar. Biol.* 120 (1994) 491–499.
- [25] R.D. Gates, L. Muscatine, Three methods for isolating viable anthozoan endoderm cells with their intracellular symbiotic dinoflagellates, *Coral Reefs* 11 (1992) 143–145.
- [26] J.C. Gwo, C.H. Lin, Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea, *Theriogenology* 49 (1998) 1289–1299.
- [27] M. Hagedorn, V.L. Carter, R.A. Steyn, D. Krupp, J.C. Leong, R.P. Lang, T.R. Tiersch, Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*, *Cryobiology* 52 (2006) 454–458.
- [28] M. Hagedorn, R. Pan, E.F. Cox, L. Hollingsworth, D. Krupp, T.D. Lewis, J.C. Leong, P. Mazur, W.F. Rall, D.R. MacFarlane, G. Fahy, F.W. Kleinhaus, Coral larvae conservation: physiology and reproduction, *Cryobiology* 52 (2006) 33–47.
- [29] M. Hagedorn, V.L. Carter, J.C. Leong, F.W. Kleinhaus, Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*), *Cryobiology* 60 (2010) 147–158.
- [30] M. Hagedorn, V. Carter, K. Martorana, M.K. Paresa, J. Acker, I.B. Baums, E. Borneman, M. Brittsan, M. Byers, M. Henley, M. Laterveer, J.A. Leong, M. McCarthy, S. Meyers, B.D. Nelson, D. Petersen, T.R. Tiersch, R.C. Uribe, E. Woods, D. Wildt, Preserving and using germplasm and dissociated embryonic cells for conserving Caribbean and Pacific Coral, *PLoS ONE* 7 (3) (2012) e33354, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033354>.
- [31] M. Hagedorn, M.J.H. Van Oppen, V. Carter, M. Henley, D. Abrego, E. Puill-Stephan, A. Negri, A. Heyward, D.R. MacFarlane, R. Spindler, First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created, *Cryobiology* 65 (2012) 157–158.
- [32] M. Hagedorn, V. Carter, M. Henley, R. Spindler, Challenges of creating a frozen repository for coral, *Cryobiology* 67 (2013) 398–442.
- [33] M. Hagedorn, A. Farrell, V.L. Carter, *Cryobiology of coral fragments*, *Cryobiology* 66 (2013) 17–23.
- [34] Y. Helman, F. Natale, R.M. Sherrell, M. LaVigne, V. Starovoytov, M.Y. Gorbunov, P.G. Falkowski, Extracellular matrix production and calcium carbonate precipitation by coral cells in vitro, *PNAS* 105 (1) (2008) 54–58.
- [35] E. Isachenko, Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success, *Reprod. Biomed. Online* 6 (2) (2003) 191–200.
- [36] C. Jeyalectumie, T. Subramoniam, Cryopreservation of spermatozoa and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*, *Biol. Bull.* 177 (1989) 247–253.
- [37] E.J. Kopecky, G.K. Ostrander, Isolation and primary culture of viable multicellular endothelial isolates from hard corals, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 35 (1999) 616–624.
- [38] E. Kramarsky-Winter, M. Fine, Y. Loya, Coral polyp expulsion, *Nature* 387 (1997) 137.
- [39] C.A. Downs, E. Kramarsky-Winter, Y. Loya, M. Vizel, Method for coral tissue cultivation and propagation. Ramot at Tel Aviv University, 2008, PCT/IL2008/001236.
- [40] P. Krishnaveni, L.M. Chou, Y. Ip, Deposition of calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) in the coral *Galaxea fascicularis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 94A (3) (1989) 509–513.
- [41] A. Lecointe, S. Cohen, M. Gèze, C. Djediat, A. Meibom, I. Domart-Coulon, Scleractinian coral cell proliferation is reduced in primary culture of suspended multicellular aggregates compared to polyps, *Cytotechnology* 65 (2013) 705–724.

- [42] M. Lezcano, C. Granja, M. Salazar, The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Cryobiology* 48 (2004) 349–356.
- [43] C. Lin, S. Tsai, The effect of chilling and cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes during short-term low temperature preservation, *Theriogenology* 77 (2012) 1257–1261.
- [44] C. Lin, T. Zhang, F.W. Kuo, S. Tsai, Gorgonian coral (*Junceella juncea* and *Junceella fragilis*) oocyte chilling sensitivity in the context adenosine triphosphate response (ATP), *Cryo Letters* 32 (2) (2011) 141–147.
- [45] C. Lin, L.H. Wang, P.J. Meng, C.S. Chen, S. Tsai, Lipid content and composition of oocytes from five coral species: potential implications of future cryopreservation efforts, *PLoS ONE* 8 (2) (2013) e57823.
- [46] C. Lin, F.W. Kuo, S. Chavanich, V. Vijakarn, Membrane lipid phase transition behavior of oocytes from three gorgonian corals in relation to chilling injury, *PLoS ONE* 9 (3) (2014) e92812.
- [47] Y. Liu, T. Xu, N. Robinson, J. Qin, X. Li, Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevis*, *Cryobiology* 68 (2014) 185–193.
- [48] A.T. Marshall, P. Clode, Effects of calcium-free and low-calcium artificial seawater on polyps of a scleractinian coral *Galaxea fascicularis*, *Coral Reefs* 23 (2004) 277–280.
- [49] T. Mass, J.L. Drake, L. Haramaty, Y. Rosenthal, O.M.E. Schofield, R.M. Sherrell, P.G. Falkowski, Aragonite precipitation by “proto-polyps” in coral cell cultures, *PLoS ONE* 7 (4) (2012) e35049.
- [50] B. Nesa, M. Hidaka, High zooxanthella density shortens the survival time of coral cell aggregates under thermal stress, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368 (2009) 81–87.
- [51] N.A. Odintsova, A.V. Boroda, Cryopreservation of the cells and larvae of marine organisms, *Russ. J. Mar. Biol.* 38 (2) (2012) 101–111.
- [52] N.P. Preston, F.E. Coman, The effects of cryoprotectants, chilling and freezing on *Penaeus esculentus* embryos and nauplii, in: T.W. Flegel (Ed.), *Adv. Shrimp Biotechnol.*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 1998, pp. 37–43.
- [53] P. Renard, Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects, *Aquaculture* 92 (1991) 43–57.
- [54] S. Richier, P.L. Merle, P. Furla, D. Pigozzia, F. Sola, D. Allemand, Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians, *Biochim. Biophys. Acta* 1621 (2003) 84–91.
- [55] R.H. Richmond, Reversible metamorphosis in coral planula larvae, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 22 (1985) 181–185.
- [56] B. Rinkevich, Cell cultures from marine invertebrates: new insights for capturing endless stemness, *Mar. Biotechnol.* 13 (2011) 345–354.
- [57] C. Roder, C. Arif, T. Bayer, M. Aranda, C. Daniels, A. Shibl, S. Chavanich, C.R. Woolstra, Bacterial profiling of White Plague Disease in a comparative coral species framework, *ISME* 1751–7362 (13) (2013) 1–9.
- [58] A. Roux, L. Sandenbergh, R. Roodt-Wilding, Preliminary investigation to determine the cytotoxicity of various cryoprotectants on southern african abalone (*Haliotis midae*) embryos, *Cryobiology* 57 (2008) 308–311.
- [59] P.W. Sammarco, Polyp Bail-Out: an escape response to environmental stress and a new means of reproduction in corals, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10 (1982) 57–65.
- [60] V. Schmid, R. Stidwill, A. Bally, B. Marcum, P. Tardent, Heat dissociation and maceration of marine Cnidaria, *Wilhelm Roux's Arch.* 190 (1981) 143–149.
- [61] F.T. Te, Response to higher sediment loads by *Pocillopora damicornis* planulae, *Coral Reefs* 11 (1992) 131–134.
- [62] S. Tsai, E. Spikings, F.W. Kuo, N.C. Lin, C. Lin, Use of an adenosine triphosphate assay, and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes, *Theriogenology* 73 (2010) 605–611.
- [63] S. Tsai, V. Kuit, Z.G. Lin, C. Lin, Application of a functional marker for the effect of cryoprotectant agents on gorgonian coral (*Junceella juncea* and *J. fragilis*) sperm sacs, *Cryo Letters* 35 (1) (2014) 1–7.
- [64] V. Vitiello, P.A. Carlino, F. Del Prete, A.L. Langellotti, G. Sansone, Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing, *Cryobiology* 63 (2) (2011) 118–124.
- [65] M. Vizek, Y. Loya, C.A. Downs, E. Kramarsky-Winter, A novel method for coral explant culture and micropropagation, *Mar. Biotechnol.* 13 (2011) 423–432.
- [66] V. Vuthiphandchaia, B. Pengpuna, S. Nimrat, Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Aquaculture* 246 (2005) 275–284.
- [67] Q.C. Wang, B. Panis, F. Engelmann, M. Lambardi, J.P.T. Valkonen, Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation, *Ann. Appl. Biol.* 154 (2008) 351–363.
- [68] T. Watanabe, I. Yuyama, S. Yasumura, Toxicological effects of biocides on symbiotic and aposymbiotic juveniles of the hermatypic coral *Acropora tenuis*, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339 (2006) 177–188.
- [69] B. Wilson, A. Muirhead, M. Bazanella, C. Huete-Stauffner, L. Vezzulli, D.G. Bourne, An improved detection and quantification method for the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*, *PLoS ONE* 8 (12) (2013) e81800.

Synthèse

Ces essais viennent corroborer les résultats obtenus sur les apex. Nous pouvons affirmer que l'éthylène glycol est le mieux toléré parmi les quatre cryoprotecteurs testés. Pour des concentrations de 1.5 M d'éthylène glycol, les balles tissulaires conservent leur mobilité alors qu'elle s'interrompt avec les autres traitements. Enfin, ce cryoprotecteur se démarque des autres en permettant la survie jusqu'à une concentration de 4.0 M. Si, dans ces essais, les balles tissulaires n'ont pas pu tolérer des solutions plus concentrées, les prochaines expérimentations auront pour objectif d'augmenter les molarités tolérées en adoptant de nouvelles stratégies.

Les balles tissulaires apportent des informations rapides et s'avèrent un très bon matériel pour des essais préliminaires. Leur mobilité constitue un excellent critère pour appréhender rapidement les répercussions post-traitement. La production rapide de quantités importantes de balles tissulaires, la possibilité de programmer les expérimentations, leur volume réduit et la facilité de leur manipulation constituent de réels atouts pour utiliser ce matériel pour la cryoconservation.

Parmi leurs principaux inconvénients, les balles tissulaires sont fragiles, notamment à la tension superficielle de l'eau. S'il était possible de sortir les apex de l'eau et des solutions de cryoprotecteur, cela est impossible avec les balles tissulaires sous peine de les désintégrer. Enfin, comme l'indique cet article, les balles tissulaires produites présentaient une certaine hétérogénéité de taille et de concentration en zooxanthelles qui doit être réduite.

Chapitre 4

Combiner pour mieux concentrer

IV.1. - Préambule

Certains auteurs mentionnent l'utilisation de « cocktails » de cryoprotecteurs pour arriver à cryoconserver efficacement le matériel biologique. Ce terme résume à lui seul tous les dosages précis qu'une solution cryoprotectrice peut nécessiter pour permettre au matériel biologique de tolérer l'exposition à l'azote liquide.

La tolérance des balles tissulaires de *P. damicornis* aux solutions individuelles de cryoprotecteurs testées dans le chapitre précédent s'est avérée insuffisante pour atteindre les fortes concentrations requises pour la vitrification. Dans ce contexte, nous avons décidé de nous intéresser à l'utilisation de mélanges de cryoprotecteurs, testée avec succès par de nombreux auteurs. De tels mélanges ont pour intérêt d'améliorer la tolérance du matériel biologique à ces solutions tout en augmentant la concentration totale en CPA, et donc l'efficacité de la solution cryoprotectrice lors de la congélation.

IV.2. - Etude bibliographique : une espèce, un protocole, un mélange de CPA

Parmi les associations possibles, les mélanges uniquement constitués de CPA non pénétrants sont assez rares. Baust et Lawrence (1979) exposent ainsi différents stades larvaires d'*A. salina* à des solutions de glucose-saccharose jusqu'à 90 min à -1 °C. Ils obtiennent de meilleures survies en utilisant les solutions osidiques combinées que des osides seuls.

La majorité des mélanges de cryoprotecteurs associent une ou plusieurs solutions de faible poids moléculaires à une ou plusieurs molécules de masses molaires plus élevées. Comme mentionné précédemment, l'association DMSO + Tréhalose (Tre) a été beaucoup utilisée parmi les associations binaires. Jeyalectumie et Subramoniam, (1989) améliorent la viabilité des spermatozoïdes de *S. ingentis* en les exposant pendant 16 h à 4 °C à une solution contenant 0.7 M DMSO + 0.25 M Tre. Il en est de même pour Odintsova *et al.* (2001) qui soumettent les cellules et les tissus de trocophores de *Mytilus trossulus* et de *Mizuchopecten yessoensis* ainsi que des blastulae et gastrulae de *Strongylocentrotus nudus* à un mélange 1.4 M DMSO + 0.1 M Tre pendant 15 min à 0 °C. Tervit *et al.* (2005) obtiennent de bons résultats de fécondation des oocytes de *C. gigas* cryoconservés avec le mélange 1.6 M EG + (0.1 M - 0.4 M) Tre à température ambiante (RT), tout comme Paredes *et al.* (2012) qui utilisent une solution similaire, 2.7 M EG + (0.2 M - 0.4 M) Tre pendant 15 min (RT) pour la

congélation des trocophores de *M. galloprovincialis*. Ils observent néanmoins une diminution de la fécondation des oocytes pour des concentrations en Tre supérieures à 0.1 M. En exposant les spermatozoïdes de *P. indicus* à une solution comprenant 0.7 M DMSO + 0.5 M Tre pendant 5 min (RT), Diwan et Joseph (1999) obtiennent les meilleurs taux de viabilité après congélation.

Outre le tréhalose, plusieurs molécules combinées à des alcools faibles (EG, PG, Met) limitent la toxicité des solutions de CPA. Ainsi, Tervit *et al.* (2005) ont pu exposer des oocytes de *C. gigas* au mélange 1.6 M EG + (0.17 - 4.25 %) PVP (RT). Paredes et Bellas (2009), indiquent la faible toxicité de solutions contenant 2.0 M PG + 0.75 M PVP et 2.0 M EG + 0.75 M PVP pour les oocytes et les embryons de *P. lividus*. Paredes *et al.* (2012) soumettent les larves trocophores de *M. galloprovincialis* à une solution de 1.6 M EG + PVP (15 min - RT).

Diwan et Joseph (1999) exposent les spermatozoïdes de *P. indicus* à un mélange associant deux cryoprotecteurs de faibles poids moléculaires : 0.7 M DMSO + 0.6 M Gly. Simon *et al.* (1994) utilisent des solutions contenant 4 % Met + 4 % EG, 4 % Met + 4 % PG, 4 % Met + 4 % DMSO pour protéger les gastrulae de *P. indicus*. Ali et Shelton (1993) obtiennent la meilleure survie de morulae de souris avec un mélange comprenant 6.0 M EG + 1.8 M Gly.

Tous ces exemples illustrent l'utilisation de solutions binaires. Des combinaisons ternaires, quaternaires voire plus ont également montré leur efficacité dans la protection de matériel biologique. Suquet *et al.* (2014) mentionnent la protection des trocophores et des larves-D de *C. gigas* en utilisant une solution contenant 1.6 M EG + 1.0 % PVP + 0.2 M Tre. Cependant, Tervit *et al.* (2005) obtiennent un faible taux de fertilisation des oocytes de *C. gigas* préalablement congelés avec une solution contenant 1.6 M EG + 0.85 % PVP + 0.2 M Tre. Ces solutions ternaires étaient constituées de deux diosides et d'un alcool. La meilleure viabilité post-congélation des spermatozoïdes de *P. indicus* est obtenue avec une solution contenant 0.7 M DMSO + 0.6 M Gly + 0.25 M Tre (Diwan et Joseph, 1999). Des embryons de mouton survivent à la congélation après traitement avec un mélange comprenant 6.0 M EG + 1.8 M Gly + 1.0 M Suc (Ali et Shelton, 1993). Des mélanges ternaires uniquement composés de solutés de faibles poids moléculaires sont efficaces comme celui utilisé par Ding *et al.*, (2007) constitué de 2.9 M DMSO + 1.3 M PG + 3.1 M Met pour la congélation d'embryons de *Pagrus major*.

Parmi les solutions quaternaires, Jalali et Crawford (2012) obtiennent les meilleures motilités des spermatozoïdes congelés et un développement normal des larves issues de ces spermatozoïdes avec mélange contenant 24.5 µl DMSO + 4.9 µl Gly + 200 µl jaune d'œuf + 100 µl saccharose. Sakai *et al.* (1990) exposent les cellules de *Citrus sinensis brasiliensis* à une solution de PVS2 à 60 % contenant 4.0 M Gly + 3.0 M EG + 2.0 M DMSO + 0.15 M Suc.

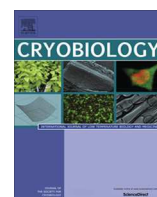
IV.3. - Le choix des traitements utilisés

Le choix des combinaisons cryoprotectrices a été dicté par notre objectif de vitrification. Ce sont donc les compositions des solutions vitrifiantes qui ont été notre première aide dans le choix des combinaisons à tester. Egalement, les solutions binaires associant les alcools et les diosides qui ont été testées dans le chapitre 1, nous ont permis de considérer les niveaux de tolérance des apex. L'étude bibliographique réalisée nous indique que les solutions vitrifiantes se composent pour l'essentiel de plusieurs alcools auxquels il n'est pas rare d'associer un dioside à des concentrations ne dépassant pas 1.0 M. Les alcools sont souvent les plus fortement concentrés.

Pour cette partie nous avons donc choisi de tester la tolérance des balles tissulaires à différentes combinaisons d'alcools avant d'y associer des CPAs non pénétrants.

IV.4. - L'étape des 4.0 molaires

Feuillassier, L., Masanet, P., Romans, P., Barthélémy, D., & Engelmann, F. (2015). Towards a vitrification-based cryopreservation protocol for the coral *Pocillopora damicornis* L.: tolerance of tissue balls to 4.5 M cryoprotectant solutions. *Cryobiology*.



Towards a vitrification-based cryopreservation protocol for the coral *Pocillopora damicornis* L.: Tolerance of tissue balls to 4.5 M cryoprotectant solutions



Lionel Feuillassier^{a,b}, Patrick Masanet^c, Pascal Romans^a, Dominique Barthélémy^d, Florent Engelmann^{b,*}

^a Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Centre de Ressources Biologiques Marines, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

^b IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^c Aquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France

^d Océanopolis, Port de plaisance du Moulin Blanc, BP91039, 29210 Brest Cedex 1, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2015

Revised 23 June 2015

Accepted 14 July 2015

Available online 16 July 2015

Keywords:

Coral

Tissue ball

Pocillopora damicornis

Cryoprotectant solutions

ABSTRACT

In this study, we tested the tolerance of tissue balls (TBs, 100–400 μm in diameter) from the coral *Pocillopora damicornis* produced using mechanical excision to exposure to cryoprotectant (CPA) solutions. TBs were treated for 20 min at room temperature with individual, binary, ternary or quaternary CPA solutions with a total molarity from 2.0 to 5.0 M. Four CPAs were used: ethylene glycol (EG), dimethylsulfoxide (Me_2SO), methanol (Met) and glycerol (Gly). In some experiments, the molarity of the CPA solutions was increased and decreased in a stepwise manner. The tolerance of TBs following CPA treatment was evaluated using two parameters. The Tissue Ball Regression (expressed in $\mu\text{m}/\text{h}$) measured the diameter regression of TBs over time. The % Undamaged TBs quantified the proportion of TBs, which remained intact over time after the CPA treatment. TBs tolerated exposure to binary solutions with a total molarity of 4.0 M containing 2.0 M EG + 2.0 M Met and 2.0 M EG + 2.0 M Gly. TBs displayed tolerance to ternary solutions with a total molarity up to 3.0 M, containing each CPA at 1.0 M. Quaternary solutions with a total molarity of 4.0 M containing each CPA at 1.0 M were not tolerated by TBs. When the molarity of the CPA solutions was increased and decreased in a stepwise manner, TBs withstood exposure to a CPA solution with a total molarity of 4.5 M, containing 1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me_2SO . This study confirmed the interest of using TBs to test CPA solutions, with the objective of developing a vitrification-based cryopreservation protocol.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Numerous safeguard programs have been developed to limit population regression of coral reefs. Habitat protection measures such as the establishment of marine reserves and artificial reef structures [10,55,83] or strategies such as coral transplantation and the gardening concept [72,75] have proved efficient to sustain recovery of corals. However, despite these numerous restoration measures, socio-economic, political and environmental pressures impede efficient coral reef conservation [8,16]. New *ex situ* tools such as cryopreservation must be developed to conserve these threatened populations. Cryopreservation has already been used to conserve rare and threatened plant and animal species, including marine organisms [5,6,28,80].

* Corresponding author.

E-mail address: florent.engelmann@ird.fr (F. Engelmann).

Cryopreservation of invertebrate marine organisms has been firstly investigated on commercially important phyla [20,30,59]. To date, a range of biomaterials have been successfully cryopreserved such as spermatozoa, oocytes, dissociated cells, embryos, tissue explants and different larval stages from various Echinoderm [1,38,65,76], Mollusc [9,53,62,67,77] and Arthropod species [2,19,69]. Cryopreservation has also been explored with other marine invertebrate organisms such the Sponge *Petrosia ficiformis*, larvae of the Polychaete *Nereis virens* and Ascidian cells [56,59,86]. Coral cryopreservation is much less advanced compared to other marine invertebrate phyla [59]. With coral, the main emphasis has been on gamete cryopreservation. Hagedorn et al. [37] and Ohki et al. [60] successfully cryopreserved coral spermatozoa using a slow cooling protocol. Lin et al. [52] and Tsai et al. [82] investigated the tolerance of oocytes and sperm sacs to cryoprotectant (CPA) exposure. Recently, several studies examined the tolerance of more complex structures including planulae, tissue balls (TBs) or apexes to CPA exposure [22,23,31,36]. *Fungia*

scutaria planulae were sensitive to slow cooling [32]. *Pocillopora damicornis* apexes showed chilling sensitivity [36] and did not tolerate exposure to individual CPA solutions with a molarity higher than 2.0 M [23]. Hagedorn et al. [32] suggested investigating cryopreservation of planulae using a vitrification approach. The vitrification technique, which comprises high cooling and warming rates, can constitute an alternative for the cryopreservation of species, which are sensitive to slow cooling procedures [11,30,45].

In contrast with the slow cooling techniques, the vitrification technique uses high CPA concentrations and high cooling and warming rates to avoid ice crystal formation in cells. During cooling and warming, ice crystals can induce irreversible damage to cell membranes. Cryopreservation techniques avoiding or limiting crystallization such as vitrification make cell and tissue long-term conservation easier and more efficient [42,48,66,88]. However, the high CPA concentrations employed in vitrification protocols have toxic effects on cells [42,48]. Therefore, before exposing biological samples to liquid nitrogen (LN), it is necessary to evaluate their tolerance to the CPA solutions employed in vitrification protocols.

With the objective of developing a vitrification protocol for the coral *P. damicornis*, we first tested the tolerance of apexes to various CPAs [23]. Apexes tolerated exposure to complex CPA solutions containing sucrose (Suc), dimethylsulfoxide (Me₂SO), ethylene glycol (EG) and/or methanol (Met) with a total molarity of 2.45 M. We then tested the tolerance of TBs to individual CPA solutions. TBs tolerated exposure to 3.0 M Met, Gly and Me₂SO solutions and to a 4.0 M EG solution [22]. However, as vitrification of CPA solutions upon cooling occurs at higher concentrations, e.g. 6.5 M for EG [3], it is thus necessary to develop CPA solutions which have a higher total molarity and which can be tolerated by *P. damicornis* TBs. Numerous authors demonstrated the beneficial effect of exposing biological materials to solutions consisting of combinations of several CPAs [3,40,63,64,73,74]. For cryopreservation of plant materials using a vitrification protocol, Sakai et al. (1990) developed a CPA solution termed PVS2 which contained a mixture of EG, Me₂SO, Gly and Suc [73]. Similarly, Wang et al. (2011) used the PVS2 solution to cryopreserve gametophytes of the alga *Undaria pinnatifida* [85]. Vitrification of human oocytes was achieved using solutions containing EG, Me₂SO and Suc [4,61]. In marine organisms, Chen and Tian (2005) accomplished vitrification of flounder embryos using a combination of Me₂SO and polyethylene glycol (PEG) [11]. Rahman et al. (2008) cryopreserved *Sillago japonica* embryos following treatment with a CPA mixture containing propylene glycol (PG), Me₂SO and Met or EG [70].

To date, the metamorphosis of TBs into polyps has been reported for *Fungia granulosa* [47,84]. It provides encouraging data for the production of TBs with other Scleractinian species. Production of TBs has been reported with the corals *Stylophora pistillata*, *P. damicornis* and *Pavona divaricata* [17,18,46,49,57]. Despite their currently low survival after 1 month [18], it is expected that the optimization of TB culture conditions will lead to the production of new polyps. TBs may represent an interesting material studying the coral-algal symbiosis [27], for producing coral cell cultures and for investigating coral tolerance to various treatments [22,57] and the physiology of coral tissues. Thus, cryopreservation of TBs might represent a valuable means for long-term conservation of Scleractinian species and for the provision of reservoir material for various investigations.

This study aimed at investigating the tolerance of TBs from the coral *P. damicornis* to exposure to CPA mixtures with a total molarity higher than 2.0 M. The CPA solutions employed were selected based on the results of Feuillassier et al. (2014) on the tolerance of *P. damicornis* TBs to individual CPAs and on previous studies performed on the development of vitrification solutions for various materials [11,70,73]. The tolerance of TBs to the CPA treatments was evaluated using two parameters. TB Regression measured

the size reduction over time of TBs after CPA treatment [18]. The % Undamaged TBs quantified the proportion of TBs, which remained intact over time and conserved their motility after the CPA treatment [22]. This parameter was based on the motility of TBs after treatment, the conservation of the smooth aspect from the membrane surface and the lack of disruptions.

Materials and methods

Biological material

Branches of colonies of the Scleractinian *P. damicornis* (L. 1758) were sampled from the Aquarium of Canet en Roussillon, France (branches resulting from spontaneous reproduction on CITES number: O3584). Experiments were conducted at the Oceanological Observatory, Pierre and Marie Curie University, Banyuls/mer, France. Prior to experiments, coral fragments were cultured for 1 month in a 230 L holding tank filled with Artificial Seawater (ASW: Reef Crystal salt, Aquarium System label; Ca²⁺: 420 ppm; Mg²⁺: 1300 ppm; KH ≈ 7) under the cultural conditions selected by Feuillassier et al. [22] (temperature: 25 °C; salinity: 35; pH: 8.3; PAR: 170 μmol m⁻² s⁻¹).

TBs of *P. damicornis* were prepared according to Feuillassier et al. [22] using a mechanical dissociation technique. Briefly, tissues were excised from coenosarc areas of coral branches using a N° 24 scalpel blade (cleaned with 96% alcohol) at room temperature (RT: 22 °C). Small tissue fragments were sampled without scraping to preserve ectoderm and endoderm cells. Samples were immersed in 3 ml wells of multiple well cluster plates for cell culture (CORNING, TC-Treated, Sterile) and incubated for 24 h (temperature: 25 ± 1 °C, hygrometry: 100%; light intensity: 20 μmol m⁻² s⁻¹) in 24 h aged-Artificial Seawater (24 h-ASW). Motile TBs were rinsed five times with 24 h-ASW and isolated individually for CPA treatment in wells of multiple well cluster plates for cell culture containing 3 ml fresh 24 h-ASW.

CPA solutions

Binary CPA solutions were used in *Experiment 1* (Table 1, “Binary”). Ternary and quaternary CPA solutions were employed in *Experiment 2* (Table 1, “Ternary” and “Quaternary”). In *Experiment 3*, TBs were exposed to a succession of three individual CPA solutions (Table 2). In *Experiment 4* a succession of three binary or ternary CPA solutions was employed (Table 3). The CPAs used in this study were Me₂SO (VWR, Analytical reagent, Assay: 99.7%), Gly (CARLO ERBA, ACS-For Analysis, Assay: 99.5%), EG (VWR, AnalaR NORMAPUR, Assay: 100%) and Met (SIGMA-ALDRICH, ACS-reagent, Assay: 99.8%). CPA stock solutions were diluted by adding ASW (pH: 8.4) to obtain the final concentrations tested in each experiment.

Experimental procedures

CPA treatments were performed using motile TBs with a diameter comprised between 100 and 400 μm (Fig. 1A). Previous experiments had shown that TBs in this size range displayed higher tolerance to CPA treatments compared to larger TBs [22]. TBs were incubated individually in 1.5 ml CPA solution at room temperature (RT: 22 °C). After the CPA treatment, TBs were rinsed three times with 24 h-ASW and maintained in an incubator (temperature: 25 ± 1 °C, hygrometry: 100%; light intensity: 20 μmol m⁻² s⁻¹). Individual observations and measurements started 24 h after the CPA treatment (Fig. 1A and B). Seawater was replaced daily with fresh 24 h-ASW. For each CPA solution tested, 30 untreated controls and 30 treated TBs were employed.

Table 1
Binary, ternary or quaternary CPA combinations used in *Experiments 1 and 2*. Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol.

CPA combination	CPA concentration (M)	Composition
Binary	2.0	0.5 M Gly + 1.5 M EG
Binary	2.0	0.5 M Met + 1.5 M EG
Binary	2.0	0.5 M Me ₂ SO + 1.5 M EG
Binary	2.0	0.5 M Me ₂ SO + 1.5 M Met
Binary	2.0	0.5 M Gly + 1.5 M Met
Binary	3.0	1.5 M EG + 1.5 M Met
Binary	3.0	1.5 M EG + 1.5 M Me ₂ SO
Binary	3.0	1.5 M EG + 1.5 M Gly
Binary	3.0	1.5 M Met + 1.5 M Me ₂ SO
Binary	3.0	1.5 M Met + 1.5 M Gly
Binary	3.0	1.5 M Me ₂ SO + 1.5 M Gly
Binary	4.0	2.0 M EG + 2.0 M Met
Binary	4.0	2.0 M EG + 2.0 M Me ₂ SO
Binary	4.0	2.0 M EG + 2.0 M Gly
Binary	4.0	2.0 M Met + 2.0 M Me ₂ SO
Binary	4.0	2.0 M Met + 2.0 M Gly
Binary	4.0	2.0 M Me ₂ SO + 2.0 M Gly
Binary	5.0	2.5 M EG + 2.5 M Met
Binary	5.0	2.5 M EG + 2.5 M Gly
Binary	5.0	3.0 M EG + 2.0 M Gly
Binary	5.0	3.0 M EG + 2.0 M Met
Ternary	3.0	1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Me ₂ SO
Ternary	3.0	1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Met
Ternary	3.0	1.0 M Met + 1.0 M Gly + 1.0 M Me ₂ SO
Ternary	4.5	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO
Ternary	4.5	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Met
Ternary	4.5	1.5 M Met + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO
Ternary	5.0	2.0 M EG + 2.0 M Gly + 1.0 M Me ₂ SO
Ternary	5.0	2.0 M EG + 2.0 M Met + 1.0 M Me ₂ SO
Quaternary	4.0	1.0 M EG + 1.0 M Met + 1.0 M Gly + 1.0 M Me ₂ SO

Table 2
CPA solutions employed in a stepwise manner in *Experiment 3*. Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol.

Sequence of CPA solutions applied to TBs			Exposure duration (min)		
Sol. 1	Sol. 2	Sol. 1	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 1
1.5 M EG	3.0 M EG	1.5 M EG	5	10	5
1.5 M Met	3.0 M Met	1.5 M Met	5	10	5
1.5 M Me ₂ SO	3.0 M Me ₂ SO	1.5 M Me ₂ SO	5	10	5
1.5 M Gly	3.0 M Gly	1.5 M Gly	5	10	5
1.5 M EG	3.0 M EG	1.5 M EG	5	20	5
1.5 M Met	3.0 M Met	1.5 M Met	5	20	5
1.5 M Me ₂ SO	3.0 M Me ₂ SO	1.5 M Me ₂ SO	5	20	5
1.5 M Gly	3.0 M Gly	1.5 M Gly	5	20	5
2.0 M EG	4.0 M EG	2.0 M EG	5	10	5
2.0 M Met	4.0 M Met	2.0 M Met	5	10	5
2.0 M Me ₂ SO	4.0 M Me ₂ SO	2.0 M Me ₂ SO	5	10	5
2.0 M Gly	4.0 M Gly	2.0 M Gly	5	10	5

Experiment 1

In this experiment, TBs were exposed at RT for 20 min to the binary CPA solutions listed in [Table 1](#). This duration was selected

Table 3
CPA solutions employed in a stepwise manner in *Experiment 4*. Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol.

Tests	Sequence of CPA solutions applied to TBs			Exposure duration (min)		
	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 1	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 1
C1	0.5 M Me ₂ SO + 1.5 M EG	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO	0.5 M Me ₂ SO + 1.5 M EG	5	10	5
C2	0.5 M Gly + 1.5 M EG	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO	0.5 M Gly + 1.5 M EG	5	10	5
C3	0.5 M Gly + 1.5 M EG	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Met	0.5 M Gly + 1.5 M EG	5	10	5
C4	0.5 M Met + 1.5 M EG	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Met	0.5 M Met + 1.5 M EG	5	10	5
C5	0.5 M Me ₂ SO + 1.5 M Met	1.5 M Met + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO	0.5 M Me ₂ SO + 1.5 M Met	5	10	5
C6	0.5 M Gly + 1.5 M Met	1.5 M Met + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO	0.5 M Gly + 1.5 M Met	5	10	5
C7	1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Me ₂ SO	1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me ₂ SO	1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Me ₂ SO	5	10	5
C8	0.5 M Gly + 1.5 M EG	2.5 M EG + 2.5 M Gly	0.5 M Gly + 1.5 M EG	10	10	10
C9	1.5 M Gly + 1.5 M EG	2.5 M EG + 2.5 M Gly	1.5 M Gly + 1.5 M EG	10	10	10

based on previous results obtained by Feuillassier et al. (2014) which showed that exposure to CPA solutions for 20 min was well tolerated by TBs. The total molarity of the CPAs used was 2.0, 3.0, 4.0 or 5.0 M.

Experiment 2

In this experiment, TBs were exposed for 20 min at RT to the ternary or quaternary solutions listed in [Table 1](#). The total molarity of the ternary CPA solutions was 3.0, 4.5 or 5.0 M and that of the quaternary CPA solution was 4.0 M. The CPA solutions selected for *Experiment 2* were based on the results obtained in *Experiment 1*.

Experiment 3

In this experiment, the molarity of the individual CPA solutions was increased and decreased in a stepwise manner. TBs were first treated for 5 min with a CPA solution with a molarity of 1.5 or 2.0 M ([Table 2](#), solution 1), then for 10 or 20 min with a CPA solution at twice the concentration of solution 1, i.e. 3.0 or 4.0 M ([Table 2](#), solution 2), and then for an additional 5 min in solution 1 before rinsing in 24 h-ASW.

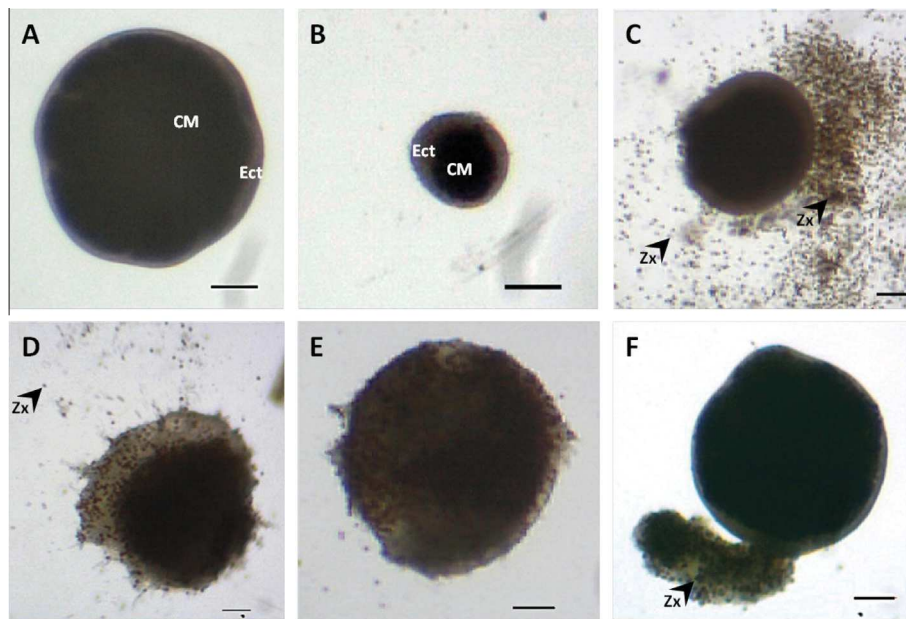


Fig. 1. Views of damaged TBs during or following CPA treatment. (A) 24 h-old untreated TB. (B) Undamaged TB 336 h (14 days) after exposure to CPA solution. (C) Mass expulsion of zooxanthellae from damaged TB after exposure to CPA solution. (D) Rapid disintegration of TB during CPA treatment. (E) TB with disrupted ectodermic surface following CPA treatment. TB lost motility. (F) TB with localized ectodermic disruption and expulsion of CM in compact aggregate following CPA treatment. TB remained motile. Ect = Ectoderm, CM = Central Mass, Zx = Zooxanthella. Scale bar = 100 μ m.

Experiment 4

In Experiment 4, the molarity of the CPA solutions used was also increased and decreased in a stepwise manner. TBs were first treated for 5 or 10 min with a binary or ternary CPA solution with a total molarity of 2.0 or 3.0 M (Table 3, solution 1), then for 10 min with a binary or ternary CPA solution with a total molarity of 4.5 or 5.0 M (Table 3, solution 2), and then for an additional 5 or 10 min with solution 1 before rinsing in 24 h-ASW. The CPA solutions selected for Experiment 4 were based on the results obtained in Experiments 1 and 2.

Observations and measurements performed

Photographs of all TBs were taken daily until TB disruption using a photographic monitoring device (MOTIC 257 SMZ-168-TLED coupled with a numeric camera MOTICAM 580 SM7619-MG4EX-RPFWFT). Two parameters were used to evaluate the effect of the CPA treatments performed in Experiments 1–4 on TB survival. The Tissue Ball Regression corresponded to the size reduction of TBs over time [22]. To calculate Tissue Ball Regression (expressed in μ m/h), the diameter of TBs was measured daily using the Motic Images (PLUS 2.0) software. The second parameter, the % Undamaged TBs, allowed evaluating the structural integrity of TBs over time until TB disruption. This parameter may be assimilated to a survival index. The % Undamaged TBs was evaluated using macroscopic observation of the structural integrity, the rotary movement and the smooth aspect of the surface of TBs (Fig. 1C–E). In most cases, motility of TBs was observed until TB disruption. High Tissue Ball Regression values and low percentages of % Undamaged TBs indicated low tolerance of TBs to CPA treatments.

Analysis of data

The results of experiments were analyzed using the R version 3.0.2 free software (The R Foundation for Statistical Computing 2013). Graphic processing was performed with Microsoft Excel (2007 version). The treatment effect was determined based on

differences between treated samples and their untreated controls. Tissue Ball Regression differences between treatments were analyzed using the Wilcoxon test. % Undamaged TBs were compared using the Fisher's Exact Test. The significance of differences was considered with a 95% confidence level (p values < 0.05).

Results

Experiment 1

Comparison between treated and control TBs

For the five 2.0 M CPA solutions tested, Tissue Ball Regression was not significantly different between treated and control samples for most durations (Fig. 2A). TBs displayed a comparable tolerance to the five 2.0 M CPA solutions tested.

No significant differences in % Undamaged TBs were observed up to 120 h between treated and control samples ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test), while significant differences ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test) were noted for longer durations (Fig. 2A). After 144 h, the % Undamaged TBs was 50% for controls whereas it was between 73 and 99% for treated TBs. After 240 h, Undamaged TBs were observed only with control samples (8%).

TBs were exposed to six CPA solutions with a total molarity of 3.0 M. Tissue Ball Regression of TBs were treated with a CPA solution containing 1.5 M Me_2SO + 1.5 M Met was significantly higher compared to non treated TBs for all durations ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 2B). Tissue Ball Regression of TBs exposed to CPA solutions containing 1.5 M Met + 1.5 M EG, 1.5 M Me_2SO + 1.5 M EG and 1.5 M Gly + 1.5 M EG was significantly higher compared to non treated TBs after 24 h and 48 h ($p < 0.05$, Wilcoxon-test). Except after 96 h and 120 h, no significant differences in Tissue Ball Regression were recorded between controls and TBs treated with 1.5 M Me_2SO M Me_2SO + 1.5 M Gly and 1.5 M Gly + 1.5 M Met ($p > 0.05$, Wilcoxon-test).

Except for the CPA solution containing 1.5 M Me_2SO + 1.5 M Met, the % Undamaged TBs were not significantly different between treated and control TBs up to 96 h ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) (Fig. 2B). For 120 h, significant differences in %

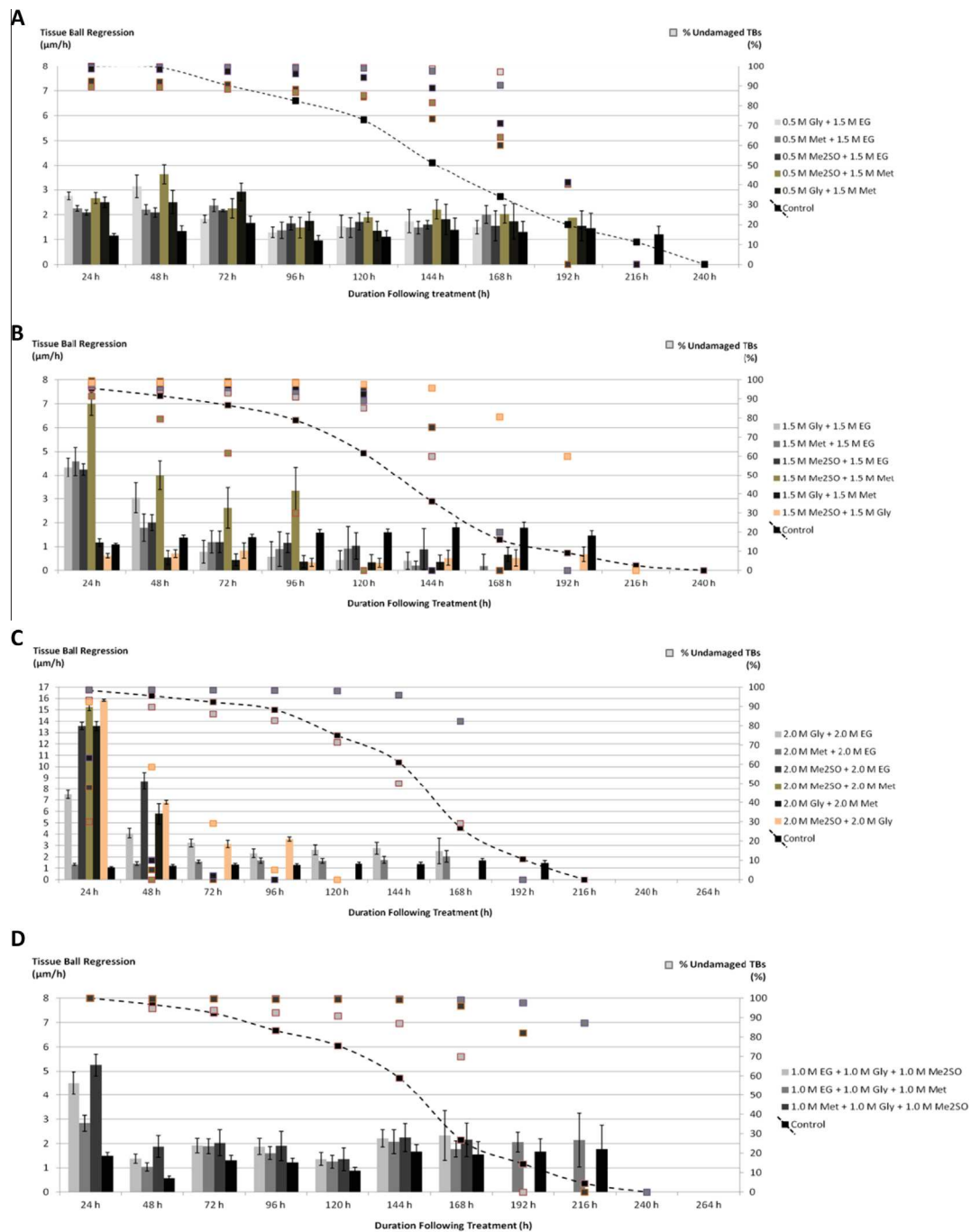


Fig. 2. Evolution of Tissue Ball Regression ($\mu\text{m/h}$) and of % Undamaged TBs (%) over time (24 h intervals) after treatment of TBs with binary or ternary CPA solutions for 20 min at room temperature ($N = 30$ TBs/treatment). Binary CPA solutions concentrated to (A) 2.0 M, (B) 3.0 M, (C) 4.0 M and ternary CPA solutions concentrated to (D) 3.0 M. Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol. Only CPA treatments allowing survival of TBs after exposure to CPA solutions were reported. Error bars represent standard deviations.

Undamaged TBs were noted between control (62%) and treated TBs ($\sim 92\%$) ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). After 192 h, 0% Undamaged TBs was observed with treated TBs, while 10% Undamaged TBs was still observed after 216 h with control TBs.

Among the six 4.0 M CPA solutions tested, only the solution containing 2.0 M Met + 2.0 M EG produced no significant differences in Tissue Ball Regression between treated and control TBs ($p > 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 2C). With the CPA solution comprising 2.0 M Gly + 2.0 M EG, Tissue Ball Regression of treated samples was significantly higher compared to controls after 24–72 h

($p < 0.05$, Wilcoxon-test). Tissue Ball Regression of TBs treated with the four other CPA solutions tested was significantly higher compared to control samples after all durations ($p < 0.05$, Wilcoxon-test). The % Undamaged TBs decreased very rapidly for these four CPA solutions (Fig. 2C). By contrast, the % Undamaged TBs of samples treated with 2.0 M Gly + 2.0 M EG and 2.0 M Met + 2.0 M EG was 98% and 72% after 120 h, respectively and it dropped to 0% after 144 and 192 h, respectively. The % Undamaged TBs of control samples was still 10% after 192 h, and it dropped to 0% after 216 h.

When TBs were treated with 5.0 M CPA solutions, no survival was achieved. As a result, Tissue Ball Regression and % Undamaged TBs values were nil after 24 h.

Comparison between treatments

For the five 2.0 M CPA solutions tested, no significant differences in Tissue Ball Regression were observed over the whole experiment duration ($p > 0.05$, Wilcoxon-test), except after 24 and 48 h for CPA solutions containing 0.5 M Me₂SO + 1.5 M Met + 1.5 M EG and 0.5 M Gly + 1.5 M EG, which led to significantly higher Tissue Ball Regression compared with other CPA solutions ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 2A). Between 0 and 120 h, no significant differences in % Undamaged TBs were noted between treatments, with values over 80% ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) (Fig. 2A). Significant differences between treatments were observed for longer durations. High % Undamaged TBs were noted up to 192 h following treatment of TBs with 0.5 M Gly + 1.5 M EG or 0.5 M Gly + 1.5 M.

With most treatments, the highest Tissue Ball Regression values and % Undamaged TBs were observed during the first 72 h. We therefore ranked the CPA solutions based on their effect on TBs, using the average values of Tissue Ball Regression obtained over the first 72 h. The following ranking was obtained, starting from the lowest Tissue Ball Regression values (i.e. the highest tolerance to CPA treatment):

Control ($1.4 \pm 0.2 \mu\text{m/h}$) < 0.5 M Me₂SO + 1.5 M EG ($2.1 \pm 0.1 \mu\text{m/h}$) < 0.5 M Met + 1.5 M EG ($2.3 \pm 0.2 \mu\text{m/h}$) < 0.5 M Gly + 1.5 M EG ($2.6 \pm 0.3 \mu\text{m/h}$) = 0.5 M Gly + 1.5 M Met ($2.6 \pm 0.3 \mu\text{m/h}$) < 0.5 M Me₂SO + 1.5 M Met ($2.9 \pm 0.3 \mu\text{m/h}$).

As regards the 3.0 M CPA solutions, the solutions containing 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Gly and 1.5 M Met + 1.5 M Gly produced significantly lower Tissue Ball Regression values ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) compared with the other solutions tested (Fig. 2B). The three CPA solutions containing 1.5 M Gly + 1.5 M EG, 1.5 M Me₂SO + 1.5 M EG and 1.5 M Met + 1.5 M EG produced similar, intermediate Tissue Ball Regression values, which were significantly different ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) compared with the other solutions used. Regressions values of TBs exposed to 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Met were significantly higher ($p < 0.05$, Wilcoxon-test), compared to the other solutions tested.

Up to 120 h after treatment, the % Undamaged TBs were not significantly different between treatments ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) and remained over 80% with all CPA solutions except with 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Met, for which it decreased rapidly. Significant differences in % Undamaged TBs were observed from 144 h onwards ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test). Treatment with 1.5 M Met + 1.5 M EG and 1.5 M Gly + 1.5 M Me₂SO led to % Undamaged TBs of 75% after 144 h and 80% after 168 h, respectively. No survival was obtained for longer treatment durations. Based on the average values of Tissue Ball Regression obtained over the first 72 h, the following ranking of 3.0 M CPA solutions was obtained, starting from the lowest Tissue Ball Regression values (i.e. the highest tolerance to CPA treatment):

1.5 M Gly + 1.5 M Met ($0.7 \pm 0.2 \mu\text{m/h}$) = 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Gly ($0.7 \pm 0.2 \mu\text{m/h}$) < Control ($1.3 \pm 0.1 \mu\text{m/h}$) < 1.5 M Me₂SO + 1.5 M EG ($2.5 \pm 0.3 \mu\text{m/h}$) < 1.5 M Met + 1.5 M EG ($2.5 \pm 0.6 \mu\text{m/h}$) < 1.5 M Gly + 1.5 M EG ($2.7 \pm 0.5 \mu\text{m/h}$) < 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Met ($4.5 \pm 0.7 \mu\text{m/h}$).

In case of 4.0 M CPA solutions, the Tissue Ball Regression values obtained with 2.0 M Me₂SO + 2.0 M EG, 2.0 M Gly + 2.0 M Met, 2.0 M Me₂SO + 2.0 M Met and 2.0 M Me₂SO + 2.0 M Gly were significantly higher ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) compared with the two other CPA solutions after 24 h and 48 h (Fig. 2C). Regression values of TBs exposed to 2.0 M Gly + 2.0 M EG were significantly higher compared to the values obtained with 2.0 M Met + 2.0 M EG between 0 and 72 h following treatment ($p < 0.05$,

Wilcoxon-test). No significant differences were obtained between these two CPA combinations after 72 h ($p > 0.05$, Wilcoxon-test).

Survival of TBs treated with 2.0 M Me₂SO + 2.0 M Met, 2.0 M Me₂SO + 2.0 M EG and 2.0 M Gly + 2.0 M Met did not exceed 72 h, with % Undamaged TBs significantly lower ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test) compared to the % Undamaged TBs of 2.0 M Gly + 2.0 M EG and 2.0 M Met + 2.0 M EG (Fig. 2C). With the solution containing 2.0 M Gly + 2.0 M Me₂SO, despite a high value after 24 h (92%), the % Undamaged TBs decreased below 30% after 72 h. % Undamaged TBs were not significantly different between 2.0 M Gly + 2.0 M EG and 2.0 M Met + 2.0 M EG up to 96 h ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) with values over 80%. After 96 h, significant differences of % Undamaged TBs were recorded between these two CPA solutions ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test). With the solution containing 2.0 M Gly + 2.0 M EG the % Undamaged TBs was nil after 144 h while it was nil after 192 h for the solution containing 2.0 M Met + 2.0 M EG.

Only CPA solutions allowing survival of TBs for durations longer than 72 h after treatment were ranked based on the TB tolerance. Based on the average values of Tissue Ball Regression obtained over the first 72 h, the following ranking of 4.0 M CPA solutions was obtained, starting from the lowest Tissue Ball Regression values (i.e. the highest tolerance to CPA treatment):

Control ($1.2 \pm 0.1 \mu\text{m/h}$) < 2.0 M Met + 2.0 M EG ($1.4 \pm 0.1 \mu\text{m/h}$) < 2.0 M Gly + 2.0 M EG ($4.9 \pm 0.4 \mu\text{m/h}$) < 2.0 M Me₂SO + 2.0 M Gly ($8.6 \pm 0.6 \mu\text{m/h}$).

CPA solutions of 4.5 M and 5.0 M molarity were not tolerated by TBs.

The comparison of Tissue Ball Regression values of treated TBs submitted to the CPA solutions tested allowed describing the effect of the total molarity of the CPAs. For total molarities of 2.0 M and 3.0 M, similar Tissue Ball Regression values were obtained for Me₂SO + EG, Met + EG and Gly + EG (Fig. 3). The solution containing Met + EG appeared as the best tolerated and inversely, the solution containing Me₂SO + Met was the least well tolerated by TBs. CPA solutions with a molarity of 4.0 M were toxic to TBs.

Experiment 2

For all durations except 24 h, no significant differences in Tissue Ball Regression were observed between treated and control TBs (Fig. 2D). No significant differences in Tissue Ball Regression were noted between the three CPA solutions ($p > 0.05$, Wilcoxon-test). Despite the absence of significant differences in Tissue Ball Regression, the CPA solution containing 1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Met displayed the lowest Tissue Ball Regression value for 24 h with $2.8 \pm 0.3 \mu\text{m/h}$ compared to 1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 Me₂SO and 1.0 M Met + 1.0 M Gly + 1.0 Me₂SO with 4.5 ± 0.5 and $5.3 \pm 0.5 \mu\text{m/h}$, respectively. No significant differences were observed for % Undamaged TBs between the three CPA combinations up to 144 h ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test) (Fig. 2D). TBs treated with the solution containing 1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Met displayed % Undamaged TBs of 87% after treatment for 192 h and reached 0% after 216 h.

TBs did not tolerate exposure to CPA combinations with a 4.5 M total molarity.

Comparison between individual, binary and ternary solutions at the same total molarity

The % Undamaged TBs at 72 h of all 3.0 M CPA solutions tested was above 80% except for three individual solutions containing 3.0 M EG, 3.0 M Me₂SO and 3.0 M Met (Fig. 4).

As regards Tissue Ball Regression, three groups of CPAs with significantly different values could be identified ($p < 0.05$, Wilcoxon-test). The first group, showing the highest Tissue Ball Regression values, included three individual solutions (3.0 M EG,

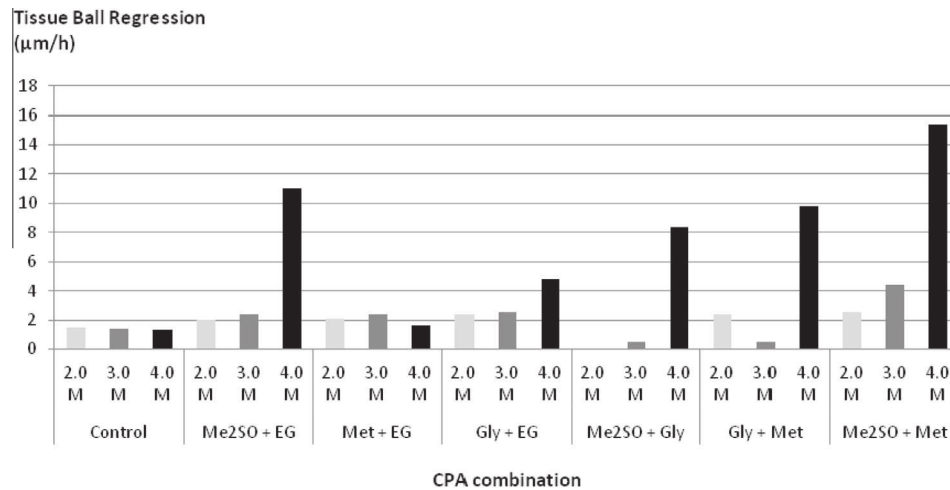


Fig. 3. Average Tissue Ball Regression ($\mu\text{m}/\text{h}$) over the first 72 h following treatment of TBs treated with binary CPA solutions with a total molarity of 2.0, 3.0 and 4.0 M. Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol. Error bars represent standard deviations.

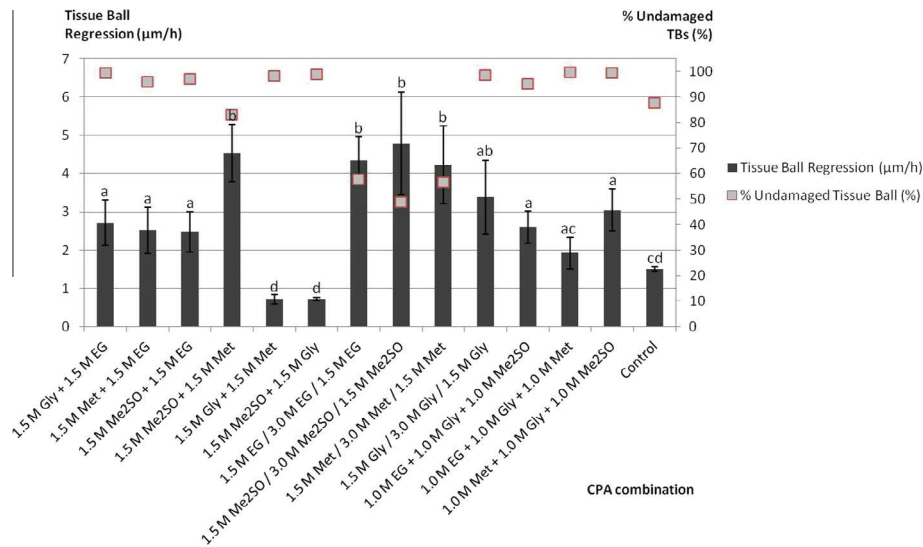


Fig. 4. Average Tissue Ball Regression ($\mu\text{m}/\text{h}$) and % Undamaged TBs over the first 72 h following treatment of TBs treated with binary and ternary CPA solutions with a total molarity of 3.0 M ($N = 30$ TBs/treatment). Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol. Error bars represent standard deviations.

3.0 M Me₂SO and 3.0 M Met) and one binary solution (1.5 M Me₂SO + 1.5 M Met). The second group, which displayed intermediate Tissue Ball Regression values, consisted of three ternary solutions (1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Me₂SO, 1.0 M EG + 1.0 M Gly + 1.0 M Met and 1.0 M Met + 1.0 M Gly + 1.0 M Me₂SO) and of three binary solutions (1.5 M Gly + 1.5 M EG, 1.5 M Met + 1.5 M EG and 1.5 M Me₂SO + 1.5 M EG). The third group, with the lowest Tissue Ball Regression values, included two binary solutions (1.5 M Gly + 1.5 M Met and 1.5 M Me₂SO + 1.5 M Gly). The Tissue Ball Regression value of the solution containing 3.0 M Gly was intermediate between the first and second groups.

Experiment 3

When TBs were exposed for 10 min to individual CPA solutions with a molarity of 3.0 M (Table 2, solution 2) following a stepwise increase in molarity, Tissue Ball Regression values of TBs treated with solutions containing EG, Met and Me₂SO were significantly higher compared to the untreated control ($p < 0.05$, Wilcoxon-test) (Fig. 5A). By contrast, except for 24 h, no significant

differences were observed in Tissue Ball Regression values of TBs treated with Gly and the untreated control ($p > 0.05$, Wilcoxon-test). The % Undamaged TBs following treatment with EG, Met and Me₂SO decreased rapidly, reaching 0% after 48 h (Fig. 5A). By contrast, the % Undamaged TBs following treatment with Gly was significantly higher ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test) with a value of 90% after 96 h and it reached 0% after 120 h. When the duration of exposure of TBs to solution 2 was increased to 20 min, Tissue Ball Regression values of TBs increased drastically, except after treatment with EG (Fig. 5B). The % Undamaged TBs decreased rapidly following treatment with the three solutions tested, reaching 0% after 72 h (Fig. 5B). By contrast, the % Undamaged TBs of control TBs reached 0% after 192 h. Tissue Ball Regression of TBs treated with the 4.0 M CPA solutions tested was very high (Fig. 5C). The % Undamaged TBs reached 0% within 48 h (Fig. 5C).

Experiment 4

Experiment 4 consisted in exposing TBs to a series of binary or ternary CPA solutions with a total molarity of 4.5–5.0 M following

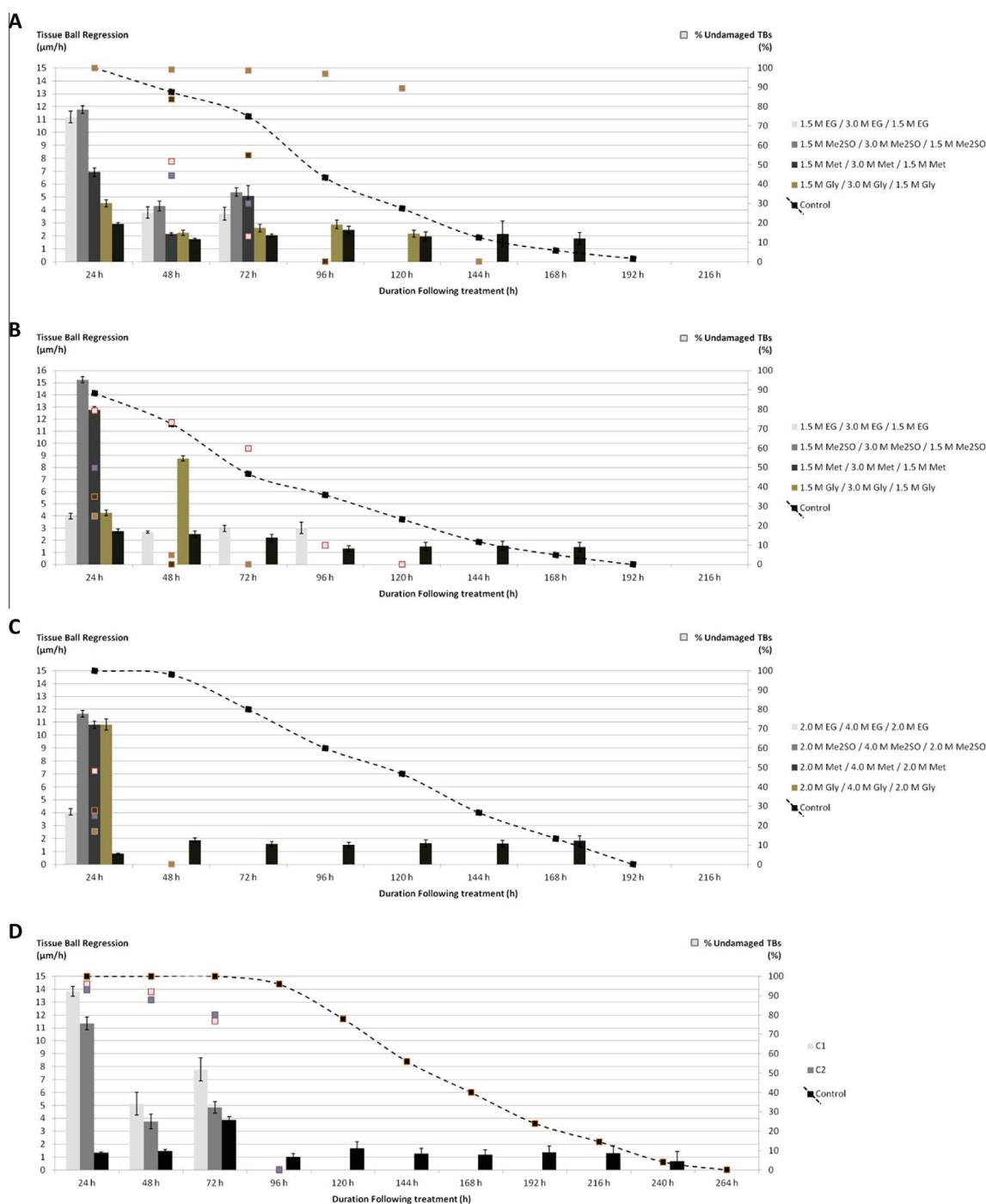


Fig. 5. Evolution of Tissue Ball Regression ($\mu\text{m}/\text{h}$) and of % Undamaged TBs (%) over time (24 h intervals) after exposure of TBs to individual, binary or ternary CPA solutions at room temperature following a stepwise increase in molarity ($N = 30$ TBs/treatment). (A) Individual CPA solutions: treatment with solution 1 for 5 min and with solution 2 for 10 min (see Table 2); highest molarity 3.0 M. (B) Individual CPA solutions: treatment with solution 1 for 5 min and with solution 2 for 20 min (see Table 2); highest molarity 3.0 M. (C) Individual CPA solutions: treatment with solution 1 for 5 min and with solution 2 for 10 min (see Table 2); highest molarity 4.0 M. (D) Binary and ternary CPA solutions, C1 and C2 (see Table 3). Only CPA treatments allowing survival of TBs are reported: treatment with solution 1 for 5 min and with solution 2 for 10 min; highest molarity tested 4.5 M. Me₂SO = Dimethylsulfoxide, EG = Ethylene glycol, Gly = Glycerol, Met = Methanol. Error bars represent standard deviations.

a stepwise increase in molarity. The Tissue Ball Regression values and % Undamaged TBs were significantly different between treated and control TBs ($p > 0.05$, Wilcoxon-test and $p < 0.05$, Fisher's Exact Test, respectively). Tissue Ball Regression values were recorded for up to 72 h (Fig. 5D) and % Undamaged TBs for up to 72 h (C2) and 96 h (C1) (Fig. 5D) for only two conditions (C1: solution 1: 0.5 M Me₂SO + 1.5 M EG, solution 2: 1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me₂SO; C2: solution 1: 0.5 M Gly + 1.5 M EG, solution 2: 1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M Me₂SO).

Discussion

Research in the field of coral cryopreservation has increased in recent years [37]. As a result, spermatozoa from several coral species were successfully cryopreserved [33–35,60]. Despite these promising achievements, additional investigations must be performed to develop cryopreservation protocols for other coral biological forms including oocytes [50,51,81] or multicellular materials such as planulae [32], apices [23,36] and TBs [22].

These coral forms contain a high diversity of cellular types, which makes the development of cryopreservation protocols more difficult. The vitrification technique has been mentioned as an interesting alternative to slow cooling techniques for the cryopreservation of sensitive or histologically complex specimens [11,48,66,88]. The establishment of a cryopreservation protocol requires the optimization of several parameters including the conditions of the cryoprotective treatment (nature and concentration of CPAs; duration of exposure of samples to CPA solution) and the rate of cooling and warming. TBs have been identified as a suitable material to test the parameters of a cryopreservation protocol [22].

The vitrification technique requires the use of highly concentrated CPA solutions, which can be toxic for the different cell types [29,48,88]. Several authors have demonstrated that solutions combining several CPAs are less toxic than a solution of a single CPA at the same total molarity for cryopreservation of embryos and larvae of invertebrate species [9,13,14] and of other organisms such as some parasitic protozoa, helminths and insect embryos [45]. By contrast, Poncet and Lebel [68] showed the lower efficiency of CPA mixtures compared to individual CPAs to protect *Haliotis tuberculata* cells during cooling. We showed in a previous work that, among four individual CPA solutions tested (Gly, Met, Me₂SO or EG) with molarities up to 3.0 M, *P. damicornis* TBs tolerated only exposure for 20 min to a solution containing 3.0 M EG [22]. In this study, the tolerance of TBs to exposure to 2.0–5.0 M CPA solutions for 20 min was investigated. TBs were exposed directly to binary, ternary and quaternary solutions. Tolerance to exposure to single, binary and ternary solutions after stepwise increase in CPA solution molarity was also experimented. The CPA solutions tested in this study were inspired from the vitrification solutions developed for animal and plant materials [3,54,89].

Our experiments demonstrated the higher tolerance of TBs to CPA solutions containing EG either in single solution or in combination with other CPAs. Among the binary solutions tested, the combination of EG + Met provided the best results both in terms of Tissue Ball Regression and of % Undamaged TBs. With this solution, TBs could withstand exposure to a molarity of 4.0 M. The combination of EG + Gly was also tolerated to a 4.0 M molarity but Tissue Ball Regression values were higher compared with EG + Met. Among the binary combinations tested, Ali and Shelton [3] showed that a CPA solution containing EG + Gly was the best tolerated by mouse embryos. In view of the high tolerance of *Crassostrea gigas* oocytes to EG, Tervit et al. [79] used this CPA as a basis for the composition of CPA solutions. By contrast, compared with other CPAs, EG was more toxic to *Paralichthys olivaceus* embryos and provided the lowest protection against cooling to -15°C [89].

In our experiments, TBs displayed low tolerance to exposure to CPA solutions containing Me₂SO combined with EG, Gly or Met at a total molarity higher than 3.0 M. This observation was verified in particular for the binary solution Me₂SO + Met. Previous observation showed that *P. damicornis* TBs did not withstand exposure to a Me₂SO solution with a molarity higher than 2.0 M [22]. These experiments highlighted the difficulty of associating Me₂SO concentrations higher than 1.0 M to other CPAs without decreasing TB tolerance. Mahmoud et al. [54] obtained the highest maturation rate of vitrified *Bubalus bubalis* oocytes following treatment containing 3.0 M EG + 3.0 M Me₂SO. Other studies demonstrated the toxicity of Me₂SO for *Eriocheir sinensis* embryos [41] and the need to associate Me₂SO with other CPAs to reduce its toxicity [39,42,44]. For CPA solutions with a total molarity of 4.0 M, the combination of 2.0 M Gly + 2.0 M EG was well tolerated by *P. damicornis* TBs but not the association of 2.0 M Gly with 2.0 M Met or Me₂SO. *B. bubalis* oocytes displayed low tolerance to treatment with these CPA solutions [54]. The low cell permeability of Gly and its high viscosity may require long exposure times to limit damage to the cell ultrastructure during LN exposure [54].

Met, in association with EG in solutions up to 4.0 M molarity, was well tolerated by TBs but this was not the case with Me₂SO or Gly. Met is considered as an efficient CPA because of its small size and its rate of permeability similar that of water [3,42]. Zhang et al. [89] demonstrated that solutions including Met combined with other CPAs had the highest protective effect on *P. olivaceus* embryos.

The three ternary 3.0 M CPA solutions tested (consisting of three CPAs at 1.0 M molarity each) were well tolerated by *P. damicornis* TBs, with Tissue Ball Regression and % Undamaged TBs values similar to those obtained after treatment with the best binary solutions at the same total molarity. Treatment with a 4.0 M quaternary solution (consisting of EG, Met, Gly and Me₂SO each at 1.0 M molarity) was not tolerated by TBs, even though each of these CPAs employed individually at a 1.0 M molarity was well tolerated [26]. Treatments with three ternary 4.5 M CPA solutions (consisting of three CPAs at 1.5 M molarity each) were not tolerated by TBs. Two main conclusions can be drawn from these results. Firstly, the use of CPA combinations allowed exposing TBs to concentrations up to 3.0 M. Compared with previous results obtained by Feuillassier et al. [22], the Tissue Ball Regression values were lower following treatment with binary or ternary CPA than with individual solutions for the same exposure durations. Except for 24 h after treatment, the Tissue Ball Regression values of TBs treated with the most efficient binary or ternary 3.0 M CPA solutions did not exceed 2 $\mu\text{m}/\text{h}$ compared to over 5 $\mu\text{m}/\text{h}$ following treatment with individual solutions at the same molarity [22]. Secondly, tolerance of TBs to a 4.0 M solution was achieved with two CPA combinations (2.0 M EG + 2.0 M Met; 2.0 M EG + 2.0 M Gly) but CPA solutions with higher total molarity were not tolerated by TBs. In addition to CPA toxicity, the osmotic shock caused by exposure of TBs to such highly concentrated CPA solutions may explain their low tolerance. Indeed, mitochondrial activity and membrane integrity can be impacted by osmotic stress [26,78,87].

Treated TBs showed higher % Undamaged TBs compared to controls after exposure to most binary solutions with a molarity of 2.0 M and 3.0 M. A similar trend was observed with TBs exposed to 3.0 M ternary solutions. Such differences in survival between treated and control TBs were also observed in previous experiments with *P. damicornis* [22]. These differences may be due to the selection of the most tolerant cell types by the CPA treatments. In addition, the growth of microbiota populations associated with TBs such as bacteria may be slowed down by the CPA treatment, thereby limiting their negative impact.

The last two experiments tested the effect of a stepwise increase and decrease in the molarity of the CPA solutions employed, with the objective of reducing osmotic shock. Using this stepwise procedure, we were able to achieve tolerance of TBs to ternary solutions with a total molarity of 4.5 M. The highest TB tolerance was recorded following treatment with the combination EG + Gly + Me₂SO. These results underline the interest of using such progressive increase and decrease in the molarity of CPA solutions, confirming the observations made by various authors with different organisms [1,9,11,15,63,70,79].

Hagedorn et al. [32] demonstrated that the permeability of *F. scutaria* planulae to Gly was 2.3×10^{-4} cm/min and that planulae contained 90% Gly after 25 min exposure. By contrast, permeability of *P. damicornis* larvae to Gly was only 0.12×10^{-4} cm/min [32]. Future experiments will be performed to study the permeability of *P. damicornis* TBs to the best tolerated CPA solution, i.e. EG + Gly + Me₂SO.

This study revealed the difficulty to expose TBs to highly concentrated CPA solutions. To achieve vitrification upon cooling, CPA solutions must have a total molarity above $\approx 40\%$ [24] corresponding to 5.0 M for Me₂SO and Gly [6], between 6.5 M and 8.0 M [3,7] for EG and up to 10.0 M for Met [3,45]. In our

experiments, we were able to expose TBs to CPA solutions with a total molarity of 4.0 M. Numerous chemicals have been already employed in cryopreservation research on human cells [21], microorganisms [43], parasitic protozoa or helminths [45], and some marine invertebrates [58,59] such as *C. gigas* [71,79], *Paracentrotus lividus* [63], *E. sinensis* [41]. These chemical agents may be added to the four CPAs tested to increase the total molarity of the CPA solution. These include amides such as acetamide, formamide, urea, dimethylformamide or dimethylacetamide [21,25,41,43,45], amino acids such as alanine, glycine and proline [25,43], sugars such as sucrose, trehalose, glucose [25,43], alcohols such as sorbitol, mannitol and polymers such as polyvinyl-pyrrolidone [12,25,43,79]. Antioxidants such as α -tocopherol and ascorbic acid [39,43] can also be added to CPA solutions to limit their toxicity.

These experiments highlighted the interest of using TBs to test the toxicity of CPA solutions. TBs have also been used in the framework of ecotoxicological studies [17,22,27,46,49,57]. In our experiments, their small size facilitated manipulations; only small volumes of reagents were required and, after treatment, they could be placed individually in wells of multiple well cluster plates for cell culture, thereby facilitating their observation.

In most experiments, control TBs displayed constant % Undamaged TBs for up to 72 h. The differences observed in % Undamaged TBs of control samples between different experiments revealed a variability of their biological quality, even though they originated from branches of the same coral colonies. Variability in culture conditions of *P. damicornis* such as the chemistry parameters of ASW and the state of stress of the animals might influence the biologic quality of corals over time.

The mechanical technique employed to produce TBs did not allow obtaining their remetamorphosis into polyps. In addition, heterogeneity in size and zooxanthellae concentration was observed between TBs. Fluctuations in zooxanthella content do not allow investigating the density of symbionts following CPA treatments. With the daily renewal of ASW, a temperature of 25 °C and a low light intensity, we were able to maintain TBs alive for up to 216 h (9 days), with an average of 120 h (5 days). These durations may be increased by using the conditions employed with TBs of other species such as *F. granulosa* [27,47,84]. In particular, modifications in light, temperature, medium enrichment and moving conditions may induce better TB performances.

In conclusion, this study demonstrated the efficiency of TBs to tolerate CPA solutions with molarities up to 4.0 M using binary or ternary combinations. TBs tolerated molarity of CPAs up to 4.5 M after exposure using a stepwise procedure to limit osmotic shock. Our results showed that a solution containing EG + Gly + Me₂SO may serve as a basis to develop new vitrifying solutions. Moreover, in order to have a better understanding of the impact of CPA treatment on the structural integrity of TBs, our future investigations will include cytological and histological approaches.

Funding statement

Funding for the implementation of this research work was provided by IRD and UPMC.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Sandrine Bodin, Francine Delmas, Hanka Hensens and Catherine Picq who provided

bibliographic references. We gratefully acknowledge Aquarium System France for the supply of synthetic salt used for the experiments.

References

- [1] S.L. Adams, P.A. Hessian, P.V. Mladenov, The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin, *Evechinus chloroticus*, *Cryobiology* 52 (2006) 139–145.
- [2] J. Alfaro, J. Komen, E.A. Huisman, Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae, *Aquaculture* 195 (2001) 353–366.
- [3] J. Ali, J.N. Shelton, Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos, *J. Reprod. Fertil.* 99 (1993) 471–477.
- [4] M. Antinori, Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries, *Reprod. BioMed.* Online 14 (1) (2006) 72–79.
- [5] H. Barnicoat, R. Cripps, J. Kendon, V. Sarasan, Conservation in vitro of rare and threatened ferns—case studies of biodiversity hotspot and island species, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 47 (2011) 37–45.
- [6] J. Brodie, R.A. Andersen, M. Kawachi, A.J.K. Millar, Endangered algal species and how to protect them, *Phycologia* 48 (5) (2009) 423–438.
- [7] V.L. Bronshteyn, P.L. Steponkus, Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol, *Cryobiology* 32 (1995) 1–22.
- [8] K.E. Carpenter, M. Abrar, G. Aebi, R.B. Aronson, S. Banks, A. Bruckner, A. Chiriboga, J. Cortés, J.C. Delbeek, L. DeVantier, G.J. Edgar, A.J. Edwards, D. Fenner, H.M. Guzmán, B.W. Hoeksema, G. Hodgson, O. Johan, W.Y. Licuanan, S.R. Livingstone, E.R. Lovell, J.A. Moore, D.O. Obura, D. Ochavillo, B.A. Polidoro, W.F. Precht, M.C. Quibilan, C. Reboton, Z.T. Richards, A.D. Rogers, J. Sanciangco, A. Sheppard, C. Sheppard, J. Smith, S. Stuart, E. Turak, J.E.N. Veron, C. Wallace, E. Weil, E. Wood, One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts, *Science* 321 (2008) 560–563.
- [9] N.H. Chao, C. Liao, Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos, *Aquaculture* 197 (2001) 161–189.
- [10] M.R. Chapman, D.L. Kramer, Gradients in coral reef fish density and size across the Barbados Marine Reserve boundary: effects of reserve protection and habitat characteristics, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181 (1999) 81–96.
- [11] S.L. Chen, Y.S. Tian, Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification, *Theriogenology* 63 (4) (2005) 1207–1219.
- [12] E.P. Chetverikova, DNA damage by reactive oxygen species in cryopreservation and the antioxidant properties of cryoprotectors, *Biophysics* 57 (2) (2012) 263–269.
- [13] Y.H. Choi, Y.J. Chang, The influence of cooling rate, developmental stage, and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*, *Cryobiology* 46 (2003) 190–193.
- [14] Y.H. Choi, J.Y. Lee, Y.J. Chang, The influence of developmental stages and protective additives on cryopreservation of surf clam (*Spisula sachalinensis*) larvae, *J. Environ. Biol.* 29 (4) (2008) 461–463.
- [15] Y.H. Choi, T.J. Nam, Influence of the toxicity of cryoprotective agents on the involvement of insulin-like growth factor-I receptor in surf clam (*Spisula sachalinensis*) larvae, *Cryo Letters* 35 (6) (2014) 537–543.
- [16] G. De'ath, K.E. Fabricius, H. Sweatman, M. Puotinen, The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes, *PNAS* 109 (44) (2012) 17995–17999.
- [17] I. Domart-Coulon, S. Tambutté, E. Tambutté, D. Allemand, Short term viability of soft tissue detached from the skeleton of reef-building corals, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309 (2004) 199–217.
- [18] I.J. Domart-Coulon, D.C. Elbert, E.P. Scully, P.S. Calimlim, G.K. Ostrander, Aragonite crystallization in primary cell cultures of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*, *PNAS* 98 (21) (2001) 11885–11890.
- [19] Q. Dong, J. Lin, C. Huang, Effects of cryoprotectant toxicity on the embryos and larvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture* 242 (2004) 655–670.
- [20] Q. Dong, C. Huang, B. Eudeline, T.R. Tiersch, Cryoprotectant optimization for sperm of diploid Pacific oysters by use of commercial dairy sperm freezing facilities, *Aquaculture* 271 (2007) 537–545.
- [21] G.M. Fahy, B. Wolk, U.S. Patent No. 6,395,467. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC, 2002.
- [22] L. Feuillassier, L. Martinez, P. Romans, I. Engelmann-Sylvestre, P. Masanet, D. Barthélémy, F. Engelmann, Survival of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* L. exposed to cryoprotectant solutions, *Cryobiology* 69 (2014) 376–385.
- [23] L. Feuillassier, P. Romans, I. Engelmann-Sylvestre, P. Masanet, D. Barthélémy, F. Engelmann, Tolerance of apexes of coral *Pocillopora damicornis* L. to cryoprotectant solutions, *Cryobiology* 68 (2014) 96–106.
- [24] A.K. Fry, A.Z. Higgins, Measurement of cryoprotectant permeability in adherent endothelial cells and applications to cryopreservation, *Cell. Mol. Bieng.* 5 (3) (2012) 287–298.
- [25] B.J. Fuller, Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state, *Cryo Letters* 25 (6) (2004) 375–388.
- [26] D. Gao, J.K. Critser, Mechanisms of cryoinjury in living cells, *ILAR J.* 41 (2000) 187–196.
- [27] S.G. Gardner, D.A. Nielsen, K. Petrou, A.W.D. Larkum, P.J. Ralph, Characterisation of coral explants: a model organism for cnidarian-dinoflagellate studies, *Coral Reefs* (2014), <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-014-1240-4> 1–10.

- [28] D. Gausen, The Norwegian gene bank programme for Atlantic salmon (*Salmo salar*), in: J.G. Cloud, G.H. Thorgaard (Eds.), Genetic Conservation of Salmonid Fishes, Plenum Press, New York, 1993, pp. 181–187.
- [29] F. Guignot, Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA, Prod. Anim. 18 (1) (2005) 27–35.
- [30] J.C. Gwo, Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review, Aquac. Res. 31 (2000) 259–271.
- [31] M. Hagedorn, V.L. Carter, R.A. Steyn, D. Krupp, J.C. Leong, R.P. Lang, T.R. Tiersch, Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*, Cryobiology 52 (2006) 454–458.
- [32] M. Hagedorn, R. Pan, E.F. Cox, L. Hollingsworth, D. Krupp, T.D. Lewis, J.C. Leong, P. Mazur, W.F. Rall, D.R. MacFarlane, G. Fahy, F.W. Kleinhans, Coral larvae conservation: physiology and reproduction, Cryobiology 52 (2006) 33–47.
- [33] M. Hagedorn, V. Carter, K. Martorana, M.K. Paresa, J. Acker, I.B. Baums, E. Borneman, M. Brittsan, M. Byers, M. Henley, M. Laterveer, J.A. Leong, M. McCarthy, S. Meyers, B.D. Nelson, D. Petersen, T.R. Tiersch, R.C. Uribe, E. Woods, D. Wildt, Preserving and using germplasm and dissociated embryonic cells for conserving Caribbean and Pacific Coral, PLoS One 7 (3) (2012) e33354, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033354>.
- [34] M. Hagedorn, M.J.H. Van Oppen, V. Carter, M. Henley, D. Abrego, E. Puill-Stephan, A. Negri, A. Heyward, D.R. MacFarlane, R. Spindler, First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created, Cryobiology 65 (2012) 157–158.
- [35] M. Hagedorn, V. Carter, M. Henley, R. Spindler, Challenges of creating a frozen repository for coral, Cryobiology 67 (2013) 398–442.
- [36] M. Hagedorn, A. Farrell, V.L. Carter, Cryobiology of coral fragments, Cryobiology 66 (2013) 17–23.
- [37] M. Hagedorn, R. Spindler, The reality, use and potential for cryopreservation of coral reefs, in: W.V. Holt, J.L. Brown, P. Comizzoli (Eds.), Reproductive Sciences in Animal Conservation, Springer, New York, 2014, pp. 317–329.
- [38] F. Hamaratoglu, A. Eroglu, M. Toner, K.C. Sadler, Cryopreservation of starfish oocytes, Cryobiology 50 (2005) 38–47.
- [39] N. Hofmann, A. Chatterjee, D. Saha, T. Müller, D. Pogozhykh, B. Glasmacher, 043 Antioxidants as additional additives to CPA may help to minimize epigenetic modifications caused by Me₂SO, Cryobiology 67 (3) (2013) 410.
- [40] A. Horváth, A. Bubalo, A. Čučević, V. Bartulović, L. Kotrik, B. Urbányi, B. Glamuzina, Cryopreservation of sperm and larvae of the european flat oyster (*Ostrea edulis*), J. Appl. Ichthyol. 28 (2012) 948–951.
- [41] X. Huang, P. Zhuang, L. Zhang, Z. Yao, T. Liu, J. Liu, G. Feng, Effects of cryoprotectant toxicity on embryos of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Brachyura), Crustaceana 84 (3) (2011) 281–291.
- [42] X. Huang, P. Zhuang, L. Zhang, G. Feng, J. Liu, T. Zhang, F. Zhao, Effects of different vitrificants on the embryos of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Brachyura), Crustaceana 86 (1) (2013) 1–15.
- [43] Z. Hubalek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, Cryobiology 46 (3) (2003) 205–229.
- [44] V. Isachenko, I.I. Katkov, S. Yakovenko, A.G.-M.I. Lulat, M. Ulug, A. Arvas, E. Isachenko, Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): Novel aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants, Cryobiology 54 (2007) 305–309.
- [45] E.R. James, Parasite cryopreservation by vitrification, Cryobiology 49 (3) (2004) 201–210.
- [46] E.J. Kopecky, G.K. Ostrander, Isolation and primary culture of viable multicellular endothelial isolates from hard corals, In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 35 (1999) 616–624.
- [47] E. Kramarsky-Winter, Y. Loya, M. Vizel, C.A. Downs, Method for coral tissue cultivation and propagation. Ramot at Tel Aviv University (2008) PCT/IL2008/001236.
- [48] L.L. Kulshova, A. Lopata, Vitrification can be more favorable than slow cooling, Fertil. Steril. 78 (3) (2002) 449–454.
- [49] A. Lecoite, S. Cohen, M. Gèze, C. Djediat, A. Meibom, I. Domart-Coulon, Scleractinian coral cell proliferation is reduced in primary culture of suspended multicellular aggregates compared to polyps, Cytotechnology 65 (2013) 705–724.
- [50] C. Lin, T. Zhang, F.W. Kuo, S. Tsai, Gorgonian coral (*Junceella juncea* and *Junceella fragilis*) oocyte chilling sensitivity in the context adenosine triphosphate response (ATP), Cryo Letters 32 (2) (2011) 141–147.
- [51] C. Lin, S. Tsai, The effect of chilling and cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes during short-term low temperature preservation, Theriogenology 77 (2012) 1257–1261.
- [52] C. Lin, L.H. Wang, P.J. Meng, C.S. Chen, S. Tsai, Lipid content and composition of oocytes from five coral species: Potential implications of future cryopreservation efforts, PLoS One 8 (2) (2013) e57823.
- [53] B. Liu, X. Li, Preliminary studies on cryopreservation of Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) larvae, J. Shellfish Res. 27 (5) (2008) 1125–1128.
- [54] K.G.H.M. Mahmoud, T.H. Scholkamy, Y.F. Ahmed, G.E. Seidel Jr, M.F. Nawito, Effect of different combinations of cryoprotectants on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods, Reprod. Domest. Anim. 45 (4) (2010) 565–571.
- [55] P.J. Mumby, N.H. Wolff, Y.M. Bozoc, I. Chollett, P. Halloran, Operationalizing the resilience of coral reefs in an era of climate change, Conserv. Lett. 7 (3) (2014) 176–187.
- [56] F. Mussino, M. Pozzolini, L. Valisano, C. Cerrano, U. Benatti, M. Giovine, Primmorphs cryopreservation: a new method for long-time storage of sponge cells, Mar. Biotechnol. (2012) 1–11.
- [57] B. Nesa, M. Hidaka, High zooxanthella density shortens the survival time of coral cell aggregates under thermal stress, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 368 (2009) 81–87.
- [58] N.A. Odintsova, A.V. Boroda, P.V. Velansky, E.Y. Kostetsky, The fatty acid profile changes in marine invertebrate larval cells during cryopreservation, Cryobiology 59 (2009) 335–343.
- [59] N.A. Odintsova, A.V. Boroda, Cryopreservation of the cells and larvae of marine organisms, Russ. J. Mar. Biol. 38 (2) (2012) 101–111.
- [60] S. Ohki, M. Morita, S. Kitanobo, A.A. Kowalska, R.K. Kowalski, Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution, Cryobiology 69 (2014) 134–139.
- [61] M.G. Palmerini, M. Antinori, M. Maione, F. Cerusico, C. Versaci, S.A. Nottola, G. Macchiarelli, M.A. Khalili, S. Antinori, Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification, J. Reprod. Dev. 60 (6) (2014) 411–420.
- [62] C.G. Paniagua-Chavez, T.R. Tiersch, Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster, Cryobiology 43 (2001) 211–223.
- [63] E. Paredes, J. Bellas, Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies, Cryobiology 59 (2009) 344–350.
- [64] E. Paredes, J. Bellas, S.L. Adams, Comparative cryopreservation study of trochophore larvae from two species of bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*), Cryobiology 65 (2012) 339–366.
- [65] E. Paredes, J. Bellas, Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) cryopreserved embryos survival and growth: Effects of cryopreservation parameters and reproductive seasonality, Cryo Letters 35 (6) (2014) 482–494.
- [66] D.E. Pegg, Principles of cryopreservation, Cryopreservation and freeze-drying protocols, Humana Press, 2007, pp. 39–57.
- [67] J.M. Poncet, A. Serpentine, E. Boucaud-Camou, J.M. Lebel, Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliotis tuberculata* (Gastropoda) and post thawed primary cell cultures, Cryobiology 44 (2002) 38–45.
- [68] J.M. Poncet, J.M. Lebel, Influence of cryoprotective agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the mollusk *Haliotis tuberculata*, Cryobiology 47 (2) (2003) 184–189.
- [69] N.P. Preston, F.E. Coman, The effects of cryoprotectants, chilling and freezing on *Penaeus esculentus* embryos and nauplii, in: T.W. Flegel (Ed.), Advances in shrimp biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 1998, pp. 37–43.
- [70] M. Rahman, S.K. Majhi, T. Suzuki, S. Matsukawa, C.A. Strüßmann, R. Takai, Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*, Cryobiology 57 (2008) 170–174.
- [71] P. Renard, Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects, Aquaculture 92 (1991) 43–57.
- [72] B. Rinkevich, Conservation of coral reefs through active restoration measures: recent approaches and last decade progress, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 4333–4342.
- [73] A. Sakai, S. Kobayashi, I. Oiyama, Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification, Plant Cell Rep. 9 (1990) 30–33.
- [74] A. Sakai, F. Engelmann, Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review, Cryo Letters 28 (3) (2007) 151–172.
- [75] L. Shaish, G. Levy, E. Gomez, B. Rinkevich, Fixed and suspended coral nurseries in the Philippines: Establishing the first step in the “gardening concept” of reef restoration, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 358 (2008) 86–97.
- [76] M.Y. Shao, Z.F. Zhang, L. Yu, J.J. Hu, K.H. Kang, Cryopreservation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) sperm, Aquac. Res. 37 (14) (2006) 1450–1457.
- [77] C.P. Suja, N. Sukumaran, S. Dharmaraj, Effect of culture media and tissue extracts in the mantle explant culture of abalone, *Haliotis varia* Linnaeus, Aquaculture 271 (2007) 516–522.
- [78] M. Suquet, C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson, R. Billard, Cryopreservation of sperm in marine fish, Aquac. Res. 31 (3) (2000) 231–243.
- [79] H.R. Tervit, S.L. Adams, R.D. Roberts, L.T. McGowan, P.A. Pugh, J.F. Smith, A.R. Janke, Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes, Cryobiology 51 (2005) 142–151.
- [80] T.R. Tiersch, H. Yang, J.A. Jenkins, Q. Dong, Sperm cryopreservation in fish and shellfish, Spermatology 65 (2007) 493–508.
- [81] S. Tsai, E. Spikings, F.W. Kuo, N.C. Lin, C. Lin, Use of an adenosine triphosphate assay, and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes, Theriogenology 73 (2010) 605–611.
- [82] S. Tsai, V. Kuit, Z.G. Lin, C. Lin, Application of a functional marker for the effect of cryoprotectant agents on gorgonian coral (*Junceella juncea* and *J. fragilis*) sperm sacs, Cryo Letters 35 (1) (2014) 1–7.
- [83] P. Van Treeck, H. Schuhmacher, Artificial reefs created by electrolysis and coral transplantation: an approach ensuring the compatibility of environmental protection and diving tourism, Estuarine Coast. Shelf Sci. 49 (Suppl. A) (1999) 75–81.
- [84] M. Vizel, Y. Loya, C.A. Downs, E. Kramarsky-Winter, A novel method for coral explant culture and micropropagation, Mar. Biotechnol. 13 (2011) 423–432.
- [85] B. Wang, E. Zhang, Y. Gu, S. Ning, Q. Wang, J. Zhou, Cryopreservation of brown algae gametophytes of *Undaria pinnatifida* by encapsulation-vitrification, Aquaculture 317 (2011) 89–93.

- [86] W.B. Wang, P.J.W. Olive, Effects of cryopreservation on the ultrastructural anatomy of 3-segment *Nereis virens* larvae (Polychaeta), *Invertebr. Biol.* 119 (3) (2000) 309–318.
- [87] E.J. Woods, J.D. Benson, Y. Agca, J.K. Critser, Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues, *Cryobiology* 48 (2) (2004) 146–156.
- [88] S. Yavin, A. Arav, Measurement of essential physical properties of vitrification solutions, *Theriogenology* 67 (1) (2007) 81–89.
- [89] Y.Z. Zhang, S.C. Zhang, X.Z. Liu, Y.J. Xu, J.H. Hu, Y.Y. Xu, J. Li, S.L. Chen, Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos, *Theriogenology* 63 (3) (2005) 763–773.

Synthèse

Les différentes solutions cryoprotectrices testées dans ce chapitre ont permis d'obtenir la tolérance des balles tissulaires à des concentrations pouvant atteindre 4.5 M. Une survie importante a en particulier été obtenue avec des solutions binaires concentrées à 4.0 M. Pour rappel, le chapitre précédent nous indiquait la difficulté d'exposer les balles tissulaires à de telles concentrations, et ce malgré leur bonne tolérance à l'EG. Ces premières investigations confortent l'idée de combiner les cryoprotecteurs afin d'augmenter les molarités tout en limitant la toxicité des solutés pour le matériel biologique.

On remarquera que l'EG est présent dans tous les mélanges les mieux tolérés. Si le Met peut être mal supporté dans certaines associations comme avec le DMSO, il constitue en revanche, avec l'EG, le milieu binaire le moins toxique pour les balles tissulaires. De même, si le Gly utilisé seul a été mal supporté par le biomatériau dans les approches précédentes, son association avec d'autres alcools a permis d'obtenir de très bons résultats de survie post-traitement. C'est notamment le cas avec l'EG. Nous pouvons donc retenir que EG + Met et EG + Gly ont été les meilleures combinaisons binaires avec lesquelles les pourcentages et durées de survie post-traitement les plus élevés ont pu être obtenus pour les plus fortes molarités (4.0 M).

Dans cette seconde étape, nous avons montré la difficulté d'exposer les TB à des concentrations proches de 4.0 M. Le stress osmotique est souvent cité comme la principale cause. Dans ce chapitre, nous avons montré l'intérêt d'utiliser des paliers de molarité afin d'augmenter davantage les concentrations testées. Si nous avons pu franchir le cap des 4.0 M en obtenant la survie après exposition à des concentrations de 4.5 M, en revanche, la durée de survie reste limitée après traitement. Comme nous l'avons indiqué, la cryoconservation offre une multitude de techniques et, si cette première démarche ne nous a pas permis d'exposer les balles tissulaires à des concentrations vitrifiantes, elle nous a démontré l'intérêt d'utiliser les balles tissulaires pour la cryoconservation du corail. Parmi les alternatives encore possibles, l'augmentation et la diminution des concentrations durant le traitement peut être non pas restreinte à trois solutions mais aller jusqu'à une quinzaine de paliers. Nous pouvons retenir également que l'eau Milli Q peut être une solution de remplacement de l'ASW dans les mélanges cryoprotecteurs. La diversité des cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants nous permet d'envisager de nombreuses autres solutions à tester individuellement ou en mélange. Enfin, dans ce chapitre, les balles tissulaires ont été traitées à température ambiante. Les prochaines investigations pourront être aussi réalisées sur glace pilée à 0 °C pour limiter la toxicité du DMSO.

La tolérance des balles tissulaires aux différents mélanges a été facilement observable grâce au recouvrement de leur mobilité post-traitement, ainsi que grâce à leur sensibilité accrue se traduisant par leur désintégration extrêmement rapide. Ces deux chapitres consacrés aux balles tissulaires ont été une première approche afin de définir une base pour l'élaboration de solutions cryoprotectrices. Si la mobilité et l'intégrité des balles tissulaires ont été indispensables pour évaluer dans le temps leur résistance aux traitements, de nouvelles

approches doivent être envisagées. Parmi celles-ci, les colorations vitales, les perturbations de la photosynthèse des *Symbiodinium* sp., les approches biomoléculaires ou encore la production d'ATP peuvent être des moyens pour identifier plus précisément les répercussions après traitement. Enfin, si l'excision mécanique nous a permis d'obtenir très rapidement des balles tissulaires en évitant les approches enzymatiques et chimiques, nous n'avons à cette étape pas obtenu de re-métamorphose. De plus, l'hétérogénéité de taille et les différences de concentrations en zooxanthelles entre les balles tissulaires constituent des points limitants.

Chapitre 5

Une approche à trois solutions: expulsion au KSW, exposition aux CPA, observation au PAS-NBB

V.1. - Préambule

Sur la base des investigations précédentes, ce chapitre s'ouvre sur de nouvelles perspectives. Malgré leur absence de métamorphose en polype primaire, les balles tissulaires de *P. damicornis* constituent un matériel rapidement accessible pour réaliser les premières investigations que nécessite la mise en place d'un protocole de cryoconservation. On peut facilement imaginer tout l'intérêt que ces tests préliminaires représentent, en permettant par la suite de tester les milieux cryoprotecteurs les plus efficaces sur des formes coralliennes pluricellulaires moins accessibles (polypes expulsés, planulae, polypes primaires).

Cette démarche nouvelle pour la cryoconservation des Anthozoaires ne doit pas pour autant occulter les points faibles des balles tissulaires. Outre l'action des autophagosomes, les balles tissulaires ont montré dans les précédents chapitres une forte hétérogénéité de taille. Même en ne sélectionnant que la classe de taille la plus performante, la comparaison des résultats de survie post-traitement peut s'avérer difficile. De plus, le rejet des balles tissulaires trop petites ou trop grandes pour une meilleure interprétation des résultats, conduit à n'utiliser qu'une petite partie du matériel produit. Enfin, l'excision mécanique, en plus d'être une technique consommatrice de branches, est très chronophage.

Nous avons donc choisi d'investiguer une nouvelle technique de production davantage tournée sur l'obtention de balles tissulaires directement issues du polype à l'image des travaux de Sammarco (1981, 1982) et non plus d'un agrégat cellulaire obtenu à partir d'un fragment tissulaire tel que réalisé par Kramarsky-Winter *et al.* (2008) et Vizel *et al.* (2011). Ces différents auteurs ont tous obtenu une re-métamorphose des balles tissulaires sans utiliser de solutions chimiques ou enzymatiques. Ayant testé sans succès l'approche de Sammarco (1982), nous avons donc choisi d'investiguer la méthode d'expulsion décrite par Domart-Coulon *et al.* (2004). Ces derniers auteurs ont pu produire des polypes expulsés sous la forme de balles tissulaires après une exposition des branches de *P. damicornis* et de *S. pistillata* à une solution d'eau de mer supplémentée en chlorure de potassium (KSW). Malgré l'absence de re-métamorphose, les balles tissulaires obtenues

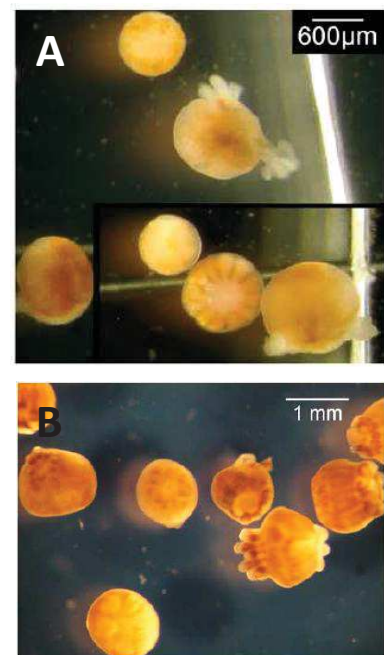


Figure 62 : Balles tissulaires de *Pocillopora damicornis* (A) et de *Stylophora pistillata* (B).
Source : Domart-Coulon *et al.*, 2004.

ont présenté une configuration très proche de celles étudiées par Sammarco (1982), pourvues des filaments mésentériques permettant l'ancrage et laissant même apparaître les tentacules chez *S. pistillata* (Fig. 62) (Domart-Coulon *et al.*, 2004).

V.2. – Etude bibliographique : le chlorure de potassium chez les invertébrés marins

Les étapes, difficiles à obtenir, de la métamorphose et/ou de la fixation décrites chez les Sclérotiniens ne sont pas propres à ces organismes. Ces difficultés sont également observées chez les autres invertébrés marins. Les populations du milieu ambiant telles que la coralline (CCA), certaines micro-algues, des biofilms bactériens, ... sont utilisées comme des inducteurs de la métamorphose et/ou de la fixation.

En 1946, Miller rapporte la métamorphose accélérée des larves du bryozoaire *Bugula sp.* exposées aux ions Cu^{2+} (Miller, 1946). Cependant cet auteur ne décrit pas davantage ce phénomène et s'attache plutôt à exposer l'intérêt des ions métalliques dans les peintures antifouling. C'est une expérience accidentelle qui conduit Lynch (1947) à réaliser une série d'essais dans le but d'induire la métamorphose des larves du bryozoaire *Bugula neritina*. Il observe durant l'été 1944 une métamorphose anormale des larves sur une courte période et à l'occasion d'une salinité fluctuante. Les premières investigations sont donc axées vers l'impact sur la mobilité larvaire d'une eau de mer diluée jusqu'à décrire « *the effects of normal sea water with sea water having a high concentration of only one of the ions* ». Lynch teste ainsi les effets du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du calcium et du chlorure de magnésium sur l'activité ciliaire et sur la métamorphose (Lynch, 1947). En 1949 cet auteur montre l'intérêt des ions lithium et potassium sur la métamorphose de *B. neritina* et de *B. turrita* (Lynch, 1949). Spindler et Müller (1971) induisent la métamorphose des larves de l'hydraire *Hydractinia echinata* sur la base des travaux de Lynch. En plus du rôle des cations, ces auteurs exploitent l'intérêt des bactéries pour induire la métamorphose (Spindler et Müller, 1971).

C'est au début des années 1980 que les investigations sur les processus dictant la métamorphose et la fixation chez les invertébrés marins prennent toute leur ampleur. La diffusion des substances ionisées agissant sur le potentiel membranaire apparaît comme l'une des explications à la métamorphose. L'augmentation de la concentration en ions K^+ va induire une dépolarisation du potentiel membranaire. Le phénomène de dépolarisation serait ainsi responsable de la métamorphose.

L'utilisation du chlorure de potassium (KCl) est privilégiée dans de nombreuses études. Ainsi, sur les Mollusques et en particulier les ormeaux, Balouin et Morse (1984) observent la fixation et la métamorphose des larves d'*Haliotis rufescens* après une exposition à une concentration de 12 mM pendant 20 h. Yool *et al.* (1986) obtiennent sur la même espèce une métamorphose à partir de 10 mM, une concentration de 20 mM à 15 °C devenant cependant toxique pour les larves (Balouin et Morse, 1984). Ces auteurs observent de plus

que la réponse larvaire au potassium peut être inhibée par le tétraéthyl d'ammonium (TEA). Les larves d'*Haliotis discus hannai* se fixent et se métamorphosent pour des concentrations entre 14 et 19 mM (Kang *et al.*, 2004) et avec des valeurs de 10 et 20 mM à 22 °C pour celles d'*Haliotis diversicolor* (Bryan et Qian, 1998). Cependant, des concentrations de 30 et 40 mM induisent un faible taux de métamorphose et deviennent toxiques après 60 h d'exposition (Bryan et Qian, 1998). Yool *et al.* (1986) obtiennent une métamorphose des larves d'*Astraea undosa* pour une concentration à 10 mM et 50 % des larves de *Crepidula fornicata* se métamorphosent en moins de 4 h après exposition à des concentrations de 15 - 20 mM (Pechenik et Heyman, 1987).

Les larves du nudibranche *Phestilla sibogae*, prédateur du Scléactiniaire *Porites compressa* se métamorphosent après 48 h d'exposition à 20 mM de KCl (Hadfield *et al.*, 2000).

Yool *et al.* (1986) s'intéressent aussi aux Annélides et montrent que les larves de *Phragmatopoma californica* s'avèrent plus sensibles avec un taux de métamorphose de 75 % dès 5 mM après 24 h d'exposition. Ils obtiennent également 90 % des larves de *Phestilla sibogae* métamorphosées après 72 h d'exposition à 20 mM de KCl (Yool *et al.*, 1986).

Chez les Echinodermes, une concentration de 40 mM de KCl induit la métamorphose des larves de *Lytechinus variegatus* en l'absence de film microbien. En revanche, en présence d'un biofilm, la même concentration inhibe la métamorphose (Cameron *et al.*, 1989).

L'induction de la métamorphose par l'ion K^+ est dépendante de la concentration mais aussi limitée par la toxicité des fortes concentrations et la durée d'exposition (Baloin et Morse, 1984 ; Yool *et al.*, 1986). Selon Pechenik *et al.* (1995), une exposition de 48 h au KCl permet une réponse maximale. L'obtention de la métamorphose apparaît également fonction de l'espèce (Yool *et al.*, 1986).

D'autres cations peuvent également induire la métamorphose larvaire comme le césium concentré à 60 mM pour *Psaronechinus miliaris* ou à 20 mM pour les larves de *Phestilla sibogae* (Hadfield *et al.*, 2000). Du chlorure ou sulfate de calcium concentrés à 40 mM permettent la métamorphose des larves de *Lytechinus variegatus* (Cameron *et al.*, 1989). Yool *et al.* (1986) observent des métamorphoses des larves de *P. sibogae* pour des expositions au $CaCl_2$ ou au $MgCl_2$ jusqu'à 30 mM mais également avec des excès de NaCl jusqu'à des concentrations de 60 mM. Un excès de magnésium peut toutefois inhiber la métamorphose (Cameron *et al.*, 1989). Kang *et al.* (2004) induisent la fixation et la métamorphose des larves d'*Haliotis discus hannai* pour de concentrations jusqu'à 600 mg/L en bromométhane. Enfin, Pechenik et Heyman (1987) n'obtiennent pas de métamorphose de *C. fornicata* après des expositions au $CaCl_2$ (20 mM) et au NaCl (10 - 20 mM).

Outre l'induction de la métamorphose et de la fixation, le KCl est également utilisé pour provoquer l'émission des gamètes de certains Echinidés. Dunn et McLachlan (1972) induisent la ponte de *Strongylocentrotus dröbachiensis* en injectant 0.50 M de KCl selon le protocole de Stephens (1972). George *et al.* (2000) provoquent la ponte de *Lyrechinus variegatus* en injectant 2 ml de KCl à 0.55 M. Vivek Raja, (1982) utilise des concentrations de 0.53 M.

Enfin, sur les Scléactiniaires, Morse *et al.* (1988) n'obtiennent pas de métamorphose des larves d'*Agaricia* spp. après exposition à des concentrations de KCl de 10 à 50 mM. Cependant, le KCl présente encore un plus grand intérêt chez les Cnidaires pour l'utilisation qui en est faite comme milieu de dissociation cellulaire. Si la dissociation mécanique des Hydrozoaires était effective dès les années 1920, les travaux de Gierer (1972) constituent les premières démarches de dissociation chimique utilisant une solution de KCl. Les capacités de régénération exceptionnelles des Hydrozoaires à partir d'aggrégats cellulaires ont été par la suite largement étudiées (Fig. 63) sur différentes espèces telles que l'hydre d'eau douce *Hydra attenuata* (Gierer, 1972) mais aussi sur *Hydra vulgaris* (Weber, 1995) ou *Hydra echinata* (Spindler et Muller, 1972 ; Walther *et al.*, 1996).

Metamorphosis inducible by	Reference
<i>Alteromonas</i> -lipid	Spindler and Müller, 1972
1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycerol (DAG)	Leitz and Müller, 1987
not by: 1-oleyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol (OAG)	Müller, 1985
phorbol esters: TPA, PDB, RPA, EPA, PDD	Müller, 1985
not by: methyl-TPA	
vanadate	Leitz and Wirth, 1991
not by: InsP ₃	Leitz and Müller, 1987
not by: Ca ²⁺	Freeman and Ridgway, 1987
Li ⁺ , K ⁺	Spindler and Müller, 1972
Cs ⁺ , Rb ⁺	Müller and Buchal, 1973
NH ₄ ⁺ , methylamin	Berling, 1988b
tetraethylammonium (TEA ⁺)	
Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , amiloride	
Mg ²⁺ -deficiency	Müller, 1985
temperature shift	Kroiher <i>et al.</i> , 1992
methylglyoxal-bis-(guanylylhydrazone) (MGBG)	present paper

Figure 63 : Stratégies pour induire la métamorphose des Hydrozoaires.
Source : Walther *et al.*, 1996.

Cette étude rapide permet d'entrevoir les différentes utilisations du KCl dans l'étude des invertébrés marins. A la lumière des concentrations et des temps d'exposition précédemment cités, les valeurs utilisées par Domart-Coulon *et al.* (2004) apparaissent dans la continuité des autres études. Ainsi, ces auteurs ont pu obtenir l'expulsion des balles tissulaires de *P. damicornis* et de *S. pistillata* en soumettant les microcolonies à des solutions de KSW concentrées de 10 à 24 mM pendant 48 h. Après l'exposition au KSW, ces microcolonies ont été transférées pendant 24 h dans du FSW jusqu'à l'obtention et le détachement du squelette des balles tissulaires.

V.3. - Le choix des traitements

L'utilisation du KCl décrite par Domart-Coulon *et al.* (2004) a été retenue comme alternative à l'approche mécanique. Ce protocole apparaît intéressant pour l'obtention rapide des balles tissulaires issues des polypes et pour la récupération de la totalité du tissu corallien après extraction.

Bien que nous ne puissions directement comparer les balles tissulaires à des planulae, les travaux de Hagedorn *et al.* (2006) nous révèlent que le glycérol concentré à 1.5 M ne remplace que 27 % du volume larvaire des planulae de *P. damicornis* après 4 h d'exposition à 20 °C (Hagedorn *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, la taille importante des planulae de *P. damicornis* serait en cause et pourrait être un frein à leur cryoconservation. Les balles tissulaires apporteraient dans ce contexte une alternative grâce à leur taille plus réduite. Nous avons ainsi choisi dans ce chapitre de tester la tolérance des balles tissulaires de *P. damicornis* à une exposition à quatre CPA, pour des temps d'expositions supérieurs à 20 min.

Enfin, nous avons également choisi d'utiliser trois colorations vitales, le BT (bleu de toluidine), le DAPI (ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole) et le PAS-NBB (ou Periodic Acid Schiff's–Naphtol Blue-Black) afin d'évaluer la viabilité des balles tissulaires après traitement.

V.4. - Tolérance des balles tissulaires aux solutions cryoprotectrices

Feuillassier, L., Collin, M., Trouillard, T., Masanet, P., Romans, P., Barthélémy, D., & Engelmann, F. (2014). Exposure of tissue balls of the coral *Pocillopora damicornis* to cryoprotectant solutions: histological study, *in preparation*.

Exposure of Tissue Balls of the Coral *Pocillopora damicornis* to Cryoprotectant Solutions: Histological Study

Tissue Balls and Cryoprotectant Solutions

Lionel Feuillassier^{1, 2}, Myriam Collin¹, Nancy Trouillard², Patrick Masanet³, Pascal Romans², Dominique Barthélémy⁴, Florent Engelmann^{1*}

¹ Institute for Development Research, Joint Research Unit Plant Diversity Adaptation and Development, Montpellier, France

² Sorbonne Universities, Pierre and Marie Curie University Paris 06, Joint Service Unit 2348, Marine Biological Resource Centre, Oceanological Observatory, Banyuls/Mer, France

³ Aquarium de Canet-en-Roussillon, Canet-en-Roussillon, France

⁴ Océanopolis, Brest, France

* florent.engelmann@ird.fr (FE)

Abstract

In this work, we studied the impact of exposure to individual cryoprotectant (CPA) solutions on tissue balls (TBs) from the tropical coral *Pocillopora damicornis* using macroscopic and histological examination. TBs were produced using exposure to artificial sea water supplemented with potassium chloride (KSW). TBs were exposed for 20 to 180 min to solutions containing ethylene glycol (EG), glycerol (Gly), methanol (Met) or dimethylsulfoxide (Me₂SO) at concentrations between 1.0 M - 4.0 M. Macroscopic analysis of CPA treatment effect was measured using Tissue Ball Regression (expressed in $\mu\text{m}/\text{h}$), which recorded the diameter regression of TBs over time, Circularity of TBs, which described TB deformations over time and survival time of TBs (h), which allowed evaluating the structural integrity of TBs over time until TB disruption. Three staining techniques, toluidine blue (BT), DAPI and periodic acid-Schiff-naphtol blue black (NBB) were used to study the effect of CPA treatment on the histological structure of TBs. The thickness of the ectoderm and of the central mass were measured and the size of different cell types was compared with untreated controls. The TBs produced using KSW treatment were well structured, with an ectoderm and a central mass separated by a mesoglea. In some TBs, the marginal part of the central mass, similar to an endoderm, contained cells with a high zooxanthellae concentration and ciliated cells. Histological and macroscopic observations showed that treatment with a EG solution was better tolerated by TBs, compared to other CPA solutions. The ectodermal cell layer constituted a barrier protecting the central mass. This study showed the importance of preserving the cell junctions of epithelial cells of the ectoderm to maintain the integrity of TBs.

Keywords: Tissue balls, Cryopreservation, Histology, Ectoderm, Mesoglea, Central Mass, Cells.

Introduction

Direct or indirect anthropogenic pressures including pollution (pesticides, herbicides, fertilizers, oils), ore mining, degradations, sampling, over-fishing and tourism strongly affect coral reefs [10]. At the beginning of 2015, a short note revealed the same rates of plankton capture and of microplastic ingestion by Scleractinian [26]. Further studies will be needed to evaluate the impact of microplastic ingestion on corals. The frequency and intensity of natural events such as the cyclone Pam which devastated the Vanuatu islands in March 2015 have increased over the last decades and affect coral stability [10,28,29]. Moreover, the increasing concentration of atmospheric carbon dioxide enhances ocean acidification, thereby limiting calcification of calcifying organisms [27]. Finally, biota which show narrow thermal limits are threatened by global warming [28]. Despite the hypothesis that some coral species may evolve when confronted to deteriorations of their living conditions, other stenoece coral species are highly threatened and show elevated risks of extinction [6,29]. However, the numerous safeguard messages sent by the scientific community to improve protection of coral reefs, indicate their pessimism regarding reef future [10,28,29,46].

The importance of coral for ecological services such as nursery grounds for fish, fish habitat, preservation of marine biodiversity and also for human services such as food and other resources, protection of islands, beaches and coast lines, and tourism activities is well known. Yet, the potential of corals for the development of new medicinal molecules is considerable compared with terrestrial plant resources [4,8]. For example, anti-HIV proteins from corals termed Cnidarins are currently being tested to prevent infection [45] and new molecules to combat cancer, leukemia and tumours are being developed from coral species [4,9]. In addition, coral skeleton represents an interesting material for dental implants [40]. This alarming and paradoxical situation demonstrates the need to develop urgent actions to safeguard this threatened genetic and medicinal patrimony. Cryopreservation (liquid nitrogen, -196°C) constitutes a good strategy to ensure the long-term *ex situ* conservation of threatened or endangered plant and animal species, including marine organisms [3,12,16,35,37].

Cryopreservation of Scleractinian has been investigated using different biomaterials such as gametes [25,36,43,47], *Symbiodinium* sp and isolated embryogenic cells [21,22,23,25] and more complex structures including apexes, planulae and tissue balls (TBs) [13,14,15,24]. To date, only spermatozoa, oocytes and dissociated cells have been successfully cryopreserved [25,43,48] while complex forms did not withstand liquid nitrogen (LN) exposure [20]. Among the existing cryopreservation techniques, vitrification may constitute an alternative for the cryopreservation of species which are sensitive to slow cooling procedures [7,30,33]. However, due to the high toxicity and the high concentration of the cryoprotectants (CPAs) employed in vitrification protocols, the tolerance of biomaterials to CPA exposure must be evaluated.

The first tests of TB tolerance to individual, binary, ternary or quaternary CPA solutions showed promising results [13,15]. To date, *P. damicornis* TBs tolerated exposure for 5 min to a 4.5 M CPA solution following a stepwise increase in the CPA concentration [15]. The best tolerated CPA solutions included an individual solution of ethylene glycol (EG) and combinations of EG + glycerol (Gly) or EG + methanol (Met). However, despite these promising results, the CPA concentrations required to achieve vitrification upon cooling were not reached.

An advantage of TBs is that they can be produced in large quantities at any time from the same biological sample, thus facilitating the implementation of the numerous tests required for the establishment of a cryopreservation protocol [13]. In our first experiments with *Pocillopora damicornis*, we used mechanical excision of TBs from coral branches with a scalpel [13,15]. Although

TBs were produced in large numbers, this technique was time-consuming and the development of TBs in polyps was not obtained, in contrast with the good results observed on *Fungia granulosa* [32,51]. We therefore decided to investigate the TB production technique developed by Domart-Coulon *et al.* (2004), which uses a chemical protocol on branches from *Stylophora pistillata* and *P. damicornis* [11]. Accordingly, TBs were produced following exposure of coral branches to sea water supplemented with potassium chloride (KSW) for 48 h. KSW has been investigated to improve larval settlement and metamorphosis of benthic invertebrates such as Mollusc and Echinoderm species [1,5,18,31].

The aim of the present study was to observe the effect of exposure to individual CPA solutions on the survival and histological organization of *P. damicornis* TBs. TBs were exposed to four CPAs, EG, Gly, Met and dimethylsulfoxide (Me₂SO), with concentrations ranging from 1.0 M to 4.0 M and for exposure times between 20 min and 3 h. Tolerance to CPA treatment was evaluated by measuring the diameter regression of TBs [13], the TB circularity and their survival time over time [13]. TB Regression measured the size reduction of TBs after CPA treatment and over time; TB survival quantified the proportion of TBs, which conserved an intact appearance over time following CPA exposure; circularity informed on the deformation of spheroid TBs after CPA exposure and over time. Histological studies allowed to describe the cellular structure of TBs and to observe cell viability after CPA treatment.

Materials and Methods

Biological material

Colonies of the Scleractinian *P. damicornis* (L. 1758) were provided from the Aquarium of Canet en Roussillon, France (branches resulting from fragmentations on CITES number: O3584). Experiments were performed at the Oceanological Observatory, Pierre et Marie Curie University, Banyuls/mer, France. Prior to experiments, corals were stalled for 1 month in a 230 L holding tank filled with Artificial Seawater (ASW: Reef Crystal salt, Aquarium System label; Ca²⁺: 420 ppm; Mg²⁺: 1300 ppm; KH ≈ 7; pH: 8.3) under the cultural conditions selected by Feuillassier *et al.* (temperature: 25°C; salinity: 35; pH: 8.3; PAR: 170 μmol m⁻² s⁻¹) [13].

Tissue ball production

TBs were prepared according to Domart-Coulon *et al.* (2004). Coral branches were placed for 48 h in 200 ml 24 h aged-Artificial Seawater (24 h-ASW) supplemented with KCl (KSW, pH: 8.3, temperature: 25°C, PAR= 170 μmol m⁻² s⁻¹, light/dark cycle: 12 h/12 h) and under bubbling air. KSW was replaced daily using a clean beaker. KCl (CARLO ERBA, ACS-ISO-For analysis, Assay on dry: 99.0-100%) was used at the concentration of 20 mM [5,11].

Detached TBs were collected and rinsed five times with 24 h-ASW (temperature: 25°C) (Fig 1E). To prevent the occurrence of fusion events between TBs (Fig 1D), these explants were isolated individually in wells of multiple well cluster plates for cell culture (CORNING, TC-Treated, Sterile) containing 3 ml fresh 24h-ASW.

CPA treatments

The CPAs tested were Me₂SO (VWR, analytical reagent, assay: 99.7%), Gly (CARLO ERBA, ACS-for analysis, assay: 99.5%), EG (VWR, AnalaR NORMAPUR, assay: 100%) and Met (SIGMA–ALDRICH, ACS-reagent, assay: 99.8%). CPA stock solutions were diluted by adding 24h-ASW (pH: 8.4) to obtain the final concentrations tested in each experiment. Before use, CPA solutions were stored at -80°C.

TBs were exposed at RT for 20 min to 3 h to CPA solutions at concentrations from 1.0 M to 4.0 M (1.5 ml CPA/TB). After CPA treatment, TBs were rinsed three times with 24 h-ASW and placed in an incubator (temperature: 25 ± 1°C, hygrometry: 100%; light intensity: 20 μmol m⁻² s⁻¹) in 2.5 ml 24h-ASW, which were replaced daily at the time of photographic monitoring. Each experimental condition included 30 TBs treated with the CPA solutions and 30 untreated controls.

Macroscopic analyses of CPA treatment effect

Control

To evaluate the efficacy of KCl supplementation on TB production, control TBs were distributed in nine classes depending on their diameter (Table 1). The number of TBs produced and their survival (in h) were measured for each class.

Treatment effect

Photographs of all TBs were taken daily until TB disruption using a photographic monitoring device (MOTIC 257 SMZ-168-TLED coupled with a numeric camera MOTICAM 580 SM7619-MG4EX-RPFWFT). Three parameters were measured over time:

- The Tissue Ball Regression corresponded to the size reduction of TBs over time [38]. To calculate Tissue Ball Regression (expressed in μm/h), the diameter of TBs was measured every 24 h until disruption.
- The survival time of TBs (h), allowed evaluating the structural integrity of TBs over time until TB disruption. The survival time was evaluated using macroscopic observation of the structural integrity, of the rotary movement and of the smooth aspect of the surface of TBs.
- The Circularity of TBs was calculated using the evolution over time of the spherical shape of TBs. A perfect spherical shape corresponded to circularity value equal to 1.0. Inversely, deformed TBs had a circularity value equal to 0.0. This parameter was employed to follow the impact of CPA treatment on TB deformation over time (Fig 1F-M).

The Tissue Ball Regression and TB Circularity were measured using the ImageJ 1.48v software developed by the National Institute of Health, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). High TB Regression values, low survival time values and TB Circularity close to 0.0 indicated low tolerance of TBs to CPA treatment.

Histology

Histological preparations

Histological experiments were performed in the Institute for Development Research, Montpellier, France. TB samples were fixed immediately after CPA treatment with a fixative solution at 4°C for 3 days in the dark. The experimental conditions studied consisted of treatment with 1.5 or 3.0 M Gly, EG, Me₂SO or Meth for 20 or 60 min. The fixative solution was replaced daily to limit precipitation. The fixation protocol employed used a solution composed by adding 2% paraformaldehyde and 1.5% glutaraldehyde to a 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7), supplemented with 1% caffeine and completed to 100% with CPA volume. After 3 days of fixation, the fixative solution was removed and the TBs were washed twice for 1 h in 30% ethanol at RT. TBs were then dehydrated at RT through a graded ethanol series (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) with changes every 1 h. TBs were immersed one last time in 100% ethanol for 1 h and then placed overnight at 4°C in a mixture (v/v) of 100% ethanol and hydrophobic resin (Technovit[®] 7100, Kulzer, VWR). Dehydrated TBs were then immersed in pure resin for 24 h with renewal of the resin after 4 and 8 h. The resin was then replaced with resin hardener for 12 h at RT. All resin blocks containing TBs were cut in 3 µm thick sections with a rotary microtome (HM 355S Microm GMBH, Thermo Scientific) and placed on standard microscope slides.

For histological staining, only slides containing the largest TB sections were chosen. Embedded TBs were treated with three histological staining solutions:

- TBs were exposed to 0.1% toluidin blue (BT, 15930, Merck) in 0.1% sodium tetraborate (B715209, Merck) for 3 min at RT. Slides were rapidly washed and dried at RT. BT staining showed cytoplasm and conjunctive structures, especially amyloid elements.
- DAPI staining was performed with Fluoromount-DAPI (0100-20, Clinisciences). DNA from living and dead cells was revealed using DAPI.
- Sections were double stained using periodic acid-Schiff's reagent (PAS, Sigma-Aldrich, Lyon, France) and naphthol blue-black (NBB, Sigma-Aldrich) according to Buffard-Morel *et al.* (1992) and Fischer (1968). This treatment stained polysaccharides in dark pink (by PAS) and soluble proteins in blue (by NBB).

Histological observations

Histological preparations were analyzed with an optical microscope (Leica Lentz DMRB 301-371) coupled with a numeric camera (Evolution MP 5.0 color Media Cybernetics Cooled RTV 32-0040C-140). Observations were performed at x 50 to x 1000 and fluorescence with DAPI was obtained using a UV lamp ($\lambda = 455 \pm 25$ nm, excitation $\lambda = 345$ nm). Photographs were taken with the QCapture Pro 7 software (Scop Pro, 2011).

TBs are organized in two main compartments, the ectoderm (Ect) and the central mass (CM), both containing specific cell types such as interstitial cells, epithelial and ciliated cells, zooxanthellae

and microbasic mastigophores (nematocytes). The maximal length of each cell type was measured on 5 TBs x 30 cells per CPA treatment. The thickness of each layer was used to establish the ratio Ect/LT (LT: Total length of TB in μm) using the ImageJ 1.48v software. In addition, the impact of the CPA treatment on Ect and CM was followed by observing the hypertonic/hypotonic state of cells, by comparing organelle staining with NBB, BT and DAPI in treated and control samples. The integrity of Ect and CM was evaluated using the following scale (Fig 2E):

Ect	CM
0 = absence of Ect	0 = absence of CM
1 = some Ect pieces around CM	1 = some CM agglomerates with large extracellular spaces
2 = Ect surrounding CM. Ect showing cellular disorganization	2 = dense CM with some extracellular spaces
3 = Ect organization similar to control	3 = CM organization similar to control

Data analysis

All analyses were carried out using the R software (R Foundation for Statistical Computing, 2007) and data were structured using Microsoft Excel (version 2007) or the R software. The treatment effect was verified on the basis of the differences between treated samples and untreated controls. Principal components analysis (PCA) was conducted to order TB tolerance using the quantitative variables of CPA treatments and to transcribe histological differences between CPA treatments. Data were centered by CPA treatment and vector overlays represented correlations between ordination axes and conditions during CPA treatments.

Results

Controls

The minimal diameter of TBs was 110 μm and their maximal diameter 1630 μm (Fig 4). The largest number of TBs was found in class 4 (TB diameter between 600 μm and 760 μm). The highest survival was found with class 5 TBs (760 μm - 920 μm), which corresponded to an average survival of 132 h ($5^{1/2}$ days) (Fig 4). The lowest average survival ($\sim 3^{1/2}$ days) was recorded for TBs of classes 8 and 9, which had a diameter > 1240 μm .

Survival time of TBs and TB Regression of classes 4-5 and 8-9 were compared over a 432 h (18 days) period (Fig 5). They followed the same trends over the first 96 h. Class 8-9 TBs did not survive more than 120 h (5 days). Survival of class 4-5 TBs was up to 71% at 72 h (3 days). For this class, 12% survival was recorded at 192 h and 1% TBs conserved their motility and smooth surface until 312 h (13 days). Several TBs survived up to 408 h (17 days).

For these two classes, the diameter regression values were higher between 24 and 72 h compared to longer durations following treatment. Moreover, class 8-9 TBs showed higher diameter regression for all durations following treatment compared to class 4-5 TBs. During the first 72 h, diameter regression was $5.05 \pm 1.12 \mu\text{m/h}$ for class 4-5 TBs compared to $1.10 \pm 1.02 \mu\text{m/h}$ for longer durations following treatment. With class 8-9 TBs, diameter regression was $13.83 \pm 7.49 \mu\text{m/h}$ for 24-72 h and $7.48 \pm 5.53 \mu\text{m/h}$ for longer durations after treatment.

Treatment effect

The Principal Components Analysis (PCA) of the quantitative variables of CPA treatments showed that PCA1 and PCA2 axes summarized 86.7% of the total variation observed (Fig 6A). There was a positive correlation between TB Regression values and CPA concentration. By contrast, negative correlations were noted between CPA concentration and survival time and between TB Regression and survival. Circularity of TBs was constant and was not correlated with CPA concentration or survival time. Some abnormalities in the shape of TBs were observed after CPA treatment, without significant correlations with CPA concentration and exposure time (Fig 1F-M).

With all four CPAs tested, TBs displayed low tolerance to treatments over 30 min with 3.0 M CPA solutions and over 20 min with 4.0 M CPA solutions (Fig 6B). The highest TB tolerances were recorded following treatment with the four CPA solutions at 1.0 M to 2.0 M concentration (Fig 6B). Significant differences in TB regression were noted between the four CPAs tested. Treatment with EG induced lower TB regression and higher survival times compared with the other CPAs. TB regression and survival values obtained following treatment with EG were the closest to those recorded with controls (Fig 6C). They were intermediate and similar following treatment with Met and Me₂SO. TBs showed the lowest tolerance to Gly treatments (Fig 6B-C).

Histological study of TBs

Control

Control TBs had a rounded shape with a smooth surface displaying a large ciliated coverage inducing rapid rotations (Fig 1C). Mesenterial filaments were observed on the external surface of TBs with their characteristic translucent folds. Zero to four mesenterial filaments per TB were observed (Fig 1A-B). These filaments showed high adhesiveness to the bottom of the multiple well cluster plates in which TBs were maintained. Histological examination of TBs revealed that the central mass (CM) was thicker than the ectoderm (Ect), with average values of $565.9 \pm 86.4 \mu\text{m}$ and $43.9 \pm 10.2 \mu\text{m}$ for CM and Ect, respectively (Fig 2F). The thickness of Ect decreased over time (data not shown). The CM/Ect ratio of TBs was comparable for all size classes.

The Ect and CM compartments were different in terms of cellular composition and organization (Fig 2A & G). The Ect presented tightly packed cells, whereas they were more dispersed in the CM. The Ect comprised a large quantity of elongated epithelial and ciliated cells (length of cells $\sim 35 \mu\text{m}$ and $\sim 9 \mu\text{m}$ for cilia) (Fig 2A & D). NBB staining revealed abundant vesicles with a proteic content in these cells and proteic granules of various sizes in secretory cells. Elongated mucocytes were also observed (Fig 2D). Some small nematocysts were observed in the Ect, mainly represented

by basitrichous isorhizes (length $\sim 15 \mu\text{m}$) with a long basis supporting an urticant filament and an elongated capsule (Fig 2C). Moreover, numerous interstitial cells with their nuclei stained in blue (length $\sim 4 \mu\text{m}$) were noted in the basal part of the Ect (Fig 2A, C & D).

A large number of zooxanthellae were observed in the CM. They were more numerous in the CM external zone than in its centre (Fig 2F/G). Zooxanthellae had a circular section, with an average diameter of $10.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$ (Fig 2B, I, J & M). They were sequestered in large vacuoles of myoepithelial cells. Their nucleus, located in the central part of the cell, was stained in blue due to the presence of proteins. Blue spots revealed condensed chromosomes. Despite its off-centered location, the pyrenoid structure was located close to the nucleus. It had a light pink staining revealing carbohydrate production. The pyrenoid was surrounded by a starch sheath, which appeared with an intense dark purple staining (Fig 2H/J/M). A mixture of blue and pink vesicles was observed around the nucleus and dispersed throughout the cytoplasm. These reserve globules had a carbohydrate, proteic or enzymatic content (Fig 2J & M). Chloroplasts, recognizable due to their light green colour, were densely distributed at the periphery of cells (Fig 2I). Some zooxanthellae were surrounded by a plasmalemma composed of thecal plates (Fig 2J). These thecal plates were stained in blue. Other zooxanthellae were surrounded by pink plasmalemma due to the presence of cellulose (Fig 2I). Some large cells underwent cellular division, revealed by their binary fission into two daughter-cells (Fig 2H). Large pieces of tentacle and mesenterial filament composed the CM (Fig 2G & K), including epithelial and interstitial cells, secretory cells with proteic contents revealed by the presence of blue granules and other granular cell types (Fig 2K & N). Two types of nematocysts were represented, spirocysts with their characteristic thread without spines and spiral arrangement ($\sim 18 \mu\text{m}$) (Fig 2B) and type 1 microbasic p-mastigophores (Fig 2K, L & N). These mastigophores presented an oval-shaped capsule and an urticant filament with a terminal tubule. The length of the thread base ($\sim 14 \mu\text{m}$) was equal to or greater than half the capsule length. The capsule was approximately $23 \mu\text{m}$ long and $5 \mu\text{m}$ wide (Fig 2K & N; Fig 3F). Large numbers of type 1 microbasic p-mastigophores were observed in mesenterial filaments. The nematocysts were concentrated at the extremity of mesenterial filaments, termed acontium (Fig 2K). Acontia also included epithelial cells with cilia, secretory cells and interstitial cells (Fig 2K).

A continuous space devoid of cells was noted between the Ect and CM. This space was identified as a mesoglea comparable to those observed in planulae and coral tissue. In some cases, the mesoglea displayed large expansions but it was invisible or missing in other cases (Fig 2A). In some TBs, the external zone of the CM close to the mesoglea, similar to an endodermal layer, had a high zooxanthellae concentration and some ciliated cells facing the centre of the CM (Fig 2E & G). Cells of the external zone of the CM were clearly separated by large extracellular spaces from the cell content concentrated in the CM centre (Fig 2E).

Observations following CPA treatments

Treatment with 1.5 M CPA solutions for 20 min and 60 min:

Histological observations confirmed the tolerance of TBs to exposure for 20 min to CPA solutions containing 1.5 M EG, Met or Me_2SO . No differences in histological structure of treated TBs were observed compared with untreated controls. The structural cohesion of Ect cells was preserved, without the appearance of extracellular spaces, of deformed cells or of perturbations in cellular arrangement. DAPI staining revealed the compact cell structure of Ect, with a large number of

interstitial cells (Fig 3A & D). The average cell diameter was similar between treated and untreated TBs. Interstitial cells kept their basal position in Ect. Cilia remained long and abundant. The mesoglea was preserved; it clearly separated the Ect and CM compartments. Zooxanthellae, which were concentrated in the CM, conserved their spherical shape and their structure was undamaged. Pyrenoid, chloroplast, nucleus, starch and protein globules showed similar staining with NBB and BT compared to controls. Nuclei appeared highly fluorescent with DAPI staining (Fig 3D-G). Most TBs treated with Gly had a similar appearance compared to those treated with the other CPAs tested. However, some TBs displayed modifications in Ect cellular organization. Epithelial cells were absent or invisible. Other cell types were highly disorganized and displayed a spherical shape similar to that of hypotonic cells (Fig 3I). In the CM, the cell content remained generally unchanged despite some modifications in the appearance of zooxanthellae. Indeed, some of the symbionts had lost their spherical shape and were restricted in larger cytoplasm than controls (Fig 3O).

TBs treated with EG or Met for up to 60 min had the same structural appearance. By contrast, TBs treated with 1.5 M Me₂SO for 60 min showed structural differences compared with other CPA treatments. Globally, the ectoderm and CM were distinctly separated by the mesoglea and their respective thickness and structure were conserved. However, some zooxanthellae in CM had a smaller size or non spherical shape (Fig 3O). Extending the duration of exposure of TBs to 1.5 M Gly to 60 min resulted in an increase in structural modifications in Ect. Some TBs conserved joint cells but cells had a round appearance (Fig 3I). Epithelial cells were devoid of cilia and they became difficult to identify. Interstitial cells were still close to the basal part of the Ect base but they had a larger diameter. Some zooxanthellae were mixed with Ect cells, thereby revealing CM damage (Fig 3I). In other parts of the Ect, all cells were disjointed and had a spherical aspect. CM cells conserved their shape and the CM kept its compact appearance.

Treatment with 3.0 M CPA solutions for 20 min and 60 min:

No modifications were noted in the organization of CM and Ect in TBs exposed to 3.0 M EG for 20 min. Cells of these two compartments displayed an undamaged appearance and were similar to those of control TBs. NBB and BT staining revealed the similarity in organelle distribution compared to controls. Long cilia were visible on the Ect surface and cell arrangement was preserved.

Similar histological observations were made in TBs treated with Met, Me₂SO or Gly for 60 min. The Ect was highly damaged. It was either absent or only visible through some cellular aggregates along the CM (Fig 3I & J). Interstitial cells represented a large part of remaining Ect cells. After the Gly treatment, cells were swollen with a rounded shape evoking an hypotonic state (Fig 3I). Inversely, following Me₂SO treatment, the restricted size of interstitial cells showing a shrunken and shrivelled appearance suggested an hypertonic state (Fig 3N). Ectodermal cells were mixed with CM cells including zooxanthellae, secretory cells and mastigophores. CM cells remained unchanged. NBB and BT staining revealed the pyrenoid, nucleus, starch and protein vesicles and chloroplasts in spherical zooxanthellae, secretory cells with proteic granules in blue and elongated nematocysts with ultrastructure containing a blue thread and basal shaft. DAPI staining following Me₂SO or Met treatment for 60 min revealed TBs without Ect layer but with a consistent fluorescence in CM cells (Fig 3B). After Gly treatment, CM cells had a low fluorescence and the Ect was not visible. Cellular disturbance in TBs was higher following Gly treatment compared to Me₂SO or Met.

TBs with highly disturbed, but continuous, Ect were observed only following treatment with EG for 60 min. The Ect thickness varied throughout the TB perimeter. Cilia of epithelial cells were

absent or shorter compared to controls. Despite the presence of all cell types in the Ect layer, the cellular organization was disturbed. BT staining allowed observing the migration of proteic vesicles towards the Ect surface. Moreover, extracellular spaces were noted in Ect and CM (Fig 3H).

For other CPA treatments, extensive cellular perturbations in Ect and CM were noted. Ect cells were absent or concentrated in aggregates and had a round shape. The majority of CM cells were not deformed and NBB staining allowed observing their organelles. However, some discharged mastigophores were noted in these cells (Fig 3M); migration of vesicles in the apical part of cells was recorded, especially following Met treatment (Fig 3L) and large extracellular spaces were observed without connections between cells (Fig 3K).

Synthesis of the histological study

Increasing CPA concentrations and TB exposure durations increased changes in cellular organization in Ect and CM (Fig 7A). The length of cilia of epithelial cells and the integrity of Ect and CM were negatively correlated with an increase in CPA concentration. An increase in CPA concentration appeared more harmful for cilia compared to an increase in treatment duration. Inversely, the length of interstitial cells was positively correlated with an increase of the treatment duration. The evolution of Ect and CM thickness was not similar and revealed the differences in reaction to CPA treatment of these two compartments. Ect thickness was negatively correlated with increasing exposure duration. Inversely, CM thickness increased with increasing exposure duration. These observations revealed that following CPA treatment, damage was first observed on Ect.

Similarly to the results obtained with TB Regression, survival time of TBs and TB circularity, differences between CPA treatments were recorded using an histological approach (Fig 7B). Preservation of cellular integrity and of Ect and CM structure was best achieved following EG treatment (Fig 7B). Treatments with Met and Me₂SO had disruptive effects on TBs. CPA solutions containing Gly were less tolerated by TBs (Fig 7B).

Discussion

Macroscopic observations and histological examinations were performed in this study to describe the impact of CPA treatments on *P. damicornis* TBs. The highest tolerance was noted after exposure of TBs to EG treatment. Met and Me₂SO exposure induced similar impacts on TB structure. Gly was the least tolerated by TBs and induced the highest damage on cellular organization. Tolerance to CPA solutions of TBs produced using KSW was similar to that of TBs produced using mechanical excision [13]. However, our results demonstrated the ability of TBs to withstand exposure to CPA solutions with a 2.0 M concentration for extended durations. Except in case of EG, CPA concentrations of 3.0 M were not tolerated by TBs for exposure durations over 20 min. These results confirmed the need to use CPA mixtures instead of individual CPA solutions at molarities over 2.0 M [15]. TBs remained motile only during treatment with 1.5 M EG. Interestingly, TBs lost their motility during exposure to 1.0 M Gly, while swimming larvae were observed by Hagedorn *et al.* (2006) at the same concentration [20].

Histological observations following treatments

Our histological observations revealed the importance of the Ect to protect the CM during CPA treatment. The occurrence of cellular damage in Ect induced immediate TB disruption and irreversible cellular dispersion of the CM. Epithelial and/or secretory cells were the most sensitive compared with other cells types. Variations in cilia length and the absence or presence of TB ciliature constituted accessible and immediate information to evaluate the level of TB tolerance to CPA treatments. In most cases, damaging treatments could be identified through the disappearance of many elongated and epithelial cells, which constituted a large part of the Ect of healthy TBs. Only interstitial cells remained visible. Gierer *et al.* (1972) revealed that epithelial cells allowed cellular reaggregation after mechanical disruption of *Hydra attenuata* tissues [19]. Epithelial cells can represent up to 30% of the cellular content of *H. attenuata*. In *P. damicornis* TBs, epithelial cells appeared sensitive to treatments with high CPA concentration and their absence impeded cellular aggregation. The cellular cohesion of the Ect depended on the distribution of epithelial cells. Further investigations on CPA treatments should take into account the importance of epithelial cells to ensure TB survival. Discharged nematocysts were noted in the CM of TBs exposed to CPA treatments up to 60 min. The discharge of nematocytes in acontia of *Calliactis parasitica* following osmotic shock was reported by Salleo *et al.* (1994). The cell swelling noted by Morabito *et al.* (2014) in *Pelagia noctiluca* nematocysts following hypotonic treatment was not observed in this study [41]. Following some CPA treatments (e.g. with Me₂SO and Gly), the vacuolisation of endodermal cells containing zooxanthellae was visible. Deformed zooxanthellae were also observed by Brown *et al.* (1995) in six Scleractinian species exposed to high seawater temperatures. Degraded TBs after CPA treatment (particularly after exposure to Gly solutions) displayed ectodermal cells showing a rounded shape, suggesting their hypotonic state. Shrivelled interstitial cells were noted following 3.0 M Me₂SO exposure for up to 60 min. These observations suggest a strong effect of Me₂SO on cell membranes for exposure durations up to 60 min. Pincet *et al.* (1994) indicated that Me₂SO could have an effect on the elastic properties of the membrane bilayers [44]. Inversely, the increase in cellular volume observed after CPA treatment reflected the high sensitivity of cells to the rinsing step. An hypotonic shock was induced in TBs, particularly after treatment with 3.0 M CPA solutions. An hypotonic state was also observed in TBs after treatment with 1.5 M Gly for 60 min. Gly has the highest molecular weight compared with Me₂SO, EG or Met. Gly may thus have a lower rate of diffusion and TBs may require a longer rinsing step to eliminate Gly to avoid hypotonic damage. Too short a rinsing step after CPA treatment may lead to an increase in cell volume. With *Aiptasia mutabilis*, Marino and La Spada (2007) reported that isolated nematocytes regulated their volume under hypotonic and hypertonic conditions [39]. These authors noted that retrieval of the initial cell volume after treatment with 20 μM Gd³⁺ or 50 μM Trifluoperazine required 15 to 20 min. Morabito *et al.* (2014) used non necrotic doses of crude venom inducing hypotonic shock of isolated *Pelagia noctiluca* nematocytes. In these experiments, volume regulation of treated cells was comparable to untreated nematocytes. Cytoskeleton rearrangement during hypotonic shock is essential to maintain cell viability [39]. In future experiments with *P. damicornis* TBs, a stepwise decrease in CPA concentration should be performed in order to reduce osmotic shock. In addition, investigations should be carried out to observe the impact of CPA treatments on the cytoskeleton.

Comparisons of results with other histological studies

The histological study of TB tolerance to CPA treatments was performed using staining techniques, which are commonly employed on corals, such as DAPI and Toluidin Blue. By contrast, NBB has not been used to describe coral structures. This technique has been largely used to describe ultrastructural changes in plant tissues following cryopreservation [2,50]. In this study, NBB staining facilitated cellular description, allowing to distinguish vesicle contents and cilia on TB surface. Based on differences in colour of the cell contents between treatments, this technique also allows to follow biochemical modifications in cells.

TBs obtained from *Fungia granulosa* displayed an ectodermic layer [17,32,51]. In study, the ectodermic layer was composed of elongated epithelial cells supporting a ciliature in alternating arrangement with secretory cells and some nematocysts. Abundant and tightly arranged interstitial cells were located in the basal part of the Ect until this half thickness of the Ect. Structural differences were noted compared with the observations of Lecointe *et al.* (2013) on *P. damicornis* TBs produced by an enzymatic technique [34]. In our study, the average Ect thickness was close to 40 μm , larger than the value (15 μm) noted by these authors. Moreover, in TBs produced using an enzymatic method, the external epithelium termed cortex was not stratified [34], whereas it displayed a regular cellular organization in TBs produced using KSW treatment. In TBs produced using KSW treatment, a clear partition between the Ect and CM divided by the mesoglea was observed, similarly to the cell arrangements in coral planulae. By contrast, no mesoglea was observed in *P. damicornis* TBs produced using an enzymatic technique [34] but it was visible in *F. granulosa* TBs produced by a mechanical procedure [17,32,51]. Following KSW treatment, most zooxanthellae of some TBs were distributed in the marginal section of the CM. Zooxanthellae may be located below the complex mesoglea-Ect to protect the symbionts and to ensure access to light. This marginal section of CM, which contained zooxanthellae was not motile while the center of the CM moved due to cilia action of cells located in the marginal section (Fig 2E). The observed structure was similar to larval organization [49].

Mechanical excision versus chemical production

In our first experiments [13,15] mechanical excision was preferred to chemical or enzymatic procedures for production of TBs to avoid any potential interaction with CPA treatments. The average diameter of TBs produced using mechanical excision was 250 μm [13] compared to 590 μm for TBs produced with KSW. Tolerance to CPA treatments was highest for TBs with a diameter between 200 μm - 300 μm in case of mechanical excision and for TBs with a diameter between 760 μm - 920 μm in case of KSW treatment. For the same diameter range (200 μm < Diameter < 400 μm), TBs produced using mechanical excision displayed a diameter regression of $1.56 \pm 0.09 \mu\text{m/h}$ between 24 and 96 h while TBs produced using chemical expulsion showed a diameter regression of $3.32 \pm 0.61 \mu\text{m/h}$ [13]. Cryopreservation was most effective with smaller biological material. In this context, TBs produced with scalpel blade would be more adapted for cryopreservation essays. Also, the mechanical approach allowed producing TBs only 12-24 h following excision, compared with a delay of 5 days with KSW solution. However, the large size heterogeneity of the TBs produced using mechanical excision and the tedious manipulations required for their production TBs encouraged investigations towards new production methods. In addition, metamorphosis of TBs in polyps reported on *F. granulosa* [32,51] was obtained with large pieces of coral tissues (1 cm in thickness x 2-3 cm in length). In our

experiments, KSW exposure allowed to obtain larger TBs containing mesenterial filaments compared with mechanical excision. In addition, TB production using a chemical procedure was easier compared to mechanical excision. It was also easier to collect TBs produced following KCl exposure. In comparison with mechanical excision, exposure to KSW solution allowed to produce larger numbers of TBs using smaller quantities of coral branches. Bryan and Qian (1998) noted the lethal effect of a 60 h treatment with 30 and 40 mM KCl on *H. diversicolor* larvae [5]. In our experiments, *P. damicornis* branches tolerated KSW exposure for up to 72 h. The biological quality of coral appeared essential for the efficiency of chemical expulsion. Some samples required long KSW exposures while other branches did not withstand exposure up to 48 h, resulting in degraded tissues. All branches used for this study were supplied from the same colony and were maintained under the same conditions; therefore, biological variability must be considered. The maximal duration before disruption reached 408 h (17 days) for TBs produced using KSW treatment compared to 264 h (11 days) for TBs produced using mechanical excision. Differences in the biological quality of corals may explain these differences. In addition, for both TB production procedures, larger TBs showed lower survival duration compared with smaller ones, as observed by Gardner *et al.* (2014) on *F. granulosa* [17]. Large TBs had a thin ectoderm and were very fragile during manipulations.

Finally, we observed in several essays metamorphosed *P. damicornis* larvae with pairs of complete mesenteries after 6 h of KCl exposure, but no settlement was achieved. These larval releases may be induced by KCl exposure, similarly to what is observed with Mollusc and Echinoderm planulae. Morse *et al.* (1988) tested the larval metamorphosis of the corals *Agaricia tenuifolia*, *A. agaricites humilis* and *A. danai* exposed to KCl but without effects [42].

Conclusion

To date, no metamorphosis of *P. damicornis* TBs in polyps has been recorded, as was the case with *F. granulosa* [32,51]. In our experiments, TB survival duration did not exceed 2 weeks. Further investigations are therefore needed to improve TB culture conditions. Some of the TBs observed were structured in two layers, the ectoderm and the endoderm-like section of the CM, separated by the mesoglea. This histological description was similar to that of *F. granulosa* TBs [32,51]. Moreover, intense rotary movements of the CM induced by ciliated cells were observed in several TBs. In such cases, the Ect and CM layers were clearly visible. These observations indicate that TB evolution over time is possible, which calls for further investigations on the remetamorphosis process.

This study confirmed that TBs constitute a valuable tool to perform cryopreservation essays on coral multicellular material. The histological investigations performed revealed the importance of the ectodermal cell layer during CPA treatments. The integrity of the ectoderm and of the cell junctions between epithelial cells are considered key elements for TB survival. Future investigations should study the response of ectoderm cells to CPA treatments in greater details.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jean-Luc Verdeil and Marc Lartaud for their assistance with use of the Image J software and to Francine Delmas, Hanka Hensens and Catherine Picq who provided bibliographic references.

Table 1. Diameter repartition of tissue balls in classes (μm).

Figure 1. Tissue balls (TBs) from *Pocillopora damicornis*. A: TB with two outer mesenteric filaments; B: TB with four mesenteric filaments; C: Ciliature and smooth surface of TBs; D: Fusion between two TBs; F-M: evolution of TB following treatment with 3.0 M methanol for 20 min. Ectoderm deformations appeared more visible 24 h after treatment and then decreased over time. Cell aggregates (arrows) visible under calcareous precipitates. E: Detachment of TBs from the skeleton following KSW treatment. Scale bar = 100 μm

Figure 2. Histological examination of TBs after staining with periodic acid-Schiff's reagent and naphthol blue black. A: Structure of TBs with Ect, Ectoderm; M, Mesoglea and CM, Central Mass. Ectoderm containing epithelial cells (*ep*) and supporting cilia (*cil*). Interstitial cells (*int*) on the Ect basal part. B: Content of CM cells with zooxanthellae (*Zx*) and spirocyst (*sp*). C: Ectoderm containing basitrichous isorhizes (*bat*). D: Thick ectoderm with epithelial cells (*ep*) in alternating position with secretory cells such as mucocytes (*muc*). Interstitial cells (*int*) are visible in the internal half of Ect. E: External part of CM resembling an endodermal layer, containing zooxanthellae and ciliated cells (cilia: black arrows). F: TB with mesenteric filaments (*Me*). G: section of a 5-day old TB showing the Ectoderm (Ect) separated from the Central Mass (CM) by the Mesoglea (M), with the marginal part of CM resembling an Endodermic layer (E) concentrating zooxanthellae (*Zx*) and ciliated cells. Damage (D) of the Ect layer inducing release of zooxanthellae. H: Central mass containing interstitial cells (*int*) and binary fission of zooxanthellae (*Zx*) with two daughter-cells. Each zooxanthellae shows a pyrenoid body surrounded by a stark sheath. I: Plasmalemma of zooxanthellae stained pink and green chloroplasts. J: Thecal plates (stained blue) of zooxanthellae. K: Acontium in CM with type 2 microbasic p-mastigophores (*ma*), interstitial cells and secretory cells (*sec*) showing proteic and enzymatic granules. Ciliature is present on the surface of the acontium. L: Details of type 2 microbasic p-mastigophores (*ma*) in CM. M: Large zooxanthellae (*Zx*) in the marginal part of CM showing spheroid pyrenoid and numerous pink or blue vesicles containing carbohydrates or proteic/enzymatic contents. The arrangement of interstitial (*int*) and epithelial cells (*ep*) is visible in the Ect. N: Tentacle in CM containing type 2 microbasic p-mastigophores (*ma*) and secretory cells (*sec*).

Figure 3. Cell distribution in TBs displayed using fluorescence of nuclei with DAPI. A: Healthy TB showing thick Ectoderm (Ect) and Central Mass (CM) with pieces of tentacles (*t*) and mesenteric filaments (*mes*). B: Dense CM without Ect after treatment with 3.0 M Me_2SO for 20 min. C: Damaged CM following exposure to 3.0 M Gly for 60 min. D: Zooxanthellae (*Zx*) distribution (arrows) in the marginal part of CM protected by Ect. Space without cells between Ect and CM corresponds to the mesoglea. E: Interstitial cells (*int*) of mesenteric filament in CM. F: Cellular organization of tentacle in CM with type 2 microbasic p-mastigophores (*ma*). The arrow shows the external part of the tentacle. Interstitial cells (*int*) compose the basis of tentacle. The basal part of mastigophores is in contact with extracellular compartment. The length of nematocyst basis supporting urticant filament exceeds half the total length of the nematocyst. G: Zooxanthella nucleus. H-O: TB damage after CPA treatment. H: Large spaces in mesoglea (arrows) after methanol exposure. I: Ectoderm (Ect) showing cell disorganization and rounded cells. J: CM without ectodermal cell barrier. K: Degraded CM. L: Migration of protein vesicles in the apical part of cells in tentacle. M: Discharged type 2 microbasic p-mastigophore with long and oriented spines along the basis supporting urticant filament. N: Interstitial

cells displaying hypertrophic state following Me₂SO treatment. O: Vacuolation of endodermal cells containing zooxanthellae.

Figure 4. Distribution of TBs after expulsion with solution containing sea water supplemented with chloride potassium. TBs were divided in size classes based on diameter. The number of TBs and their average survival time (h) are indicated for each class size (n=7015 TBs).

Figure 5. Effect of Duration Following Treatment (h) on survival (%) and Diameter Regression (%) of TBs of classes 4-5 (600-760 μm) and 8-9 (760-920 μm).

Figure 6. Principal Component Analysis displaying the tolerance of TBs to CPA treatments. CPAs were dimethylsulfoxide (Me₂SO), glycerol (Gly), ethylene glycol (EG) or methanol (Met). Reg.: Diameter regression of TBs over time, Circ.: TB Circularity and Surv.: Survival time of TBs following treatment were followed for each TB. CPA treatments were performed using concentrations of 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 M for 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 1h30, 2h00 and 3h00. The first two axes explain 86.7% of the total variation among treated samples. A: Variables graph supplemented with illustrating qualitative variables. B: Individual graph showing treatment impact depending on concentration and exposure time. C: Individual graph with confidence area and significant differences between treatments.

Figure 7. Principal Component Analysis displaying histological differences of TBs after CPA treatments. CPAs were dimethylsulfoxide (Me₂SO), glycerol (Gly), ethylene glycol (EG) or methanol (Met). Diameter regression of TBs over time, TB Circularity and Durations of TBs following treatment were followed for each TB. CPA treatments were performed using concentrations of 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 for 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 1h30, 2h00 and 3h00. The first two axes explain 69.9% of the total variation among treated samples. A: Graph with variables: LCo: Length of ectoderm (μm), LCM: Length of Central Mass (μm), Cil: Maximum length of cilium (μm), IC: Maximum length of Intersitial Cells (μm), Zx: Maximum length of Zoxanthellae (μm), Ect: Structural conservation of ectoderm after CPA treatment (0=absence of Ect; 1= some Ect pieces around CM; 2= Ect surrounding CM. Ect showing cellular disorganizations; 3= Ect organization similar with control) and CM: Structural conservation of central mass after CPA treatment (0=absence of CM; 1= some CM agglomerates with larges extracellular spaces; 2=dense CM with some extracellular spaces; 3= CM organization similar with control). Graph supplemented with illustrating qualitative variables B: Individual graph showing differences between CPA treatments.

Classes	Diameter
Class 1	110 μm < TB \leq 280 μm
Class 2	280 μm < TB \leq 440 μm
Class 3	440 μm < TB \leq 600 μm
Class 4	600 μm < TB \leq 760 μm
Class 5	760 μm < TB \leq 920 μm
Class 6	920 μm < TB \leq 1080 μm
Class 7	1080 μm < TB \leq 1240 μm
Class 8	1240 μm < TB \leq 1400 μm
Class 9	1400 μm < TB

Table 1

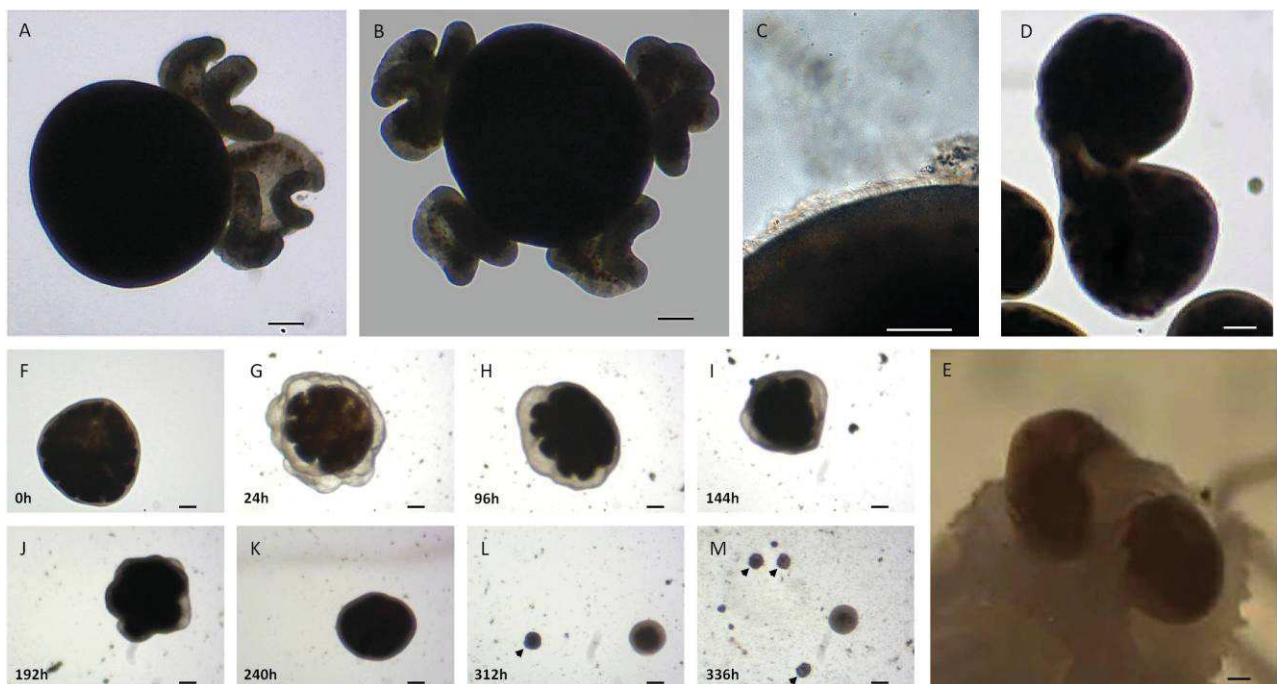


Figure 1

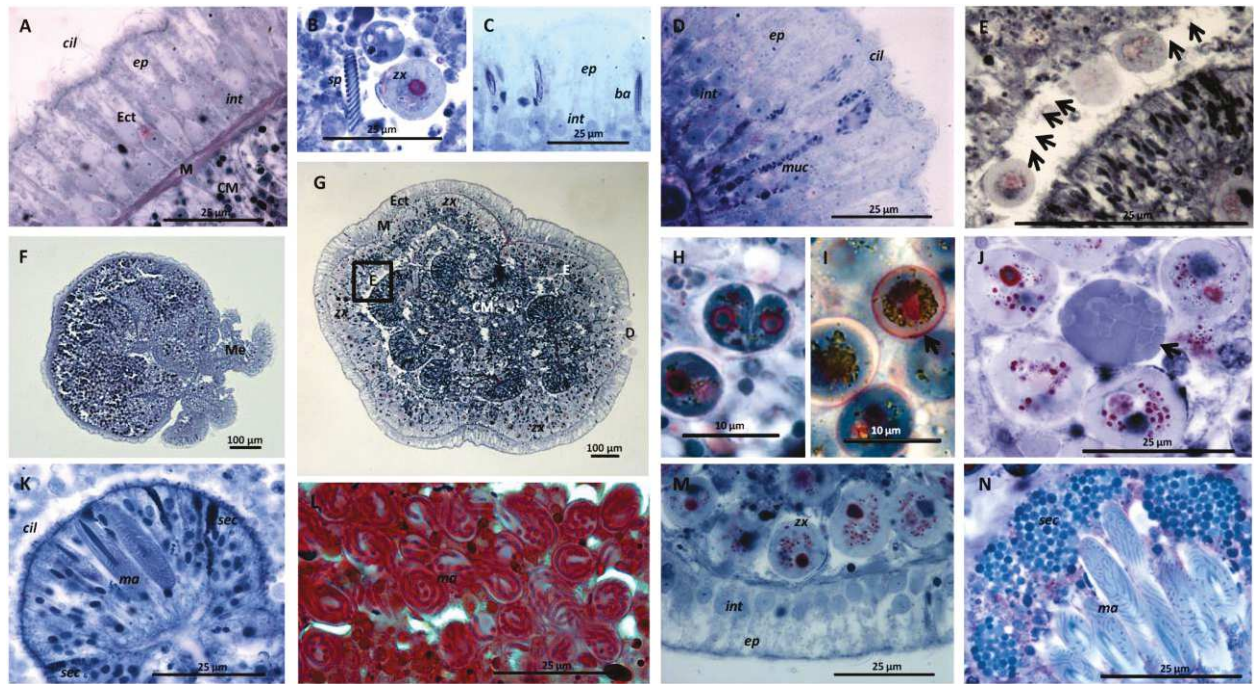


Figure 2

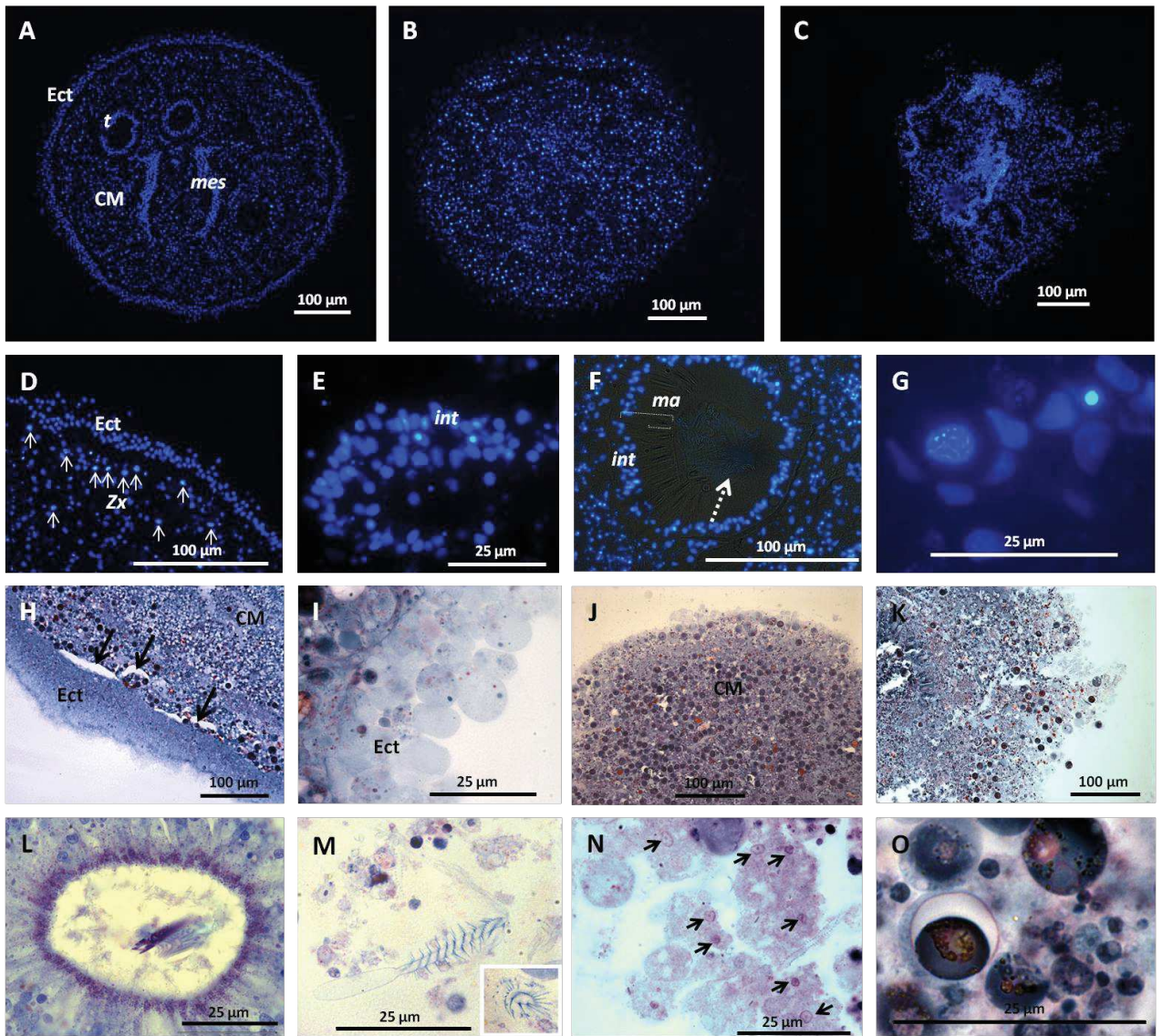


Figure 3

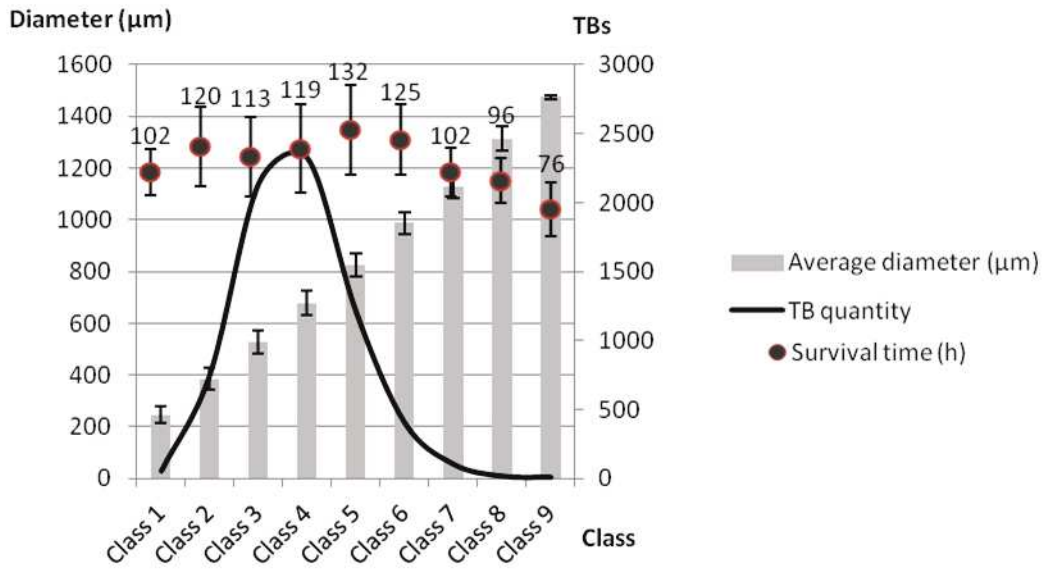


Figure 4

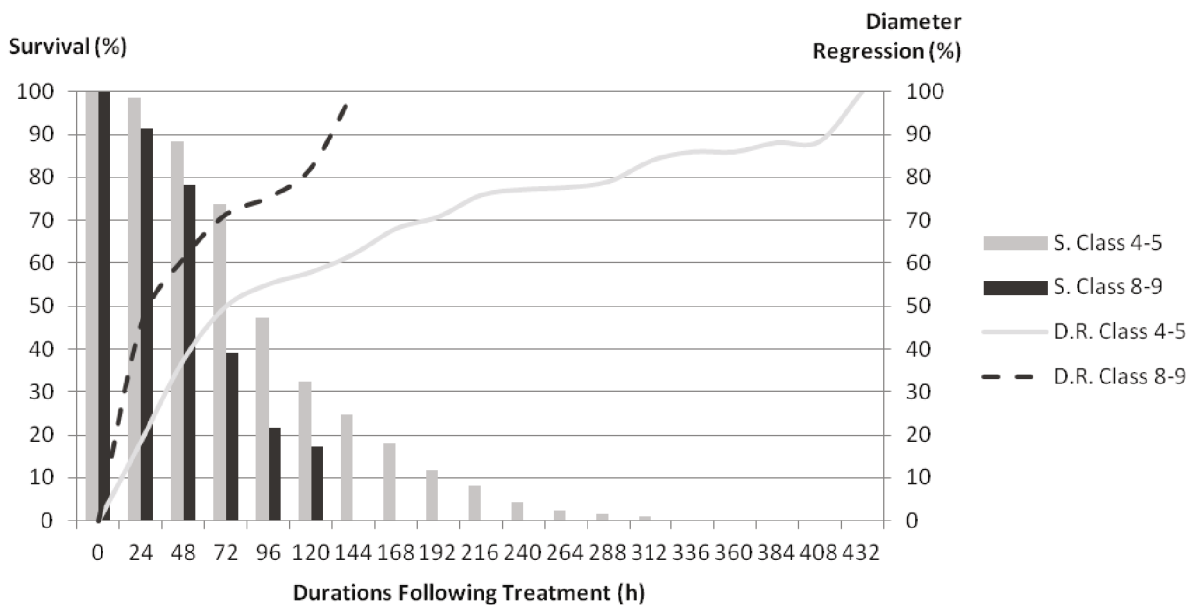


Figure 5

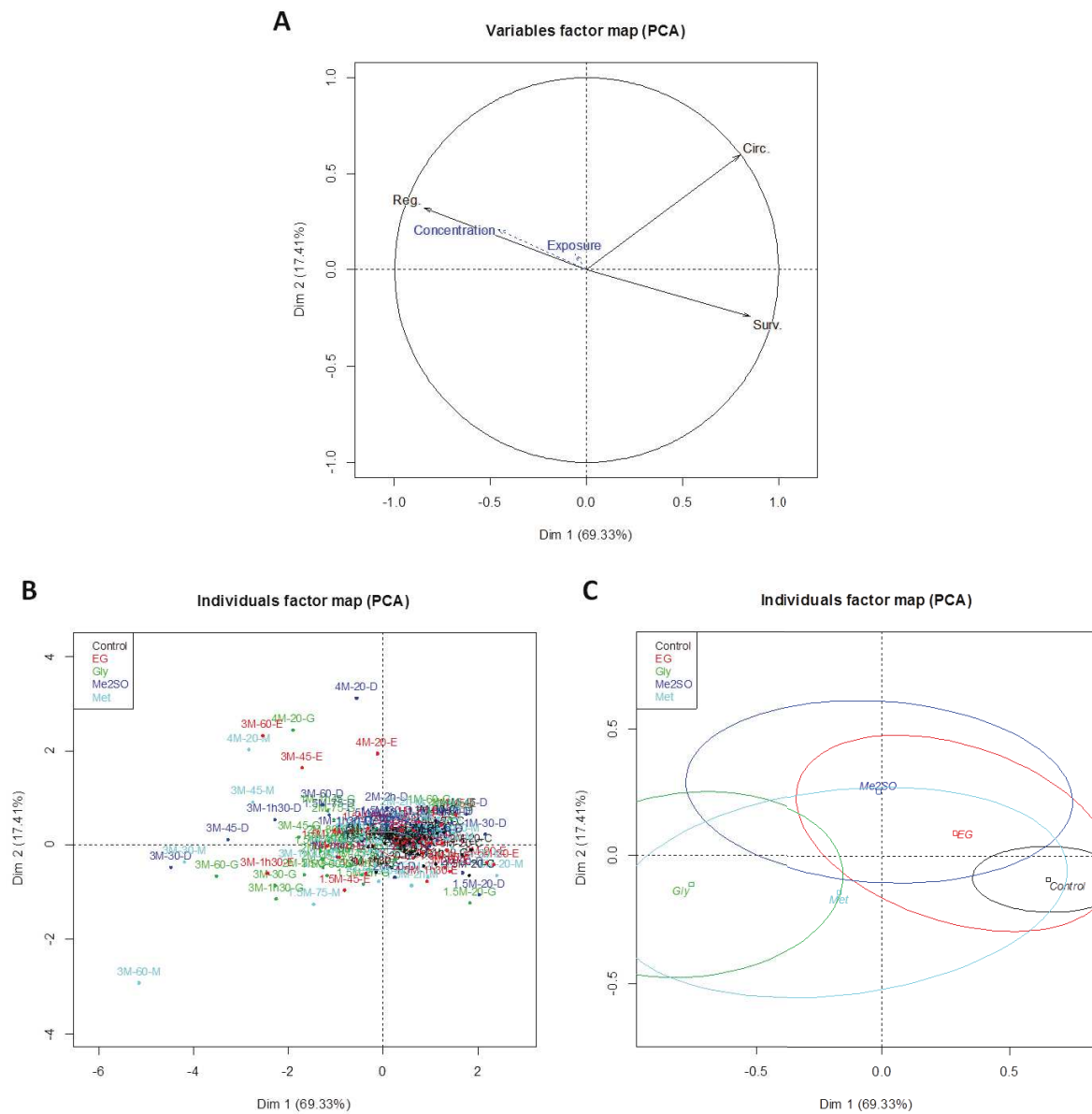


Figure 6

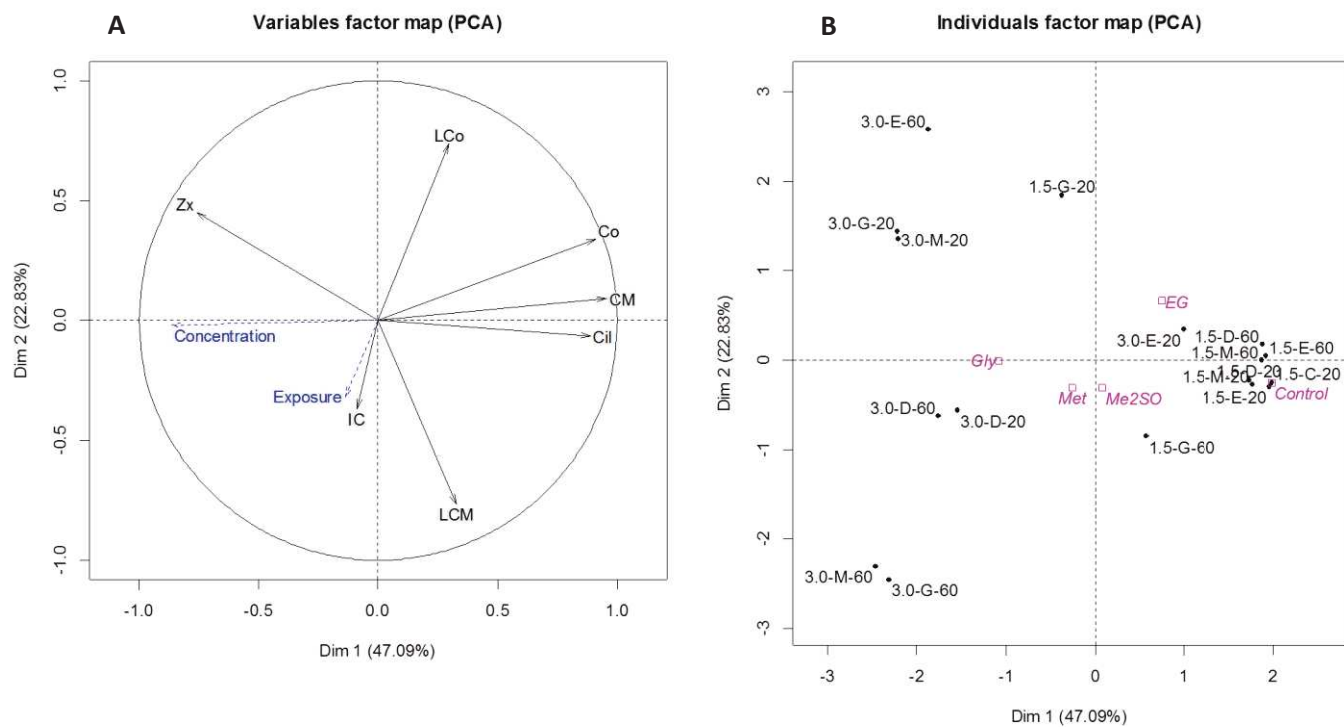


Figure 7

- [1] Balouin AJ, Morse DE (1984) Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biol Bull* 167: 124–138.
- [2] Barraco G, Sylvestre I, Collin M, Escoute J, Lartaud M et al. (2014) Histochemical analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Protoplasma* 251(1): 177–189.
- [3] Brodie J, Andersen RA, Kawachi M, Millar AJK (2009) Endangered algal species and how to protect them. *Phycologia* 48(5): 423–438.
- [4] Bruckner AW (2002) Life-saving products from coral reefs. *Issues in Science and Technology* 18(3): 39–44.
- [5] Bryan PJ, Qian PY (1998) Induction of larval attachment and metamorphosis in the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 223(1): 39–51.
- [6] Carpenter KE, Abrar M, Aeby G, Aronson RB, Banks S et al. (2008) One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* 321: 560–563.
- [7] Chen SL, Tian YS (2005) Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63(4): 1207–1219.
- [8] Costa-Neto EM (2005) Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77(1): 33–43.
- [9] Datta D, Talapatra SN, Swarnakar S (2015) Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. *International Letters of Natural Sciences* 7: 42–61.
- [10] De'ath G, Fabricius KE, Sweatman H, Puotinen M (2012) The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes. *PNAS* 109(44): 17995–17999.
- [11] Domart-Coulon I, Tambutté S, Tambutté E, Allemand D (2004) Short term viability of soft tissue detached from the skeleton of reef-building corals. *J Exp Mar Biol Ecol* 309: 199–217.
- [12] Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40(5): 427–433.
- [13] Feuillassier L, Masanet P, Romans P, Barthélémy D, Engelmann F (2015) Towards a vitrification-based cryopreservation protocol for the coral *Pocillopora damicornis* L.: tolerance of tissue balls to 4.5 M cryoprotectant solutions. *Cryobiology*.
- [14] Feuillassier L, Romans P, Engelmann-Sylvestre I, Masanet P, Barthélémy D et al. (2014a) Tolerance of apexes of coral *Pocillopora damicornis* L. to cryoprotectant solutions. *Cryobiology* 68: 96–106.
- [15] Feuillassier L, Martinez L, Romans P, Engelmann-Sylvestre I, Masanet P et al. (2014b) Survival of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* L. exposed to cryoprotectant solutions. *Cryobiology* 69: 376–385.
- [16] Fickel J, Wagener A, Ludwig A (2007) Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research* 53(2): 81–89.
- [17] Gardner SG, Nielsen DA, Petrou K, Larkum AWD, Ralph PJ (2014) Characterisation of coral explants: a model organism for cnidarian-dinoflagellate studies. *Coral Reefs* DOI 10.1007/s00338-014-1240-4: 1–10.
- [18] George SB, Lawrence JM, Lawrence AL, Ford J (2000) Fertilization and development of eggs of the sea urchin *Lytechinus variegatus* maintained on an extruded feed. *Journal of the World Aquaculture Society* 31(2): 232–238.
- [19] Gierer A, Berking S, Bode H, David CN, Flick K et al. (1972) Regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Nature/New Biology* 88: 98–101.
- [20] Hagedorn M, Spindler R (2014) The Reality, Use and Potential for Cryopreservation of Coral Reefs. In: W.V. Holt, J.L. Brown, P. Comizzoli, editors. *Reproductive Sciences in Animal Conservation*. New York: Springer. pp. 317-329.
- [21] Hagedorn M, Farrell A, Carter VL (2013a) Cryobiology of coral fragments. *Cryobiology* 66: 17–23.
- [22] Hagedorn M, Carter VL, Leong JC, Kleinhans FW (2010) Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*). *Cryobiology* 60: 147–158.
- [23] Hagedorn M, Carter V, Henley M, Spindler R (2013b) Challenges of creating a frozen repository for coral. *Cryobiology* 67: 398–442.

- [24] Hagedorn M, Pan R, Cox EF, Hollingsworth L, Krupp D et al. (2006) Coral larvae conservation: Physiology and reproduction. *Cryobiology* 52: 33–47.
- [25] Hagedorn M, Carter V, Martorana K, Paresa MK, Acker J et al. (2012) Preserving and using germplasm and dissociated embryonic cells for conserving Caribbean and Pacific Coral. *PLoS ONE* 7(3): e33354. doi:33310.31371/journal.pone.0033354.
- [26] Hall NM, Berry KLE, Rintoul L, Hoogenboom MO (2015) Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Marine Biology* 162(3): 725–732.
- [27] Hendriks IE, Duarte CM, Álvarez M (2010) Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: a meta-analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86(2): 157–164.
- [28] Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshwater Res* 50: 839–866.
- [29] Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR et al. (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301: 929–933.
- [30] James ER (2004) Parasite cryopreservation by vitrification. *Cryobiology* 49(3): 201–210.
- [31] Kang KH, Kim BH, Kim JM (2004) Induction of larval settlement and metamorphosis of the abalone, *Haliotis discus hannai* larvae using bromomethane and potassium chloride. *Aquaculture* 230(1): 249–259.
- [32] Kramarsky-Winter E, Loya Y, Vizel M, Downs CA (2008) Method for coral tissue cultivation and propagation. Ramot at Tel Aviv University: PCT/IL2008/001236.
- [33] Kuleshova LL, Lopata A (2002) Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and sterility* 78(3): 449–454.
- [34] Lecointe A, Cohen S, Gèze M, Djediat C, Meibom A, Domart-Coulon, I (2013) Scleractinian coral cell proliferation is reduced in primary culture of suspended multicellular aggregates compared to polyps. *Cytotechnology* 65: 705–724.
- [35] Leibo SP, Songsasen N (2002) Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57(1): 303–326.
- [36] Lin C, Kuo FW, Chavanich S, Viyakarn V (2014) Membrane lipid phase transition behavior of oocytes from three gorgonian corals in relation to chilling injury. *PLoS ONE* 9(3): e92812.
- [37] Liu Y, Li X (2015) Successful oocyte cryopreservation in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 438: 55–58.
- [38] Luna GM, Biavasco, F., & Danovaro, R. (2007) Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. *Environmental Microbiology* 9(7): 1851–1857.
- [39] Marino A, La Spada G (2007) Calcium and cytoskeleton signaling during cell volume regulation in isolated nematocytes of *Aiptasia mutabilis* (Cnidaria: Anthozoa). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147(1): 196–204.
- [40] Mohamed Zahid Z, Abdul Rahman S, Khursheed Alam M, Pohchi A, Jinnu M et al. (2015) Prospective 3D assessment of CORAGRAF and bio-oss as bone substitutes in maxillary sinus augmentation for implant placement. *Journal of Hard Tissue Biology* 24(1): 43–48.
- [41] Morabito R, Dossena S, La Spada G, Marino A (2014) Regulatory volume decrease in isolated nematocytes is affected by crude venom from the jellyfish *Pelagia noctiluca*. *Journal of Biological Research* 87(2): 50–55.
- [42] Morse DE, Hooker N, Morse AN, Jensen RA (1988) Control of larval metamorphosis and recruitment in sympatric agariciid corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 116(3): 193–217.
- [43] Ohki S, Morita M, Kitanobo S, Kowalska AA, Kowalski RK (2014) Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. *Cryobiology* 69: 134–139.
- [44] Pincet F, Perez E, Wolfe J (1994) Do trehalose and dimethyl sulfoxide affect intermembrane forces? *Cryobiology* 31(6): 531–539.
- [45] Ramessar K, Xiong C, Krumpel L, Buckheit R, Wilson J et al. (2014) Isolation and characterization of a novel class of potent anti-HIV proteins from an Australian soft coral. *The FASEB Journal* 28(1 Supplement): 975–976.

- [46] Salvat B (2015) Health and Degradation of Coral Reefs: Assessment and Future. Marine Productivity: Perturbations and Resilience of Socio-ecosystems: Springer International Publishing. pp. 343–354.
- [47] Tsai S, Kuit V, Lin ZG, Lin C (2014) Application of a functional marker for the effect of cryoprotectant agents on gorgonian coral (*Junceella juncea* and *J. fragilis*) sperm sacs. *CryoLetters* 35(1): 1–7.
- [48] Tsai S, Yen W, Chavanich S, Viyakarn V, Lin C (2015) Development of cryopreservation techniques for gorgonian (*Junceella juncea*) oocytes through vitrification. *PLoS ONE* 10(5): e0123409.
- [49] Vandermeulen JH (1974) Studies on reef corals. II. Fine structure of planktonic planula larva of *Pocillopora damicornis*, with emphasis on the aboral epidermis. *Marine Biology* 27: 239–249.
- [50] Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 13(3-4): 218–221.
- [51] Vizek M, Loya Y, Downs CA, Kramarsky-Winter E (2011) A novel method for coral explant culture and micropropagation. *Mar Biotechnol* 13: 423–432.

Synthèse

Les résultats obtenus permettent de confirmer la tolérance des balles tissulaires à des concentrations en CPA inférieures ou égales à 2.0 M, même pour des temps d'exposition très longs (jusqu'à 3 h avec 1.5 M EG). Ils confirment également la faible tolérance des balles tissulaires au Gly utilisé seul.

Cette approche nous aura permis de confirmer l'intérêt d'utiliser les balles tissulaires pour étudier la cryoconservation des Scléactiniaires. Le choix de tester la méthode chimique au lieu de l'excision mécanique s'est avéré bénéfique. L'emploi du KSW a permis l'obtention d'échantillons plus homogènes en taille et en concentration en zooxanthelles par rapport à l'approche mécanique. L'utilisation du KSW a aussi été l'occasion de réaliser un nombre important de tests de tolérance aux CPA grâce à la production importante et rapide de balles tissulaires.

Malgré l'absence de métamorphose, l'organisation des balles tissulaires produite dans nos essais apparaît proche de celle décrite par Sammarco (1982). Nous avons pu obtenir les filaments mésentériques considérés comme des filaments d'ancrage par Sammarco (1982) et Domart-Coulon *et al.* (2004). D'autres alternatives au chlorure de potassium pourraient être testées. Ainsi, Balouin et Morse (1984) ont remarqué que 10 mM K_2SO_4 étaient moins toxiques pour l'induction de la métamorphose des larves d'*H. rufescens* par rapport à 20 mM de KCl. Cependant, ces auteurs rapportent une plus grande efficacité de l'association des ions $K^+ + Cl^-$ que la combinaison avec SO_4^{2-} .

De même, l'exposition des branches de *P. damicornis* au KSW a permis l'expulsion de planulae métamorphosées. Cependant, placées dans du FSW, ces larves ne se sont jamais fixées. Nos observations rejoignent celles de Kang *et al.* (2004), qui révèlent que le taux de fixation des larves d'*H. discus hannai* exposées au KSW est inférieur à celui des témoins non traités. En revanche, pour des concentrations inférieures à 24 mM, ces auteurs obtiennent des taux de métamorphose supérieurs avec les échantillons traités. Ils indiquent ainsi que le chlorure de potassium est davantage lié au processus de métamorphose qu'à l'amélioration de la fixation.

Enfin, l'approche histologique a permis de comprendre l'importance des cellules de l'ectoderme dans la résistance des balles tissulaires exposées aux traitements cryoprotecteurs. Ce travail nous a aussi permis d'étudier l'organisation cellulaire entre l'ectoderme et la masse centrale et de mettre en évidence la présence d'une mésoglée. Sur quelques balles tissulaires, nous avons pu observer une évolution de l'arrangement cellulaire, particulièrement au niveau de la masse centrale. Nous avons pu distinguer une concentration des zooxanthelles en périphérie de la masse centrale parmi lesquelles étaient visibles des cellules interstitielles et des cellules ciliées dont la ciliature était orientée vers l'intérieur de la masse centrale. Cette organisation nouvelle était comparable à une ébauche d'endoderme. Enfin, l'utilisation du

PAS-NBB, couramment employé en histologie végétale, apparaît très intéressante à développer pour l'histologie corallienne. L'affinité de cette coloration pour les glucides et les protéines est un bon indicateur de la qualité du matériel testé après traitement.

Chapitre 6

Une équation non résolue à -196 °C

VI.1. - Préambule

L'utilisation des balles tissulaires est désormais retenue pour nos prochaines investigations. Les chapitres précédents ont permis de définir les solutions cryoprotectrices les mieux tolérées par les balles tissulaires. Enfin, l'exposition des balles tissulaires à une augmentation graduelle de la concentration a permis de limiter les chocs osmotiques et d'augmenter la molarité totale des solutions cryoprotectrices utilisées, ce qui est un préalable à une démarche de vitrification.

La vitrification reste encore peu utilisée sur les organismes marins, bien que certains auteurs aient montré l'efficacité de cette technique pour permettre la congélation des spermatozoïdes mais aussi des embryons de poissons.

VI.2. - Etude bibliographique : le rôle clé des cryoprotecteurs dans la technique de vitrification

Le protocole de vitrification s'articule autour de 3 solutions, bien que de nombreuses variantes soient présentées dans la littérature. Le traitement avec la solution de loading (LS) commence à déshydrater les explants. Cette première solution a un rôle d'osmoprotection. L'application de la solution de vitrification (VS) augmente la déshydratation. Lors de l'immersion dans l'azote liquide, la VS vitrifie et entraîne la vitrification des solutés intracellulaires des échantillons. Enfin la solution d'unloading (ULS), est utilisée pour le réchauffement rapide des échantillons et la dilution de la VS. Elle permet d'éviter le choc osmotique qui serait observé si les échantillons étaient directement immergés dans l'eau de mer.

La vitrification de l'eau est effective pour une température de -130 °C. L'eau dans son état vitreux correspond à une viscosité de 10^{13} poise (1 Po = 1 g/cm/s) (Cuevas-Urbe *et al.*, 2013). La viscosité de l'eau à l'état liquide est de 1 centipoise (1 cPo). L'addition des cryoprotecteurs permettra de diminuer la température de vitrification. Cette méthode présente l'avantage d'être simple, rapide à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'équipements sophistiqués. En revanche, les manipulations délicates requièrent un personnel plus

expérimenté que pour la congélation lente. La réalisation d'un protocole de vitrification performant nécessite l'optimisation de toutes les étapes (Zhang et Rawson, 1996). Cette technique soumet les échantillons à des fortes concentrations en cryoprotecteurs ainsi qu'à des vitesses de refroidissement et de réchauffement élevées. La composition et la concentration des solutions, mais aussi la durée et la température d'exposition, influencent directement la survie du matériel biologique congelé (Zhang et Rawson, 1996). Certaines solutions vitrifiantes s'avèrent plus toxiques à 0 °C qu'à température ambiante (Zhang et Rawson, 1996). Les conditions de refroidissement, de réchauffement et de dilution de la VS influencent également la survie post-traitement. La toxicité chimique et les chocs osmotiques sont les deux principales causes de dommages cellulaires. Zhang *et al.* (2009) indiquent que ces deux effets peuvent être provoqués par des durées trop longues d'exposition à la VS. Si des durées d'exposition trop importantes s'avèrent néfastes, inversement, des durées trop courtes produisent une déshydratation insuffisante, entraînant la formation de glace dans le compartiment intracellulaire (Liu *et al.*, 2004 ; Sakai et Engelmann, 2007 ; Zhang *et al.*, 2009). Afin de limiter les dommages membranaires, certains protocoles de vitrification comprennent l'exposition du matériel biologique à des solutions cryoprotectrices progressivement plus concentrées.

La vitrification a permis de congeler des oocytes, des spermatozoïdes et des embryons de poissons d'espèces marines comme d'eau douce (Cuevas-Uribe *et al.*, 2013). La taille importante des larves de poissons (de 1 à 7 mm), leur complexité structurale et leur faible perméabilité peuvent constituer un frein au succès de la cryoconservation en induisant la formation de glace intracellulaire et des dommages liés au refroidissement. Chen et Tian, (2005) indiquent que la vitrification permet d'éviter ces difficultés. Ces auteurs, qui se sont intéressés à la vitrification des embryons de *Paralichthys olivaceus* ont obtenu la survie la plus élevée avec la solution FVS1 (Fig. 64). Ces mêmes auteurs ont réalisé une augmentation graduelle de molarité en cinq étapes, leur permettant d'obtenir de meilleures survies après traitement (Chen et Tian, 2005). Tian *et al.* (2002) ont réussi la vitrification des embryons de *Lateolabrax japonicus* en utilisant la solution FVS2.

	FVS1	FVS2	FVS3	FVS4
Basic solution 2 (%)	67	60	55	50
Propylene glycol (%)	20	24	27	30
Methanol (%)	13	16	18	20
Osmolarity (mOsm L ⁻¹)	3445	3679	5243	5564
pH	7.8	7.9	7.9	8.1

Figure 64 : Solutions vitrifiantes testées sur les embryons de *Paralichthys olivaceus*.
Source : Chen et Tian, 2005.

L'exemple de Cabrita *et al.* (2003) est assez atypique. Ces auteurs exposeront les embryons (stades bourgeon caudal) de *Scophthalmus maximus* à une première solution de 2.0 M DMSO pendant 5 min, puis à une seconde solution de 3.0 M DMSO pendant 5 min, pour ensuite les exposer à un mélange de 5.0 M Me₂SO + 2.0 M Met + 1.0 M EG pendant 2 min (RT) et enfin à une solution contenant 5.0 M Me₂SO + 2.0 M Met + 1.0 M EG plus 5 % PVP

ou 0.3 M Suc pendant 2 min 4 °C. Cabrita *et al.* (2003) ont obtenu les meilleurs taux de motilité des spermatozoïdes et d'intégrité membranaire de *Lutjanus campechanus*, *Cynoscion nebulosus* et *Sciaenops ocellatus* après exposition à une solution de vitrification constituée de 2.1 M DMSO + 2.7 M EG + 1.4 M Gly + 1 % X-1000TM + 1 % Z-1000TM. D'autres espèces ont été testées à la vitrification parmi lesquelles *Brachydanio rerio*. Malgré l'absence de survie, Zhang *et al.* (1996) préserveront la morphologie des larves de *B. rerio* grâce au mélange 2.0 M butane-2,3-diol + 3.0 M propane-1,2-diol + 6 % polyéthylène glycol 400. Figueroa *et al.* (2015) vitrifieront les spermatozoïdes de *Salmo salar* avec le milieu de Cortland supplémenté avec 1.4 M DMSO + 2 % BSA + 0.13 M Suc + 50 % SP. Ces auteurs mettront en évidence le rôle important du SP dans la fourniture d'antioxydants permettant de réduire les effets des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces ROS étant responsables de la peroxydation lipidique, la fragmentation de l'ADN, les perturbations de l'activité mitochondriale et jusqu'à l'apoptose cellulaire. Cuevas-Urbe *et al.* (2011a) parviendront à vitrifier les spermatozoïdes d'un Siluridé en les exposant à un mélange uniquement composé de CPA pénétrants 6.2 M Met + 2.0 M methyl glycol (MG) + 1.3 M PG en une seule étape pendant moins de 15 sec dans la LS et de 1 min dans la VS (Cuevas-Urbe *et al.*, 2011a). Tous ces exemples démontrent la nécessité de recourir à des solutions complexes de cryoprotecteurs pour accéder à la vitrification tout en protégeant les échantillons.

Cependant, l'opposition récurrente entre la nécessaire cryoprotection et la toxicité des cryoprotecteurs classiques motive de plus en plus les chercheurs à tester de nouvelles solutions cryoprotectrices moins agressives pour le matériel cellulaire. Merino *et al.* (2011, 2012) s'inspirent de la technique de vitrification en goutte (droplet-vitrification) très utilisée pour la cryoconservation des végétaux. Avec cette technique, ils obtiennent sur *Oncorhynchus mykiss* jusqu'à 90 % de spermatozoïdes motiles et sans déformation post-vitrification en les traitant avec une solution constituée de milieu de Cortland + 1 % BSA + 40 % plasma séminal (SP). Abed-Elmdoust *et al.* (2014) innovent en réussissant la vitrification des spermatozoïdes de l'esturgeon *Acipenser persicus* après 5 min d'exposition à 10 µM d'AFPIII (origine poisson) connues comme des IBP.

Sur les microalgues, la vitrification des protoplastes de *Porphyra yezoensis* a été possible après traitement avec une VS incluant 1.4 M DMSO + 4.1 M Gly + 0.5 M Suc (Liu *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (2009) vitrifient également les deux diatomées *Nitzschia closterium minutissima* et *Chaetoceros muelleri* en utilisant la solution PVS2 (0.4 M Suc + 3.3 M Gly + 2.4 M EG + 2.0 DMSO), généralement employée en cryobiologie végétale.

Aujourd'hui il semble que les essais de vitrification sur les invertébrés marins se réduisent à la seule étude de Castelo-Branco *et al.* (2015). Ces auteurs y présentent la vitrification réussie des spermatozoïdes du Pénéidé *L. vannamei*. Les spermatozoïdes sont exposés pendant 10 min à 25 °C à une solution de base (Ca-FSW + 0.4 M Tre) associée à la lécithine de soja (1 à 2 %) avant immersion dans LN. Ils obtiennent également des taux de motilité supérieurs à 80 % avec l'addition de méthanol concentré à 9.4 M.

VI.3. - Le choix des traitements

La diversité de la composition des solutions de vitrification utilisées dans les différentes études présentées précédemment sont révélatrices de la tolérance propre de l'espèce.

Les combinaisons binaires ainsi que les successions de solutions cryoprotectrices les mieux tolérées dans les précédents chapitres ont été testées sur des lots de balles tissulaires homogènes. Une étude histologique a été réalisée pour évaluer l'impact des traitements sur l'organisation cellulaire et pour définir les types cellulaires les plus sensibles aux traitements. Enfin, dans ce chapitre, la méthode de V Cryo-plate est utilisée pour la première fois avec du matériel biologique d'origine marine.

VI.4. - La vitrification des balles tissulaires

Feuillassier, L., Collin, M., Trouillard, T., Masanet, P., Romans, P., Barthélémy, D., & Engelmann, F. Cryopreservation of tissue balls from the reef coral *Pocillopora damicornis* using the V Cryo-plate technique, *in preparation*.

Cryopreservation of tissue balls from the reef coral *Pocillopora damicornis* using the V Cryo-plate technique

Lionel Feuillassier^{1, 2}, Myriam Collin¹, Nancy Trouillard², Patrick Masanet³, Pascal Romans², Dominique Barthélémy⁴, Florent Engelmann¹

¹IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Centre de Ressources Biologiques Marines, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France

³Aquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France

⁴Océanopolis, Port de plaisance du Moulin Blanc, BP91039, 29210 Brest Cedex 1, France

Author for correspondence:

Florent Engelmann

IRD

UMR DIADE

911 avenue Agropolis

BP 64501

34394 Montpellier cedex 5

France

Tel: +33 (0)4 67 41 63 80

Fax: +33 (0)4 67 41 62 52

Email: florent.engelmann@ird.fr

Résumé.

Dans cette étude, la technique de V-Cryo plate utilisée pour la cryoconservation des végétaux a été adaptée aux balles tissulaires (TB, 600 - 900 μm de diamètre) du corail *Pocillopora damicornis*. L'intérêt de cette technique est de faciliter les manipulations pour la mise en place d'un protocole de vitrification. Les TB ont été produites après exposition pendant 48 h à une solution d'eau de mer supplémentée avec du chlorure de potassium (KSW) contenant 20 mM KCl à 25 °C. Une étude histologique a été réalisée sur les TB après leur exposition à des mélanges de cryoprotecteurs (CPA) et à des successions de solutions cryoprotectrices. Des séries de solutions ont permis d'exposer les TB à une augmentation et une diminution progressive de la concentration en CPA. Les solutions cryoprotectrices étaient composées d'éthylène glycol (EG), de diméthyl sulfoxyde (DMSO) et de glycérol (Gly). Pour toutes les solutions cryoprotectrices testées, les TB ont été exposées pendant une durée totale de 20 min à température ambiante (RT) pour des molarités jusqu'à 4.0 M mais aussi à 0 °C pour des molarités jusqu'à 4.5 M. Après l'exposition à l'azote liquide, aucune survie des balles tissulaires n'a été obtenue. Cependant, les observations histologiques ont permis de mieux comprendre le comportement des types cellulaires soumis aux solutions cryoprotectrices. Les cellules composant l'ectoderme constituent une barrière protectrice permettant de protéger la masse centrale (CM) durant et après le traitement. Les jonctions des cellules épithéliales apparaissent essentielles pour maintenir l'intégrité des balles tissulaires. Dans la CM, les zooxanthelles et les cnidocytes ont été observés. La vacuolisation des microalgues indique leur dégradation avant le phénomène de blanchissement. Des observations complémentaires sur l'impact du protocole de congélation sur chaque type cellulaire devront être réalisées. Cette étude montre l'intérêt d'utiliser les cryo-plates pour les essais de vitrification des balles tissulaires.

Mot-clefs : Corail, V Cryo-plate, vitrification, histologie, ectoderme, masse centrale

Introduction

La pollution à l'échelle globale, la surexploitation des ressources, le réchauffement global et le changement rapide du climat, l'acidification des océans et les pressions anthropiques sont en grande partie responsables des profonds changements observés dans les écosystèmes marins et terrestres. Les activités humaines influent de façon importante sur la composition faunistique et floristique des différents milieux, entraînant une raréfaction des ressources naturelles et constituent à plus long terme une réelle menace pour l'avenir de l'humanité. Ainsi, les récifs coralliens sont sévèrement affectés. Selon De'ath *et al.* (2012), la couverture corallienne de la Grande Barrière de Corail a régressé de 28 % durant les 27 dernières années. Ces auteurs évaluent à près de 50 % la couverture corallienne disparue par rapport au récif initial (De'ath *et al.*, 2012). Les scientifiques prédisent que la totalité des récifs de notre planète seront impactés dès 2050 (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007 ; Bruke *et al.*, 2011) et les visions les plus pessimistes projettent un risque d'extinction des coraux dès le début du 22^{ème} siècle. Malgré les efforts de restauration des récifs, de nouvelles approches de conservation sont nécessaires afin de conserver de façon durable la diversité génétique corallienne. La technique de cryoconservation peut constituer un outil efficace pour permettre la conservation en sécurité et sur le long terme de la ressource corallienne. Malgré tout le potentiel de cette méthode de conservation, le nombre de protocoles permettant la congélation du matériel corallien reste très limité. A ce jour, le sperme de neuf espèces de coraux a été cryoconservé avec succès en utilisant la technique de congélation lente (Hagedorn et Spindler, 2014 ; Ohki *et al.*, 2014). La congélation de suspensions cellulaires a aussi été réussie (Hagedorn et Spindler, 2014) tout comme celle des oocytes de la gorgone *Junceella juncea* (Tsai *et al.*, 2015). Des formes coralliennes plus complexes contenant une composition multicellulaire telles que les planulae (Hagedorn *et al.*, 2006a), les apex (Hagedorn *et al.*, 2013 ; Feuillassier *et al.*, 2014a) et les balles tissulaires (Feuillassier *et al.*, 2014b, 2015, *soumis*) n'ont pas encore été congelées.

Les études précédentes testant les balles tissulaires (TB) du Scléactiniaire *Pocillopora damicornis* ont montré l'intérêt ce type de matériel pour mettre au point un protocole de cryoconservation (Feuillassier *et al.*, 2014b, 2015, *soumis*). Les essais préliminaires réalisés ont indiqué que les TB étaient plus tolérantes à l'exposition à des mélanges de cryoprotecteurs (CPA) plutôt qu'à des solutions de CPA individuels (Feuillassier *et al.*, 2015). Brièvement, la tolérance des TB a été testée pour plusieurs combinaisons contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO), de l'éthylène glycol (EG), du glycérol (Gly) ou du méthanol (Met). Les meilleures

survies ont été obtenues après exposition à des mélanges binaires contenant 2.0 M EG + 2.0 M Met et 2.0 M EG + 2.0 M Gly pendant 20 min à température ambiante (RT). De plus, les TB ont toléré les traitements utilisant des séries de trois solutions permettant une augmentation puis une diminution progressive de la molarité. Les TB ont été exposées à une première solution de molarité intermédiaire, contenant 1.5 M EG + 0.5 M Gly ou 1.5 M EG + 0.5 M Me₂SO pendant 5 min à RT avant d'être immergées dans une seconde solution constituée de 1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M DMSO pendant 10 min à 0 °C. Enfin, pour la dernière étape, les TB ont été soumises à la première solution de CPA pendant 5 min à RT (Feuillassier *et al.*, 2015).

La technique de vitrification nécessite des solutions de CPA beaucoup plus concentrées que pour la technique de la congélation lente. Les étapes de déshydratation et de vitrification exposant le matériel respectivement à la solution de loading (LS) et à la solution de vitrification (VS) sont réalisées avant l'immersion dans l'azote liquide (LN). Après LN, les étapes de décongélation et de réhydratation sont réalisées en utilisant la solution d'unloading (ULS), plus faiblement concentrée en CPA. La technique de vitrification a été particulièrement développée pour la cryoconservation de matériel végétal (Engelmann, 2004 ; Sakai et Engelmann, 2007 ; Kim *et al.*, 2009). Elle a également été utilisée pour différents organismes marins. Ainsi, Chen et Tian (2005) ont congelé les embryons de *Paralichthys olivaceus* en utilisant une VS constituée de 2.8 M propylène glycol (PG) + 3.2 M Met + Basic Solution 2 (BS2). Les embryons de *Lateolabrax japonicus* ont été traités avec un mélange comprenant 3.4 M PG + 3.9 M Met + BS2 avant leur congélation (Tian *et al.*, 2002). Cabrita *et al.* (2003) ont utilisé une VS contenant 5.0 M Me₂SO + 2.0 M Met + 1.0 M EG + 0.3 M Saccharose (Suc) sur les embryons de *Scophthalmus maximus* et une VS contenant 2.1 M DMSO + 2.7 M EG + 1.4 M Gly + X-1000TM + Z-1000TM pour cryoconserver le sperme de *Lutjanus campechanus*, *Cynoscion nebulosus* and *Sciaenops ocellatus*. Cuevas-Uribe *et al.* (2011a) ont décrit la vitrification des spermatozoïdes d'une espèce de poisson-chat en soumettant les gamètes à une solution de 6.2 M Met + 2.0 M methyl glycol (MG) + 1.3 M PG. Liu *et al.* (2004) ont testé une VS composée de 1.4 M DMSO + 4.1 M Gly + 0.5 M Suc sur *Porphyra yezoensis*. Castelo-Branco *et al.* (2015) ont vitrifié les spermatozoïdes de *Litopenaeus vannamei* avec des VS constitué de tréhalose (0.4 M), de lécithine de soja et de Met à une concentration totale de 9.4 M.

Très peu de travaux sur la vitrification ont été rapportés sur les invertébrés marins. La première vitrification réussie a été obtenue par Chao *et al.* (1994) sur des

embryons de *Crassostrea gigas* âgés de 8 h. Hamaratoğlu *et al.* (2005) ont rapporté la réussite de leur protocole sur les oocytes de l'étoile de mer *Asterina miniata*. Enfin, la vitrification a été appliquée avec succès sur les spermatozoïdes de *Litopenaeus vannamei* (Castelo-Branco *et al.*, 2015). Sur les coraux, la vitrification peut constituer une alternative à la méthode de la congélation lente pour la conservation des planulae et des *Symbiodinium* sp. (Hagedorn et Spindler, 2014).

Les premiers essais de vitrification réalisés avec les balles tissulaires (Feuillassier *et al.*, 2014b) ont montré que leur taille réduite et leur fragilité rendaient leur manipulation difficile. Une nouvelle technique de cryoconservation appelée V Cryo-plate a été développée récemment pour les apex de chrysanthème (Yamamoto *et al.*, 2012) et appliquée à plusieurs autres espèces végétales (Sekizawa *et al.*, 2011, Yamamoto *et al.*, 2012, Niino *et al.*, 2014). Dans cette technique, les explants sont fixés sur des plaques en aluminium (les cryo-plates) avec une goutte d'alginate de calcium, ce qui évite les manipulations potentiellement dommageables et permet de traiter les lots d'explants de manière homogène. Dans cette étude, nous avons adapté cette méthode des végétaux vers les coraux en l'appliquant sur les TB de *P. damicornis* pour améliorer l'accessibilité de ce nouveau matériel corallien à une démarche de vitrification.

Les études histologiques réalisées sur les TB après exposition aux solutions contenant un seul CPA ont souligné l'importance de la couche ectodermique des TB dans la protection du contenu cellulaire de la CM (Feuillassier *et al.*, *soumis*). La préservation des jonctions entre les cellules épithéliales apparaît essentielle pour maintenir la survie des TB après les traitements cryoprotecteurs.

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'impact sur l'organisation cellulaire des TB de *P. damicornis* de leur exposition à une succession de mélanges cryoprotecteurs. Les TB ont été produites par expulsion chimique selon le protocole développé par Feuillassier *et al.*, (*soumis*). Les dommages sur l'agencement cellulaire de l'ectoderme et de la masse centrale des TB après exposition aux CPA ont été évalués en utilisant les approches histologiques développés dans Feuillassier *et al.*, (*soumis*). Dans cette étude, les TB de *P. damicornis* ont été fixés sur des cryo-plates en suivant le protocole développé par Yamamoto *et al.* (2012).

Matériels et Méthodes

Préparation des Balles Tissulaires

Des fragments de branches provenant de colonies de *P. damicornis* (L. 1758) ont été collectées à l'Aquarium de Canet en Roussillon, France (CITES number: O3584), et mises en culture à l'Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, Université Pierre et Marie Curie, France dans les conditions décrites par Feuillassier *et al.* (2014b).

Les TB ont été obtenues en utilisant le protocole de Feuillassier *et al.* (*soumis*), basé sur le protocole développé par Domart-Coulon *et al.* (2004). Les branches de *P. damicornis* ont été placées pendant 48 h dans une eau de mer artificielle vieillie de 24 h (24h-ASW), supplémentée avec 20 mM chlorure de potassium (CARLO ERBA, ACS-ISO-For analysis) et sous bullage d'air (KSW : K⁺ + seawater). Après l'exposition au KSW, les branches ont été transférées dans un bécher contenant 24h-ASW dont le contenu a été renouvelé quotidiennement et sous bullage. Une stabulation pendant 3 jours dans du 24h-ASW a suffi pour obtenir l'expulsion des TB (Fig. 1A), qui ont été collectées, rincées avec du 24h-ASW puis isolées individuellement dans les puits de microplaques destinées à la culture cellulaire (CORNING, TC-Treated, Sterile). Ces puits contenaient 3 ml de 24h-ASW fraîche, renouvelée quotidiennement.

Solutions cryoprotectrices utilisées

La sélection des solutions de CPA testées dans cette étude s'est faite en se basant sur les taux de survie obtenus par Feuillassier *et al.* (2015, *soumis*). Les solutions de CPA étaient composées avec du DMSO (VWR, analytical reagent, assay: 99.7%), de l'EG (VWR, AnalaR NORMAPUR, assay: 100%) et du Gly (CARLO ERBA, ACS-for analysis, assay: 99.5%). Les concentrations finales ont été obtenues en utilisant du 24h-ASW (pH : 8.4). Les mélanges obtenus ont été congelés à - 80 °C avant utilisation.

Procédures expérimentales

Les TB ont été sélectionnées en fonction de l'intensité de leur mobilité, de leur forme sphéroïde et de leur diamètre, compris entre 600 et 900 μm (Fig. 1A) pour lequel les meilleurs taux de survie ont été obtenus par Feuillassier *et al.* (*soumis*). Chaque procédure expérimentale a été réalisée en utilisant 15 TB non traitées pour le témoin et 15 TB traitées pour les essais.

Après leur collecte et leur rinçage avec du 24h-ASW comme précédemment décrit, les TB ont été placées individuellement dans chaque puits des cryo-plates (Taiyo Nippon Sanso Corp Tokyo, Japan) No. 2 (37 x 0.7 mm contenant 10 puits circulaires de 1.5 mm de diamètre et de 0.75 mm de profondeur) en utilisant une micropipette (à RT). L'excès de 24h-ASW a été retiré en utilisant un papier absorbant. Toutes les manipulations ont été réalisées en utilisant des pinces de laboratoire pour déplacer plus facilement les cryo-plates. Une attention particulière a été portée afin d'éviter le détachement des TB des cryo-plates durant les traitements et pour éviter la formation de bulles lors du remplacement des solutions de CPA.

Les TB ont été fixées après deux durées, immédiatement après le traitement cryoprotecteur (T0) et 48 h après le traitement (T48). Les traitements sont listés dans le Tableau 1. Pour T48, les TB ont été rincées trois fois à RT (22°C) avec du 24h-ASW après l'exposition à la solution de CPA et incubées (température : $25 \pm 1^\circ\text{C}$, hygrométrie : 100 %, intensité lumineuse : $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les TB ont été maintenues durant 48 h et fixées avec la même solution fixatrice.

Expériences 1 à 4

Pour ces quatre premières expériences, les TB ont été exposées à une seule solution cryoprotectrice, sans les soumettre à des successions de solutions de CPA (Tableau 1). Ces solutions ont été choisies en fonction des plus fortes tolérances obtenues par Feuillassier *et al.* (2015, *soumis*). L'*Expérience 1* a été réalisée en exposant les TB à du 24h-ASW pendant 20 min pour permettre de constituer l'échantillon contrôle (Tableau 1). L'*Expérience 2* a permis d'exposer les TB pendant 20 min à une solution de CPA contenant 2.0 M EG. Une solution binaire composée de 2.0 M EG + 2.0 M Gly a été testée pendant 20 min sur les TB dans l'*Expérience 3*. L'*Expérience 4* avait pour objectif de tester une solution de composition et de molarité similaire à une solution de LS comme utilisée pour la vitrification. Les cryo-plates

contenant les TB ont été placées dans une boîte de Petri et recouvertes avec 2 ml de LS par cryo-plate à RT. La LS a ensuite été retirée et les cryo-plates séchées en utilisant un papier absorbant. Les TB ont ensuite été rincées selon la technique exposée précédemment. Enfin, les TB ont été prélevées sur les cryo-plates et directement fixées pour les études histologiques.

Expériences 5 et 6

Ces deux expériences ont consisté à exposer les TB à des solutions successives en utilisant respectivement deux et trois étapes (Tableau 1). Ces essais ont permis d'évaluer la tolérance des TB à une augmentation (exposition à la solution de loading [LS] puis de vitrification [2]) puis à une diminution (exposition à la solution d'unloading [ULS]) de concentration des solutions cryoprotectrices, similaire à un protocole de vitrification.

Après l'étape de loading réalisée comme dans l'*Expérience 4*, les cryo-plates ont été placées dans une boîte de Petri placée sur glace pilée et contenant la VS. Les cryo-plates ont été ensuite sorties de la VS, séchées avec du papier absorbant puis recouvertes avec 2 ml d'ULS. L'étape de rinçage a été similaire à celle réalisée pour l'*Expérience 4*.

Expériences 7 à 9

Chaque expérience constituait une étape de la technique de vitrification. Dans l'*Expérience 7* les TB placées sur des cryo-plates ont été uniquement exposées à la LS (Tableau 1). Dans l'*Expérience 8*, les TB ont été exposées à la LS, à la VS puis à l'ULS. Enfin, dans l'*Expérience 9* les TB ont été traitées avec la LS puis la VS, immergées pendant 1 h dans LN puis réchauffées dans l'ULS à RT pendant 1 min. Après le réchauffement dans l'ULS, les cryo-plates ont été séchées avec du papier absorbant puis recouvertes avec 2 ml d'ULS fraîche à RT pendant 4 min dans une nouvelle boîte de Petri. Les TB ont enfin été rincées (Fig. 1C).

Observations histologiques

Les préparations histologiques et les observations ont été réalisées à l'IRD de Montpellier, France, en utilisant le protocole mis au point par Feuillassier *et al.* (*soumis*). Pour

toutes les expériences, les échantillons de TB ont été divisés en deux. Les TB ont été fixées avec un fixateur et conservées 3 jours à l'obscurité et à 4 °C. La solution fixatrice étaient composée de 2 % de paraformaldéhyde + 1.5 % de glutaraldéhyde + 0.2 M de tampon phosphate (pH 7) + 1 % de caféine et le volume complété à 100 % la solution de CPA utilisée pour chaque expérience. Le fixateur a été remplacé quotidiennement. Les TB ont été déshydratées en utilisant une série graduellement plus concentrée d'alcools de 30 % à 100 %, avant d'être enrobées dans une résine hydrophobe (Technovit[®] 7100, Kulzer, VWR) selon. Après durcissement de la résine, les TB ont été coupées en séries de sections de 4 µm en utilisant un microtome (HM 355S Microm GMBH, Thermo Scientific) puis colorées avec du bleu de toluidine (BT) additionné à du tétraborate de sodium (B715209, Merck), avec du DAPI (Fluoromount-DAPI, 0100-20, Clinisciences) ou avec un mélange acide périodique-Schiff-naphthol blue-black (PAS-NBB, Sigma-Aldrich). Les sections histologiques ont été examinées sous microscope optique (Leica Lentz DMRB 301-371) couplé avec une caméra numérique (Evolution MP 5.0 color Media Cybernetics Cooled RTV 32-0040C-140). Les observations ont été réalisées de x 50 à x 100 et sous fluorescence pour le DAPI en utilisant une lampe UV ($\lambda = 455 \pm 25$ nm, excitation $\lambda = 345$ nm). Les photographies ont été réalisées avec le logiciel QCapture Pro 7 (Scop Pro, 2011).

Résultats

Expériences 1 à 4

Pour les conditions T0 et T48, l'organisation cellulaire des TB exposées à une solution individuelle contenant 2.0 M EG (*Expérience 2*) ne diffère pas des observations faites sur les TB témoins (*Expérience 1*). Pour la majorité des TB observées, le feuillet ectodermique est composé de longues cellules épithéliales ciliées. La coloration PAS-NBB permet de souligner la présence des cellules sécrétrices contenant des granules bleus suggérant un contenu protéique. Ces cellules, dépourvues de ciliature, sont enchâssées entre les cellules épithéliales, à l'instar de quelques nématocytes (Fig.2A). De nombreuses cellules interstitielles, avec un noyau coloré en bleu foncé par le PAS-NBB, se trouvent également confinées dans la partie basale de l'ectoderme (Fig.2A). L'ectoderme comprend principalement de nombreuses cellules interstitielles de petite taille, bien observables avec le DAPI (Fig.3E). La masse centrale (CM) est distinctement séparée de l'ectoderme par la mésoglée (Fig.2A). Les

zooxanthelles sont abondamment concentrées dans la CM (Fig.2C), comme les cellules interstitielles, les cnidocytes tels que les p-mastigophores microbasiques de type 1 et quelques spirocytes (Fig.2D and E). Des vésicules avec un contenu protéique sont également observées. De larges pièces tissulaires provenant des tentacules et des filaments mésentériques sont apparents dans la CM (Fig.2B). Dans l'*Expérience 3*, les TB traitées avec le mélange 2.0 M EG + 2.0 M Gly restent soit intactes après traitement soit au contraire sont fortement dégradées. Les TB non abîmées montrent un arrangement cellulaire similaire à celui des TB témoins. Néanmoins, les zooxanthelles distribuées dans la CM montrent un phénomène de vacuolisation et de nombreux espaces intracellulaires sont observés (Fig.3A). Les TB endommagées sont dépourvues de leur ectoderme ; seule leur CM reste visible. Quelques zooxanthelles vacuolées et nématocytes déchargés sont observés (Fig.3A et C). La taille des cellules interstitielles apparaît également réduite (Fig.3B). Les observations avec le DAPI confirment les dommages importants dans l'organisation des cellules des TB, avec de larges espaces dans la CM (Fig.3H).

Les TB tolèrent l'exposition au mélange cryoprotecteur contenant 1.5 M EG + 0.5 M Gly (*Expérience 4*). L'ectoderme ainsi que la CM ne présentent pas de perturbations de leurs principaux types cellulaires. Les cellules sécrétrices et les nématocytes, dont de petits isorhises basitriques, sont observés parmi les cellules épithéliales ciliées (Fig.3K). Par comparaison avec l'*Expérience 3*, les cellules interstitielles ne montrent pas une taille réduite (Fig.3K). Parmi les 15 TB observées, seules deux étaient dépourvues de feuillet ectodermique, avec la seule CM visible dont les cellules ne présentaient pas d'atteinte structurale (Fig.3O).

Expériences 5 et 6

Pour T0, les TB ne présentent pas de perturbations dans leur organisation cellulaire après traitement avec les CPA. Les cellules épithéliales ciliées de l'ectoderme sont visibles comme les cellules interstitielles réparties à la base de l'ectoderme, près de la mésogée. Les cellules épithéliales apparaissent très resserrées les unes avec les autres mais avec cependant des fortes irrégularités dans leur longueur, conférant à l'ectoderme une surface d'apparence crantée (Fig.3D et F). De plus, la partie apicale des cellules épithéliales est davantage arrondie par rapport aux cellules des TB témoins. La CM ne présente pas de zooxanthelles vacuolées ni d'espaces intracellulaires. Quelques TB présentent des dommages comme une perturbation

de la mésoglée visible sous la forme de larges espaces entre l'ectoderme et la CM, remplis de liquide ou de gaz (Fig.3I). De même, le feuillet ectodermique de certaines TB est complètement dégradé (Fig.3G et O). Quelques TB fortement endommagées présentent d'importantes perturbations dans l'agencement cellulaire de l'ectoderme ainsi que des espaces intracellulaires dans la CM. Les colorations au DAPI confirment l'absence d'organisation cellulaire dans ces TB endommagées.

Dans cette expérience, seules des TB sans ectoderme ont été obtenues pour T48. Les observations histologiques avec le DAPI confirment la viabilité des cellules dans la CM avec la présence de zooxanthelles, de cellules interstitielles et d'autres petites cellules en abondance, non identifiées.

L'*Expérience 6* a permis d'obtenir des TB intactes à l'instar de l'*Expérience 5*. La coloration au DAPI des TB pourvus d'une surface ectodermique crantée confirme l'épaisseur du feuillet ectodermique (Fig.3D et F). De plus, une CM compacte est souvent observée. Ce traitement est toléré par les TB et les nouvelles observations après 48 h indiquent le bon état de préservation des TB. Cependant, quelques TB présentent certains dommages tels que des zooxanthelles vacuolées dans la CM et la présence d'espaces intercellulaires. Plusieurs zooxanthelles larges et transparentes sont observées sur les TB les plus fortement impactées (Fig.3J). Les TB les plus dégradées sont seulement composées de la CM (Fig.3M). Enfin, pour quelques TB, la CM présente de fortes dégradations et la coloration avec le DAPI confirme la dégradation importante des TB.

Expériences 7 à 9

Les TB ne survivent pas à l'exposition à LN. Les colorations histologiques révèlent des dommages importants, avec des cellules isolées et de nombreux espaces intracellulaires. Dans le feuillet ectodermique, les cellules épithéliales conservent leur agencement mais avec des espaces entre chaque cellule mettant en évidence l'absence de jonctions (Fig.3N). Les cellules interstitielles de l'ectoderme et de la CM ont diminué de taille et ont l'apparence de cellules rétractées et échancrées, comme dans un état hypertonique. Quelques TB présentent

dans leur ectoderme une dissémination des cellules interstitielles, plus seulement réparties en position basale mais atteignant aussi l'extrémité apicale de l'ectoderme (Fig.3L). Dans la CM, quelques cas de vacuolisation sont observables sur les zooxanthelles. Pour les TB les plus dégradées, l'ectoderme est fortement endommagé à l'état de fragments, isolé de la CM.

Discussion

La vitrification des organismes marins est encore très peu développée, bien que cette méthode apparaisse comme une alternative intéressante pour permettre la cryoconservation des espèces de poissons et/ou d'autres matériels sensibles à la congélation (Chen et Tian, 2005 ; Robles *et al.*, 2005 ; Figueroa *et al.*, 2015). Cette technique est peu coûteuse car elle ne nécessite pas d'équipement spécialisé et requiert un temps de manipulation court (Cuevas-Uribe *et al.*, 2011b ; Figueroa *et al.*, 2015). Les récents essais de vitrification sur les espèces aquatiques, comme ceux de que Junior *et al.* (2015) sur les spermatozoïdes de *C. macropomum*, font ressortir la nécessité d'améliorer l'efficacité de ces protocoles . De plus, certains auteurs font état de la difficulté de reproduire les protocoles déjà publiés (Cuevas-Uribe *et al.*, 2013, Edashige *et al.*, 2006). La standardisation des protocoles de vitrification devrait permettre de faciliter leur utilisation sur de nouvelles espèces aquatiques (Cuevas-Uribe *et al.*, 2013).

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois qu'il était possible d'adapter la technique de V Cryo-plate, développée pour la cryoconservation des végétaux (Yamamoto *et al.*, 2012), pour la cryoconservation de matériel biologique d'origine animale, les TB du corail *P. damicornis*. L'utilisation des cryo-plates a permis de limiter le nombre de manipulations des TB et de traiter en même temps et de manière homogène des lots de TB.

L'étude histologique réalisée dans ce travail a permis d'évaluer l'impact des traitements cryoprotecteurs sur l'organisation cellulaire des TB. Les TB comprennent deux compartiments, l'ectoderme et la CM, séparés par la mésogée. Comme indiqué par Feuillassier *et al.* (*soumis*), le rôle des cellules composant l'ectoderme apparaît essentiel pour limiter la désintégration des TB pendant et après les traitements avec les CPA. Les colorations histologiques confirment la tolérance élevée des TB pour une solution individuelle d'EG. Cet alcool a été précédemment décrit comme le mieux toléré parmi tous les traitements auxquels les TB ont été exposées (Feuillassier *et al.*, *soumis*). L'agencement cellulaire similaire entre les TB témoins et les TB traitées à l'EG incite à composer les futures combinaisons de CPA

en utilisant l'EG comme composé de base de ces mélanges cryoprotecteurs. Dans cette étude, les solutions binaires contenant 1.5 M EG + 0.5 M Gly ont été tolérées pendant 20 min à RT. Les sections histologiques montrent des TB exemptes de désorganisation dans la couche cellulaire qui compose l'ectoderme, même 48 h après le traitement. Les TB exposées à un mélange plus concentré contenant 2.0 M EG + 2.0 M Gly présentent quelques images de traumatismes cellulaires comme la vacuolisation des zooxanthelles, la dévagination de cnidocytes ainsi que des cellules interstitielles de taille réduite et échancrées. Ces répercussions cellulaires excluent de facto l'utilisation de ce mélange à des concentrations plus élevées. Dans cette étude, des successions de solutions ont également été testées en se basant sur les résultats obtenus par Feuillassier *et al.* (2015). Les TB ont été exposées pendant 5 min à RT à une solution contenant 1.5 M EG + 0.5 M Gly, puis à une solution contenant 1.5 M EG + 1.5 M Gly + 1.5 M DMSO pendant 10 min sur glace pilée, et enfin à une solution contenant 1.5 M EG + 0.5 M Gly pendant 5 min à RT. Les observations histologiques confirment que ces conditions impactent faiblement les TBs, comme indiqué par Feuillassier *et al.* (2015). De nouvelles investigations doivent être menées afin d'augmenter la concentration totale en CPA mais également d'accroître le nombre de paliers de concentration dans le but de limiter les chocs osmotiques, notamment induits au moment du rinçage des TB.

Rinkevich (1996) indique qu'un certain nombre d'auteurs ont observé l'absence de cellules interstitielles vraies chez les Anthozoaires, tandis que d'autres études considèrent l'activité pluripotente de ces mêmes cellules interstitielles. Dans notre étude, de petites cellules arrondies ont été observées en abondance dans la région basale du feuillet ectodermique avec une position similaire à celle rapportée par Marshall et Wright (1993) sur *Galaxea fascicularis*. Ces cellules interstitielles sont localisées entre les cellules épithéliales et les granulocytes. De façon similaire avec les observations de Davis (1969), le noyau sombre des cellules interstitielles est localisé au centre des cellules. Le contenu basophile essentiellement dû aux ribosomes libres caractérise les cellules interstitielles (Chapman, 1974). Cette composition a également été bien observée dans cette étude avec la coloration au PAS-NBB, qui révèle le contenu bleu des cellules interstitielles attribuable au contenu protéique. Campbell et David (1974) ont décrit l'activité de prolifération des cellules interstitielles de *Hydra attenuata* isolées individuellement ou sous la forme d'agrégats cellulaires. Ce type cellulaire multipotent est identifié comme le précurseur des cellules urticantes à l'issue de plusieurs divisions cellulaires constituant un agrégat permettant par la suite la formation des nématocytes. De plus, les cellules interstitielles sont à l'origine des

cellules épithéliales après différenciation (Campbell et David, 1974 ; Domart-Coulon *et al.*, 2004). Dans les TB de *P. damicornis*, les cellules interstitielles ont seulement été observées isolées, sans agrégation mais néanmoins avec une distribution régulière dans tout l'ectoderme. Des cellules interstitielles suggérant un état hypertonique ont été observées durant cette étude, en particulier lors des expériences 7 à 9 après congélation dans LN. De façon similaire, les cellules interstitielles, tout comme les cellules épithéliales, se sont montrées sensibles aux traitements avec des CPA dont la molarité était supérieure à 4.5 M. Ces deux types cellulaires semblent produire une barrière protectrice permettant de préserver le contenu cellulaire de la CM. Les jonctions épithéliales apparaissent dans ce contexte essentielles pour conserver l'intégrité des TB après leur exposition aux CPA (Feuillassier *et al.*, *soumis*). Dans les tentacules de *Hydra attenuata*, Wood et Novak (1982) ont décrit les jonctions apicales reliant étroitement chaque nématocyte à une cellule épithéliale, l'ensemble étant ainsi dénommé « battery cell » (Wood et Novak, 1982). Ces auteurs ont détaillé une deuxième jonction s'établissant entre les nématocytes et simultanément entre les cellules de la partie basale de l'ectoderme et avec la mésoglée. Domart-Coulon *et al.* (2004) ont induit la dissociation irréversible des cellules de *P. damicornis* en lysant les jonctions cellulaires avec la cytochalasine D pour obtenir des cellules isolées. Chez les animaux, les jonctions lacunaires et les protéines contractiles sont considérées comme largement impliquées dans la connexion entre les cellules épithéliales (Gabbiani *et al.*, 1978). Ces auteurs ont montré que la production des jonctions lacunaires et des protéines contractiles est renforcée dans les epithelia après l'exposition à des conditions stressantes. Dans les TB, des études plus poussées sont nécessaires pour identifier ces jonctions et déterminer l'impact des traitements cryoprotecteurs sur le maintien de ces interconnexions.

Parmi les cellules présentes dans la CM, les zooxanthelles endommagées conservent leur forme sphéroïde malgré l'état de vacuolisation et la transparence de certaines cellules observées dans cette étude. Kiryu *et al.* (2015) notent que la vacuolisation des symbiontes constitue la première étape de la dégradation des zooxanthelles. Mise et Hidaka (2003) suggèrent que ce processus est caractéristique de l'état nécrotique des cellules hôtes. La forme irrégulière et la rupture de la membrane de la cellule hôte libérant ainsi le dinoflagellé (Mise et Hidaka, 2003 ; Ladrière *et al.*, 2008 ; Kiryu *et al.*, 2015) n'ont pas été observées dans cette étude. L'observation de dégradations plus avancées des zooxanthelles peut demander un délai d'observation supérieur à 48 h. L'observation de zooxanthelles anormales décrites dans cette étude après l'exposition aux CPA est similaire aux observations rapportées par les auteurs

s'intéressant au phénomène de blanchissement. Le phénomène de blanchissement peut être la résultante d'une exposition à des températures basses ou élevées mais aussi d'une exposition à certaines pollutions (Hoegh-Guldberg et Fine, 2004 ; Ladrière *et al.*, 2008 ; Plass-Johnson *et al.*, 2015). De plus, les anomalies observées sur les zooxanthelles peuvent être dues à la combinaison de deux facteurs physiques ou chimiques (Ladrière *et al.*, 2008 ; Plass-Johnson *et al.*, 2015). Ainsi dans cette étude, l'exposition des TB aux solutions de CPA et à une température basse pourrait être la cause de ce phénomène de blanchissement. Enfin, les réponses différentes des zooxanthelles aux facteurs de stress peuvent être dues à la variabilité génétique des *Symbiodinium* sp. présentes dans les tissus de *P. damicornis*. Une étude plus approfondie doit être réalisée dans l'objectif de comprendre la tolérance des symbiotes aux solutions cryoprotectrices. Hagedorn *et al.* (2010) ont observé de faibles tolérances des *Symbiodinium* sp. de trois Scléactiniaires incluant *P. damicornis*. L'activité photosynthétique de ces symbiotes a été préservée après l'exposition à des solutions individuelles de CPA contenant 0.71 M DMSO, 0.69 M Gly, 1.24 M méthanol ou 0.70 M propylène glycol pendant 20 min à 23-25°C. Ces auteurs ont révélé la faible perméabilité des *Symbiodinium* sp. aux CPA et des différences entre les clades dans la tolérance à la pression osmotique et dans les dommages liés au refroidissement. Ces facteurs semblent être limitants pour réussir leur cryoconservation par la congélation lente (Hagedorn *et al.*, 2010). La vitrification apparaît plus prometteuse pour la conservation de ces cellules (Hagedorn et Spindler, 2014).

La perte progressive des pigments photosynthétiques après traitement induit un changement de coloration des zooxanthelles notamment observé dans les *Expériences 5* et *6*. La coloration PAS-NBB révèle des zooxanthelles avec un cytoplasme bleu, témoignant du contenu protéique des symbiotes. Ces cellules deviennent pâles jusqu'à transparentes en fonction des expériences réalisées. L'évolution vers la transparence indique une dégradation progressive du contenu protéique et des disaccharides jusqu'à la dégradation des organites après le traitement. Ladrière *et al.* (2008) ont observé une telle décoloration à la suite d'un stress thermique. Mise et Hidaka (2003) ont aussi noté une transparence des zooxanthelles contenues dans les tissus d'*Acropora nasuta* pour des périodes où la température des eaux de surface excédait 30°C. Franklin *et al.* (2004) ont décrit le processus de vacuolisation, l'accumulation de lipides et la complète désorganisation des organites qui s'opère dans les zooxanthelles à la suite d'un stress thermique ou d'un stress lumineux. Des observations requérant l'usage de la microscopie électronique pourraient permettre d'étudier l'importance des dégradations après l'exposition aux CPA. Comme indiqué dans l'étude de Hagedorn *et al.* (2010), les perturbations induites par les solutions de CPA pourraient avoir un impact sur la

photoinhibition, ce qui nécessiterait de ce fait de nouvelles études pour évaluer l'efficacité photosynthétique après traitement. L'oxydation des pigments photosynthétiques peut être provoquée par les dommages oxydatifs induits par la production des dérivés de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) (Fleck *et al.*, 2003 ; Franklin *et al.*, 2004 ; Kiryu *et al.*, 2015). Fleck *et al.* (2000) ont décrit l'inhibition de l'activité photosynthétique de la microalgue *Euglena gracilis* due à la production de radicaux hydroxyle après exposition aux CPA. Day *et al.* (2000) suggèrent que l'addition de desferrioxamine dans les mélanges de CPA permet de réduire la production d'hydroxyle et ainsi de diminuer le niveau de stress oxydatif d'*E. gracilis*. L'augmentation de l'activité de la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD) renseigne sur la capacité de réduction des superoxydes (O_2^-) et du peroxide d'hydrogène (H_2O_2) et évite également la production de groupements carbonyles et des aldéhydes produits à l'issue de la peroxydation lipidique (Fleck *et al.*, 2003 ; Higuchi *et al.*, 2012). Fleck *et al.* (2003) indiquent que la SOD, la CAT et la glutathion réductase permettent d'augmenter la tolérance au froid de la microalgue *Haematococcus pluvialis* durant les traitements cryogéniques avec l'utilisation de 0.7 M DMSO pendant 15 min à 20 - 22 °C (Fleck *et al.*, 2003). Ces ROS, associés à des températures élevées, induisent une réduction de la photosynthèse et de la calcification (Higuchi *et al.*, 2012). Le stress oxydatif est caractérisé par une corrélation négative entre la concentration en carbonyles et la chlorophylle a. Inversement, une corrélation positive est obtenue entre la quantité d'HSP70 et de carbonyles (Downs *et al.*, 2002). Egalement, ces auteurs décrivent que le dosage de l'ubiquitine qui indique des dommages protéiques ainsi que la détermination de la concentration en glutathione permettent tous deux d'évaluer la production d'antioxydants après stress. Enfin, le phénomène de blanchissement peut être aussi considéré comme un processus généré pour protéger les cellules coralliennes contre les stress oxydatifs induits par la dégradation des zooxanthelles (Downs *et al.*, 2002). Des analyses plus poussées doivent donc être conduites afin de déterminer les niveaux de production des ROS après exposition aux traitements cryoprotecteurs.

L'observation de cnidocytes dévaginés a permis d'évaluer la tolérance des nématocytes aux différents traitements cryoprotecteurs. La libération du filament urticant et du venin s'opère par stimuli mécaniques et chimiques. Des groupes de disaccharides N-acétylés et des composés aminés impactent le cnidocyte et les supporting-cell complexes (CSCCs) qui modulent la décharge des cnidocytes (Mire-Thibodeaux et Watson, 1993 ; La Spada *et al.*, 2002). La dose optimale de disaccharide a été identifiée à 10^{-7} M pour

l'Octocoralliaire *Haliplanella* sp. (Mire-Thibodeaux et Watson, 1993). Dans nos expériences, seuls des CPA de faible poids moléculaires ont été testés, sans l'addition de disaccharides. Cependant, de nombreux protocoles de cryoconservation utilisent des solutions cryoprotectrices contenant des disaccharides. Sur les TB, l'utilisation des disaccharides pourrait donc impacter la dévagination des cnidocytes. Cette hypothèse requiert plus d'investigations afin de déterminer l'impact de l'utilisation des disaccharides. De façon intéressante, le cnidocyte est imperméable à l'eau et devient perméable seulement lors de la décharge. La capsule est seulement perméable aux petites molécules de masse molaire inférieure à 600 (Hidaka, 2012).

Ca^{2+} (10 mM) (Salleo *et al.*, 1994 ; Hidaka, 2012) et de fortes concentrations externes en K^+ (200 mM KCl) (Salleo *et al.*, 1996) ont été identifiés pour produire des chocs hyposmotiques entraînant une décharge des nématocytes. Inversement, une eau sans calcium (Ca-FSW : Ca^{2+} -free solution) limite le processus de dévagination (Salleo *et al.*, 1996; La Spada *et al.*, 2002). Dans cette étude, les essais utilisant du Ca-FSW pour produire les TB n'ont pas été concluants (*résultats non publiés*) et la concentration en K^+ utilisée dans le KSW est très faible (20 mM) comparée aux 200 mM nécessaire pour le phénomène de décharge. En revanche, Salleo *et al.* (1994) indiquent que le gonflement des cellules induit par les conditions hypotoniques peut provoquer la dévagination des cnidocytes due au stimulus mécanique généré par la déformation de la membrane. Ainsi, les traitements utilisant les CPA et les fluctuations dans la configuration membranaire produites par les contraintes physiques du protocole de vitrification peuvent provoquer le phénomène de décharge des nématocytes. Dans cette étude, l'étape de rinçage a été pratiquée en trois étapes pour limiter les chocs osmotiques. Des études complémentaires doivent être réalisées afin de déterminer les concentrations en CPA qui s'avèrent les moins traumatisantes pour les nématocytes.

Salleo *et al.* (1996) ont décrit la dévagination des nématocytes des acontia, induite par 0.4 mM d'oxide nitrique (NO), notamment pour les mastigophores microbasiques d'*Aiptasia diaphana* (Salleo *et al.*, 1996). Ces auteurs ont également noté la dévagination des nématocytes en présence de NO malgré une exposition dans du Ca-FSW. En situation de stress comme lors d'un contexte de blanchissement, le stress thermique peut provoquer la production de nitrites qui seront transformés en NO (Bouchard et Yamasaki, 2008). La production de NO provenant d'une activité photosynthétique déficiente des zooxanthelles après exposition à un mélange de CPA non optimal pourrait donc être en partie responsable de la décharge des nématocytes. Ainsi, l'interprétation des réactions de chaque type cellulaire aux traitements cryoprotecteurs peut dépendre d'un certain nombre de facteurs. Ce peut être

d'abord la tolérance propre à chaque type cellulaire aux différents traitements cryoprotecteurs mais aussi la capacité de ces mêmes cellules à résister aux signaux tels les ROS (ROS : reactive oxygen species) provenant d'autres types cellulaires stressés.

Cette étude souligne les difficultés d'étudier la cryoconservation sur un matériel pluricellulaire tel que les TB. L'interprétation des résultats doit tenir compte de la réponse spécifique de chaque type cellulaire mais aussi des interactions qui s'établissent entre les cellules en réponse au stress induit par les traitements. Des investigations complémentaires seront nécessaires pour identifier la tolérance de chaque type cellulaire à la vitrification. Cette étude révèle également des différences de tolérance entre les TB pour un même traitement. Les survies obtenues par Chen et Tian (2005) sur les embryons de *P. olivaceus* après vitrification démontrent l'importance de tester une large quantité de matériel dans l'objectif d'obtenir la survie de quelques individus. Enfin, nos résultats montrent la nécessité de préserver les jonctions cellulaires durant le traitement, en particulier pour les cellules de l'ectoderme.

Nous proposons dans cette étude une nouvelle approche de cryoconservation, par l'adaptation de la méthode V Cryo-plate aux TB de *P. damicornis*. Cette approche est très innovante car elle utilise pour la cryoconservation des Scléactiniaires un nouveau matériel corallien, les TB qui ont très peu étudiés à ce jour. De plus, la technique de V Cryo-plate s'avère très bien adaptée à la manipulation de matériels fragiles tels que les TB.

Remerciements

Les auteurs remercient Francine Delmas, Hanka Hensens et Catherine Picq pour leur aide dans l'obtention des références bibliographiques.

Tableau 1. Combinaisons binaires ou ternaires de CPA testées pour le traitement cryoprotecteur de TB de *P. damicornis*.

Figure 1. Utilisation de la méthode V Cryo-plate pour la vitrification des TB de *P. damicornis*. **A** : TB de *P. damicornis* pourvu de deux filaments mésentériques ; **B** : Cryo-plates en aluminium contenant 10 puits vides (**a**) et 10 TB isolées (**b**) ; **C** : TB retirées de leurs cryo-plates après exposition à l'azote liquide et immergées dans l'ULS.

Figure 2. Observations histologiques des TB témoins. **A** : Ectoderme (Ect) contenant des cellules épithéliales (*ep*) ciliées (*cil*), des cellules sécrétrices (*sec*) et des cellules interstitielles (*int*) en position basale. La mésogée constitue une séparation acellulaire entre l'Ect et la masse centrale (CM) ; **B** : Pièces de tentacules (T) dans la CM ; **C** : Zooxanthelles (Zx) localisées dans la CM pourvues d'un pyrénocyste en rose, d'un cytoplasme bleu, un noyau en bleu foncé et de chloroplastes en jaune-vert ; **D** : Spirocyte (*sp*) dans la CM doté de son filament spiralé bleu ; **E** : p-mastigophore microbasique (*ma*) et cellules sécrétrices (*sec*) d'un tentacule localisé dans la CM.

Figure 3. Observations histologiques de TB après exposition aux traitements avec des CPA. **A** : Deux zooxanthelles (Zx), l'une non endommagées et l'autre avec une vacuolisation, de taille plus réduite dans un large cytoplasme (*cyt*) ; **B** : Cellules interstitielles (*int*) avec une apparence rétractée ; **C** : Large isorhize (*iso*) intact en bleu et p-mastigophore microbasique endommagé (*ma*). Capsule (*c*) séparée de sa base du filament (*sh*) pourvue d'épines (*sp*) d'un p-mastigophore microbasique ; **D** : Ectoderme et sa surface d'aspect cranté ; **E** : Fluorescence des noyaux après coloration au DAPI des TB témoins révélant l'ectoderme (Ect) et la masse centrale (CM) séparés par la mésogée (M). Les cellules interstitielles (*int*) se localisent au niveau de la partie basale de l'Ect ; **F** : Fine épaisseur de l'ectoderme révélée par la faible quantité de cellules interstitielles. Les zooxanthelles (Zx : flèches blanches) sont identifiables par des points très lumineux ; **G** : TB avec une CM, dépourvue d'ectoderme ; **H** : TB avec une CM dégradée et dépourvue d'ectoderme ; **I** : TB avec une extension mésogéique (flèches) ; **J** : TB dégradées sans ectoderme et avec une CM fortement dégradée. Présence de zooxanthelles larges et transparentes (flèches) jouxtant des zooxanthelles de taille normale ; **K** : Ectoderme d'une TB contenant de petits nématocytes (*nem*) localisés entre les cellules

ciliées épithéliales (*cil* et *ep*). Présence de cellules interstitielles (*int*) et de cellules sécrétrices (*sec*) ; **L** : Perturbations de l'agencement cellulaire ectodermique. Des cellules arrondies (*r.c*, flèches noires) sont visibles en position apicale de l'ectoderme et des cellules interstitielles (flèches blanches) de taille réduite sont également apparentes ; **M** : TB avec un ectoderme fragmenté et une CM non endommagée ; **N** : Ectoderme contenant des cellules disjointes ; **O** : TB sans ectoderme mais pourvu d'une mésoglye et d'une CM préservées.

Experiment n°	Fixed		CPA treatment				CPA concentration (M)			
	T0	T48	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4
1 (Control)			24h-ASW				0.0M 20min RT			
2			2.0M EG				2.0M 20min RT			
3			2.0M EG + 2.0M Gly				4.0M 20min RT			
4			1.5M EG + 0.5M Gly				2.0M 20min RT			
5			1.5M EG + 0.5M Gly	1.5M EG + 1.5M Gly + 1.5M Me ₂ SO			2.0M 10min RT	4.5M 10min ~0°C		
6			1.5M EG + 0.5M Gly	1.5M EG + 1.5M Gly + 1.5M Me ₂ SO	1.5M EG + 0.5M Gly		2.0M 5min RT	4.5M 10min ~0°C	2.0M 5min RT	
7			1.5M EG + 0.5M Gly	Liquid nitrogen			2.0M 20min RT	- 1h -196°C		
8			1.5M EG + 0.5M Gly	1.5M EG + 1.5M Gly + 1.5M Me ₂ SO	Liquid nitrogen		2.0M 10min RT	4.5M 10min ~0°C	- 1h -196°C	
9			1.5M EG + 0.5M Gly	1.5M EG + 1.5M Gly + 1.5M Me ₂ SO	Liquid nitrogen	1.5M EG + 0.5M Gly	2.0M 10min RT	4.5M 10min ~0°C	- 1h -196°C	2.0M 10min RT

Tableau 1

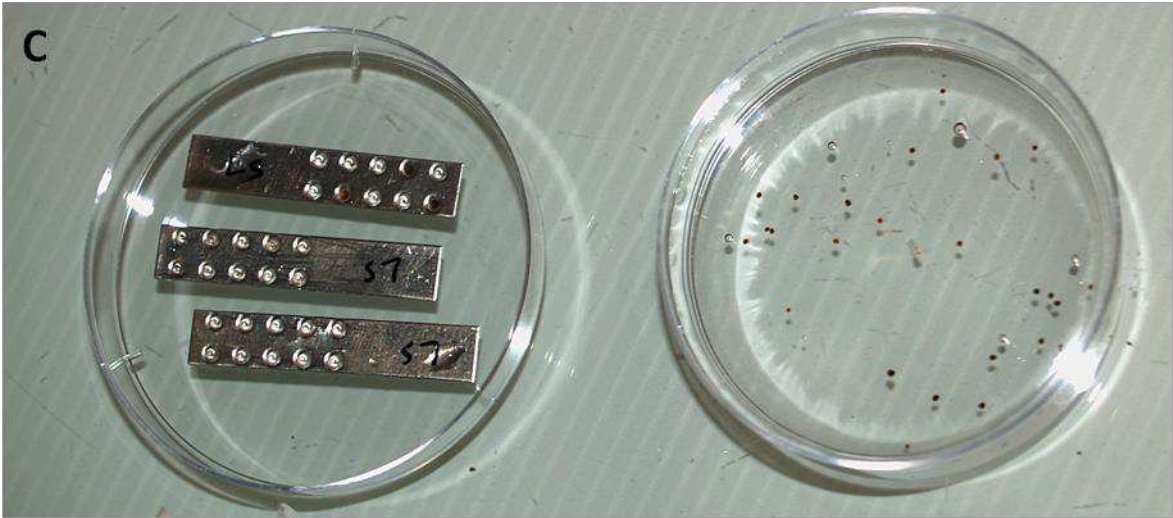
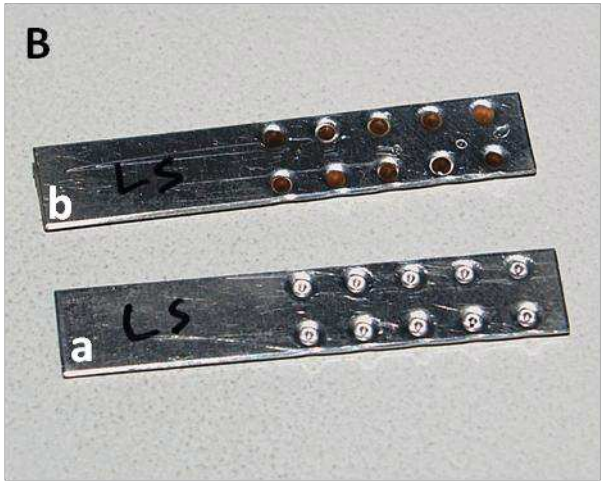


Figure 1

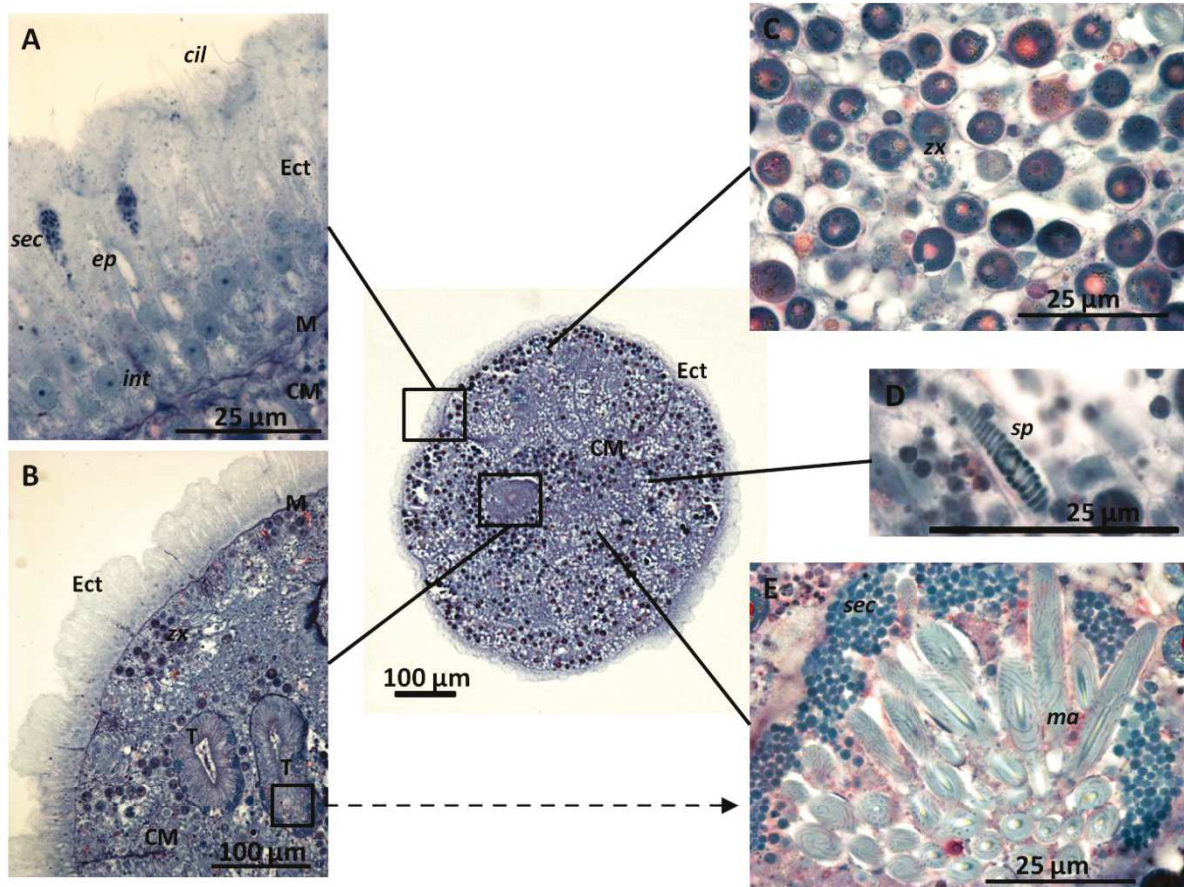


Figure 2

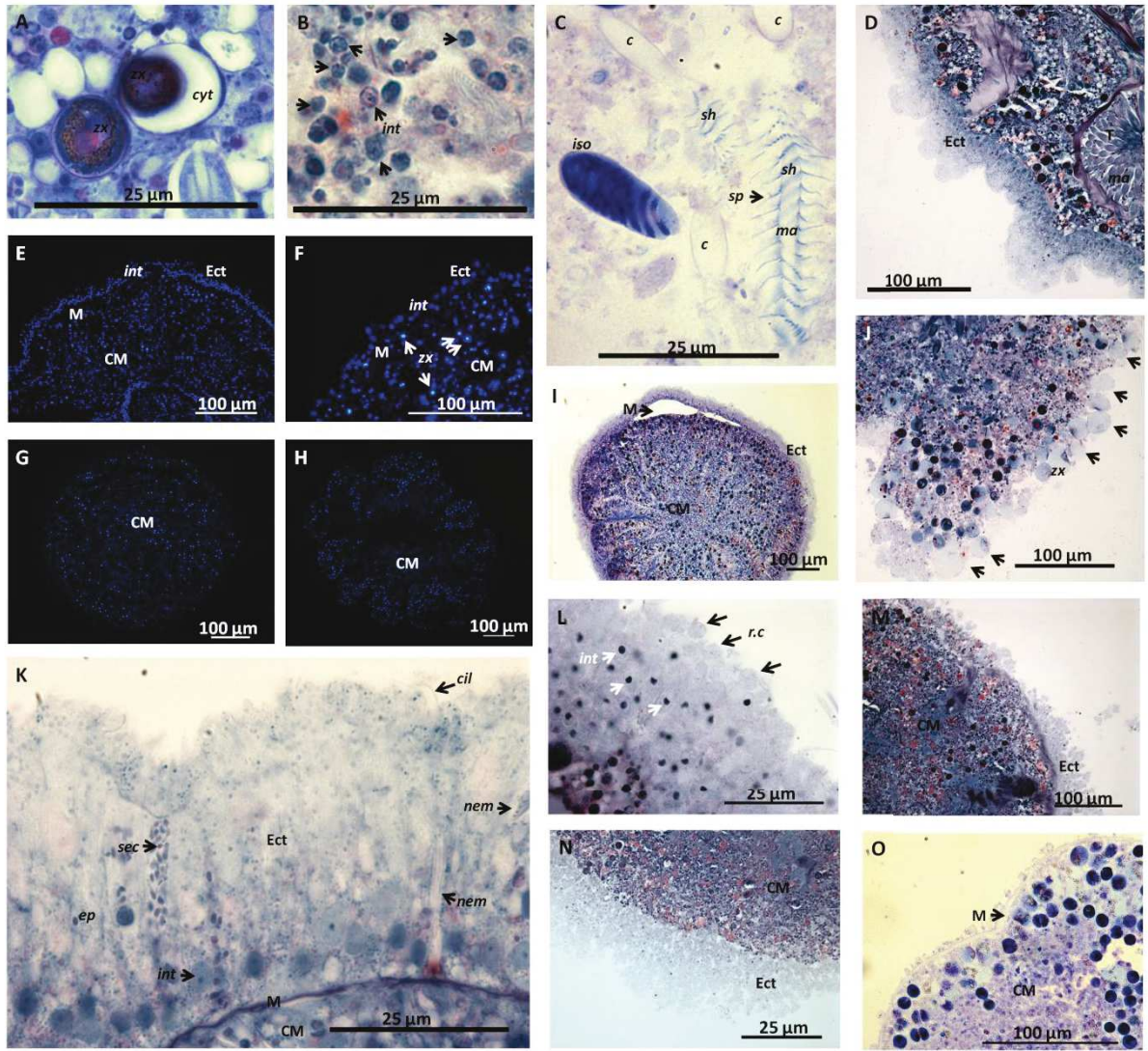


Figure 3

- J.N. Bouchard, H. Yamasaki, Heat stress stimulates nitric oxide production in *Symbiodinium microadriaticum*: a possible linkage between nitric oxide and the coral bleaching phenomenon. *Plant Cell Physiol* 49 (4) (2008) 641–652.
- E. Cabrita, V. Robles, O. Chereguini, J.C. Wallace, M.P. Herráez, Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 47 (3) (2003) 204–213.
- R.D. Campbell, C.N. David, Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata* II. Interstitial cells. *Journal of cell science* 16 (2) (1974) 349–358.
- T. Castelo-Branco, A.M. Batista, M.M.P. Guerra, R. Soares, S. Peixoto, Sperm vitrification in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 436 (2015) 110–113.
- N.H. Chao, C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai, T.T. Lin, Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquatic living resources* 7 (2) (1994) 99–104.
- D.M. Chapman, Cnidarian histology, *Coelenterate biology: Reviews and new perspectives*, Academic Press New York, 1974, pp. 1–92.
- S.L. Chen, Y.S. Tian, Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63 (4) (2005) 1207–1219.
- R. Cuevas-Uribe, S.P. Leibo, J. Daly, T.R. Tiersch, Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology* 63 (3) (2011) 186–197.
- R. Cuevas-Uribe, H. Yang, J. Daly, M.G. Savage, R.B. Walter, T.R. Tiersch, Production of F1 offspring with vitrified sperm from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus hellerii*. *Zebrafish* 8 (4) (2011) 167–179.
- R. Cuevas-Uribe, E.J. Chesney, J. Daly, T.R. Tiersch, Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture Research* 46 (2013) 1770–1784.
- L.E. Davis, Differentiation of neurosensory cells in *Hydra*. *Journal of cell science* 5 (3) (1969) 699–726.
- J.G. Day, R.A. Fleck, E.E. Benson, Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. *Journal of Applied Phycology* 12 (3-5) (2000) 369–377.
- G. De'ath, K.E. Fabricius, H. Sweatman, M. Puotinen, The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes. *PNAS* 109 (44) (2012) 17995–17999.
- I. Domart-Coulon, S. Tambutté, E. Tambutté, D. Allemand, Short term viability of soft tissue detached from the skeleton of reef-building corals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309 (2004) 199–217.
- C.A. Downs, J.E. Fauth, J.C. Halas, P. Dustan, J. Bemiss, C.M. Woodley, Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (4) (2002) 533–543.
- K. Edashige, D.M. Valdez, T. Hara, N. Saida, S. Seki, M. Kasai, Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. *Cryobiology* 53 (1) (2006) 96–106.
- F. Engelmann, Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40 (5) (2004) 427–433.
- L. Feuillassier, L. Martinez, P. Romans, I. Engelmann-Sylvestre, P. Masanet, D. Barthélémy, F. Engelmann, Survival of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* L. exposed to cryoprotectant solutions. *Cryobiology* 69 (2014) 376–385.
- L. Feuillassier, P. Romans, I. Engelmann-Sylvestre, P. Masanet, D. Barthélémy, F. Engelmann, Tolerance of apices of coral *Pocillopora damicornis* L. to cryoprotectant solutions. *Cryobiology* 68 (2014) 96–106.
- L. Feuillassier, P. Masanet, P. Romans, D. Barthélémy, F. Engelmann, Towards a vitrification-based cryopreservation protocol for the coral *Pocillopora damicornis* L.: tolerance of tissue balls to 4.5 M cryoprotectant solutions. *Cryobiology* (2015).
- E. Figueroa, O. Merino, J. Risopatrón, V. Isachenko, R. Sánchez, B. Effer, E. Isachenko, J.G. Farias, I. Valdebenito, Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83 (2) (2015) 238–245.
- R.A. Fleck, E.E. Benson, D.H. Bremner, J.G. Day, Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: a novel

- approach for developing protistan cryopreservation strategies. *Free radical research* 32 (2) (2000) 157–170.
- R.A. Fleck, E.E. Benson, D.H. Bremner, J.G. Day, A comparative study of antioxidant protection in cryopreserved unicellular algae *Euglena gracilis* and *Haematococcus pluvialis*. *CryoLetters* 24 (4) (2003) 213–228.
- D.J. Franklin, O. Hoegh-Guldberg, R.J. Jones, J.A. Berges, Cell death and degeneration in the symbiotic dinoflagellates of the coral *Stylophora pistillata* during bleaching. *Marine Ecology Progress Series* 272 (2004) 117–130.
- G. Gabbiani, C. Chaponnier, I. Hüttner, Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *The Journal of cell biology* 76 (3) (1978) 561–568.
- M. Hagedorn, R. Pan, E.F. Cox, L. Hollingsworth, D. Krupp, T.D. Lewis, J.C. Leong, P. Mazur, W.F. Rall, D.R. MacFarlane, G. Fahy, F.W. Kleinmans, Coral larvae conservation: Physiology and reproduction. *Cryobiology* 52 (2006) 33–47.
- M. Hagedorn, V.L. Carter, J.C. Leong, F.W. Kleinmans, Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*). *Cryobiology* 60 (2010) 147–158.
- M. Hagedorn, A. Farrell, V.L. Carter, Cryobiology of coral fragments. *Cryobiology* 66 (2013) 17–23.
- M. Hagedorn, R. Spindler, The Reality, Use and Potential for Cryopreservation of Coral Reefs. in: W.V. Holt, J.L. Brown, and P. Comizzoli, (Eds.), *Reproductive Sciences in Animal Conservation*, Springer, New York, 2014, pp. 317–329.
- F. Hamaratoğlu, A. Eroğlu, M. Toner, K.C. Sadler, Cryopreservation of starfish oocytes. *Cryobiology* 50 (2005) 38–47.
- M. Hidaka, Mechanism of nematocyst discharge. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 15 (2012) 45.
- T. Higuchi, Y. Suzuki, H. Fujimura, Multiple effects of hydrogen peroxide and temperature on antioxidants and bleaching, 4C Coral reef response to multiple stresses: organisms to ecosystems, 12th International Coral Reef Symposium, Cairns, Australia, 2012.
- O. Hoegh-Guldberg, M. Fine, Low temperatures cause coral bleaching. *Coral Reefs* 23 (3) (2004) 444–444.
- O. Hoegh-Guldberg, P.J. Mumby, A.J. Hooten, R.S. Steneck, P. Greenfield, E. Gomez, C.D. Harvell, P.F. Sale, A.J. Edwards, K. Caldeira, N. Knowlton, C.M. Eakin, R. Iglesias-Prieto, N. Muthiga, R.H. Bradbury, A. Dubi, M.E. Hatzios, Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318 (2007) 1737–1742.
- A.V. Junior, K.L. Goularte, J.P. Alves, F.A. Pereira, E.F. Silva, T.F. Cardoso, R.D. Jardim, D.P. Streit Jr, C.D. Corcini, Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Animal reproduction science* 157 (2015) 71–77.
- H.H. Kim, Y.G. Lee, S.U. Park, S.C. Lee, H.J. Baek, E.G. Cho, F. Engelmann, Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters* 30 (4) (2009) 291–299.
- Y. Kiryu, J.H. Landsberg, E.C. Peters, E. Tichenor, C. Burleson, N. Perry, Pathological effects of cyanobacteria on sea fans in southeast Florida. *Journal of invertebrate pathology* 129 (2015) 13–27.
- G. La Spada, G. Sorrenti, A. Soffli, B. Montaleone, A. Marino, G. Musci, Thiol-induced discharge of acontial nematocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132 (2) (2002) 367–373.
- O. Ladrière, P. Compère, N. Decloux, P. Vandewalle, M. Poulicek, Morphological alterations of zooxanthellae in bleached cnidarian hosts. *Cahiers de biologie marine* 49 (3) (2008) 215–227.
- H. Liu, W. Yu, J. Dai, Q. Gong, K. Yang, X. Lu, Cryopreservation of protoplasts of the alga *Porphyra yezoensis* by vitrification. *Plant science* 166 (1) (2004) 97–102.
- A.T. Marshall, O.P. Wright, Confocal laser scanning light microscopy of the extra-theclal epithelia of undecalcified scleractinian corals. *Cell and tissue research* 272 (3) (1993) 533–543.
- P. Mire-Thibodeaux, G.M. Watson, Direct monitoring of intracellular calcium ions in sea anemone tentacles suggests regulation of nematocyst discharge by remote, rare epidermal cells. *The Biological Bulletin* 185 (3) (1993) 335–345.

- T. Mise, M. Hidaka, Degradation of zooxanthellae in the coral *Acropora nasuta* during bleaching. *Galaxea JCRS* 5 (2003) 33–39.
- T. Niino, K. Watanabe, N. Nohara, T. Rafique, S.I. Yamamoto, K. Fukui, M.V. Arizaga, C.R. Castillo Martinez, T. Matsumoto, F. Engelmann, Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate. *Plant Biotechnology* 31 (3) (2014) 281–287.
- S. Ohki, M. Morita, S. Kitanobo, A.A. Kowalska, R.K. Kowalski, Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. *Cryobiology* 69 (2014) 134–139.
- J.G. Plass-Johnson, U. Cardini, N. van Hoytema, E. Bayraktarov, I. Burghardt, M.S. Naumann, C. Wild, Coral Bleaching. in: S. Netherlands, (Ed.), *Environmental Indicators*, 2015, pp. 117–146.
- B. Rinkevich, Do reproduction and regeneration in damaged corals compete for energy allocation? *Marine ecology progress series* 143 (1) (1996) 297–302.
- V. Robles, E. Cabrita, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, M.P. Herráez, Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology* 64 (7) (2005) 1633–1646.
- A. Sakai, F. Engelmann, Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28 (3) (2007) 151–172.
- A. Salleo, G. La Spada, M. Drago, G. Curcio, Hypotonic shock-induced discharge in acontia of *Calliactis parasitica* is blocked by gadolinium. *Experientia* 50 (2) (1994) 148–152.
- A. Salleo, G. Musci, P. Barra, L. Calabrese, The discharge mechanism of acontial nematocytes involves the release of nitric oxide. *The Journal of experimental biology* 199 (6) (1996) 1261–1267.
- K. Sekizawa, S.I. Yamamoto, T. Rafique, K. Fukui, T. Niino, Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnology* 28 (4) (2011) 401–405.
- Y. Tian, S. Chen, A. Yan, X. Ji, G. Yu, Cryopreservation of the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by vitrification. *Acta zoologica Sinica* 49 (6) (2002) 843–850.
- S. Tsai, W. Yen, S. Chavanich, V. Viyakarn, C. Lin, Development of cryopreservation techniques for gorgonian (*Junceella juncea*) oocytes through vitrification. *PLoS ONE* 10 (5) (2015) e0123409.
- R.L. Wood, P.L. Novak, The anchoring of nematocysts and nematocytes in the tentacles of hydra. *Journal of ultrastructure research* 81 (1) (1982) 104–116.
- S.I. Yamamoto, T. Rafique, K. Fukui, K. Sekizawa, T. Niino, V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *CryoLetters* 33 (1) (2012) 12–23.

Synthèse

Grâce à l'avancée des travaux sur la cryoconservation des gamètes, embryons et larves d'organismes aquatiques une large diversité de protocoles de congélation est aujourd'hui disponible. La difficulté d'obtenir les mêmes résultats post-traitements que certaines méthodes publiées, pousse de plus en plus les auteurs à vouloir standardiser les protocoles de congélation pour les mettre à la portée de tous (Cuevas-Uribe *et al.*, 2011a, 2013). Dans ce contexte, nous avons souhaité dans ce dernier chapitre proposer une démarche de vitrification des balles tissulaires qui reste facilement reproductible. La production simple et rapide des balles tissulaires à l'aide d'une solution de KSW a permis de valider cette technique pour les prochaines investigations. De plus, la méthode de V Cryo-plate, jusqu'alors uniquement utilisée pour des explants végétaux, a été adaptée avec succès aux balles tissulaires de *P. damicornis*. Avec l'utilisation des cryo-plates, nous permettons ainsi une plus grande facilité de manipulation des balles tissulaires durant les expérimentations.

Parmi les avantages que présente la vitrification en goutte, cette technique permet d'éliminer les bactéries qui pourraient survivre avec la congélation lente. Des bactéries sont en effet capables de survivre à la température de l'azote liquide. Il a même été démontré qu'un réchauffement du milieu ambiant pouvait réduire la capacité de développement et de reproduction de ces bactéries (Shivaji, 2015). D'autres auteurs ont aussi observé que certaines populations bactériennes (mycoplasmes) et virales, en plus de résister aux basses températures, résistent également à la stérilisation de l'azote liquide par les radiations ionisantes et les ultraviolets. Si la diminution de température ne permet pas d'éradiquer les populations bactériennes, en revanche l'augmentation de la vitesse de congélation peut être une alternative. La vitrification en goutte assure l'aseptie par refroidissement ultra-rapide (Merino *et al.*, 2012). C'est notamment le cas pour le virus de l'anémie du saumon induite qui attaque les spermatozoïdes des Salmonidés et qui résiste à la congélation lente (Merino *et al.*, 2012). Ce virus pourrait être éliminé par la vitrification en goutte. Chez les Scléactiniaires, l'intérêt d'éliminer certaines bactérioses telles que les vibrioses est potentiellement intéressant. Néanmoins, il a été démontré qu'une symbiose entre une flore bactérienne établie dans le mucus et le tissu corallien constitue, en plus d'un soutien nutritionnel, une barrière naturelle aux agents pathogènes. Dans ce contexte, l'éradication de la flore bactérienne par la vitrification amène de nombreuses interrogations sur la résistance du matériel corallien face aux agressions environnementales après exposition aux solutions cryoprotectrices et à l'azote liquide. De nombreuses investigations apparaissent nécessaires afin d'évaluer l'impact des traitements sur la composition bactérienne et sur les répercussions d'une telle élimination pour les cellules du corail hôte.

Dans nos essais, les balles tissulaires n'ont pas survécu à des concentrations en cryoprotecteurs supérieures à 4.5 M. De telles molarités ne permettent pas d'obtenir la vitrification des échantillons. En se basant sur la composition EG + Gly + DMSO et dans l'objectif d'augmenter la concentration en cryoprotecteurs, d'autres combinaisons doivent être

testées avec l'addition de nouveaux cryoprotecteurs pénétrants ou non pénétrants. Enfin, Chen et Tian (2005) ont montré que, sur les 292 embryons de *Paralichthys olivaceus* congelés par vitrification, seuls 20 embryons ont été viables après décongélation, dont 14 correctement formés. Ces chiffres reflètent la nécessité de réaliser un grand nombre de répétitions afin d'obtenir des pourcentages de survie post-traitement suffisants pour pouvoir décrire les conditions permettant d'obtenir cette survie.

Conclusion générale et perspectives

La Terre concentrerait près de 9 millions d'espèces, dont seulement 1.8 millions décrites par les taxonomistes. Certaines d'entre-elles, à peine identifiées, n'existent déjà plus, tandis que d'autres ont déjà disparu et ne seront jamais connues. L'océan hébergerait à lui seul près de 2.2 millions d'espèces. La disparition des récifs coralliens impacterait plus du tiers des 280 000 espèces marines jusqu'alors recensées. Aujourd'hui, 25 % des récifs sont sous la menace d'une disparition et les prévisions de réchauffement global et d'acidification des océans laissent peu de place à l'optimisme pour les années futures.

Les manifestations en faveur de la protection des océans sont pourtant bien réelles. Le tour du monde des événements internationaux pour une gestion durable de l'environnement, amorcé depuis le Club de Rome de 1968 et le rapport Brundtland en 1987, résume à lui seul les difficultés d'entente entre les pays. Les sommets de la Terre de Rio (1992), de Kyoto (1997), de Johannesburg (2002), de Copenhague (2009), de Rio + 20 (2012) se succèdent dans un monde saturé par la loi du productivisme où les engagements en faveur de l'environnement sont souvent pris *a minima*, sans contraintes et uniquement sur le long terme. La sixième extinction des espèces est en marche rapide, car accentuée par une pression anthropique toujours plus forte. L'avenir de l'Humanité repose désormais sur la capacité de notre espèce à savoir préserver les autres espèces. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte où la conservation de la diversité corallienne devient un enjeu pour la pérennité des générations futures.

La cryoconservation est une technique éprouvée sur de nombreuses espèces marines et terrestres, végétales et animales. Elle se révèle être un moyen peu coûteux et de mise en œuvre rapide pour préserver en sécurité et à long terme le matériel biologique. Avec moins de 10 années de recul, la cryoconservation des Anthozoaires est une thématique de recherche très récente. Les différentes orientations prises au cours de ces premiers travaux ont permis de montrer les possibilités qu'offrent les Anthozoaires pour la cryoconservation et l'éventail des techniques utilisables pour leur congélation. Cette thèse a été conduite en deux étapes ; une première étape de mises au point techniques puis une seconde étape analytique. Les investigations techniques ont d'abord été dirigées vers l'étude du matériel corallien dans l'objectif de déterminer la forme corallienne pluricellulaire la plus adaptée aux contraintes des manipulations et des conditions imposées par la technique de cryoconservation. Dans un second temps, les investigations techniques ont été menées sur la technique de vitrification dans le but de sélectionner les traitements cryoprotecteurs les mieux tolérés par le matériel corallien préalablement sélectionné. L'approche analytique, au travers une étude histologique, a permis de décrire l'impact de la technique de vitrification sur le matériel corallien.

Les apex de *P. damicornis*, la première forme corallienne testée pour la cryoconservation, ont été choisis pour leurs capacités de croissance. Si leur culture est apparue facilement réalisable, en revanche les apex se sont avérés peu tolérants aux conditions testées pour leur cryoconservation. Les expérimentations suivantes ont été menées

avec comme objectif d'utiliser des individus et non plus des colonies. Ainsi, les planulae, les polypes primaires et les polypes isolés ont été étudiés. Ces investigations nous permettent aujourd'hui de proposer dans cette thèse une nouvelle technique d'isolement des recrues à travers la méthode OozoFix. Si l'isolement des recrues coralliennes n'est pas une problématique nouvelle, en revanche la technique d'isolement mise au point, qui permet de constituer des lots définis de polypes primaires sur de très faibles surfaces, est réellement innovante. Pour les essais de cryoconservation, cette méthode permet de transférer rapidement des lots de polypes primaires entre différentes solutions de cryoprotecteurs. Elle permet aussi de limiter les dommages liés aux manipulations du matériel corallien. Cette technique offre des facilités de manipulation qui à ce jour étaient perçues comme un véritable frein à l'expérimentation sur les recrues. La technique OozoFix a d'ailleurs permis la refixation des polypes isolés de *P. damicornis*, montrant là tout son intérêt pour de futures investigations.

En ce qui concerne les polypes isolés, l'observation de polypes isolés et mobiles de *P. damicornis* dans ce travail de thèse n'a, semble-t-il, encore jamais été rapportée. Nous avons ainsi montré qu'une espèce branchue à petits polypes (SPS) telle que *P. damicornis* peut utiliser ce type de reproduction asexuée, à ce jour uniquement observée sur des espèces massives telles que *F. fавus* et *O. patagonica*. L'espèce *P. damicornis* a donc la faculté d'expulser des polypes isolés, viables, capable de se refixer et d'édifier une nouvelle colonie par une re-calcification et la reproduction de polypes clones.

Bien que ces différents matériels puissent se révéler intéressants pour la cryoconservation des coraux, les contraintes de production (faibles quantités, durées importantes de préparation) nous ont conduits à étudier une autre forme pluricellulaire, les balles tissulaires. Les balles tissulaires ont été obtenues par deux techniques très différentes, l'excision mécanique et l'expulsion par voie chimique. Nous avons proposé pour la première fois la production de balles tissulaires de *P. damicornis* obtenues à partir d'explants tissulaires issus d'une excision mécanique. Cette technique qui nécessite de 12 à 24 h d'incubation post-excision, s'avère très intéressante pour l'obtention rapide de balles tissulaires. Elle permet des prélèvements ciblés sur la partie apicale ou basale de la branche, au niveau du polype ou du coenosarque. Elle peut être ainsi beaucoup plus sélective que certaines méthodes comme l'utilisation de l'hydropulseur, tout en conservant l'agencement et les jonctions cellulaires ecto- et endodermiques. L'excision au scalpel présente enfin l'avantage d'être plus adaptée à des espèces pourvues de faibles quantités et/ou épaisseurs de tissus mous ainsi que pour espèces pourvues de branches à fines sections telles que les Pocilloporidés. Cependant, l'excision mécanique conduit à un échantillonnage trop hétérogène ainsi qu'à une absence de métamorphose en polype primaire. Ces contraintes nous ont incités à utiliser une seconde technique, adaptée du protocole de Domart-Coulon *et al.* (2004). L'expulsion chimique nous a permis d'obtenir des lots de balles tissulaires de tailles plus homogènes, en grande quantité et sur des courtes durées. L'isolement du contenu cellulaire de chaque polype en une balle tissulaire après exposition au KSW s'est avéré très efficace pour limiter les différences de composition cellulaire entre les balles tissulaires. Nous avons ainsi pu, pour la première fois, soumettre les balles tissulaires de Scléactiniaires à un protocole de cryoconservation. Les balles tissulaires apparaissent comme un très bon outil pour tester les nombreuses solutions

cryoprotectrices et, plus généralement, les différentes étapes d'un protocole de vitrification. Leur facilité de production, d'utilisation, de suivi post-traitement, leur mobilité et leur organisation cellulaire figurent parmi leurs nombreux atouts pour la recherche d'un protocole de cryoconservation. Une fois un tel protocole mis au point sur les balles tissulaires, il pourra être testé sur des formes moins accessibles telles que les planulae, les polypes isolés ou les polypes primaires.

Si aucune régénération des balles tissulaires en polypes n'a été observée dans notre travail, les résultats obtenus sur *F. granulosa* et même sur un Pocilloporidé, *S. hystrix*, pour lesquels la métamorphose de balles tissulaires en polypes a été obtenue, constituent un réel espoir pour les expérimentations futures. Des investigations complémentaires doivent être réalisées afin de comprendre les processus limitant la métamorphose d'une balle tissulaire en polype. De même, nous avons fait le choix de ne jamais utiliser de milieux de culture et/ou d'antimicrobiens pour la maintenance des balles tissulaires. A ce jour, nous avons montré que les balles tissulaires sont capables de survivre plus de 2 semaines sans adjuvants. Nous avons ainsi pu mettre en évidence à travers ce travail qu'il est possible d'isoler l'animal de la colonie corallienne, mais aussi d'adapter le matériel corallien aux techniques de cryoconservation. Les balles tissulaires sont un véritable atout pour les essais de cryoconservation grâce aux grandes quantités produites et la rapidité de cette production. Les répliques nécessaires à l'interprétation des résultats deviennent possibles grâce aux balles tissulaires. Cette technique permet enfin d'optimiser et de minimiser la consommation d'un matériel corallien classé en Annexe II-B de la Convention de Washington, tout en réalisant les nombreux essais que requiert la mise en place d'un protocole de cryoconservation.

Si la recherche d'un matériel corallien pluricellulaire adapté à la cryoconservation a représenté une partie importante de cette thèse, l'établissement d'un protocole de cryoconservation a également été un axe majeur de notre travail. Les différentes solutions cryoprotectrices testées ont été choisies en fonction des résultats publiés principalement sur les invertébrés marins, mais en tenant compte également des travaux réalisés sur les poissons, et même les animaux terrestres et les plantes. Nous savons désormais que les balles tissulaires tolèrent des concentrations en DMSO, EG, Gly et Met jusqu'à 2.0 M pour des temps d'exposition de 20 min. Une concentration plus faible, de 1.0 ou 1.5 M, peut être supportée pour des temps d'exposition allant jusqu'à 3 h pour l'EG. Cet alcool apparaît d'ailleurs comme le mieux toléré par les balles tissulaires, aussi bien employé seul qu'en mélange avec d'autres cryoprotecteurs. L'EG est également le cryoprotecteur le mieux toléré par les apex. Si le Met est bien toléré seul ou en mélange avec l'EG, en revanche, il dégrade très rapidement les balles tissulaires lorsqu'il est mélangé au DMSO. Le DMSO apparaît rapidement toxique pour des concentrations supérieures à 1.5 M. Il peut être utilisé en mélange mais à des concentrations n'excédant pas cette concentration limite. Les solutions individuelles contenant du Gly sont enfin très mal tolérées par les balles tissulaires. Si l'association Gly + Suc est rapidement létale pour les apex de *P. damicornis*, elle apparaît en revanche supportée par les balles tissulaires de la même espèce. Le Gly est toléré par les balles tissulaires dans des associations binaires et ternaires.

L'utilisation des solutions binaires et ternaires nous a permis d'exposer les balles tissulaires à des concentrations de 4.0 M. Les mélanges EG + Met et EG + Gly ont été les solutions les mieux supportées. L'exposition des balles tissulaires à une succession de mélanges de cryoprotecteurs a permis d'augmenter progressivement la molarité totale et d'obtenir de la survie pour une molarité de 4.5 M. Cependant, des solutions à 4.5 M ne sont pas suffisamment concentrées pour vitrifier lors de leur immersion dans l'azote liquide. A fortiori, elles ne peuvent induire la vitrification des solutés intracellulaires dans les balles tissulaires. Si les solutions cryoprotectrices utilisées n'ont pas permis d'aboutir à un protocole de vitrification, d'autres solutions cryoprotectrices devront être testées. L'ajout de tréhalose ou de saccharose dans les solutions de vitrification doit être testé, tout comme l'addition de PVP, d'acétamides, d'AFP et/ou d'AFGP. Le remplacement total ou partiel de l'eau de mer par de l'eau Milli-Q dans les solutions cryoprotectrices pourra être expérimenté afin de limiter la pression osmotique au moment de la congélation. Enfin, le nombre de paliers de concentration des solutions cryoprotectrices pourrait être augmenté pour limiter le stress osmotique et leur application pourrait être effectuée à 0 °C pour diminuer la toxicité des cryoprotecteurs.

Une originalité de notre travail sur la cryoconservation a été d'adapter la technique de V Cryo-plate, initialement développée pour les végétaux, à notre modèle animal. Cette technique, de mise en œuvre simple, facilite la manipulation des balles tissulaires lors de leur exposition aux solutions cryoprotectrices et permet également d'améliorer la reproductibilité des essais.

Enfin, une approche analytique a été développée sur les balles tissulaires exposées aux mélanges cryoprotecteurs ayant permis d'obtenir les plus forts taux de survie afin d'évaluer l'impact de ces différents traitements. L'étude histologique réalisée a produit de nombreux résultats. Nous avons tout d'abord pu préciser la structure histologique des balles tissulaires. Nous avons mis en évidence la présence d'un ectoderme dont la composition cellulaire évoque celle de l'ectoderme oral composant le tissu des branches de *P. damicornis*. Nous avons également observé une mésoglée séparant très distinctement l'ectoderme de la masse centrale. Enfin, nous avons décrit chez certaines balles tissulaires une forte concentration des zooxanthelles dans la partie la plus externe de la masse centrale, accolée à la mésoglée. D'autres cellules y sont associées, dont des cellules interstitielles et des cellules ciliées. Un tel arrangement cellulaire suggère l'ébauche d'un endoderme, tel qu'observé chez *F. granulosa* (Kramarsky-Winter *et al.*, 2008 ; Vizel *et al.*, 2011 ; Gardner *et al.*, 2014). Cette étude histologique nous a également permis d'observer l'impact de l'exposition aux solutions cryoprotectrices sur l'intégrité structurale des balles tissulaires. Nous avons ainsi montré le rôle important des cellules épithéliales localisées dans l'ectoderme des balles tissulaires. Leur jonction est apparue indispensable à l'intégrité des balles tissulaires, pendant et après les traitements cryoprotecteurs. Nous avons également observé la grande sensibilité des balles tissulaires aux étapes de rinçage. Enfin, nous avons montré l'intérêt de la coloration PAS-NBB, qui facilite l'identification des différents types cellulaires et l'interprétation des résultats. Grâce à cette coloration, nous avons pu caractériser les contenus protéiques et glucidiques des différents types cellulaires. Nous pourrions l'utiliser pour observer les

variations de l'intensité de coloration dans le temps afin de mettre en évidence les perturbations engendrées par les traitements sur la synthèse protéique et glucidique. Les inclusions lipidiques peuvent être révélées grâce à la coloration au noir Soudan. Les lipides jouent un rôle important dans la tolérance à la cryoconservation. Les membranes plasmiques ainsi que le contenu lipidique de chaque type cellulaire ont été révélés. La désorganisation des bicouches lipidiques après traitement pourrait ainsi être observée pour les différentes cellules. Egalement, les premiers essais réalisés avec l'iodure de propidium associé au di-acétate de fluorescéine ont permis d'individualiser les cellules lysées et les cellules vivantes. Ce mélange de fluorochromes pourrait aussi être utilisé en cytométrie de flux dont les variations de réfraction permettraient d'identifier la viabilité de chaque type cellulaire. Il faut cependant noter que l'autofluorescence des zooxanthelles pourrait apparaître rapidement contraignante et fausser l'interprétation des résultats. L'histochimie peut également être un recours pour la visualisation des organites cellulaires après traitements avec l'utilisation de colorations spécifiques telles que le vert Janus B pour la détection des mitochondries. Les phosphatases acides sont également utilisées comme marqueur histochimique des lysosomes. L'immunocytochimie peut enfin être envisagée pour détecter plus précisément l'état des jonctions cellulaires épithéliales après traitements, pour suivre l'intégrité membranaire après exposition aux solutions et pour étudier la perméabilité des cellules aux agents cryoprotecteurs.

Enfin, certains cryoprotecteurs comme le DMSO sont connus pour désorganiser le cytosquelette. Dans ce contexte, une étude cytologique permettrait de mieux comprendre la tolérance des différents types cellulaires aux conditions imposées par les traitements (molarité des CPA, température et durée d'exposition). A l'image de travaux de Hagedorn *et al.* (2006a) traitant de la perméabilité des larves de *F. scutaria* et de *P. damicornis* aux cryoprotecteurs, il serait intéressant d'étudier la perméabilité des différents types cellulaires, et plus largement des compartiments, des balles tissulaires aux mélanges cryoprotecteurs.

A ces méthodes analytiques surtout qualitatives, d'autres approches complémentaires plus quantitatives devront être associées. Ainsi, les perturbations physiologiques induites par les techniques de cryoconservation peuvent être étudiées. Nous connaissons l'importance des zooxanthelles pour l'hôte. L'efficacité photosynthétique des microalgues après exposition des balles tissulaires aux solutions cryoprotectrices peut être évaluée en mesurant la qualité de l'activité du photosystème II (PSII) des zooxanthelles au moyen d'un fluorimètre PAM (Pulse Amplitude Modulation). Par ailleurs, l'impact des traitements cryoprotecteurs pourrait également être étudié sur les zooxanthelles en mesurant par chromatographie en phase gazeuse la concentration d'antioxydants tels que le DMS et le DMSP. Cette approche permettrait d'évaluer l'état de stress des cellules animales et végétales soumises aux différentes conditions expérimentales.

L'activité métabolique a déjà été appréhendée au travers l'approche histologique comme un moyen d'évaluer l'effet des différents traitements sur la viabilité des balles tissulaires. La détermination du profil biomoléculaire en fonction des conditions expérimentales pourrait permettre de quantifier la production de glucides, lipides et protéines par la voie de l'HPLC ou par des dosages spectrophotométriques. Enfin, le dosage plus ciblé

de certaines protéines considérées comme des marqueurs de stress thermiques tels que les AFP et les HSP pourrait aussi indiquer l'état post-traitement du matériel corallien. Dans ce même objectif, la mesure de l'activité mitochondriale pourrait permettre d'évaluer l'impact des traitements sur le niveau énergétique et donc métabolique des cellules coralliennes. Enfin, l'analyse du ratio ARN/ADN peut être un moyen supplémentaire d'évaluer la synthèse protéique et de décrire par là même, la réponse des coraux au stress.

En conclusion, ce travail de thèse a proposé des pistes innovantes, aussi bien pour la fourniture du matériel corallien à des fins expérimentales que pour la mise au point d'une technique de vitrification. Les essais réalisés constituent la base d'un protocole de vitrification et confirment l'intérêt d'utiliser les balles tissulaires pour les recherches sur la cryoconservation. De nombreuses perspectives d'études s'ouvrent, notamment en développant des approches analytiques.

Ainsi s'achève ce travail de thèse dont l'objectif était de contribuer à développer un peu plus les connaissances sur la cryoconservation du corail. La conservation du patrimoine corallien et plus largement de nos ressources, devient un enjeu majeur pour les prochaines décennies. La COP21 prévue à Paris en novembre-décembre 2015 en est une illustration. Quarante années auront été nécessaires pour témoigner de l'importance de l'écosystème corallien pour le maintien de la biodiversité marine mais aussi de sa fragilité. Les quarante prochaines années portent désormais l'espoir que nos générations sauront prendre et appliquer les bonnes décisions pour une gestion responsable et durable de ce milieu.

Communications

Présentation orale

Feuillassier, L., Collin, M., Trouillard, N., Masanet, P., Romans, P., Barthélémy, D., Engelmann, F. Tolerance of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* to exposure to cryoprotectant treatment (April 27-30, 2015). International Conference *Low Temperature Science and Biotechnological Advances (CryoBiotech2015)*, New Delhi, India.

Posters

Poster 1 : Feuillassier, L., Romans, P., Engelmann-Sylvestre, I., Engelmann, F. Cryopreservation: a new tool for coral conservation (November 2014). Journée Aragoyenne.

Poster 2 : Feuillassier, L., Collin, M., Masanet, P., Romans, P., Engelmann, F. Les balles tissulaires du corail *Pocillopora damicornis* au service de la cryoconservation (October 2014). Fête de la Science.

Poster 3 : Feuillassier, L., Collin, M., Trouillard, N., Masanet, P., Romans, P., Barthélémy, D., Engelmann, F. Histological evidence of the role of cortex in preserving the integrity of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus 1758) during cryoprotectant treatment (April 27-30, 2015). International Conference *Low Temperature Science and Biotechnological Advances (CryoBiotech2015)*, New Delhi, India. STLB Best Poster Award.

International Conference - CryoBiotech2015 - STLB Best Poster Award *Poster 3*.

Poster 4 : Feuillassier, L., Collin, M., Trouillard, N., Masanet, P., Romans, P., Engelmann-Sylvestre, I., Barthélémy, D., Engelmann, F. Cryopreservation for long-term conservation of coral diversity: a case study with *Pocillopora damicornis* (August 03-06, 2015). International Congress ICCB-ECCB2015, Montpellier, France.

Cryopreservation : a new tool for coral conservation

Lionel Feuillassier ^{1,2} (feuillassier@obs-banyuls.fr) - Pascal Romans ¹ - Isabelle Sylvestre-Engelmann ² - Florent Engelmann ²

¹ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMS 2348-CRBM, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, F-75005, Paris, France

² IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05, France

1 Coral reefs are living on borrowed time

Coral reefs are among the world's most productive ecosystems but they are also the ones most threatened by environmental aggressions and anthropogenic pressure.

The measures taken to protect and restore coral reef ecosystems have proved insufficient to limit reef degradation. Thus, urgent action must be taken to efficiently conserve these ecosystems.

2 Cryopreservation, a proven technique with marine invertebrates

Firstly developed for gametes, embryos and larvae from commercial marine invertebrate species, cryopreservation (storage of biological material at ultra-low temperature, liquid nitrogen, -196°C) is now applied for the conservation of rare and threatened species.

Gametes, embryos and larvae from several phyla of marine invertebrate organisms including Sponges, Echinoderms, Molluscs and Arthropods have been successfully cryopreserved.

Cryopreservation constitutes a good strategy to ensure long-term *ex situ* conservation of threatened corals.

3 Optimisation of coral cryopreservation technique

In cryopreservation protocols, free intracellular water must be extracted from cells to avoid the formation of ice crystals upon cooling, which is detrimental to cellular integrity.

Tissues and organs are thus treated with highly concentrated cryoprotectant (CPA) solutions, which dehydrate cells before liquid nitrogen exposure.

All parameters of a cryopreservation protocol must be optimized to achieve high survival of cryopreserved samples. The main parameters include the type and physiological state of explants selected, the nature of CPAs employed, their concentration, their exposure duration, the cooling and warming rates and the recovery conditions.

Coral cryopreservation is a recent research area since the first studies started at the end of the 90's.

Spermatozoa and dissociated cells were successfully cryopreserved in 2012 using a slow cooling process.

More complex forms like planulae, polyps or apices appears highly sensitive to slow cooling procedures.

In our experiments, we investigated the potential of apices and tissue balls (TBs) of the tropical coral *Pocillopora damicornis* to withstand cryopreservation using a vitrification technique, which includes treatment of explants with highly concentrated CPA solutions followed by ultra-rapid cooling.

4 Investigations

Apexes and TBs were exposed to solutions of individual CPAs or binary or ternary CPA mixtures applied at various concentrations and for various durations.

Tolerance of apices to CPA solutions

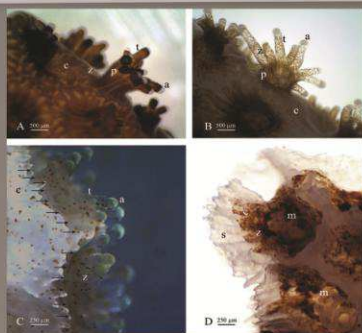
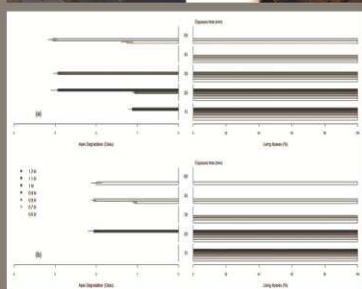
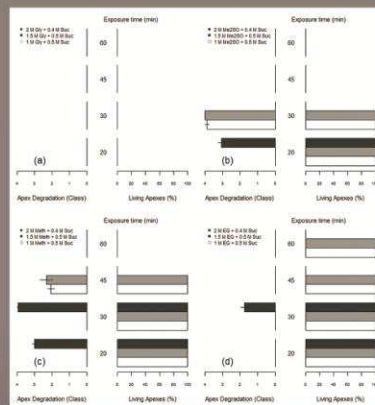


Illustration of the four classes defined to evaluate *P. damicornis* apex viability 24h after the CPA treatment. A (class 1): intact apex; B (class 2): moderate zooxanthellae expulsion (moderate damage); C (class 3): large zooxanthellae expulsion (moderate to severe damage); D (class 4): very large zooxanthellae expulsion and localized tissular necrosis (severe damage). a: acrosphere; c: coenosarc; m: mesenteric capsizing; p: polyp; s: skeleton; t: tentacle; z: zooxanthellae.



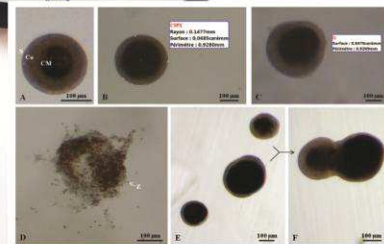
P. damicornis apex degradation and percentage of living apices 24 h after exposure for 15, 20, 30, 45 or 60 min to a CPA solution containing (a) sucrose or (b) trehalose at various concentrations (0.6-1.2 M).



P. damicornis apex degradation and percentage of living apices 24 h after treatment with (a) glycerol (Gly) + sucrose (Suc); (b) dimethyl sulfoxide (Me₂SO) + Suc; (c) methanol (Meth) + Suc and (d) ethylene glycol (EG) + Suc at different concentrations and exposures times.

Apexes tolerated exposure to CPA mixtures containing permeant (EG, Meth, Me₂SO, Gly) and non permeant CPAs (Suc or trehalose). Better results were obtained with EG + Suc. Gly + Suc combinations were lethal in all experimental conditions tested. Apexes tolerated a maximum molarity 2.4 M. Apex exposition to 1.5 M permeant CPA + 0.5 M Suc for 30 min showed the highest survival results.

Tolerance of TBs to CPA solutions



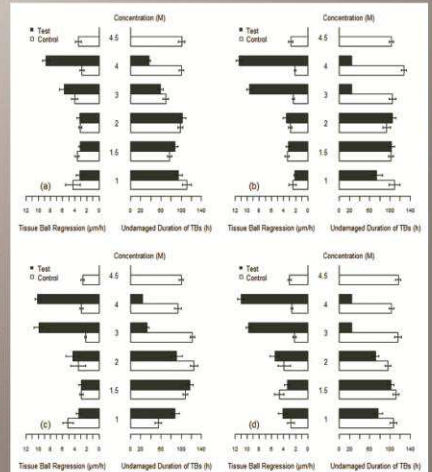
In vitro production of TBs from *P. damicornis* incubated for 24h after mechanical excision. A: TB organisation with S: smooth surface; Co: cortex and CM: central mass. B: Spheroid TB parameters measured with the Motic software. C: Parameters of a TB with irregular shape. D: TB disruption with unidentified coral cells and brown zooxanthellae (Z). E: Size heterogeneity in TB samples. F: Fusion between two TBs.

P. damicornis Tissue Ball Regression (TBR) and Undamaged Duration of Tissue Balls (UDTB) after treatment for 20 min with various CPA solutions (N = 30 TBs/treatment). Four individual CPA solutions were tested containing: (a) ethylene glycol (EG), (b) methanol (Meth), (c) dimethyl sulfoxide (Me₂SO) and (d) glycerol (Gly) at different concentrations.

TBs withstand treatment with more concentrated CPA solutions compared to apices. The best results were obtained with EG.

For all CPAs employed at the three lower concentrations (1.0, 1.5 and 2.0 M), no significant differences (p>0.05, Wilcoxon-test) between treated and control TBs were noted.

TBs did not tolerate treatment with concentrations higher than 4.0 M for the four CPAs tested.



5 Conclusion

TBs showed higher potential to withstand CPA treatments compared to apices. TBs can be efficiently used to test other parameters of the vitrification protocol before applying it to less easily available coral forms such as planulae or isolated polyps.

Les balles tissulaires du corail *Pocillopora damicornis* au service de la cryoconservation.



Lionel Feuillassier^{1,2} - Myriam Collin¹ - Patrick Masanet³ - Pascal Romans² - Florent Engemann¹

¹ IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05, France

² Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMS 2348-CRBM, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, F-75005, Paris, France

³ Aquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France

Les balles tissulaires du corail tropical *Pocillopora damicornis* sont produites dans le cadre d'une collaboration scientifique entre l'Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer et l'IRD de Montpellier.

Ces deux laboratoires s'investissent sur un projet commun : établir un **protocole de vitrification** (cryoconservation rapide) **sur une forme corallienne pluricellulaire**.

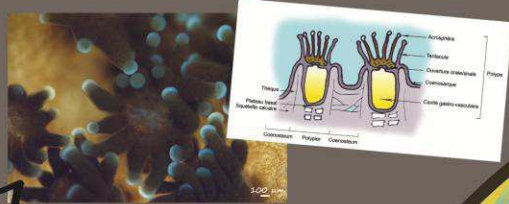
La cryoconservation des coraux est une science récente et peu maîtrisée.

Les balles tissulaires de coraux sont pour la première fois proposées à la cryoconservation pour :

- la diversité cellulaire,
- la facilité de production,
- l'homogénéité des lots,
- les quantités produites importantes.



Formation par étapes des balles tissulaires



1 Polypes avant traitement



2 Rétractation des tentacules

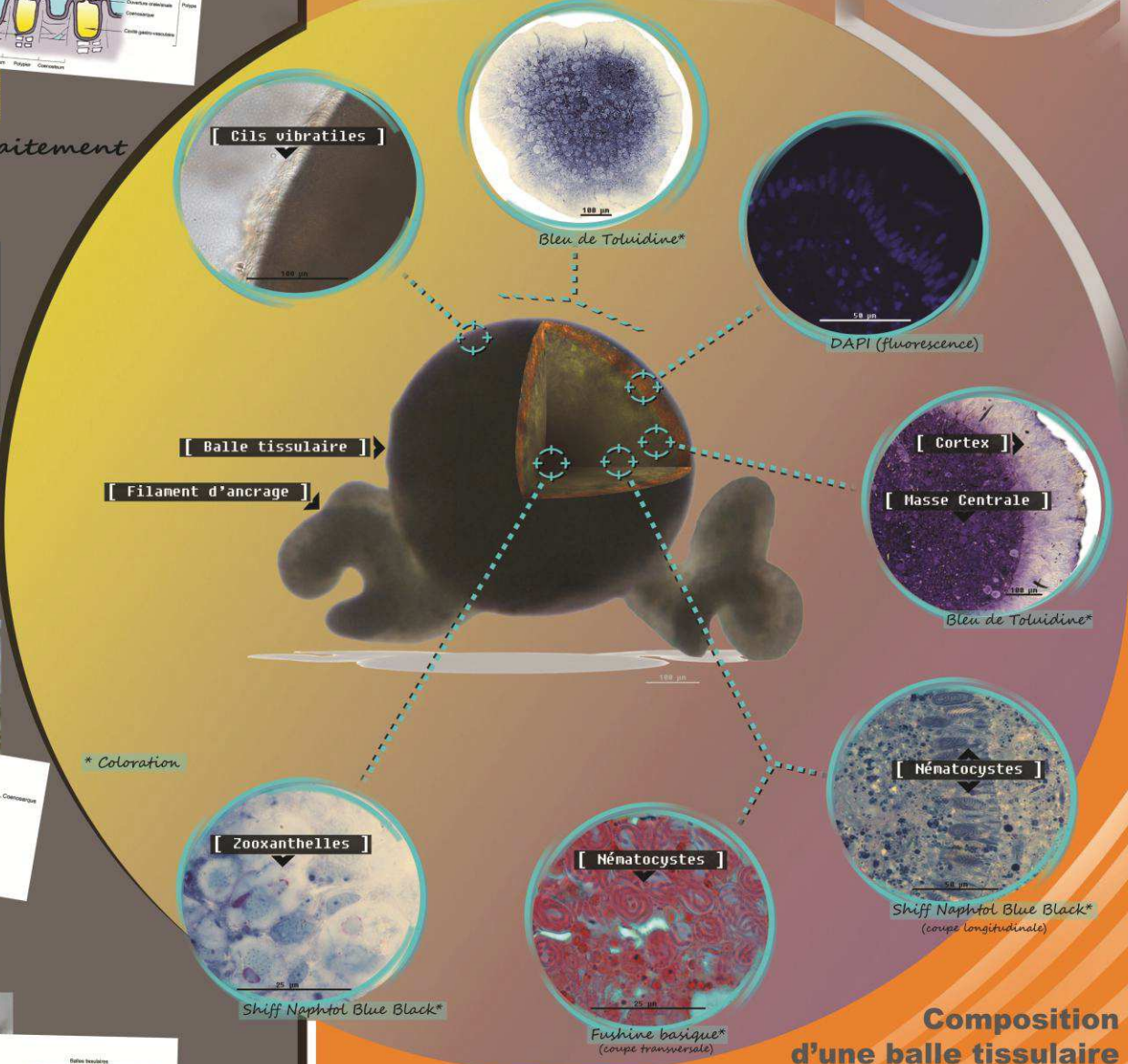


3 Squelette apparent



4 Formation des balles tissulaires et expulsion

[Histologie]



Composition d'une balle tissulaire

Les balles tissulaires s'organisent en deux compartiments, une zone périphérique identifiée comme le **cortex** et une **masse centrale** quelquefois pourvue d'une cavité interne.

La **surface lisse et ciliée** des balles tissulaires leur confère une **motilité** importante visible sous la forme de **rotations** continues.

Les **différents types cellulaires** qui composent la balle tissulaire sont **répartis de façon spécifique** entre le cortex et la masse centrale. Le cortex contient les **nématocystes** (cellules de capture et de défense), les **cellules interstitielles**, les **cellules épithéliales ciliées** et les **cellules glandulaires**. La masse centrale renferme dans sa périphérie les **zooxanthelles** et contient également des **mucocytes**, des **cellules glandulaires** ainsi que des **fragments tissulaires**.

Histological evidence of the role of cortex in preserving the integrity of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus 1758) during cryoprotectant treatment

Lionel Feuillassier^{1,2}, Myriam Collin², Nancy Trouillard¹, Patrick Masanet³, Pascal Romans¹, Dominique Barthélémy⁴, Florent Engelmann²

¹ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMS 2348-CRBM, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, F-75005, Paris, France
² IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05, France
³ Aquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France
⁴ Océanopolis, Port de plaisance du Moulin Blanc, BP91039, F-29210 Brest Cedex 1, France

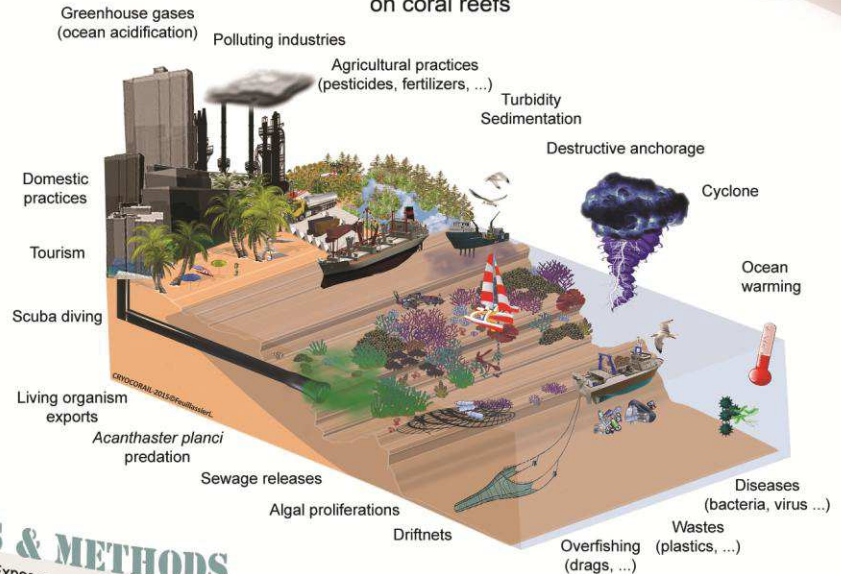
INTRODUCTION

Coral reefs represent the most diversified marine ecosystem and display high potential as a source of molecules for human medicine. Environmental and human pressures constitute the main threats to coral reef stability.

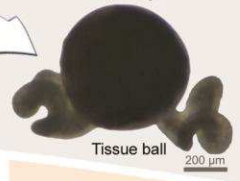
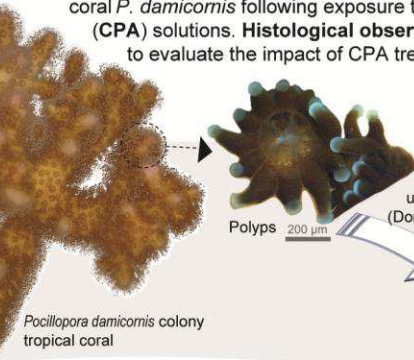
Cryopreservation offers an interesting approach to ensure the long-term *ex situ* conservation of coral diversity. To date, coral spermatozoa have been successfully cryopreserved (Hagedorn *et al*, 2012; Ohki *et al*, 2014) whereas cryopreservation of pluricellular materials including planulae or apexes has not been achieved (Hagedorn and Spindler, 2014; Feuillassier *et al*, 2014a). Aggregated cells termed tissue balls (TBs) proved to be a material of choice for establishing a cryopreservation protocol (Feuillassier *et al*, 2014b).

This study aimed at testing the tolerance of TBs from the tropical coral *P. damicornis* following exposure to individual cryoprotectant (CPA) solutions. Histological observations were performed to evaluate the impact of CPA treatment on TB structure.

Environmental and anthropogenic threats on coral reefs



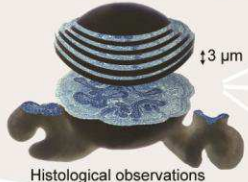
MATERIALS & METHODS



Chemical expulsion using sea water + KCl (Domart-Coulon *et al*, 2004)

Exposure to:
 - glycerol (Gly),
 - ethylene glycol (EG),
 - methanol (Met),
 - dimethylsulfoxide (Me2SO).

1.5 M - 3.0 M for 20 min and 60 min

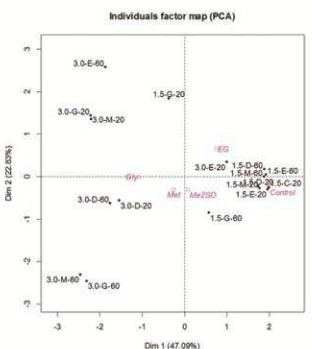
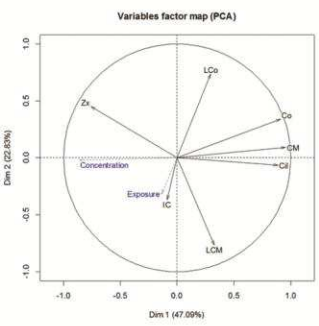


Toluidine Blue (BT): stains nucleus in blue and cytoplasm in light blue.
Periodic acid-Schiff-naphthol blue-black (NBB): stains proteins in blue and carbohydrates in pink.
4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI): blue fluorochrome revealing dsDNA.

RESULTS

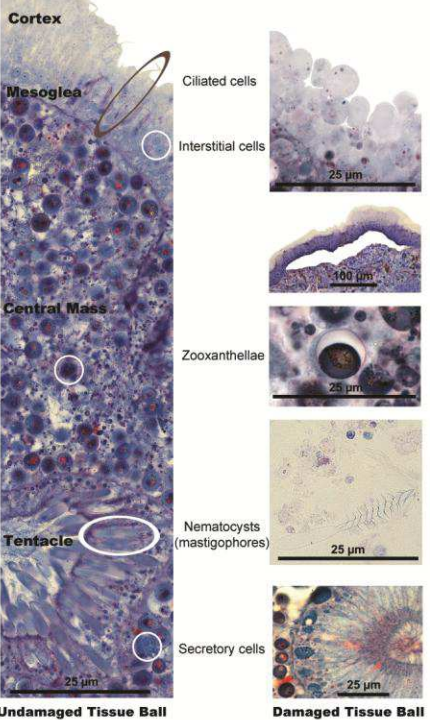
TBs displayed differences in cellular organization between Co and CM. Co showed well organized cells with epithelial cells alternating with secretory cells (mucocytes) and some nematocysts. Interstitial cells were visible at the basis of Co.
 CM concentrated most zooxanthellae (microalgal symbionts) in its external part. Tentacles and mesenterial filaments containing nematocysts (defense and capture cells) were observed in CM, along with interstitial cells and secretory cells.

Following treatment with a 3.0 M CPA solution, TBs showed high cellular disorganization, especially in Co. Isolated circular cells were observed. Ciliated and epithelial cells appeared highly disrupted. CM was less damaged than Co. Some zooxanthellae displayed vacuolation and nematocysts were discharged.

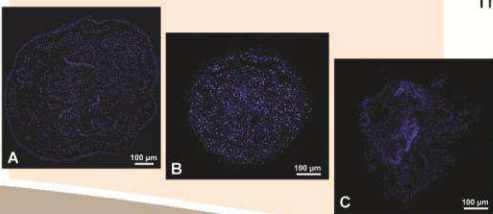


Principal Component Analysis exposing histological differences induced by CPA treatment. LCo: Length of cortex (µm); LCM: Length of central mass (µm); Cil: Maximum length of cilium (µm); IC: Maximum length of interstitial cells (µm); Zx: Maximum length of zooxanthellae (µm); Co: Structural conservation of cortex after CPA treatment; CM: Structural conservation of central mass after CPA treatment.

TBs tolerated treatment for 20 min and 60 min with the four CPA solutions concentrated at 1.5 M. The organization of cells in Co and CM was conserved. Damage was observed for a 3.0 M concentration. The tolerance of TBs to CPA solutions was: EG > Met = Me2SO > Gly.



Histological comparison between undamaged and damaged TBs. TBs were organized in two cellular compartments, the cortex (Co) and the central mass (CM) separated by the mesoglea.



DAPI examination. A: Undamaged TB with Co and CM, B: Damaged TB with CM, C: Damaged CM of TB.

SUMMARY

TBs tolerated 60 min exposure to 1.5 M CPA solutions. However, treatment for 60 min with 3.0 M CPA solutions induced structural damage, especially with Gly, Me2SO and Met, while EG was better tolerated. Epithelial and ciliated cells were the most sensitive cell types. Disruption of these cells resulted in a disjunctive Co. Co cells constituted a protective barrier for CM during CPA treatment. Further experiments should focus on the use of CPA mixtures, which may better preserve the structural integrity of TBs. This study confirmed that TBs represent a valuable material for the establishment of cryopreservation protocols.

REFERENCES

Domart-Coulon *et al*, (2004) Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 309(2), 199-217.
 Feuillassier *et al*, (2014a) Cryobiology, 69(3), 376-385.
 Feuillassier *et al*, (2014b) Cryobiology, 68(1), 96-106.
 Hagedorn and Spindler, 2014 In Reproductive Sciences in Animal Conservation (pp. 317-329). Springer New York.
 Ohki *et al*, (2014) Cryobiology, 69(1), 134-139.

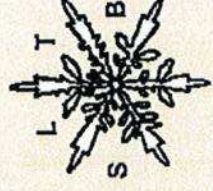


International Conference
Low Temperature Science and
Biotechnological Advances

27-30 April 2015

NASC Complex, New Delhi, India

SLTB Best Poster Award



This Certificate is Awarded to Dr./Mr./Ms. Lionel Feuillassier, Myriam Collin,

Nancy Trouillard, Patrick Masonet & Pascal Romans for the Best Poster entitled

Histological Evidence of the Role of Cortex to Preserve the Integrity of Jissue Balls.....

Presented in Session No. 2 on Aquatic Species

Preservation



K.C. Bansal
Organizing Secretary and Director, ICAR-NBPGR



Bart Panis
General Secretary, Society for Low Temperature Biology

Cryopreservation for long-term conservation of coral diversity: a case study with *Pocillopora damicornis*

Lionel Feuillassier^{1,2}, Myriam Collin¹, Nancy Trouillard², Patrick Masanet³, Pascal Romans², Isabelle Engelmann-Sylvestre¹, Dominique Barthélémy⁴, Florent Engelmann¹



¹ IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 05, France

² Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMS 2348-CRBM, Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer, F-75005, Paris, France

³ Aquarium de Canet-en-Roussillon, 2 boulevard de la Jetée, 66140 Canet-en-Roussillon, France

⁴ Océanopolis, Port de plaisance du Moulin Blanc, BP91039, F-29210 Brest Cedex 1, France

ICCB-ECCB 2015

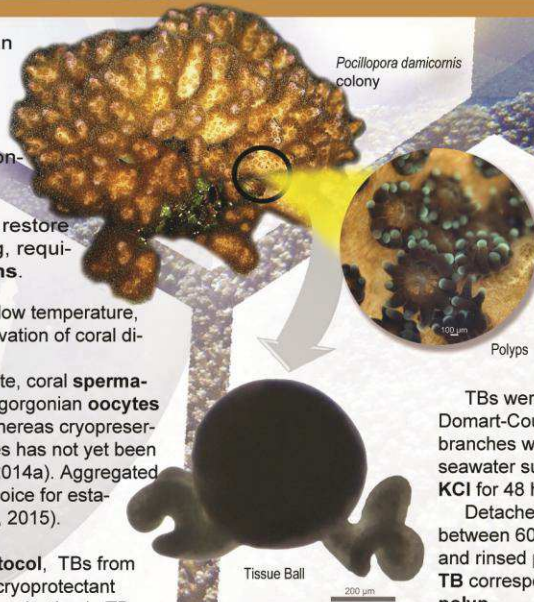
Reef-building constructions represent less than 0.2% of the total marine surface but they constitute vital area for 25% of all marine species. Coral reefs represent the world's most productive ecosystems and also the most diversified marine ecosystems. However, coral reefs are under threats due to environmental and anthropic pressures.

Despite numerous measures taken to protect and restore coral reef ecosystems, reef degradation is increasing, requiring the establishment of urgent conservation actions.

Cryopreservation (storage of biological material at ultra-low temperature, liquid nitrogen, -196°C) may ensure long-term *ex situ* conservation of coral diversity.

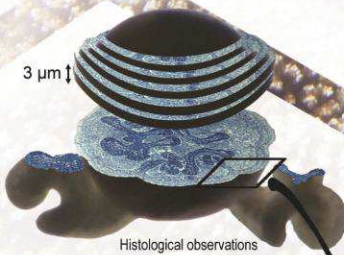
Coral cryopreservation is a recent research area. To date, coral spermatozoa (Hagedorn and Spindler, 2014; Ohki *et al.*, 2014) and gorgonian oocytes (Tsai *et al.*, 2015) have been successfully cryopreserved whereas cryopreservation of pluricellular materials including planulae or apex has not yet been achieved (Hagedorn and Spindler, 2014; Feuillassier *et al.*, 2014a). Aggregated cells termed tissue balls (TBs) proved to be a material of choice for establishing a cryopreservation protocol (Feuillassier *et al.*, 2014, 2015).

With the objective of developing a cryopreservation protocol, TBs from the tropical coral *P. damicornis* were exposed to individual cryoprotectant (CPA) solutions. The impact of CPA treatment on cellular organization in TBs was evaluated using histological observations.



TBs were prepared according to Domart-Coulon *et al.* (2004). Coral branches were exposed to artificial seawater supplemented with 20 mM KCl for 48 h (25°C, bubbling air).

Detached TBs with a diameter between 600 - 900 µm were collected and rinsed prior to experiments. One TB corresponded to one retracted polyp.



Histological observations

The integrity of the cells constituting the TB compartments was evaluated after the CPA treatments.

Histological observations were performed using three staining solutions:

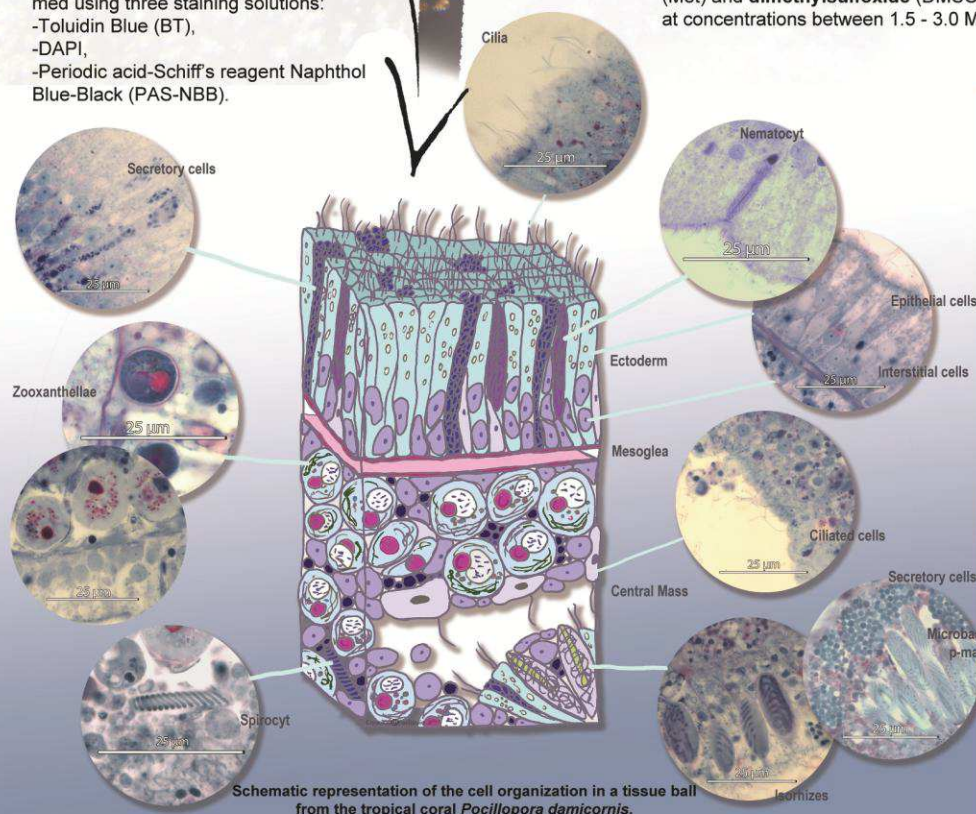
- Toluidin Blue (BT),
- DAPI,
- Periodic acid-Schiff's reagent Naphthol Blue-Black (PAS-NBB).



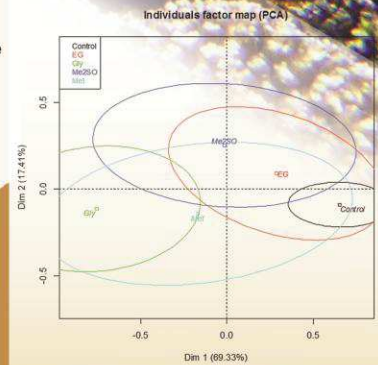
Cryo-plate containing isolated TBs

TBs were placed individually in wells of cryo-plates (Yamamoto *et al.*, 2011) and exposed to CPA solutions for 20 min or 60 min.

CPA solutions were composed of the following individual CPAs: ethylene glycol (EG), glycerol (Gly), methanol (Met) and dimethylsulfoxide (DMSO) at concentrations between 1.5 - 3.0 M.



Schematic representation of the cell organization in a tissue ball from the tropical coral *Pocillopora damicornis*.



Principal Component Analysis exposing histological differences induced by CPA treatment.

TBs tolerated treatments for 20 min and 60 min with the four CPA solutions concentrated at 1.5 M. Damage was observed at 3.0 M concentration.

TBs were composed of an ectoderm and a central mass (CM) divided by a cellular layer termed mesoglea. Epithelial and interstitial cells represented the most abundant cell types in the ectoderm. In addition, secretory cells and some nematocytes were observed. The CM contained zooxanthellae (microalgae), several nematocytes (isorhizes, mastigophores, spirocyts), interstitial cells, secretory cells and some ciliated cells. Epithelial and ciliated cells of the ectoderm were the most sensitive cell types to CPA treatments. The integrity of TBs during and after exposure to CPA solution depended on the tolerance of the ectoderm.

Further investigations should focus on the preservation of junctions between epithelial cells following CPA treatments. TBs constitute a valuable tool to understand the impact of a cryopreservation protocol on the cellular organization of multicellular coral materials.

Références bibliographiques

- A. Abed-Elmdoust, H. Farahmand, B. Mojazi-Amiri, G. Rafiee, R. Rahimi, Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquaculture Research* (2014) 1–6.
- H. Acosta-Salmón, D.R. Jerry, P.C. Southgate, Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology* 54 (2007) 13–18.
- F.H. Acuña, A. Garese, The cnidae of the acrospheres of the corallimorpharian *Corynactis carnea* (Studer, 1878) (Cnidaria, Corallimorpharia, Corallimorphidae): composition, abundance and biometry. *Belg. J. Zool.* 139 (1) (2009) 50–57.
- S.L. Adams, P.A. Hessian, P.V. Mladenov, The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin, *Evechinus chloroticus*. *Cryobiology* 52 (2006) 139–145.
- S.L. Adams, S.L. Gale, Z. Hilton, J.F. Smith, H.R. Tervit, D. Burritt, A. Rusk, L.T. McGowan, A.C. Alfaro, 069 Advances in shellfish germplasm cryopreservation: Current status and future directions. *Cryobiology* 67 (3) (2013) 417.
- S.L. Adams, L. Salinas-Flores, M.H. Lim, Diet conditioning of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Broodstock to improve oocyte cryopreservation Success. *Journal of Shellfish Research* 32 (2) (2013) 391–399.
- S. Agostini, Y. Suzuki, T. Higuchi, B.E. Casareto, K. Yoshinaga, Y. Nakano, H. Fujimura, Biological and chemical characteristics of the coral gastric cavity. *Coral Reefs* 31 (2012) 147–156.
- F.A. Al-Horani, E. Tambutté, D. Allemand, Dark calcification and the daily rhythm of calcification in the scleractinian coral, *Galaxea fascicularis*. *Coral Reefs Journal of the International Society for Reef Studies* 26 (3) (2007) 531–538.
- S. Al-Moghrabi, D. Allemand, J. Jaubert, Valine uptake by the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*: characterization and effect of light and nutritional status. *Journal of Comparative Physiology B* 163 (5) (1993) 355–362.
- S. Al-Moghrabi, C. Goiran, D. Allemand, N. Speziale, J. Jaubert, Inorganic carbon uptake for photosynthesis by the symbiotic coral-dinoflagellate association II. Mechanisms for bicarbonate uptake. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199 (2) (1996) 227–248.
- J. Alfaro, J. Komen, E.A. Huisman, Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. *Aquaculture* 195 (2001) 353–366.
- J. Ali, J.N. Shelton, Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Journal of reproduction and fertility* 99 (2) (1993) 471–477.
- D. Allemand, C. Ferrier-Pagès, P. Furla, F. Houlbrèque, S. Puvarel, S. Reynaud, E. Tambutté, S. Tambutté, D. Zoccola, Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *C. R. Palevol* 3 (2004) 453–467.
- D. Allemand, E. Tambutté, D. Zoccola, S. Tambutté, Coral calcification, cells to reefs. in: Springer, (Ed.), *Coral reefs: an ecosystem in transition*, Z. Dubinsky and N. Stambler, Netherlands, 2011, pp. 119–150.
- K.O. Amar, B. Rinkevich, A floating mid-water coral nursery as larval dispersion hub: testing an idea. *Marine Biology* 151 (2) (2007) 713–718.
- T. Anchoroguy, C.A. Cecchini, J.H. Crowe, L.M. Crowe, Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology* 28 (1991) 467–473.
- A.C. Anil, A.S. Tulaskar, D.C. Khandeparkar, A.B. Wagh, Cryopreservation of *Balanus amphitrite* nauplii. *Cryobiology* 34 (1997) 131–140.

- A. Antonius, D. Lipscomb, First protozoan coral-killer identified in the Indo-Pacific. *Atoll Research Bulletin* 481 (2000).
- T. Arakawa, J.F. Carpenter, Y.A. Kita, J.H. Crowe, The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *Cryobiology* 27 (1990) 401–415.
- R. Arun, T. Subramoniam, Effect of freezing rates on the survival of penaeid prawn larvae: a parameter analysis. *CryoLetters* 18 (1997) 359–368.
- E. Asahina, Freezing, injury in egg cells of the sea urchin. *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms: proceedings* 2 (1967) 211–229.
- E. Asahina, T. Takahashi, Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin. *Cryobiology* 15 (1978) 122–127.
- M.J. Ashwood-Smith, C. Warby, Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinylpyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology* 8 (5) (1971) 453–464.
- J. Bakhach, V. Casoli, J.-C. Guimberteau, La cryopréservation de tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Annales de chirurgie plastique esthétique* 52 (2007) 531–547.
- A.J. Balouin, D.E. Morse, Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biol. Bull.* 167 (1984) 124–138.
- J.K. Bang, J.H. Lee, R.N. Murugan, S.G. Lee, H. Do, H.Y. Koh, H.E. Shim, H.C. Kim, H.J. Kim, Antifreeze peptides and glycopeptides, and their derivatives: potential uses in biotechnology. *Marine drugs* 11 (6) (2013).
- S.A. Barakat, S. Al- Rousan, M.S. Al-Trabeen, Possible Index for Marine Pollution from of Scleractinian Corals in Northern Gulf of Aqaba, Jordan. *Journal of Natural Sciences Research* 4 (18) (2014) 25–35.
- S.A. Barakat, S. Al-Rousan, M.S. Al-Trabeen, Use of scleractinian corals to indicate marine pollution in the northern Gulf of Aqaba, Jordan. *Environ Monit Assess* 187 (2) (2015) 1–12.
- S. Barnay-Verdier, D. Dall'Osso, N. Joli, J. Olivré, F. Priouzeau, T. Zamoum, P.L. Merle, P. Furla, Establishment of primary cell culture from the temperate symbiotic cnidarian, *Anemonia viridis*. *Cytotechnology* 65 (2013) 697–704.
- A.N. Bart, S. Choosuk, D.P. Thakur, Spermaphore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquacult. Res.* 37 (2006) 523–528.
- D. Barthelemy, Progress in sexual coral reproduction at Oceanopolis. in: R.J. Leewis and M. Janse, (Ed.), *Advances in Coral Husbandry in Public Aquariums*, Public Aquarium Husbandry Series, Burgers' Zoo, Arnhem, the Netherlands, 2008, pp. 339–346.
- J.G. Baust, A.L. Lawrence, Enhancement of chill tolerance in larval *Artemia salina*: cooling regimens and multiple type cryoprotectant exposure. *Proc. World Maricul. Soc.* 10 (1979) 421–428.
- J.A.N. Bautista, H. Kanagawa, Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *jpn. J. Vet. Res.* 45 (4) (1998) 183–191.
- L. Beauvais, Sur la taxonomie des madréporaires mésozoïques. *Acta Palaeontologica Polonica* 25 (3-4) (1980) 345–360.
- R. Beeden, J. Maynard, M. Puotinen, P. Marshall, J. Dryden, J. Goldberg, G. Williams, Impacts and recovery from severe tropical cyclone Yasi on the Great Barrier Reef. *PLoS ONE* (2015).
- S.D. Behlmer, G. Brown, Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 7 (3) (1984) 193–199.
- J. Beirão, L. Zilli, S. Vilella, E. Cabrita, R. Schiavone, M.P. Herráez, Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. *Biology of reproduction* 86 (2) (2012) 59.
- Y. Ben-Haim, E. Rosenberg, A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* 141 (1) (2002) 47–55.
- S. Bénazet-Tambutté, D. Allemand, J. Jaubert, Permeability of the oral epithelial layers in cnidarians. *Marine Biology* 126 (1) (1996) 43–53.

- S. Bhavanishankar, T. Subramoniam, Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.). *J. Exp. Zool.* 277 (1997) 326–336.
- C. Birkeland, R.H. Randall, G. Grimm, Three methods of coral transplantation for the purpose of reestablishing a coral community in the thermal effluent area at the Tanguisson power plant, University of Guam, Marine Laboratory, 1979.
- P. Bongaerts, M. Carmichael, K.B. Hay, L. Tonk, P.R. Frade, O. Hoegh-Guldberg, Prevalent endosymbiont zonation shapes the depth distributions of scleractinian coral species. *Royal Society Open Science* 2 (2) (2015) 140297.
- L. Bongiorni, S. Shafir, D. Angel, B. Rinkevich, Survival, growth and gonad development of two hermatypic corals subjected to in situ fish-farm nutrient enrichment. *Marine Ecology Progress Series* 253 (2003) 137–144.
- T.C. Bosch, Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for *Hydra* regeneration. *Developmental biology* 303 (2) (2007) 421–433.
- D.G. Bourne, T.D. Ainsworth, F.J. Pollock, B.L. Willis, Towards a better understanding of white syndromes and their causes on Indo-Pacific coral reefs. *Coral Reefs* 34 (1) (2015) 233–242.
- L. Bramanti, M. Iannelli, T.Y. Fan, P.J. Edmunds, Using demographic models to project the effects of climate change on scleractinian corals: *Pocillopora damicornis* as a case study. *Coral Reefs* 34 (2) (2015) 505–515.
- S. Branchini, F. Pensa, P. Neri, B.M. Tonucci, L. Mattielli, A. Collavo, M.E. Sillingardi, C. Piccinetti, F. Zaccanti, S. Goffredo, Using a citizen science program to monitor coral reef biodiversity through space and time. *Biodiversity and Conservation* 24 (2) (2015) 319–336.
- I. Braslavsky, R. Drori, LabVIEW-operated novel nanoliter osmometer for ice binding protein investigations. *Journal of visualized experiments* (e4189) (2013) 72.
- A.D. Broadbent, G.B. Jones, R.J. Jones, DMSP in corals and benthic algae from the Great Barrier Reef. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55 (4) (2002) 547–555.
- A.D. Broadbent, G.B. Jones, DMS and DMSP in mucus ropes, coral mucus, surface films and sediment pore waters from coral reefs in the Great Barrier Reef. *Marine and Freshwater Research* 55 (8) (2004) 849–855.
- B.E. Brown, R. Hewitt, M.D. Le Tissier, The nature and construction of skeletal spines in *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *Coral Reefs* 2 (1983) 81–89.
- B.E. Brown, A.W. Tudhope, M.D.A. Le Tissier, T.P. Scoffin, A novel mechanism for iron incorporation into coral skeletons. *Coral Reefs* 10 (1991) 211–215.
- B.E. Brown, M.D.A. Le Tissier, R.P. Dunne, Tissue retraction in the scleractinian coral *Coeloseris mayeri*, its effect upon coral pigmentation, and preliminary implications for heat balance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105 (1994) 209–218.
- B.E. Brown, J.C. Bythell, Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 296 (2005) 219–309.
- N.K. Browne, J.K. Tay, J. Low, O. Larson, P.A. Todd, Fluctuations in coral health of four common inshore reef corals in response to seasonal and anthropogenic changes in water quality. *Marine environmental research* 105 (2015) 39–52.
- A.W. Bruckner, Life-saving products from coral reefs. *Issues in Science and Technology* 18 (3) (2002) 39–44.
- J.F. Bruno, L.E. Petes, C. Drew Harvell, A. Hetterger, Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology letters* 6 (12) (2003) 1056–1061.
- P.J. Bryan, P.Y. Qian, Induction of larval attachment and metamorphosis in the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 223 (1) (1998) 39–51.
- D. Bryant, L. Burke, J. McManus, M. Spalding, Reefs at risk: a map-based indicator of threats to the world's coral reefs. (1998).
- R.G. Bunge, J.K. Sherman, Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 172 (1953) 767–768.

- L. Burke, J. Maidens, Chp5 Economic Valuation Methodology, Reefs at Risk in the Caribbean, World Resources Institute, 2004, pp. 5.
- L. Buxton, S. Takahashi, R. Hill, P.J. Ralph, Variability in the primary site of photosynthetic damage in *Symbiodinium* sp.(dinophyceae) exposed to thermal stress. *Journal of phycology* 48 (1) (2012) 117–126.
- J.C. Bythell, C. Wild, Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 408 (1) (2011) 88–93.
- E. Cabrita, V. Robles, O. Chereguini, J.C. Wallace, M.P. Herráez, Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 47 (3) (2003) 204–213.
- K. Caldeira, M.E. Wickett, Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425 (2003) 365.
- R.A. Cameron, T.R. Tosteson, V. Hensley, The control of sea urchin metamorphosis: ionic effects. *Development, growth & differentiation* 31 (6) (1989) 589–594.
- R.D. Campbell, C.N. David, Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata* II. Interstitial cells. *Journal of cell science* 16 (2) (1974) 349–358.
- J. Cardona-Costa, F. García-Ximénez, Vitrification of zebrafish embryo blastomeres in microvolumes. *Cryoletters* 28 (4) (2007) 303–309.
- J.F. Carpenter, P.E. Dawson, Quantitation of dimethyl sulfoxide in solutions and tissues by high-performance liquid chromatography. *Cryobiology* 28 (3) (1991) 210–215.
- J.F. Carpenter, T.N. Hansen, Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (19) (1992) 8953–8957.
- K.E. Carpenter, M. Abrar, G. Aeby, R.B. Aronson, S. Banks, A. Bruckner, A. Chiriboga, J. Cortés, J.C. Delbeek, L. DeVantier, G.J. Edgar, A.J. Edwards, D. Fenner, H.M. Guzmán, B.W. Hoeksema, G. Hodgson, O. Johan, W.Y. Licuanan, S.R. Livingstone, E.R. Lovell, J.A. Moore, D.O. Obura, D. Ochavillo, B.A. Polidoro, W.F. Precht, M.C. Quibilan, C. Reboton, Z.T. Richards, A.D. Rogers, J. Sanciangco, A. Sheppard, C. Sheppard, J. Smith, S. Stuart, E. Turak, J.E.N. Veron, C. Wallace, E. Weil, E. Wood, One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* 321 (2008) 560–563.
- T. Castelo-Branco, A.M. Batista, M.M.P. Guerra, R. Soares, S. Peixoto, Sperm vitrification in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 436 (2015) 110–113.
- J. Ceh, M.R. Kilburn, J.B. Cliff, J.B. Raina, M. Keulen, D.G. Bourne, Nutrient cycling in early coral life stages: *Pocillopora damicornis* larvae provide their algal symbiont (*Symbiodinium*) with nitrogen acquired from bacterial associates. *Ecology and Evolution* 3 (8) (2013) 2393–2400.
- J.M. Cervino, F.L. Thompson, B. Gomez-Gil, E.A. Lorence, T.J. Goreau, R.L. Hayes, K.B. Winiarski-Cervino, G.W. Smith, K. Huguen, E. Bartels, The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *Journal of Applied Microbiology* 105 (5) (2008) 1658–1671.
- H. Cesar, L. Burke, L. Pet-Soede, The economics of worldwide coral reef degradation, Cesar Environmental Economics Consulting, Arnhem, 2003.
- H.S. Cesar, Coral reefs: their functions, threats and economic value. (2002) 14–39.
- N.H. Chao, C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai, T.T. Lin, Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquatic living resources* 7 (2) (1994) 99–104.
- M.R. Chapman, D.L. Kramer, Gradients in coral reef fish density and size across the Barbados Marine Reserve boundary: effects of reserve protection and habitat characteristics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181 (1999) 81–96.
- S. Chavanich, K. Soong, A. Zvuloni, B. Rinkevich, P. Alino, Conservation, management, and restoration of coral reefs. *Zoology* 118 (2) (2015) 132–134.
- B.W. Chen, C. Uvarani, C.Y. Huang, T.L. Hwang, C.F. Dai, J.H. Sheu, New anti-inflammatory tocopherol-derived metabolites from the Taiwanese soft coral *Cladiella hirsuta*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25 (1) (2015) 92–95.

- C.S. Chen, H.P. Lin, C.C. Yeh, L.S. Fang, Use of a fluorescent membrane probe to identify zooxanthellae in hospite among dissociated endoderm cell culture from coral. *Protoplasma* 226 (2005) 175–179.
- P.Y. Chen, C.C. Chen, L. Chu, B. McCarl, Evaluating the economic damage of climate change on global coral reefs. *Global Environmental Change* 30 (2015) 12–20.
- S.L. Chen, Y.S. Tian, Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63 (4) (2005) 1207–1219.
- Y.H. Choi, Y.J. Chang, The influence of cooling rate, developmental stage, and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 46 (2003) 190–193.
- Y.H. Choi, J.Y. Lee, Y.J. Chang, The influence of developmental stages and protective additives on cryopreservation of surf clam (*Spisula sachalinensis*) larvae. *J. Env. Biol.* 29 (4) (2008) 461–463.
- Y.H. Choi, Y.J. Chang, Influences of developmental stages, protective additives and concentrations of cryoprotective agents on the cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *CryoLetters* 35 (6) (2014) 495–500.
- S. Chow, Y. TAM, Y. Ogasawara, Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin* 168 (3) (1985) 471–475.
- D. Cleland, P. Krader, C. McCree, J. Tang, D. Emerson, Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of microbiological methods* 58 (1) (2004) 31–38.
- A.L. Cohen, T.A. McConnaughey, Geochemical perspectives on coral mineralization. *Reviews in mineralogy and geochemistry* 54 (1) (2003) 151–187.
- A.L. Cohen, D.C. McCorkle, S. de Putron, G.A. Gaetani, K.A. Rose, Morphological and compositional changes in the skeletons of new coral recruits reared in acidified seawater: Insights into the biomineralization response to ocean acidification. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 10 (7) (2009).
- M.F. Colombo-Pallotta, A. Rodríguez-Román, R. Iglesias-Prieto, Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs* 29 (4) (2010) 899–907.
- S. Comeau, R.C. Carpenter, Y. Nojiri, H.M. Putnam, S. K., E. P.J., Pacific-wide contrast highlights resistance of reef calcifiers to ocean acidification. *Proc. R. Soc. B* 281 (2014) 20141339.
- E.M. Costa-Neto, Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77 (1) (2005) 33–43.
- C.M. Crowder, W.L. Liang, V.M. Weis, T.Y. Fan, Elevated temperature alters the lunar timing of planulation in the brooding coral *Pocillopora damicornis*. *PLoS ONE* 9 (10) (2014) e107906.
- R. Cuevas-Urbe, S.P. Leibo, J. Daly, T.R. Tiersch, Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology* 63 (3) (2011) 186–197.
- R. Cuevas-Urbe, E.J. Chesney, J. Daly, T.R. Tiersch, Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture Research* 46 (2013) 1770–1784.
- G. Cuvier, *Histoires des Sciences Naturelles depuis leur origine jusqu'à nos jours, chez tous les peuples connus*. in: Boccard, (Ed.), 1665/66 - 1792: *Journal des savants*, Académie des Inscriptions et Belles-Lettres (Paris), 1841.
- M. Daly, M.R. Brugler, P. Cartwright, A.G. Collins, M.N. Dawson, D.G. Fautin, S.C. France, C.S. McFadden, D.M. Opresko, E. Rodriguez, S.L. Romano, J.L. Stake, The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668 (2007) 127–182.
- D. Datta, S.N. Talapatra, S. Swarnakar, Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. *International Letters of Natural Sciences* 7 (2015) 42–61.
- P.L. Davies, J. Baardsnes, M.J. Kuiper, V.K. Walker, Structure and function of antifreeze proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357 (1423) (2002) 927–935.

- P.S. Davies, The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs* 2 (4) (1984) 181–186.
- P.S. Davies, Short-term growth measurements of corals using an accurate buoyant weighing technique. *Marine biology* 101 (3) (1989) 389–395.
- P.S. Davies, Coral nubbins and explants for reef assessment and laboratory ecotoxicology. *Coral Reefs* 14 (4) (1995) 267–269.
- S.K. Davy, D. Allemand, V.M. Weis, Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (2) (2012) 229–261.
- R.S. De Groot, M.A. Wilson, R.M. Boumans, A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological economics* 41 (3) (2002) 393–408.
- G. De'ath, K.E. Fabricius, H. Sweatman, M. Puotinen, The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes. *PNAS* 109 (44) (2012) 17995–17999.
- P.G. Debenedetti, Supercooled and glassy water. *Journal of Physics: Condensed Matter* 15 (45) (2003) R1669–R1726.
- E.S.M. Deschaseaux, V.H. Beltran, G.B. Jones, M.A. Deseo, H.B. Swan, P.L. Harrison, B.D. Eyre, Comparative response of DMS and DMSP concentrations in *Symbiodinium* clades C1 and D1 under thermal stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 459 (2014) 181–189.
- D. Destoumieux-Garzón, M. Duperthuy, A.S. Vanhove, P. Schmitt, S.N. Wai, Resistance to Antimicrobial Peptides in *Vibrios*. *Antibiotics* 4 (3) (2014) 540–563.
- A.L. DeVries, S.K. Komatsu, R.E. Feeney, Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *Journal of Biological Chemistry* 245 (11) (1970) 2901–2908.
- O. Di Matteo, A.L. Langellotti, P. Masullo, G. Sansone, Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology* 58 (2) (2009) 145–150.
- F.H. Ding, Z.Z. Xiao, J. Li, Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* 68 (5) (2007) 702–708.
- A.D. Diwan, K. Kandasami, Freezing of viable embryos and larvae of marine shrimp, *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquacult. Res.* 28 (1997) 947–950.
- A.D. Diwan, S. Joseph, Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian J. Fish.* 46 (2) (1999) 159–166.
- J.R. Dobrinsky, Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45 (1) (1996) 17–26.
- I. Domart-Coulon, S. Tambutté, E. Tambutté, D. Allemand, Short term viability of soft tissue detached from the skeleton of reef-building corals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309 (2004) 199–217.
- I.J. Domart-Coulon, D.C. Elbert, E.P. Scully, P.S. Calimlim, G.K. Ostrander, Aragonite crystallization in primary cell cultures of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*. *PNAS* 98 (21) (2001) 11885–11890.
- I.J. Domart-Coulon, N. Traylor-Knowles, E. Peters, D. Elbert, C.A. Downs, K. Price, J. Stubbs, S. McLaughlin, E. Cox, G. Aeby, R. Brown, G.K. Ostrander, Comprehensive characterization of skeletal tissue growth anomalies of the finger coral *Porites compressa*. *Coral Reefs* 25 (4) (2006) 531–543.
- Q. Dong, J. Lin, C. Huang, Effects of cryoprotectant toxicity on the embryos and larvae of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 242 (2004) 655–670.
- Q. Dong, C. Huang, B. Eudeline, T.R. Tiersch, Cryoprotectant optimization for sperm of diploid Pacific oysters by use of commercial dairy sperm freezing facilities. *Aquaculture* 271 (2007) 537–545.
- S.D. Donner, W.J. Skirving, C.M. Little, M. Oppenheimer, O. Hoegh-Guldberg, Global assessment of coral bleaching and required rates of adaptation under climate change. *Global Change Biology* 11 (2005) 2251–2265.
- A.E. Douglas, Coral bleaching—how and why? *Marine pollution bulletin* 46 (4) (2003) 385–392.

- C.A. Downs, E. Kramarsky-Winter, J. Martinez, A. Kushmaro, C.M. Woodley, Y. Loya, G.K. Ostrander, Symbiophagy as a cellular mechanism for coral bleaching. *Autophagy* 5(2) (2009) 211–216.
- R.S. Dunn, J. McLachlan, Cryopreservation of echinoderm sperm. *Canadian journal of zoology* 51 (6) (1973) 666–669.
- P.J. Edmunds, S.C. Burgess, H.M. Putnam, M.L. Baskett, L. Bramanti, N.S. Fabina, X. Han, M.P. Lesser, J.S. Madin, C.B. Wall, D.M. Yost, R.D. Gates, Evaluating the causal basis of ecological success within the scleractinia: an integral projection model approach. *Marine Biology* 161 (12) (2014) 2719–2734.
- F. Engelmann, Les nouvelles méthodes de conservation ex situ, horizon.documentation.ird.fr, 1992.
- F. Engelmann, S. Dussert, Développement de la cryoconservation pour la conservation des ressources génétiques végétales. *Cahiers Agricultures* 9 (3) (2000) 237–244.
- F. Engelmann, Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40 (5) (2004) 427–433.
- N. Epstein, R.P.M. Bak, B. Rinkevich, Strategies for gardening denuded coral reef areas: the applicability of using different types of coral material for reef restoration. *Restoration Ecology* 9 (4) (2001) 432–442.
- L.A. Estroff, L. Addadi, S. Weiner, A.D. Hamilton, An organic hydrogel as a matrix for the growth of calcite crystals. *Org. Biomol. Chem.* 2 (1) (2004) 137–141.
- P. Ettinger-Epstein, S. Whalan, C.N. Battershill, R. de Nys, A hierarchy of settlement cues influences larval behaviour in a coral reef sponge. *Mar Ecol Prog Ser* 365 (2008) 103–113.
- A. Fabbrocini, R. D’Adamo, S. Pelosi, L.F. Oliveira, F. Silvestri, G. Sansone, Gamete cryobanks for laboratory research: Developing a rapid and easy-to-perform protocol for the cryopreservation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816) spermatozoa. *Cryobiology* 69 (1) (2014) 149–156.
- Y.H. Fadlallah, Sexual reproduction, development and larval biology in scleractinian corals. *Coral reefs* 2 (3) (1983) 129–150.
- G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman, Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21 (4) (1984) 407–426.
- G.M. Fahy, W.F. Rall, Vitrification: an overview. *Vitrification in assisted reproduction*. Informa Healthcare, London (2007) 1–20.
- G.M. Fahy, Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 60 (2010) S45–S53.
- G.M. Fahy, B. Wowk, Principles of cryopreservation by vitrification. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. in: N.J. Clifton, (Ed.), *Methods in molecular biology*, Springer New York, 2015, pp. 21–82.
- T.Y. Fan, J.J. Li, S.X. Le, L.S. Fang, Lunar periodicity of larval release by pocilloporid corals in southern Taiwan. *Zoological Studies* 41 (3) (2002) 288–294.
- T.Y. Fan, K.H. Lin, F.W. Kuo, K. Soong, L.L. Liu, L.S. Fang, Diel patterns of larval release by five brooding scleractinian corals. *Mar Ecol Prog Ser* 321 (2006) 133–142.
- R.A. Feely, C.L. Sabine, K. Lee, W. Berelson, J. Kleypas, V.J. Fabry, F.J. Millero, Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science* 305(5682) (2004) 362–366.
- C. Ferrier-Pagès, C. Richard, D. Forcioli, D. Allemand, M. Pichon, J.M. Shick, Effects of temperature and UV radiation increases on the photosynthetic efficiency in four scleractinian coral species. *Biol. Bull.* 213 (2007) 76–87.
- E. Figueroa, O. Merino, J. Risopatrón, V. Isachenko, R. Sánchez, B. Effer, E. Isachenko, J.G. Farias, I. Valdebenito, Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83 (2) (2015) 238–245.
- M. Fine, D. Tchernov, Scleractinian coral species survive and recover from decalcification. *Science* 315 (2007) 1811.
- K. Fink, E. Zeuthen, Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. *Experimental cell research* 128 (1) (1980) 23–30.
- J.R. Finnerty, K. Pang, P. Burton, D. Paulson, M.Q. Martindale, Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science* 304 (5675) (2004) 1335–1337.

- U. Frank, C. Rabinowitz, B. Rinkevich, In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. *Mar. Biol.* 120 (1994) 491–499.
- D. Fransolet, S. Roberty, A.C. Herman, L. Tonk, O. Hoegh-Guldberg, J.C. Plumier, Increased cell proliferation and mucocyte density in the sea anemone *Aiptasia pallida* recovering from bleaching. *PLoS ONE* 8 (5) (2013) e65015.
- Y. Fuchinoue, T. Katayama, M. Obata, A. Murata, R. Kinzie, S. Taguchi, Growth, biochemical properties, and chlorophyll fluorescence of symbiotic and free-living dinoflagellates in response to ammonium enrichment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 438 (2012) 1–6.
- B.J. Fuller, Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* 25 (6) (2004) 375–388.
- B. Galliot, Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Current opinion in genetics & development* 10 (6) (2000) 629–637.
- S.B. Galloway, C.M. Woodley, S.M. McLaughlin, T.M. Work, V.S. Bochler, C.U. Meteyer, L. Sileo, E.C. Peters, E. Kramarsky-Winters, J.F. Morado, P.G. Parnell, D.S. Rotstein, R.A. Harley, J. Nicholson, T.L. Reynolds, Coral Disease and Health Workshop: Coral Histopathology II, NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4, Silver Spring, National Oceanic and Atmospheric Administration, 2007, pp. 84.
- S.G. Gardner, D.A. Nielsen, K. Petrou, A.W.D. Larkum, P.J. Ralph, Characterisation of coral explants: a model organism for cnidarian-dinoflagellate studies. *Coral Reefs* DOI 10.1007/s00338-014-1240-4 (2014) 1–10.
- T.A. Gardner, I.M. Cote, J.A. Gill, A. Grant, A.R. Watkinson, Hurricanes and Caribbean coral reefs: impacts, recovery patterns, and role in long-term decline. *Ecology letters* 86 (1) (2005) 174–184.
- R.D. Gates, L. Muscatine, Three methods for isolating viable anthozoan endoderm cells with their intracellular symbiotic dinoflagellates. *Coral Reefs* 11 (1992) 143–145.
- R.D. Gates, P.J. Edmunds, The physiological mechanisms of acclimatization in tropical reef corals. *American Zoologist* 39 (1) (1999) 30–43.
- J.P. Gattuso, D. Allemand, M. Frankignoulle, Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: A review on interactions and control by carbonate chemistry. *Amer. Zool.* 39 (1999) 160–183.
- J.P. Gattuso, S. Reynaud-Vaganay, P. Furla, S. Romaine-Lioud, J. Jaubert, I. Bourge, M. Frankignoulle, Calcification does not stimulate photosynthesis in the zooxanthellate scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Limnology and Oceanography* 45 (1) (2000) 246–250.
- S.B. George, J.M. Lawrence, A.L. Lawrence, J. Ford, Fertilization and development of eggs of the sea urchin *Lytechinus variegatus* maintained on an extruded feed. *Journal of the World Aquaculture Society* 31 (2) (2000) 232–238.
- E.M. Gibbin, H.M. Putnam, R.D. Gates, M.R. Nitschke, S.K. Davy, Species-specific differences in thermal tolerance may define susceptibility to intracellular acidosis in reef corals. *Marine Biology* 162 (3) (2015) 717–723.
- A. Gierer, S. Berking, H. Bode, C.N. David, K. Flick, G. Hansmann, H. Schaller, E. Trenkner, Regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Nature/New Biology* 88 (1972) 98–101.
- J. Gilmour, Experimental investigation into the effects of suspended sediment on fertilisation, larval survival and settlement in a scleractinian coral. *Marine Biology* 135 (3) (1999) 451–462.
- M.S. Glas, Y. Sato, K.E. Ulstrup, D.G. Bourne, Biogeochemical conditions determine virulence of black band disease in corals. *The ISME journal* 6 (8) (2012) 1526–1534.
- P.W. Glynn, D.A. Krupp, Feeding biology of a hawaiian sea star corallivore, *Culcita novaeguineae* Muller & Troschel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96 (1) (1986) 75–96.
- P.W. Glynn, N.J. Gassman, C.M. Eakin, J. Cortes, D.B. Smith, H.M. Guzman, Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador). *Marine Biology* 109 (3) (1991) 355–368.

- P.W. Glynn, J.L. Maté, A.C. Baker, M.O. Calderón, Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997-1998 El Niño-Southern Oscillation event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982-1983 event. *Bulletin of Marine Science* 69 (1) (2001) 79–109.
- G. Goodbody-Gringley, Diel planulation by the brooding coral *Favia fragum* (Esper, 1797). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 389 (1) (2010) 70–74.
- T.F. Goreau, The physiology of skeleton formation in corals. I. A method for measuring the rate of calcium deposition by corals under different conditions. *Biol. Bull.* 116 (1959) 59–75.
- T.F. Goreau, N.I. Goreau, The physiology of skeleton formation in corals. II. Calcium deposition by hermatypic corals under various conditions in the reef. *Biol. Bull.* (1959) 239–250.
- R. Gosden, Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertility and sterility* 96 (2) (2011) 264–268.
- N.A.J. Graham, S.K. Wilson, S. Jennings, N.V.C. Polunin, J.P. Bijoux, J. Robinson, Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems. *PNAS* 103 (22) (2006) 8425–8429.
- P.P. Grassé, D. Doumenc, L. Beauvais, J.P. Chevalier, C. Herberts, J. Lafuste, P. Semenoff-Tian-Chansky, G.A.B. Shelton, Y. Tiffon, A. Tixier-Durivault, M. Van-Praët, *Traité de zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Cnidaires. Anthozoaires*, Masson, Paris, 1987.
- D.H. Green, P.J. Edmunds, X. Pochon, R.D. Gates, The effects of substratum type on the growth, mortality, and photophysiology of juvenile corals in St. John, US Virgin Islands. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 384 (1) (2010) 18–29.
- N. Greer, Freezing under pressure: A new method for cryopreservation. *Cryobiology* 70 (1) (2015) 66–70.
- J.R. Guest, A.H. Baird, J.A. Maynard, E. Muttaqin, A.J. Edwards, S.J. Campbell, K. Yewdall, Y.A. Affendi, L.M. Chou, Contrasting patterns of coral bleaching susceptibility in 2010 suggest an adaptive response to thermal stress. *7* (3) (2012) e33353.
- F. Guignot, Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA, Prod. Anim.* 18 (1) (2005) 27–35.
- J.C. Gwo, Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology* 43 (1995) 1163–1174.
- J.C. Gwo, C.H. Lin, Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. *Theriogenology* 49 (1998) 1289–1299.
- J.C. Gwo, Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research* 31 (2000) 259–271.
- M.G. Hadfield, E.A. Meleshkevitch, D.Y. Boudko, The apical sensory organ of a gastropod veliger is a receptor for settlement cues. *The Biological Bulletin* 198 (1) (2000) 67–76.
- M. Hagedorn, V.L. Carter, R.A. Steyn, D. Krupp, J.C. Leong, R.P. Lang, T.R. Tiersch, Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*. *Cryobiology* 52 (2006a) 454–458.
- M. Hagedorn, R. Pan, E.F. Cox, L. Hollingsworth, D. Krupp, T.D. Lewis, J.C. Leong, P. Mazur, W.F. Rall, D.R. MacFarlane, G. Fahy, F.W. Kleinhans, Coral larvae conservation: Physiology and reproduction. *Cryobiology* 52 (2006b) 33–47.
- M. Hagedorn, V.L. Carter, J.C. Leong, F.W. Kleinhans, Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*). *Cryobiology* 60 (2010a) 147–158.
- M. Hagedorn, V.L. Carter, S. Ly, R.M. Andrell, P.H. Yancey, J.A.C. Leong, F.W. Kleinhans, Analysis of internal osmolality in developing coral larvae, *Fungia scutaria*. *Physiological and Biochemical Zoology* 83 (1) (2010b) 157–166.
- M. Hagedorn, V. Carter, K. Martorana, M.K. Paresa, J. Acker, I.B. Baums, E. Borneman, M. Brittsan, M. Byers, M. Henley, M. Laterveer, J.A. Leong, M. McCarthy, S. Meyers, B.D. Nelson, D. Petersen, T.R. Tiersch, R.C. Uribe, E. Woods, D. Wildt, Preserving and using germplasm and dissociated embryonic cells for conserving Caribbean and Pacific Coral. *PLoS ONE* 7 (3) (2012a) e33354. doi:10.1371/journal.pone.0033354.

- M. Hagedorn, M.J.H. Van Oppen, V. Carter, M. Henley, D. Abrego, E. Puill-Stephan, A. Negri, A. Heyward, D.R. MacFarlane, R. Spindler, First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. *Cryobiology* 65 (2012b) 157–158.
- M. Hagedorn, V. Carter, M. Henley, R. Spindler, Challenges of creating a frozen repository for coral. *Cryobiology* 67 (2013a) 398–442.
- M. Hagedorn, A. Farrell, V.L. Carter, *Cryobiology of coral fragments*. *Cryobiology* 66 (2013b) 17–23.
- M. Hagedorn, R. Spindler, The Reality, Use and Potential for Cryopreservation of Coral Reefs. in: W.V. Holt, J.L. Brown, and P. Comizzoli, (Eds.), *Reproductive Sciences in Animal Conservation*, Springer, New York, 2014, pp. 317-329.
- M. Hagedorn, V. Carter, N. Zuchowicz, M. Phillips, C. Penfield, B. Shamenek, E.A. Vallen, F.W. Kleinhans, K. Peterson, M. White, P.H. Yancey, Trehalose is a chemical attractant in the establishment of coral symbiosis. *PLoS ONE* 10 (1) (2015) e0117087.
- N.M. Hall, K.L.E. Berry, L. Rintoul, M.O. Hoogenboom, Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Marine Biology* 162 (3) (2015) 725–732.
- F. Hamaratoğlu, A. Eroğlu, M. Toner, K.C. Sadler, Cryopreservation of starfish oocytes. *Cryobiology* 50 (2005) 38–47.
- A.D. Harland, B.E. Brown, Metal tolerance in the scleractinian coral *Porites lutea*. *Marine Pollution Bulletin* 20 (7) (1989) 353–357.
- J.F. Harrigan, The planula larva of *Pocillopora damicornis*: lunar periodicity of swarming and substratum selection behavior. *University of Hawaii* 475 (1972).
- M.M. Hassan, J.G. Qin, X. Li, Sperm cryopreservation in oysters: A review of its current status and potentials for future application in aquaculture. *Aquaculture* 438 (2015) 24–32.
- P.M. Haugan, H. Drange, Effects of CO₂ on the ocean environment. *Energy Conversion and Management* 37 (6) (1996) 1019–1022.
- R.L. Hayes, N.I. Goreau, The significance of emerging diseases in the tropical coral reef ecosystem. *Rev. Biol. Trop* 46 (5) (1998) 173–185.
- S. He, L.C. Woods, Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 48 (3) (2004) 254–262.
- Y. Helman, F. Natale, R.M. Sherrell, M. LaVigne, V. Starovoytov, M.Y. Gorbunov, P.G. Falkowski, Extracellular matrix production and calcium carbonate precipitation by coral cells in vitro. *PNAS* 105 (1) (2008) 54–58.
- S. Hengherr, A.G. Heyer, F. Brümmer, R.O. Schill, Trehalose as protecting agent in aquatic invertebrates during dormancy induced by desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151 (1) (2008) S34.
- G.L. Herndl, B. Velimirov, Role of bacteria in the gastral cavity of Anthozoa, IFREMER, 1986, pp. 407–414.
- A.J. Heyward, A.P. Negri, Natural inducers for coral larval metamorphosis. *Coral Reefs* 18 (3) (1999) 273–279.
- M. Hidaka, Tissue compatibility between colonies and between newly settled larvae of *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs* 4 (2) (1985) 111–116.
- W.H. Hilbertz, T.J. Goreau, U.S. Patent No. 5,543,034. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. (1996).
- R.W. Hill, C. Li, A.D. Jones, J.P. Gunn, P.R. Frade, Abundant betaines in reef-building corals and ecological indicators of a photoprotective role. *Coral reefs* 29 (4) (2010) 869–880.
- G. Hodgson, Abundance and distribution of planktonic coral larvae in Kaneohe Bay, Oahu, Hawaii. *Mar Ecol Prog Ser* 26 (1985) 61–71.
- G. Hodgson, Sediment and the settlement of larvae of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs* 9 (1) (1990) 41–43.
- O. Hoegh-Guldberg, Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshwater Res.* 50 (1999) 839–866.

- Á. Horváth, A. Bubalo, A. Čučević, V. Bartulović, L. Kotrik, B. Urbányi, B. Glamuzina, Cryopreservation of sperm and larvae of the european flat oyster (*Ostrea edulis*). *J. Appl. Ichthyol.* 28 (2012) 948–951.
- F. Houlbrèque, S. Reynaud, C. Godinot, F. Oberhänsli, R. Rodolfo-Metalpa, C. Ferrier-Pagès, Ocean acidification reduces feeding rates in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Limnology and Oceanography* 60 (1) (2015) 89–99.
- T.P. Hughes, Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition* 265 (5178) (1994) 1547–1551.
- T.P. Hughes, A.H. Baird, D.R. Bellwood, M. Card, S.R. Connolly, C. Folke, R. Grosberg, O. Hoegh-Guldberg, J.B.C. Jackson, J. Kleypas, J.M. Lough, P. Marshall, M. Nyström, S.R. Palumbi, J.M. Pandolfi, B. Rosen, J. Roughgarden, Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301 (2003) 929–933.
- B.C.C. Hume, C. D'Angelo, E.G. Smith, J.R. Stevens, J. Burt, J. Wiedenmann, *Symbiodinium thermophilum* sp. nov., a thermotolerant symbiotic alga prevalent in corals of the world's hottest sea, the Persian/Arabian Gulf. *Scientific reports* 5 (8562) (2015) 1–8.
- V. Isachenko, E. Isachenko, M. Montag, V. Zaeva, I. Krivokharchenko, F. Nawroth, S. Dessolet, I. Katkov, H. Van der Ven, Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online* 10 (3) (2005) 350–354.
- N. Isomura, M. Nishihira, Size variation of planulae and its effect on the lifetime of planulae in three pocilloporid corals. *Coral Reefs* 20 (2001) 309–315.
- A. Jalali, B. Crawford, A freezing technique that maintains viability of sperm from the starfish *Pisaster ochraceus*. *Invertebrate Reproduction & Development* 56 (3) (2012) 242–248.
- C. Jeyalectumie, T. Subramoniam, Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biol. Bull.* 177 (1989) 247–253.
- P. Joannot, Un corail, des coraux, des récifs coralliens : aperçu. *Les Amis du Muséum National d'Histoire Naturelle* 240 (2009) 49–53.
- G.B. Jones, A.J. Trevena, The influence of coral reefs on atmospheric dimethylsulphide over the Great Barrier Reef, Coral Sea, Gulf of Papua and Solomon and Bismarck Seas. *Marine and freshwater research* 56 (1) (2005) 85–93.
- R.J. Jones, A.P. Kerswell, Phytotoxicity of Photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Marine Ecology Progress Series* 261 (2003) 149–159.
- R.J. Jones, J. Muller, D. Haynes, U. Schreiber, Effects of herbicides diuron and atrazine on corals of the Great Barrier Reef, Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 251 (2003) 153–167.
- K.H. Kang, B.H. Kim, J.M. Kim, Induction of larval settlement and metamorphosis of the abalone, *Haliotis discus hannai* larvae using bromomethane and potassium chloride. *Aquaculture* 230 (1) (2004) 249–259.
- K.H. Kang, Z. Zhang, Z. Bao, M. Shao, Cryopreservation of veliger larvae of trumpet Shell, *Charonia sauliae*: an essential preparation to artificial propagation. *J. Ocean Univ. China* 8 (3) (2009) 265–269.
- X. Kang, G. Li, S. Mu, M. Guo, S. Ge, Acrosome reaction of chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda) spermatozoa: Promoted by long-term cryopreservation. *Aquaculture* 295 (2009) 195–199.
- K.L. Kaposi, B. Mos, B.P. Kelaher, S.A. Dworjanyn, Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental science & technology* 48 (3) (2014) 1638–1645.
- M. Kasai, J.H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai, T. Machida, A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction and Fertility* 89 (1) (1990) 91–97.
- G. Kass-Simon, A.A. Scappaticci, The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. Zool.* 80 (2002) 1772–1794.
- T. Kawamoto, T. Narita, K. Isowa, H. Aoki, M. Hayashi, A. Komaru, H. Ohta, Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 54 (2007) 19–26.

- J.A. Kleypas, R.W. Buddemeier, D. Archer, J.P. Gattuso, C. Langdon, B.N. Opdyke, Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs. *Science* 284 (1999) 118–120.
- A. Klueter, J.B. Crandall, F.I. Archer, M.A. Teece, M.A. Coffroth, Taxonomic and Environmental Variation of Metabolite Profiles in Marine Dinoflagellates of the Genus *Symbiodinium*. *Metabolites* 5 (1) (2015) 74–99.
- N. Knowlton, The future of coral reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (10) (2001) 5419–5425.
- K. Koop, D. Booth, A. Broadbent, J. Brodie, D. Bucher, D. Capone, D. Yellowlees, ENCORE: the effect of nutrient enrichment on coral reefs. Synthesis of results and conclusions. *Marine pollution bulletin* 42 (9) (2001) 91–120.
- E.J. Kopecky, G.K. Ostrander, Isolation and primary culture of viable multicellular endothelial isolates from hard corals. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Animal* 35 (1999) 616–624.
- E. Kramarsky-Winter, Y. Loya, Regeneration versus budding in fungiid corals: a trade-off. *Marine ecology progress series* 134 (1) (1996) 179–185.
- E. Kramarsky-Winter, M. Fine, Y. Loya, Coral polyp expulsion. *Nature* 387 (1997) 137.
- E. Kramarsky-Winter, Y. Loya, M. Vizek, C.A. Downs, Method for coral tissue cultivation and propagation. Ramot at Tel Aviv University (2008) PCT/IL2008/001236.
- P. Krishnaveni, L.M. Chou, Y.K. Ip, Deposition of calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) in the coral, *Galaxea fascicularis*. *Camp. Biochem. Physiol* 94A (3) (1989) 509–513.
- D.A. Krupp, Sexual reproduction and early development of the solitary coral *Fungia scutaria* (Anthozoa: Scleractinia). *Coral Reefs* 2 (3) (1983) 159–164.
- L.L. Kuleshova, A. Lopata, Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and sterility* 78 (3) (2002) 449–454.
- A.K. Kumaraguru, Coral reefs and conservation. *Marine Biological Resources of India: An Overview* (2002) 30–31.
- K.M. Kuo, K. Soong, Post-settlement survival of reef-coral juveniles in southern Taiwan. *Zoological Studies* 49 (6) (2010) 724–734.
- Y.Y. Latypov, B.M. Ly, L.H. Hoang, P.Q. Long, N.B. Khoa, Experimental artificial cultivation of corals from colony fragments. *Russian Journal of Marine Biology* 39 (2) (2013) 148–152.
- F. Le Marrec-Croq, P. Fritayre, C. Chesné, A. Guillouzo, G. Dorange, Cryopreservation of *Pecten maximus* Heart Cells. *Cryobiology* 37 (3) (1998) 200–206.
- M.D.A.A. Le Tissier, Patterns of formation and the ultrastructure of the larval skeleton of *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* 98 (1988) 493–501.
- A. Lecointe, S. Cohen, M. Gèze, C. Djediat, A. Meibom, I. Domart-Coulon, Scleractinian coral cell proliferation is reduced in primary culture of suspended multicellular aggregates compared to polyps. *Cytotechnology* 65 (2013) 705–724.
- M.P. Lesser, M. Stat, R.D. Gates, The endosymbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* sp.) of corals are parasites and mutualists. *Coral Reefs* 32 (3) (2013) 603–611.
- J.B. Lewis, Settlement behavior of planulae larvae of hermatypic coral *Favia-fragum* (Esper). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 15 (2) (1974) 165–172.
- M. Lezcano, C. Granja, M. Salazar, The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology* 48 (2004) 349–356.
- C. Lin, T. Zhang, F.W. Kuo, S. Tsai, Gorgonian coral (*Junceella juncea* and *Junceella fragilis*) oocyte chilling sensitivity in the context adenosine triphosphate response (ATP). *CryoLetters* 32 (2) (2011) 141–147.
- C. Lin, S. Tsai, The effect of chilling and cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes during short-term low temperature preservation. *Theriogenology* 77 (2012) 1257–1261.
- C. Lin, L.H. Wang, P.J. Meng, C.S. Chen, S. Tsai, Lipid content and composition of oocytes from five coral species: Potential implications of future cryopreservation efforts. *PLoS ONE* 8 (2) (2013) e57823.

- C. Lin, F.W. Kuo, S. Chavanich, V. Viyakarn, Membrane lipid phase transition behavior of oocytes from three gorgonian corals in relation to chilling injury. *PLoS ONE* 9 (3) (2014) e92812.
- T.T. Lin, N.H. Chao, H.T. Tung, Factors affecting survival of cryopreserved oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Cryobiology* 39 (1999) 192–196.
- O. Lindén, D. Souter, D. Wilhelmsson, D. Obura, Coral reef degradation in the Indian Ocean: status report 2002, Kalmar (Suecia), 2002.
- B. Liu, X. Li, Preliminary studies on cryopreservation of Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) larvae. *J. Shellfish. Res.* 27 (5) (2008) 1125–1128.
- H. Liu, W. Yu, J. Dai, Q. Gong, K. Yang, X. Lu, Cryopreservation of protoplasts of the alga *Porphyra yezoensis* by vitrification. *Plant science* 166 (1) (2004) 97–102.
- Y. Liu, T. Xu, N. Robinson, J. Qin, X. Li, Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Cryobiology* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.01.002>.
- Y. Liu, X. Li, Successful oocyte cryopreservation in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 438 (2015) 55–58.
- J.E. Lovelock, M.W.H. Bishop, Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183 (1959) 1394–1395.
- G.M. Luna, Biavasco, F., & Danovaro, R, Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. *Environmental Microbiology* 9 (7) (2007) 1851–1857.
- B. Luyet, A review of research on the preservation of hearts in the frozen state. *Cryobiology* 8 (2) (1971) 190–207.
- W.F. Lynch, The behavior and metamorphosis of the larva of *Bugula neritina* (Linnaeus): experimental modification of the length of the free-swimming period and the responses of the larvae to light and gravity. *The Biological Bulletin* 92 (2) (1947) 115–150.
- W.F. Lynch, Modification of the responses of two species of *Bugula* larvae from Woods Hole to light and gravity: ecological aspects of the behavior of *Bugula* larvae. *The Biological Bulletin* 97 (3) (1949) 302–310.
- L. Lyons, D.R. Jerry, P.C. Southgate, Cryopreservation of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) spermatozoa: Effects of cryoprotectants on spermatozoa motility. *J. Shellfish Res.* 24 (4) (2005) 1187–1190.
- M. Maida, J.C. Coll, P.W. Sammarco, Shedding new light on scleractinian coral recruitment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 180 (2) (1994) 189–202.
- G. Maise, C. Labbé, B. Ogier de Baulny, S. Leveroni Calvi, P. Haffray, Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA, Prod. Anim.* 11 (1) (1998) 57–65.
- J.F. Manery, Effects of Ca ions on membranes. *Federation proceedings* 25 (1966) 1804–1810.
- A.T. Marshall, O.P. Wright, Confocal laser scanning light microscopy of the extra-thecal epithelia of undecalcified scleractinian corals. *Cell and tissue research* 272 (3) (1993) 533–543.
- A.T. Marshall, P. Clode, Effects of calcium-free and low-calcium artificial seawater on polyps of a scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Coral Reefs* 23 (2004) 277–280.
- S. Martinez-Paramo, S. Perez-Cerezales, V. Barbosa, V. Robles, P. Herraiez, Advances on Fish Embryo Cryopreservation Using Antifreeze Proteins. *Biology of Reproduction* 78 (1) (2008) 152.
- T. Mass, J.L. Drake, L. Haramaty, Y. Rosenthal, O.M.E. Schofield, R.M. Sherrell, P.G. Falkowski, Aragonite precipitation by “proto-polyps” in coral cell cultures. *PLoS ONE* 7 (4) (2012) e35049.
- S.R. Massel, T.J. Done, Effects of cyclone waves on massive coral assemblages on the Great Barrier Reef: meteorology, hydrodynamics and demography. *Coral Reefs* 12 (3-4) (1993) 153–166.
- M. Matsumoto, S. Saito, I. Ohmine, Molecular dynamics simulation of the ice nucleation and growth process leading to water freezing. *Nature* 416 (6879) (2002) 409–413.
- P. Mazur, K.W. Cole, Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology* 26 (1) (1989) 1–29.
- L. McAlister, S. Strausberg, A. Kulaga, D.B. Finkelstein, Altered patterns of protein synthesis induced by heat shock of yeast. *Current genetics* 1 (1) (1979) 63–74.

- P. Melamed, Z. Gong, G. Fletcher, C.L. Hew, The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture* 204 (3) (2002) 255–269.
- O. Merino, J. Risopatrón, R. Sánchez, E. Isachenko, E. Figueroa, I. Valdebenito, V. Isachenko, Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Animal reproduction science* 124 (1) (2011) 125–131.
- O. Merino, R. Sánchez, J. Risopatrón, E. Isachenko, I.I. Katkov, E. Figueroa, I. Valdebenito, P. Mallmann, V. Isachenko, Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. *Andrologia* 44 (1) (2012) 390–395.
- H.T. Meryman, Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47 (2007) 935–945.
- M.A. Miller, Toxic effects of copper on attachment and growth of *Bugula neritina*. *The Biological Bulletin* 90 (2) (1946) 122–140.
- F. Moberg, C. Folke, Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological economics* 29 (2) (1999) 215–233.
- C. Mora, 36 Perpetual struggle for conservation in a crowded world and the needed paradigm shift for easing ultimate burdens, *Ecology of Fishes on Coral Reefs*, Cambridge University Press, 2015, pp. 289.
- G.J. Morris, Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections. *Institute of Terrestrial Ecology* (1981).
- D.E. Morse, N. Hooker, A.N. Morse, R.A. Jensen, Control of larval metamorphosis and recruitment in sympatric agariciid corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 116 (3) (1988) 193–217.
- Z.A. Muchlisin, Review: Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas* 6 (1) (2005) 66–69.
- K.M. Mullen, E.C. Peters, C.D. Harvell, Coral Resistance to Disease. *Coral Health and Disease* (2004) 377–399.
- C.N. Mundy, R.C. Babcock, Role of light intensity and spectral quality in coral settlement: implications for depth-dependent settlement? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 223 (2) (1998) 235–255.
- L. Muscatine, Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science* 156 (3774) (1967) 516–519.
- L. Muscatine, R.R. Pool, E. Cernichiari, Some factors influencing selective release of soluble organic material by zooxanthellae from reef corals. *Marine Biology* 13 (4) (1972) 298–308.
- L. Muscatine, E. Tambutte, D. Allemand, Morphology of coral desmocytes, cells that anchor the calciblastic epithelium to the skeleton. *Coral Reefs* 16 (1997) 205–213.
- F. Mussino, M. Pozzolini, L. Valisano, C. Cerrano, U. Benatti, M. Giovine, Primmorphs cryopreservation: A new method for long-time storage of sponge cells. *Mar. Biotechnol.* (2012) 1–11.
- T. Narita, T. Kawamoto, K. Isowa, H. Aoki, M. Hayashi, H. Ohta, A. Komaru, Effects of cryopreservation on sperm structure in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fish. Sci.* 74 (2008) 1069–1074.
- A. Negri, C. Vollhardt, C. Humphrey, A. Heyward, R. Jones, G. Eaglesham, K. Fabricius, Effects of the herbicide diuron on the early life history stages of coral. *Marine Pollution Bulletin* 51 (2005) 370–383.
- B. Nesa, M. Hidaka, High zooxanthella density shortens the survival time of coral cell aggregates under thermal stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368 (2009) 81–87.
- G.A. Nevitt, Sensory ecology on the high seas: the odor world of the procellariiform seabirds. *Journal of Experimental Biology* 211 (11) (2008) 1706–1713.
- Y. Nozawa, P.L. Harrison, Effects of elevated temperature on larval settlement and post-settlement survival in scleractinian corals, *Acropora solitaryensis* and *Favites chinensis*. *Marine Biology* 152 (5) (2007) 1181–1185.

- D. Obura, G. Grimsditch, Resilience Assessment of coral reefs: Assessment protocol for coral reefs, focusing on coral bleaching and thermal stress. IUCN Climate Change and Coral Reefs Marine Working Paper Series 5 (2009).
- N. Odintsova, K. Kiselev, N. Sanina, E. Kostetsky, Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. *CryoLetters* 22 (5) (2001) 299–310.
- N.A. Odintsova, A.V. Boroda, Cryopreservation of the cells and larvae of marine organisms. *Russ. J. Mar. Biol.* 38 (2) (2012) 101–111.
- S. Ohki, M. Morita, S. Kitanobo, A.A. Kowalska, R.K. Kowalski, Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. *Cryobiology* 69 (2014) 134–139.
- P.J.W. Olive, W.B. Wang, Cryopreservation of *Nereis virens* (Polychaeta, Annelida) Larvae: The Mechanism of Cryopreservation of a Differentiated Metazoan. *Cryobiology* 34 (3) (1997) 284–294.
- A. Oren & N. Gunde-Cimerman, Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? Minireview, *FEMS Microbiol Lett* 269 (2007) 1–10.
- J.C. Orr, V.J. Fabry, O. Aumont, L. Bopp, S.C. Doney, R.A. Feely, A. Gnanadesikan, N. Gruber, A. Ishida, F. Joos, R.M. Key, K. Lindsay, E. Maier-Reimer, R. Matear, P. Monfray, A. Mouchet, R.G. Najjar, G.K. Plattner, K.B. Rodgers, C.L. Sabine, J.L. Sarmiento, R. Schlitzer, R.D. Slater, I.J. Totterdell, M.F. Weirig, Y. Yamanaka, A. Yool, Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437 (2005) 681–686.
- C. Östman, A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Scientia Marina* 64 (S1) (2000) 31–46.
- R. Owen, A. Knap, N. Ostrander, K. Carbery, Comparative acute toxicity of herbicides to photosynthesis of coral zooxanthellae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70 (2003) 541–548.
- S. Özbek, P.G. Balasubramanian, T.W. Holstein, Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 54 (8) (2009) 1038–1045.
- J.M. Pandolfi, S.R. Connolly, D.J. Marshall, A.L. Cohen, Projecting coral reef futures under global warming and ocean acidification. *Science* 433 (2011) 418–422.
- C.G. Paniagua-Chavez, J.T. Buchanan, J.E. Supan, T.R. Tiersch, Settlement and growth of eastern oysters produced from cryopreserved larvae. *Cryoletters* 19 (5) (1998) 283–292.
- C.G. Paniagua-Chavez, T.R. Tiersch, Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology* 43 (3) (2001) 211–223.
- E. Paredes, J. Bellas, Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. *Cryobiology* 59 (2009) 344–350.
- E. Paredes, S.L. Adams, H.R. Tervit, J.F. Smith, L.T. McGowan, S.L. Gale, J.R. Morrish, E. Watts, Cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) trochophore larvae. *Cryobiology* 65 (2012) 256–262.
- E. Paredes, J. Bellas, S.L. Adams, Comparative cryopreservation study of trochophore larvae from two species of bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and Blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Cryobiology* 67 (3) (2013) 274–279.
- J.A. Pechenik, W.D. Heyman, Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 112 (1987) 27–38.
- W.D. Permata, R.A. Kinzie III, M. Hidaka, Histological studies on the origin of planulae of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Ecology Progress Series* 200 (2000) 191–200.
- E.C. Peters, 37(1-4), 113-137., A survey of cellular reactions to environmental stress and disease in Caribbean scleractinian corals. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 37(1-4) (1984) 113–137.
- D. Petersen, M. Laterveer, H. Schuhmacher, Innovative substrate tiles to spatially control larval settlement in coral culture. *Marine Biology* 146 (5) (2005) 937–942.
- D. Petersen, J. Falcató, P. Gilles, R. Jones, Sexual reproduction of scleractinian corals in public aquariums: current status and future perspectives. *International Zoo Yearbook* 41 (1) (2007) 122–137.
- X. Pochon, R.D. Gates, A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular phylogenetics and evolution* 56 (1) (2010) 492–497.

- C. Polge, A.U. Smith, A.S. Parkes, Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164 (4172) (1949) 666–666.
- S.A. Pomponi, R. Willoughby, M.E. Kaighn, A.E. Wright, Development of techniques for in vitro production of bioactive natural products from marine sponges. in: K.M.a.J. Mitsuhashi, (Ed.), *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications*, 1997, pp. 231–237.
- J.M. Poncet, J.M. Lebel, Influence of cryoprotective agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the mollusk *Haliotis tuberculata*. *Cryobiology* 47 (2) (2003) 184–189.
- J. Ponthier, F. Van den Berghe, S. Parrilla-Hernandez, C. Hanzen, S. Deleuze, Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives. *Ann. Méd. Vét.* 158 (2014) 57–72.
- N.P. Preston, F.E. Coman, The effects of cryoprotectants, chilling and freezing on *Penaeus esculentus* embryos and nauplii. in: Flegel TW, (Ed.), *Advances in shrimp biotechnology*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 1998, pp. 37–43.
- H.M. Putnam, P.J. Edmunds, T.Y. Fan, Effect of temperature on the settlement choice and photophysiology of larvae from the reef coral *Stylophora pistillata*. *The Biological Bulletin* 215 (2) (2008) 135–142.
- X. Qin-Zhao, X. Jian-Hai, Effects of different combinations of cryoprotectants on spermatozoon vitality of Chinese scallop, *Chlamys farreri*, during low temperature equilibrium. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 13 (4) (1995) 354–361.
- J.B. Raina, D.M. Tapiolas, S. Forêt, A. Lutz, D. Abrego, J. Ceh, F.O. Seneca, P.L. Clode, D.G. Bourne, B.L. Willis, C.A. Motti, DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. *Nature* 502 (7473) (2013) 677–680.
- V. Raja, Fertilization and early development - Inducing spawning in sea urchins, *Manual of research methods for marine invertebrate reproduction*, CMFRI Special Publication, India, 1982, pp. 181–183.
- W.F. Rall, M. Czlonkowska, S.C. Barton, C. Polge, Cryoprotection of day-4 mouse embryos by methanol. *Journal of reproduction and fertility* 70 (1) (1984) 293–300.
- W.F. Rall, Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24 (5) (1987) 387–402.
- C.J. Randall, A.M. Szmant, Elevated temperature reduces survivorship and settlement of the larvae of the Caribbean scleractinian coral, *Favia fragum* (Esper). *Coral Reefs* 28 (2) (2009) 537–545.
- P. Renard, J.C. Cochard, Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop *Pecten maximus* (L) embryos: influence of the biochemical and osmotic effects. *CryoLetters* 10 (3) (1989).
- P. Renard, Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture* 92 (1991) 43–57.
- T.R. Rice, The accumulation and exchange of strontium by marine planktonic algae. *Limnology and Oceanography* 1 (2) (1956) 123–138.
- L.L. Richardson, Red band disease: A new cyanobacterial infestation of corals. *Diving for Science* (1992) 153–160.
- S. Richier, P.L. Merle, P. Furla, D. Pigozzia, F. Sola, D. Allemand, Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochim. Biophys. Acta* 1621 (2003) 84–91.
- R.H. Richmond, P.L. Jokiel, Lunar periodicity in larva release in the reef coral *Pocillopora damicornis* at Enewetak and Hawaii. *Bulletin of Marine Science* 34 (2) (1984) 280–287.
- R.H. Richmond, Reversible metamorphosis in coral planula larvae. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 22 (1985) 181–185.
- R.H. Richmond, Energetics, competency, and long-distance dispersal of planula larvae of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* 93 (1987) 527–533.
- R.H. Richmond, C.L. Hunter, Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the Tropical Pacific, and the Red Sea. *Marine ecology progress series* 60 (1) (1990) 185–203.

- R.H. Richmond, Reproduction and recruitment in corals: critical links in the persistence of reefs. Life and death of coral reefs. Chapman & Hall, New York (1997) 175–197.
- B. Riegl, M. Berumen, A. Bruckner, Coral population trajectories, increased disturbance and management intervention: a sensitivity analysis. *Ecology and evolution* 3 (4) (2013) 1050–1064.
- B. Rinkevich, Y. Loya, The reproduction of the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. II. Synchronization in breeding and seasonality of planulae shedding. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1 (1979) 145–152.
- B. Rinkevich, C. Rabinowitz, Acquiring embryo-derived cell cultures and aseptic metamorphosis of larvae from the colonial protochordate *Botryllus schlosseri*. *Invertebrate reproduction & development* 25 (1) (1994) 59–72.
- B. Rinkevich, Restoration strategies for coral reefs damaged by recreational activities: the use of sexual and asexual recruits. *Restoration Ecology* 3 (4) (1995) 241–251.
- B. Rinkevich, Do reproduction and regeneration in damaged corals compete for energy allocation? *Marine ecology progress series* 143 (1) (1996) 297–302.
- B. Rinkevich, Initiation of epithelial cell cultures from palpeal buds of *Botryllus schlosseri*, a colonial tunicate. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 33 (1997) 422–424.
- B. Rinkevich, M. Ilan, R. Blisko, Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 34 (10) (1998) 753–756.
- B. Rinkevich, S. Shafir, Ex situ culture of colonial marine ornamental invertebrates: concepts for domestication. *Aquarium Sciences and Conservation* 2 (4) (2000) 237–250.
- B. Rinkevich, Conservation of coral reefs through active restoration measures: Recent approaches and last decade progress. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 4333–4342.
- K.B. Ritchie, G.W. Smith, Type II white-band disease. *Rev Biol Trop* 46 (suppl 5) (1998) 199–203.
- K.B. Ritchie, Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 322 (2006) 1–14.
- V. Robles, E. Cabrita, M. Real, R. Alvarez, M.P. Herráez, Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* 47 (1) (2003) 30–39.
- V. Robles, E. Cabrita, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, M.P. Herráez, Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology* 64 (7) (2005) 1633–1646.
- V. Robles, E. Cabrita, L. Anel, M.P. Herráez, Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: toxicity and protein distribution. *Aquaculture* 261 (4) (2006) 1299–1306.
- V. Robles, V. Barbosa, M.P. Herráez, S. Martínez-Páramo, M.L. Cancela, The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology* 68 (2) (2007) 284–289.
- E.A. Robson, Problems of supply and demand for cnidae in Anthozoa, The biology of the nematocysts, Academic Press San Diego, 1988, pp. 179–207.
- B.R. Rosen, J.D. Taylor, Reef coral from Aldabra: new mode of reproduction. *Science* 166 (3901) (1969) 119–121.
- A. Roux, L. Sandenbergh, R. Roodt-Wilding, Preliminary investigation to determine the cytotoxicity of various cryoprotectants on southern african abalone (*Haliotis midae*) embryos. *Cryobiology* 57 (2008) 308–311.
- B. Rubinsky, A. Arav, A.L. Devries, The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology* 29 (1) (1992) 69–79.
- B. Rubinsky, Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Failure Reviews* 8 (2003) 277–284.
- A.B. Rusk, A.C. Alfaro, S.L. Adams, 122 Cryopreservation effects on larval development of the New Zealand greenshell™ mussel, *Perna canaliculus*. *Cryobiology* 67 (3) (2013) 432–433.
- A. Sakai, S. Kobayashi, I. Oiyama, Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9 (1990) 30–33.

- A. Sakai, F. Engelmann, Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28 (3) (2007) 151–172.
- L. Salinas-Flores, C.G. Paniagua-Chavez, J.A. Jenkins, T.R. Tiersch, Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *J. Shellfish. Res.* 24 (2) (2005) 415–420.
- B. Salvat, Health and Degradation of Coral Reefs: Assessment and Future, *Marine Productivity: Perturbations and Resilience of Socio-ecosystems*, Springer International Publishing, 2015, pp. 343–354.
- P.W. Sammarco, Escape response and dispersal in an Indo-Pacific coral under stress: "Polyp bail-out." *Proc 4th Int Coral Reef Symp* 1981, pp. 194.
- P.W. Sammarco, Polyp Bail-Out: An escape response to environmental stress and a new means of reproduction in corals. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 10 (1982) 57–65.
- D.L. Santavy, E.C. Peters, C. Quirolo, J.W. Porter, C.N. Bianchi, Yellow-blotch disease outbreak on reefs of the San Blas Islands, Panama. *Coral reefs* 18 (1) (1999) 97.
- M. Sato, Mortality and growth of juvenile coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *Coral Reefs* 4 (1) (1985) 27–33.
- V. Schmid, R. Stidwill, A. Bally, B. Marcum, P. Tardent, Heat dissociation and maceration of marine Cnidaria. *Wilhelm Roux's Archives* 190 (1981) 143–149.
- P. Schuchert, Phylogenetic analysis of the Cnidaria. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 31 (3) (1993) 161–173.
- S. Shafir, J. Van Rijn, B. Rinkevich, The use of coral nubbins in coral reef ecotoxicology testing. *Biomol. Eng.* 20 (2003) 401–406.
- S. Shafir, J. Van Rijn, B. Rinkevich, Steps in the construction of underwater coral nursery, an essential component in reef restoration acts. *Marine Biology* 149 (3) (2006) 679–687.
- M.Y. Shao, Z.F. Zhang, L. Yu, J.J. Hu, K.H. Kang, Cryopreservation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) sperm. *Aquaculture Research* 37 (14) (2006) 1450–1457.
- J.M. Shaw, G.M. Jones, Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update* 9 (6) (2003) 583–605.
- C.R. Sheppard, Predicted recurrences of mass coral mortality in the Indian Ocean. *Nature* 425 (6955) (2003) 294–297.
- J.K. Sherman, Historical synopsis of human semen cryobanking. in: G. David and W.S. Price, (Ed.), *Human Artificial Insemination and Semen Preservation*, Springer US, 1980, pp. 95–105.
- R.L. Sherman, D.S. Gilliam, R.E. Spieler, Site-dependent differences in artificial reef function: implications for coral reef restoration. *Bulletin of marine science* 69 (2) (2001) 1053–1056.
- R. Simo, A.D. Hatton, G. Malin, P.S. Liss, Particulate dimethyl sulphoxide in seawater: production by microplankton. *Marine Ecology Progress Series* 167 (1998) 291–296.
- C. Simon, P. Dumont, F.X. Cuende, A. Diter, Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. *Cryobiology* 31 (3) (1994) 245–253.
- J.F. Smith, S.L. Adams, S.L. Gale, L.T. McGowan, H.R. Tervit, R.D. Roberts, Cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) sperm. I. Establishment of freezing protocol. *Aquaculture* 334 (2012) 199–204.
- J.E. Sorauf, Skeletal microstructure and microarchitecture in Scleractinia (Coelenterata). *Palaeontology* 15 (1) (1972) 88–107.
- M. Spalding, C. Ravilious, E.P. Green, *World atlas of coral reefs*. Univ of California Press (2001).
- K.D. Spindler, W.A. Müller, Induction of metamorphosis by bacteria and by a lithium-pulse in the larvae of *Hydractinia echinata* (Hydrozoa). *Wilhelm Roux'Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 169 (4) (1972) 271–280.
- C.A. Staples, S.R. Murphy, J.E. McLaughlin, H.W. Leung, T.C. Cascieri, C.H. Farr, Determination of selected fate and aquatic toxicity characteristics of acrylic acid and a series of acrylic esters. *Chemosphere* 40 (1) (2000) 29–38.
- J. Stefels, Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research* 43 (3) (2000) 183–197.

- J. Stefels, M. Steinke, S. Turner, G. Malin, S. Belviso, Environmental constraints on the production and removal of the climatically active gas dimethylsulphide (DMS) and implications for ecosystem modelling, *Phaeocystis*, major link in the biogeochemical cycling of climate-relevant elements, Springer Netherlands, 2007, pp. 245–275.
- R.E. Stephens, Studies on the development of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. I. Ecology and normal development. *The Biological Bulletin* 142 (1) (1972) 132–144.
- J.A. Stoddart, Asexual production of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* 76 (1983) 279–284.
- L.P. Suescún-Bolívar, R. Iglesias-Prieto, P.E. Thome, Induction of glycerol synthesis and release in cultured *Symbiodinium*. *PLoS ONE* 7 (10) (2012) e47182.
- W.K.D.J. Sunda, D.J. Kieber, R.P. Kiene, S. Huntsman, An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* 418 (6895) (2002) 317–320.
- M. Suquet, C. Labbé, S. Puyo, C. Mingant, B. Quittet, M. Boulais, I. Queau, D. Ratiskol, B. Diss, P. Haffray, Survival, Growth and Reproduction of Cryopreserved Larvae from a Marine Invertebrate, the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *PLoS ONE* 9 (4) (2014) e93486.
- H.U. Sverdrup, M.W. Johnson, R.H. Fleming, *The Oceans: Their physics, chemistry, and general biology* (Vol. 7). New York: Prentice-Hall (1942).
- I.M. Svishchev, P.G. Kusalik, Crystallization of liquid water in a molecular dynamics simulation. *Physical review letters* 73 (7) (1994) 975.
- M. Sweet, J. Craggs, J. Robson, J. Bythell, Assessment of the microbial communities associated with white syndrome and brown jelly syndrome in aquarium corals. *Journal of zoo and aquarium research* 1 (1) (2013) 20–27.
- A. Szmant-Froelich, P. Yevich, M.E.Q. Pilson, Gametogenesis and early development of the temperate coral *Astrangia danae* (Anthozoa: Scleractinia). *Biol. Bull.* 158 (1980) 257–269.
- A. Szmant-Froelich, M. Reutter, L. Riggs, Sexual reproduction of *Favia fragum* (Esper): lunar patterns of gametogenesis, embryogenesis and planulation in Puerto Rico. *Bulletin of Marine Science* 37 (3) (1985) 880–892.
- E. Tambutté, D. Allemand, I. Bourge, J.R. Gattuso, J. Jaubert, An improved ⁴⁵Ca protocol for investigating physiological mechanisms in coral calcification. *Mar. Biol.* 122 (1995) 453–459.
- E. Tambutté, D. Allemand, D. Zoccola, A. Meibom, S. Lotto, N. Caminiti, S. Tambutté, Observations of the tissue-skeleton interface in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs* 26 (2007) 517–529.
- J.E. Tanner, Seasonality and lunar periodicity in the reproduction of Pocilloporid corals. *Coral Reefs* 15 (1996) 59–66.
- F.T. Te, Response to higher sediment loads by *Pocillopora damicornis* planulae. *Coral Reefs* 11 (1992) 131–134.
- H.R. Tervit, S.L. Adams, R.D. Roberts, L.T. McGowan, P.A. Pugh, J.F. Smith, A.R. Janke, Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology* 51 (2005) 142–151.
- Y. Tian, S. Chen, A. Yan, X. Ji, G. Yu, Cryopreservation of the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by vitrification. *Acta zoologica Sinica* 49 (6) (2002) 843–850.
- T.R. Tiersch, H. Yang, J.A. Jenkins, Q. Dong, Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Spermatology* 65 (2007) 493–508.
- H. Tioho, M. Tokeshi, S. Nojima, Experimental analysis of recruitment in a scleractinian coral at high latitude. *Mar Ecol Prog Ser* 213 (2001) 79–86.
- B.N. Tissot, L.E. Hallacher, Effects of aquarium collectors on coral reef fishes in Kona, Hawaii. *Conservation Biology* 17 (6) (2003) 1759–1768.
- J.D. Toledo, H. Kurokura, Cryopreservation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. *Aquaculture* 91 (3) (1990) 385–394.
- N. Traylor-Knowles, B.R. Granger, T.J. Lubinski, J.R. Parikh, S. Garamszegi, Y. Xia, J.A. Marto, L. Kaufman, J.R. Finnerty, Production of a reference transcriptome and transcriptomic database

- (PocilloporaBase) for the cauliflower coral, *Pocillopora damicornis*. BMC genomics 12 (1) (2011) 585.
- S. Tsai, E. Spikings, F.W. Kuo, N.C. Lin, C. Lin, Use of an adenosine triphosphate assay, and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora spp.*) oocytes. Theriogenology 73 (2010) 605–611.
- S. Tsai, E. Spikings, I.C. Huang, C. Lin, Study on the mitochondrial activity and membrane potential after exposing later stage oocytes of two gorgonian corals (*Junceella juncea* and *Junceella fragilis*) to cryoprotectants. CryoLetters 32 (1) (2011) 1–12.
- S. Tsai, C. Lin, Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. Braz. Arch. Biol. Technol. 55 (3) (2012) 425–433.
- S. Tsai, V. Kuit, Z.G. Lin, C. Lin, Application of a functional marker for the effect of cryoprotectant agents on gorgonian coral (*Junceella juncea* and *J. fragilis*) sperm sacs. CryoLetters 35 (1) (2014) 1–7.
- S. Tsai, P. Thongpooe, F.W. Kuo, C. Lin, Impacts of low temperature preservation on mitochondrial DNA copy number in oocytes of the hard coral *Echinopora sp.* Mitochondrial DNA 0 (2015a) 1–4.
- S. Tsai, W. Yen, S. Chavanich, V. Viyakam, C. Lin, Development of cryopreservation techniques for gorgonian (*Junceella juncea*) oocytes through vitrification. PLoS ONE 10 (5) (2015b) e0123409 1–14.
- H. Usuki, M. Hamaguchi, H. Ishioka, Effects of developmental stage, seawater concentration and rearing temperature on cryopreservation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Fish. Sci. 68 (2002) 757–762.
- S. Uthicke, M. Logan, M. Liddy, D. Francis, N. Hardy, M. Lamare, Climate change as an unexpected co-factor promoting coral eating seastar (*Acanthaster planci*) outbreaks. Scientific reports 5 (2015) 8402.
- G. Vajta, M. Kuwayama, Improving cryopreservation systems. Theriogenology 65 (1) (2006) 236–244.
- D.P. Van Vuuren, J. Edmonds, M. Kainuma, K. Riahi, A. Thomson, K. Hibbard, G.C. Hurtt, T. Kram, V. Krey, J.F. Lamarque, T. Masui, M. Meinshausen, N. Nakicenovic, S.J. Smith, S.K. Rose, The representative concentration pathways: an overview. Climatic change 109 (2011) 5–31.
- J.H. Vandermeulen, N.D. Davis, L. Muscatine, The effect of inhibitors of photosynthesis on zooxanthellae in corals and other marine invertebrates. Marine Biology 16 (3) (1972) 185–191.
- J.H. Vandermeulen, N. Watabe, Studies on reef corals. I. Skeleton formation by newly settled planula larva of *Pocillopora damicornis*. Marine Biology 23 (1) (1973) 47–57.
- J.H. Vandermeulen, Studies on reef corals. II. Fine structure of planktonic planula larva of *Pocillopora damicornis*, with emphasis on the aboral epidermis. Marine Biology 27 (1974) 239–249.
- R.L. Vega Thurber, D.E. Burkepile, C. Fuchs, A.A. Shantz, R. McMinds, J.R. Zaneveld, Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. Global change biology 20 (2) (2014) 544–554.
- J.E.N. Veron, O. Hoegh-Guldberg, T.M. Lenton, J.M. Lough, D.O. Obura, P. Pearce-Kelly, C.R.C. Sheppard, M. Spalding, M.G. Stafford-Smith, A.D. Rogers, The coral reef crisis: The critical importance of <350 ppm CO₂. Marine Pollution Bulletin 58 (2009) 1428–1436.
- R.D. Villanueva, H.T. Yap, M.N.E. Montaña, Timing of planulation by pocilloporid corals in the northwestern Philippines. Mar. Ecol. Prog. Ser. 370 (2008) 111–119.
- V. Vitiello, P.A. Carlino, F. Del Prete, A.L. Langellotti, G. Sansone, Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing. Cryobiology 63 (2) (2011) 118–124.
- M. Vizel, Y. Loya, C.A. Downs, E. Kramarsky-Winter, A novel method for coral explant culture and micropropagation. Mar. Biotechnol. 13 (2011) 423–432.

- V. Vuthiphandchai, B. Pengpuna, S. Nimrat, Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 246 (2005) 275–284.
- V. Vuthiphandchai, S. Nimrat, S. Kotcharat, A.N. Bart, Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology* 68 (2007) 1192–1199.
- V. Vuthiphandchaia, B. Pengpuna, S. Nimrat, Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 246 (2005) 275–284.
- C. Wabnitz, From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species. *UNEP/Earthprint* 17 (2003).
- S.A. Wainwright, Skeletal organization in the coral, *Pocillopora damicornis*. *Quart. J. micr. Sci.* 104 (2) (1963) 169–183.
- M. Walther, R. Ulrich, M. Kroiher, S. Berking, Metamorphosis and pattern formation in *Hydractinia echinata*, a colonial hydroid. *The International journal of developmental biology* 40 (1) (1996) 313–322.
- W.B. Wang, P.J.W. Olive, Effects of cryopreservation on the ultrastructural anatomy of 3-segment *Nereis virens* larvae (Polychaeta). *Invertebrate Biology* 119 (3) (2000) 309–318.
- T. Watanabe, I. Yuyama, S. Yasumura, Toxicological effects of biocides on symbiotic and aposymbiotic juveniles of the hermatypic coral *Acropora tenuis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339 (2006) 177–188.
- V.M. Weis, S.K. Davy, O. Hoegh-Guldberg, M. Rodriguez-Lanetty, J.R. Pringle, Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends in ecology & evolution* 23 (7) (2008) 369–376.
- G.M. Wellington, Reversal of digestive interactions between Pacific reef corals: mediation by sweeper tentacles. *Oecologia* 47 (3) (1980) 340–343.
- D.G. Whittingham, Embryo Banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 78 (1972) 395–402.
- R.B. Williams, Acrorhagi, catch tentacles and sweeper tentacles: a synopsis of ‘aggression’ of actinarian and scleractinian Cnidaria. *Hydrobiologia* 216 (1) (1991) 539–545.
- J.R. Wilson, P.L. Harrison, Settlement-competency periods of larvae of three species of scleractinian corals. *Marine Biology* 131 (2) (1998) 339–345.
- R. Winkler, A. Antonius, D. Abigail Renegar, The skeleton eroding band disease on coral reefs of Aqaba, Red Sea. *Marine Ecology Progress Series* 25 (2) (2004) 129–144.
- E.M. Wood, Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies. *Marine Conservation Society, Ross-on-Wye, UK* (2001) 80.
- L.C. Woodall, A. Sanchez-Vidal, M. Canals, G.L. Paterson, R. Coppock, V. Sleight, A. Calafat, A.D. Rogers, B.E. Narayanaswamy, R.C. Thompson, The deep sea is a major sink for microplastic debris. *Royal Society Open Science* 1 (4) (2014) 140317.
- S.A. Wooldridge, Breakdown of the coral-algae symbiosis: towards formalising a linkage between warm-water bleaching thresholds and the growth rate of the intracellular zooxanthellae. *Biogeosciences Discussions* 9 (7) (2012) 8111–8139.
- S.C. Wyers, H.S. Barnes, S.R. Smith, Spawning of hermatypic corals in Bermuda: a pilot study. *Hydrobiologia* 216 (1) (1991) 109–116.
- T. Yacobovitch, V.M. Weis, Y. Benayahu, Development and survivorship of zooxanthellate and azooxanthellate primary polyps of the soft coral *Heteroxenia fuscescens*: laboratory and field comparisons. *Marine Biology* 142 (6) (2003) 1055–1063.
- I. Yakovleva, R. Bhagooli, A. Takemura, M. Hidaka, Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 139 (2004) 721–730.
- P.H. Yancey, M. Heppenstall, S. Ly, R.M. Andrell, R.D. Gates, V.L. Carter, M. Hagedorn, Betaines and dimethylsulfonylpropionate as major osmolytes in cnidaria with endosymbiotic dinoflagellates. *Physiological and Biochemical Zoology* 83 (1) (2010) 167–173.

- C.M. Yonge, The significance of the relationship between corals and zooxanthellae. *Nature* 128 (1931) 309–311.
- A.J. Yool, S.M. Grau, M.G. Hadfield, R.A. Jensen, D.A. Markell, D.E. Morse, Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. *The Biological Bulletin* 170 (2) (1986) 255–266.
- A.I. Younis, B. Rooks, S. Khan, K.G. Gould, The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *Journal of andrology* 19 (2) (1998) 207–214.
- D. Zakai, Z. Dubinsky, A. Avishai, T. Caaras, N.E. Chadwick, Lunar periodicity of planula release in the reef-building coral *Stylophora pistillata*. *Marine Ecology Progress Series* 311 (2006) 93–102.
- E. Zhang, L. Zhang, B. Wang, B. Yan, Q. Wang, Cryopreservation of marine diatom algae by encapsulation-vitrification. *Cryoletters* 30 (3) (2009) 224–231.
- T. Zhang, D.M. Rawson, Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 33 (1) (1996) 1–13.