



**HAL**  
open science

# Physiologie des transports ioniques et moléculaires chez les coraux, implications environnementales

Coralie Bernardet

► **To cite this version:**

Coralie Bernardet. Physiologie des transports ioniques et moléculaires chez les coraux, implications environnementales. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS496 . tel-03423244

**HAL Id: tel-03423244**

**<https://theses.hal.science/tel-03423244v1>**

Submitted on 10 Nov 2021

**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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant

*Centre Scientifique de Monaco / Département de Biologie Marine*

*Equipe de Physiologie et Biochimie*

## **Physiologie des transports ioniques et moléculaires chez les coraux, implications environnementales**

Par **Coralie BERNARDET**

Thèse de doctorat en Sciences de la vie (Complexité du Vivant)

Dirigée par les Drs. **Sylvie TAMBUTTE** et **Alexander VENN**

Présentée et soutenue publiquement le **8 novembre 2019** à Monaco

Devant un jury composé de :

<b>Dr. Joël GAUTRON</b>	Rapporteur
<b>Dr. Frédéric MARIN</b>	Rapporteur
<b>Dr. Ceri LEWIS</b>	Examineur
<b>Dr. Evelyn HOULISTON</b>	Examineur
<b>Dr. Jérémie VIDAL-DUPIOL</b>	Examineur
<b>Dr. Sylvie TAMBUTTE</b>	Directrice de Thèse
<b>Dr. Alexander VENN</b>	Co-encadrant



*A mes parents,*

*A Dimitri,*



*« Lorsque l'homme aura coupé le dernier arbre, pollué la dernière goutte d'eau, tué le dernier animal et pêché le dernier poisson, alors, il se rendra compte que l'argent n'est pas comestible » (Chef amérindien, 1854)*



## Remerciements

Que d'émotions d'aboutir à la rédaction de ces quelques lignes qui, bien que présentées au début de ce manuscrit, marquent la fin de l'écriture de ma Thèse. Ces trois dernières années ont été d'une grande richesse tant sur le plan scientifique et professionnel que sur le plan personnel. Cette formidable expérience a été rendue possible grâce à de nombreuses personnes que je tiens à remercier chaleureusement.

*Pour commencer, je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse, les Docteurs Joël Gautron et Frédéric Marin, en tant que rapporteurs, et les Docteurs Evelyn Houliston, Ceri Lewis et Jérémie Vidal-Dupiol, en tant qu'examineurs, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.*

*De même, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, les Docteurs Lucas Leclere, Eric Wajnberg et Jérémie Vidal-Dupiol, pour leurs remarques et discussions constructives lors de nos réunions qui m'ont permis d'obtenir un regard extérieur sur mon travail et d'en améliorer certains aspects. Merci à Eric également pour ces précieux conseils en statistiques et les nombreux mails que nous avons échangé à ce sujet.*

*Je souhaite aussi remercier le Président du CSM, le Professeur Rampal, ainsi que la Secrétaire Générale, Madame Corinne Gaziello, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire.*

*Par la même occasion, je remercie le Professeur Denis Allemand, Directeur Scientifique du CSM, de m'avoir accueillie au Centre Scientifique de Monaco. Je vous suis également reconnaissante de m'avoir conviée à venir discuter avec vous au CSM lors de notre rencontre alors que je travaillais au Musée Océanographique de Monaco. Cela a été pour moi l'élément déclencheur de mon retour vers le milieu de la Recherche.*

*Je souhaite adresser mes prochains remerciements à mes deux encadrants, Sylvie et Alex qui ont été extraordinaires pendant ces trois années. En premier lieu, je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance en choisissant de m'offrir ce sujet de thèse. Par la suite, vous avez été d'excellents guides dans l'apprentissage du métier de chercheur. La qualité de votre encadrement m'a permis au fil du temps de m'affirmer et de prendre conscience de l'expertise que j'ai développée au sein du laboratoire. Malgré tes responsabilités de chef d'équipe, Sylvie tu as toujours su te rendre disponible pour répondre à mes questions et me conseiller. Quant à Alex, ta gentillesse et tes encouragements ont été d'un grand soutien, notamment lorsque tout ne se passait pas comme prévu (les joies de la science !).*

*Je tiens aussi à remercier l'ensemble de mes collègues Chercheurs et PostDocs dont j'ai partagé l'open space ces trois dernières années. Malgré certaines divergences concernant les préférences thermiques des uns et des autres et un bureau parfois un peu animé, c'est avec un*

*pincement au cœur que je dois aujourd'hui laisser ma place au sein d'une équipe où je me suis rapidement sentie intégrée.*

*Tout d'abord, Eric, un grand merci pour l'aide que tu m'as apportée et les conseils que tu m'as donnés à chaque fois que je t'ai sollicité. Je garde aussi en mémoire ces conversations que nous avons eu à propos de notre passion commune pour l'écologie.*

*Didier, mes journées dans ce bureau n'auraient pas été les mêmes sans ta personnalité détonante alternant blagues (parfois douteuses) et chansonnette, et de temps à autre des emportements. Mais c'est bien pour ça qu'on t'adore. Je te remercie aussi d'avoir tenté de parfaire notre culture générale lors de nos repas le midi bien que la tâche n'ait pas été aisée.*

*Philippe, je te remercie pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. Tu as toi aussi contribué à rendre cet espace de travail plus vivant et m'auras beaucoup fait rire.*

*En dehors de l'aspect humain, je vous remercie Philippe et Didier pour vos larges connaissances en biologie moléculaire.*

*Enfin Duygu, je te remercie pour ta gentillesse et ces quelques leçons de yoga sur la digue auxquelles j'ai participé au début de ma thèse qui étaient un excellent moyen de se ressourcer après une journée de travail.*

*Toujours au sein de mon équipe, je tiens à adresser un grand merci à nos deux formidables techniciennes.*

*Natacha, merci beaucoup pour le temps que tu as passé à me former à certaines techniques la première année et de t'être rendue disponible lorsque j'en avais besoin, notamment toutes ces fois où je t'ai rajouté des mesures de MCP (pas toujours planifiées au préalable).*

*Nathalie, je te remercie encore énormément pour tout ce que tu as fait pour moi. Je t'ai notamment fait endurer un certain nombre de titrations et de qPCR et je t'en suis extrêmement reconnaissante. J'ai été très heureuse aussi de partager ces trois années avec toi. Toutes nos discussions et nos petits repas au Stars juste toutes les deux vont me manquer.*

*Je remercie aussi Estelle que j'ai encadrée lors de son stage de M1 et qui a fourni un très bon travail pour compléter mes propres expériences.*

*Je voudrais aussi remercier les autres équipes scientifiques du CSM, à commencer par l'équipe d'Ecophysiologie pour les échanges que j'ai pu avoir avec vous : Christine, Stéphanie, Renaud, Eric B., Cécile, Magali, Laura M, Vanessa, Jeroen, Leila, Lucile et Chloé.*

*Je remercie également l'ensemble des membres des équipes de Biologie polaire et de Biologie médicale avec qui j'ai eu le plaisir de discuter au coin café ou sur le trajet de la gare, ainsi qu'à Nathalie Hilmi en tant que représentante de l'Economie environnementale. Un merci tout particulier à Jérôme en Biologie médicale qui a fait preuve de bonté et de compassion en me servant de chauffeur lors des nombreuses grèves de la SNCF.*

*Mes prochains remerciements s'adressent aux techniciens dont le rôle est crucial pour le bon fonctionnement du laboratoire et des aquariums. Merci Dominique pour tes qualités d'aquariologiste qui nous permettent d'avoir des aquariums d'une grande beauté. Merci Eric E. pour le support technique que tu nous offres. Et enfin, merci Robert pour tous les nombreux*

*services que tu nous rends au quotidien, tu fais parfois même de véritables miracles, et ce toujours avec un grand sourire et beaucoup de bienveillance.*

*Je souhaite aussi remercier Alexandra, notre chère Secrétaire scientifique, pour ta bonne humeur, ton humour et ta gentillesse. Encore mille mercis également pour ton aide précieuse et ton soutien lors des ennuis que j'ai rencontré récemment...*

*Merci également à Jorge, l'homme qui murmurait à l'oreille des ordinateurs. Tu m'as sauvée lorsque mon ordinateur faisait des siennes.*

*Merci aussi aux trois Secrétaires administratives, Patricia, Barbara et Muriel, pour le travail essentiel qu'elles fournissent pour supporter nos activités de recherche.*

*Je tiens également à remercier sincèrement Aude Lectard du support technique de Thermofisher pour toute l'aide qu'elle m'a apportée lors des problèmes rencontrés avec notre machine qPCR. Merci surtout pour tous les mots gentils que vous avez pu avoir pour Nathalie et moi et pour la confiance que vous nous avez témoignée quant à la qualité de notre travail.*

*Pour conclure cette partie des remerciements, je souhaite aussi remercier ces étudiants qui sont passés par le CSM et avec qui j'ai partagé de bons moments tels que Pauline, Bertrand, Pierre, Nicholas, Thomas et Mélanie. Je voudrais aussi remercier Quentin qui est absolument unique en son genre et sans qui les pauses déjeuner n'auraient pas été aussi divertissantes. Un grand merci aussi à Alice dont je me suis rapidement sentie très proche. Je te souhaite une belle réussite en ce début de thèse et je compte bien que nous continuions à nous retrouver pour aller au cinéma voir le dernier Disney sorti en salles et papoter de tout et de rien. Et pour terminer comment ne pas remercier Laura, ma chère partenaire de thèse dans l'équipe de Physiologie. Je ne me souviens même pas comment était mon quotidien au labo avant que tu arrives il y a deux ans. Nous avons partagé tellement toutes les deux, bons comme mauvais moments, tant dans le travail que dans nos vies personnelles. Tu fais partie de ces belles rencontres que j'ai faites au CSM et je te remercie pour ça. Ti voglio molto bene.*

Enfin, je souhaite remercier toutes ces autres personnes chères à mon cœur et qui ont contribué à me permettre d'arriver où j'en suis aujourd'hui.

*Un grand merci à Didier, Tiziana, Fali et Auriane qui m'ont accueillie à bras ouverts au Musée Océanographique de Monaco pendant mon année de pause entre le Master et la Thèse. J'ai adoré travailler avec vous et transmettre mes connaissances à petits et grands à travers les ateliers ludiques que vous avez imaginés pour sensibiliser le public aux merveilles du milieu marin. Un grand merci par la même occasion à tous les animateurs vacataires avec qui j'ai partagé ces moments et à l'ensemble du personnel du Musée, titulaires et saisonniers, ainsi que son Directeur, Robert Calcagno.*

*Je tiens aussi à remercier mes amis dans la vie qui ont été également indispensables dans mon accomplissement.*

*Mes amis de Marseille : Karine, Charlène, Laëti et Xavier. C'est toujours un bonheur de suivre les péripéties des uns des autres malgré la distance et de nous rejoindre occasionnellement pour rattraper quelques peu le temps perdu.*

*Merci Julie de m'avoir hébergée nombre de fois lors de mes séjours parisiens, l'occasion aussi pour nous de nous retrouver et de refaire le monde comme nous le faisons déjà adolescentes.*

*Merci aussi à toi Mathilde, mon chou. Il y a tellement de choses que je pourrais dire. Merci pour ces soirées entières passées au téléphone pour nous raconter mutuellement le moindre détail de notre vie, d'avoir subi des trajets de train phénoménaux pour me rendre visite ne serait-ce que quelques jours, merci tout simplement de toujours être là pour moi et d'être une amie si formidable.*

*Et bien évidemment, Séréna, ma binôme de Master, ma colocataire en Australie, devenue une amie très chère. Ces trois dernières années nous avons connu ensemble, malgré la distance, les hauts et les bas de la vie d'un thésard et avons pu en discuter en comprenant mutuellement les difficultés, les enjeux et les satisfactions qu'elle représente. Merci pour ces heures passées sur Skype à discuter aussi bien de science que de nos vies. Merci aussi d'avoir pris le temps de lire la totalité de ma thèse et pour tous les judicieux commentaires que tu m'as faits afin d'améliorer la présentation de mon travail dans ce manuscrit.*

*A présent, je souhaite remercier Dimitri, pour ton soutien, tes encouragements et ta confiance en moi. Je n'aurais pas pu vivre cette expérience de la même manière sans ta présence et ton réconfort. Ton amour est la source de mon bonheur et de mon épanouissement personnel et m'a permis d'offrir en retour le meilleur de moi-même dans mon travail. Merci pour tout mon amour. Je t'aime.*

*Je terminerai ces remerciements par mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans tous les aspects de ma vie. Vous m'avez encouragée à poursuivre mes rêves depuis le jour où, enfant, je vous ai dit vouloir faire de la biologie marine mon métier et m'avez accompagnée dès lors dans les divers forums professionnels, fêtes de la science et journées portes ouvertes pour me renseigner sur mes possibilités. Vous m'avez également aidée financièrement pour me permettre de suivre mes études peu importe où elles me dirigeaient, du Canada à l'Australie en passant par les Caraïbes. Rien de tout cela n'aurait été possible sans vous et je ne pourrai jamais assez vous témoigner toute ma gratitude. Alors encore une fois merci de tout mon cœur.*

## Table des matières

<b>Remerciements.....</b>	<b>9</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>17</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>23</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>25</b>
<b>Liste des communications scientifiques.....</b>	<b>27</b>
<b>Liste des publications.....</b>	<b>27</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>29</b>
<b>CHAPITRE 1 – Les coraux récifaux dans un monde qui change, quel avenir ?.....</b>	<b>31</b>
1. Du récif corallien au corail récifal.....	33
1.1. Les récifs coralliens, des écosystèmes primordiaux.....	33
1.1.1. Importance écologique des récifs.....	33
1.1.2. Les récifs coralliens et l’Homme.....	34
1.1.3. Des écosystèmes menacés.....	34
1.2. Le corail constructeur de récif.....	37
1.2.1. Taxonomie.....	38
1.2.2. Cycle de vie et anatomie des coraux Scléactiniaires, exemple de <i>Stylophora pistillata</i> .....	40
1.2.3. Une symbiose mutualiste avec des microalgues.....	42
1.3. <i>Stylophora pistillata</i> , une espèce d’intérêt.....	44
1.3.1. Origine de <i>Stylophora pistillata</i> .....	44
1.3.2. <i>Stylophora pistillata</i> , une espèce résistante.....	45
1.3.3. Différentes méthodes de culture et de croissance.....	46
2. La calcification, un enjeu de taille pour les coraux récifaux.....	48
2.1. Formation d’un exosquelette, structure de la colonie.....	48
2.1.1. Des ions/molécules essentiels à la calcification.....	49
2.1.2. Le rôle de la matrice organique.....	51
2.2. Influence des paramètres environnementaux sur la calcification.....	52
3. Problématique de l’étude.....	53
<b>CHAPITRE 2 – Effet de la température sur la calcification : lien entre physiologie et expression des gènes codant pour des transporteurs ioniques.....</b>	<b>55</b>
1. État des connaissances actuelles.....	57
1.1. Impact de la température sur la croissance des coraux.....	57
1.2. Réponse transcriptomique des coraux à un choc thermique et à la lumière.....	59
2. Résultats personnels : Réponse de <i>Stylophora pistillata</i> à un changement de température, de l’animal au gène.....	61
2.1. Contexte de l’étude.....	61

2.2.	Impact de la température sur la calcification : réponse physiologique à l'échelle de l'animal.....	64
2.2.1.	Caractérisation des courbes de performance thermique de <i>S. pistillata</i> .....	64
2.2.2.	Interactions entre les différents paramètres physiologiques en réponse à un stress thermique .....	66
2.3.	Impact de la température sur la calcification : réponse des transporteurs ioniques à l'échelle des expressions géniques .....	68
2.3.1.	Similitudes entre physiologie et expression des gènes de transports ioniques	68
2.3.2.	Impact des températures extrêmes sur le transport et la conversion du carbone inorganique dissous .....	70
2.4.	Perspectives .....	73
2.5.	Publication.....	74
	Points-clé du chapitre 2 .....	98

### **CHAPITRE 3 – Effet de la température sur la régulation du pH et des ions au site de calcification ..... 99**

1.	La régulation du pH au site de calcification .....	101
1.1.	Le pH : quelques généralités .....	101
1.1.1.	Définition du pH.....	101
1.1.2.	Différentes méthodes de mesures du pH dans le milieu extracellulaire calcifiant .....	101
1.2.	Les coraux augmentent le pH dans le milieu extracellulaire calcifiant par rapport à l'eau de mer .....	106
2.	Résultats personnels : Mesures du pH et expression des gènes de transports ioniques sur des microcolonies à plat.....	107
2.1.	Contexte de l'étude.....	107
2.2.	Matériel et méthodes .....	107
2.2.1.	Matériel biologique et design expérimental .....	107
2.2.2.	Mesures du pH dans le MEC et dans les cellules calcicoblastiques.....	108
2.2.3.	Expression des gènes de transport ioniques par PCR en temps réel.....	111
2.2.4.	Analyses statistiques.....	113
2.3.	Résultats .....	113
2.3.1.	Mesure du pHe dans le milieu calcifiant et dans les cellules calcicoblastiques .....	113
2.3.2.	Expression des gènes impliqués dans le transport des ions.....	116
2.4.	Discussion .....	122
2.4.1.	Utilisation de microcolonies à plat de <i>Stylophora pistillata</i> .....	122
2.4.2.	Impact de la température et de la lumière sur la régulation du pH.....	123
2.4.3.	Implication des gènes de transport ioniques dans la réponse de <i>S. pistillata</i> et sa régulation du pH face à un stress thermique.....	125
2.5.	Perspectives .....	126
	Points-clé du chapitre 3 .....	128

### **CHAPITRE 4 – Effet de la température sur la perméabilité des tissus et la diffusion paracellulaire des ions vers le milieu extracellulaire calcifiant .. 129**

1.	Généralités sur les jonctions intercellulaires et la perméabilité des épithéliums.....	131
1.1.	Les jonctions intercellulaires chez les Métazoaires .....	131
1.1.1.	Les jonctions communicantes.....	131
1.1.2.	Les jonctions d'ancrage .....	132

1.1.3. Les jonctions d'occlusion .....	135
1.2. Les jonctions septées : régulation de la perméabilité des tissus chez les invertébrés, dont les coraux.....	136
1.2.1. Structure des jonctions septées .....	136
1.2.2. La perméabilité des tissus chez les coraux .....	137
2. Résultats personnels : Mesure de la perméabilité des tissus et expression des gènes de jonctions sur des microcolonies à plat .....	139
2.1. Contexte de l'étude.....	139
2.2. Matériel et méthodes .....	139
2.2.1. Matériel biologique et design expérimental .....	139
2.2.2. Mesure de la perméabilité des tissus .....	140
2.2.3. Expression des gènes des jonctions septées.....	141
2.2.4. Analyses statistiques .....	143
2.3. Résultats .....	143
2.3.1. Calcul du demi-temps de renouvellement ( $t_{1/2}$ ) du milieu extracellulaire calcifiant .....	143
2.3.2. Expression des gènes des jonctions septées.....	144
2.4. Discussion .....	150
2.4.1. Influence des paramètres environnementaux sur la perméabilité des tissus : implications dans le processus de calcification .....	150
2.4.2. Déclin de la perméabilité à l'obscurité et lors de stress thermiques : implications de la régulation des gènes de jonctions septées .....	151
2.5. Perspectives .....	154
Points-clé du chapitre 4 .....	156

**CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES – Physiologie des transports ioniques et moléculaires chez les coraux, implications environnementales .....** 157

**Références bibliographiques .....** 167

**Annexes.....** i



## Liste des figures

- Figure 1.** Représentation schématique de l'effet de serre naturel et suite à une augmentation de l'émission des gaz à effet de serre.  $p\text{CO}_2$  désigne la pression partielle du  $\text{CO}_2$ . D'après Will Elder (National Park Services). ..... 36
- Figure 2.** Représentation schématique du phénomène d'acidification des océans. D'après Hoegh-Guldberg *et al.* (2007). ..... 37
- Figure 3.** Position taxonomique de *Stylophora pistillata* au sein de l'embranchement des Cnidaires (phylogénie simplifiée). D'après le National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>). ..... 39
- Figure 4.** Représentation schématique de polypes liés par le cœnosarque. D'après Tambutté *et al.* (2011). ..... 40
- Figure 5.** Modèle de l'anatomie de *Stylophora pistillata*. ..... 41
- Figure 6.** Photographie de trois zooxanthelles dans une cellule endodermique isolée de *S. pistillata*. Les zones rouges correspondent à la fluorescence de la chlorophylle dans les chloroplastes des zooxanthelles. La cellule, tamponnée à un pH de 7,5, apparaît jaune du fait de la présence de SNARF-1 AM (seminaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester, voir p121). © Coralie Bernardet (CSM) ..... 42
- Figure 7.** Photographies de *S. pistillata* en bonne santé et blanchi : A. Colonie, et C. polypes en bonne santé ; B. Colonie, et D. polypes blanchis. © Coralie Bernardet (CSM) ..... 43
- Figure 8.** Photographie d'une colonie de *Stylophora pistillata*. © Eric Tambutté (CSM) ..... 44
- Figure 9.** Répartition géographique de *S. pistillata*. D'après Veron *et al.* (2016). ..... 45
- Figure 10.** Bouturage de microcolonies sur fil. A. Jeunes boutures sur fil placées dans un bac de cicatrisation. B. Une microcolonie sur fil après cicatrisation. © Coralie Bernardet (CSM) ..... 46
- Figure 11.** Microcolonies poussant à plat : A. sur lame, et B. sur lamelle de verre. Le front de croissance est la zone de l'échantillon situé entre les deux flèches rouges © Coralie Bernardet (CSM) ..... 47
- Figure 12.** Morphologie d'une microcolonie de *Stylophora pistillata* ayant poussé à plat. A. Photographie d'une microcolonie observée sous une loupe binoculaire, B. Front de croissance de la microcolonie observée au microscope confocal (Leica SP8). EDM désigne l'eau de mer, MEC une poche de milieu extracellulaire calcifiant, C un cristal de  $\text{CaCO}_3$  et Z les zooxanthelles de l'endoderme aboral. © Coralie Bernardet (CSM) ..... 48
- Figure 13.** Représentation schématique des voies de transport des ions chez *S. pistillata*. La voie transcellulaire est représentée en rouge et la voie paracellulaire en vert. .... 51
- Figure 14.** Courbe de performance thermique théorique pour un animal ectotherme. 57
- Figure 15.** Représentation schématique de la distribution des transporteurs ioniques au niveau de l'épithélium calcicoblastique et du milieu extracellulaire calcifiant chez *S. pistillata*. ..... 64

- Figure 16. Courbes de performance thermique de *Stylophora pistillata*.** Les courbes sont issues de régressions polynomiales, les points correspondent aux moyennes et les barres d'erreur sont les écart-types. Les cercles pleins (●) représentent les données de nuit et les cercles vides (○) représentent les données de jour : (A) Taux de calcification (n = 6, nuit P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,71 et jour P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,88), (B) Taux de respiration (n = 6, nuit P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,76 et jour P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,69), (C) Taux de photosynthèse nette (n = 6, P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,68) and (D) Densité de symbiotes (n = 3, P = 0,48, R<sup>2</sup>= 0,85). D'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019). ..... 65
- Figure 17. Corrélations entre les différents paramètres physiologiques mesurés.** Corrélations entre : A. taux de calcification et de respiration de nuit (p = 1,6.10<sup>-10</sup> et R<sup>2</sup> = 0,47) ; B. taux de calcification et de respiration de jour (p = 3,1.10<sup>-14</sup> et R<sup>2</sup> = 0,56) ; C. taux de respiration de jour et de photosynthèse nette (p = 3,1.10<sup>-13</sup> et R<sup>2</sup> = 0,56). Modifiée d'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019). ..... 67
- Figure 18. Taux de photosynthèse normalisé par la densité de zooxanthelles.** Les barres d'erreur ne sont pas représentées sur cette figure car les données concernant le taux de photosynthèse et la densité de zooxanthelles sont issues de deux expériences différentes. Modifiée d'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019)... 67
- Figure 19. Analyse discriminante sur les expressions de 17 gènes de transports ioniques chez *S. pistillata*.** Chaque point représente le profil d'expression génique pour un échantillon, et les ellipses délimitent les différents groupes. Le bleu représente les échantillons à 17°C, le jaune à 25°C et le rouge à 32°C. Les ronds pleins (●) représentent les individus de nuit et les ronds vides (○) représentent les individus de jour. Les graphiques A, B et C sont issus de l'analyse discriminante selon les facteurs discriminants (DF). DF1 explique 24% de variation, DF2 explique 24% et DF3 explique 22%. Des ANOVAs à un facteur réalisées sur chacun des trois axes de l'analyse discriminante montrent des différences significatives entre les groupes (P < 0,05). D'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019). ..... 69
- Figure 20. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans le chapitre 2 : A. la nuit, et B. le jour.** L'échelle de l'axe y est arbitraire. Les courbes des taux de calcification (orange), respiration (jaune) et photosynthèse (vert), sont issues des régressions polynomiales présentées dans le chapitre 2. La courbe représentant l'expression des gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID (marron) est tracée de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour. .... 98
- Figure 21.** A. Distribution des espèces aqueuses du bore en fonction du pH. B. δ<sup>11</sup>B des deux espèces majoritaires du bore en fonction du pH. D'après Hemming et Hanson (1992). ..... 102
- Figure 22. Diagramme schématique montrant comment le pH est calculé à partir des variations dans la composition isotopique du bore.** D'après (McCulloch *et al.*, 2012a). ..... 103
- Figure 23. Spectre d'émission de la sonde fluorescente SNARF-1 à différentes valeurs de pH.**..... 105
- Figure 24. Exemple de courbe de calibration réalisée avec la sonde SNARF-1 dans une eau de mer tamponnée.** ..... 105

- Figure 25. Photo du microscope confocal Leica SP5 lors de mesures du pH dans le MEC.** © Coralie Bernardet (CSM) ..... 108
- Figure 26. Représentation schématique d'un z-stack.** Les différents plans en z représentent les plans d'observation d'une microcolonie à plat en partant de la lamelle et en remontant dans l'échantillon. Le pHe est mesuré à partir de la moyenne de fluorescence acquise dans 3 plans, au milieu de la poche de MEC dans une zone d'intérêt (ROI1). Les cristaux de CaCO<sub>3</sub> (en noir) sont visibles dans les premiers plans, car proches de la lamelle, et disparaissent ensuite, recouverts par les cellules calcicoblastiques (en jaune). ..... 110
- Figure 27. Front de croissance d'une microcolonie à plat observée au microscope confocal inversé.** A. et C. Images en lumière transmise, B. Incubation dans du SNARF-1 permettant la visualisation des poches de MEC et les mesures de pHe (en rouge), D. Incubation dans du SNARF-1 AM permettant les mesures de pH<sub>i</sub> dans les cellules calcicoblastiques (CC) (en jaune). Des régions d'intérêt (ROI) permettent d'obtenir les valeurs de ratio de fluorescence dans les zones d'intérêt et de calculer ensuite le pH. EDM désigne l'eau de mer, et C désigne un cristal de CaCO<sub>3</sub>. ..... 111
- Figure 28. Photographie d'une microcolonie à plat dont le front de croissance (délimité par la ligne blanche) a été découpé selon la ligne rouge pour en extraire l'ARN.** © Coralie Bernardet (CSM) ..... 112
- Figure 29. Mesures du pH dans le MEC (points rouges), dans l'eau de mer (points bleus) et dans la couche limite de diffusion (CLD) (points jaunes) :** A. le jour, et B. la nuit. Les points représentent les moyennes et les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n = 5, excepté à 20°C nuit où n = 4). Les étoiles noires montrent les différences statistiques entre le pHe et le pH<sub>EDM</sub>. Des ANOVAs à un facteur ont montré des différences significatives entre le pHe et le pH<sub>EDM</sub> (p < 0,0001). Des ANOVAs à deux facteurs conduites sur les mesures de pHe n'ont montré aucune différence statistique avec la température (p = 0,08) et la condition jour/nuit (p = 0,32), ni aucune interaction significative entre ces deux paramètres (p = 0,34). ..... 114
- Figure 30. Mesure de pH intracellulaire dans les cellules calcicoblastiques :** A. le jour, et B. la nuit. Les points représentent les moyennes et les barres d'erreur correspondent aux écart-types (à 20°C et 25°C : n = 4 ; à 31°C : n = 5). Des ANOVAs à deux facteurs conduites sur les mesures de pH<sub>i</sub> n'ont montré aucune différence statistique avec la température (p = 0,22) et la condition jour/nuit (p = 0,18), ni aucune interaction significative entre ces deux paramètres (p = 0,38). ..... 115
- Figure 31. Analyse discriminante sur l'expression de 17 gènes de transporteurs ioniques chez *S. pistillata*.** Chaque point représente le profil d'expression génique d'un échantillon, et les ellipses les groupes de ressemblance. En bleu sont représentés les échantillons à 20°C, en jaune à 25°C et en rouge à 31°C. Les points pleins correspondent aux individus de nuit, et les points ouverts les individus de jour. A,B et C montrent les représentations graphiques selon les différents Facteurs Discriminants (DF). DF1 explique 25% de variations, DF2 21% et DF3 21%. 117
- Figure 32. Représentation graphique de l'expression des 17 gènes étudiés relative à 25°C (transformation log10) :** A. pendant la nuit, et B. pendant le jour. Les barres bleues correspondent à l'expression des gènes à 20°C (n = 4) et les barres rouges

- à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,01$ ) la nuit (en bleu) et le jour (en rouge) avec l'expression des gènes à 25°C..... 119
- Figure 33. Représentation graphique de l'expression des 17 gènes étudiés le jour relative à la nuit (transformation log10) :** A. à 20°C (n = 4), B. à 25°C (n = 4), et C. à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,01$ ) avec l'expression des gènes durant la nuit pour chacune des températures. .... 121
- Figure 34. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans les chapitres 2 et 3 :** A. la nuit, et B. le jour. La courbe représentant l'expression des gènes impliqués dans le transport des protons (violet) est tracée de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour. Les droites montrant les valeurs de  $pH_e$  (magenta) et de  $pH_i$  (rose clair) sont extrapolées en fonction des valeurs mesurées à 20°C, 25°C et 31°C. .... 128
- Figure 35. Modèle de jonction communicante.** Modifié d'après Evans et Martin (2002). .... 132
- Figure 36. Modèle de jonction d'adhérence.**  $\alpha$  et  $\beta$  représentent les caténines, et AF6 sont les afadines Modifié d'après Mateo *et al.* (2015). .... 133
- Figure 37. Modèle de desmosome.** Modifié d'après Cooper (Cooper, 2000). .... 134
- Figure 38. Modèle d'hémidesmosome.** D'après Alberts *et al.* (2008). .... 134
- Figure 39. Modèle de jonction serrée chez les vertébrés.** Modifié d'après Niessen (2007). .... 135
- Figure 40. Modèle de jonction septée chez les insectes.** D'après Beyenbach et Piermarini (2011). .... 136
- Figure 41. Modèle euristique de jonction septée chez les Cnidaires.** Modifié d'après Ganot *et al.* (2015) .... 137
- Figure 42. Photographies :** A. du microscope confocal (Leica SP8), B. d'une microcolonie incubée en présence de calcéine dans une chambre de perfusion. © Coralie Bernardet (CSM) .... 140
- Figure 43. Exemples de courbes d'intensité de fluorescence (A) et du  $\ln(Fe-F)$  (B) dans les poches de MEC en fonction du temps.**  $F_e$  désigne l'intensité de fluorescence à l'équilibre et  $F$  l'intensité de fluorescence à un temps  $t$ . .... 141
- Figure 44. Demi-temps de renouvellement de la calcéine dans les poches de MEC ( $t_{1/2}$ ) à 20°C, 25°C et 31°C.** Les boîtes à moustaches bleues correspondent aux mesures de nuit et les rouges aux mesures de jour (n = 4-7). Les boîtes à moustaches sont délimitées par le premier et le troisième quartile, les croix représentent la moyenne, les barres du milieu sont les médianes, les points représentent chacune des valeurs et les barres d'erreur sont les écart-types. Les étoiles montrent les différences statistiques par rapport à : 25°C nuit (en bleu), 25°C jour (en rouge), à la nuit (en noir), selon une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post-hoc (pairwise.t.test). .... 143
- Figure 45. Analyse discriminante sur l'expression de 17 gènes de jonctions chez *S. pistillata*.** Chaque point représente le profil d'expression génique d'un échantillon, et les ellipses les groupes de ressemblance. En bleu sont représentés les échantillons à 20°C, en jaune à 25°C et en rouge à 31°C. Les points pleins correspondent aux individus de nuit, et les points ouverts les individus de jour.

A,B et C montrent les représentations graphiques selon les différents Facteurs Discriminants (DF). DF1 explique 24% de variations, DF2 23% et DF3 19%. 145

- Figure 46. Représentation graphique de l'expression des gènes de jonctions relative à 25°C (transformation log10) :** A. pendant la nuit, et B. pendant le jour. Les barres bleues correspondent à l'expression des gènes à 20°C (n = 4) et les barres rouges à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) à 20°C (en bleu) et à 31°C (en rouge) avec l'expression des gènes à 25°C. .... 147
- Figure 47. Représentation graphique de l'expression des gènes de jonctions le jour relative à la nuit (transformation log10) :** A. à 20°C (n = 4), B. à 25°C (n = 4), et C. à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) avec l'expression des gènes durant la nuit pour chacune des températures. .... 149
- Figure 48. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans les chapitres 2, 3 et 4 :** A. la nuit, et B. le jour. La courbe de perméabilité (bleue) est tracée à partir de valeurs arbitraires de perméabilité reflétant la profil inverse des mesures de  $t^{1/2}$ . La courbe représentant l'expression des gènes de jonctions septées (bleue turquoise) est tracée de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour. .... 156
- Figure 49. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans les chapitres 2, 3 et 4 en réponse à la température :** A. la nuit, et B. le jour. L'échelle de l'axe y est arbitraire. Les courbes des taux de calcification (orange), respiration (jaune) et photosynthèse (verte), sont issues des régressions polynomiales présentées dans le chapitre 2. Les courbes représentant l'expression des gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID (marron) et dans le transport des protons (violet), ainsi que des gènes de jonctions septées (bleue turquoise) sont tracées de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour. Les droites montrant les valeurs de  $pH_e$  (magenta) et de  $pH_i$  (rose clair) sont extrapolées en fonction des valeurs mesurées à 20°C, 25°C et 31°C. La courbe de perméabilité (bleue) est tracée à partir de valeurs arbitraires de perméabilité reflétant la profil inverse des mesures de  $t^{1/2}$ . .... 163
- Figure 50. Modèle heuristique des mécanismes impliqués dans la formation de la fraction minérale du squelette en carbonate de calcium de *S. pistillata* durant la nuit :** (A) en condition contrôle, et (B) lors d'un stress thermique. Les étoiles jaunes représentent les processus affectés lors d'un stress thermique selon les résultats obtenus au cours de cette thèse. .... 164



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b>	Résumé des différentes études caractérisant des courbes de performance thermique au regard de la calcification pour des espèces de coraux tropicaux constructeurs de récifs. ....	59
<b>Tableau 2.</b>	Liste des gènes de transport des ions de <i>S. pistillata</i> analysés dans cette étude, avec les séquences des amorces et la taille des produits de PCR en temps réel. Des informations supplémentaires peuvent être obtenues dans la base de données des Cnidaires : <a href="http://www.data.centrescientifique.mc">www.data.centrescientifique.mc</a> (Maor-Landaw <i>et al.</i> , 2014). D’après l’article 1 (Bernardet <i>et al.</i> , 2019). ....	63
<b>Tableau 3.</b>	Résumé des différences statistiques des expressions géniques à 17°C et 32°C comparées à 25°C pendant la nuit et le jour déterminées par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent une augmentation ou diminution d’expression significative par rapport à 25°C ( $p < 0.05$ ). Les flèches grises représentent les tendances relatives à 25°C ( $p < 0.1$ ). Tiré de l’article 1 (Bernardet <i>et al.</i> , 2019). ....	71
<b>Tableau 4.</b>	Résumé des différences statistiques des expressions géniques à 17°C, 25°C et 32°C pendant le jour comparé à la nuit déterminées par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent une augmentation ou diminution d’expression significative le jour par rapport à la nuit ( $p < 0.05$ ). Tiré de l’article 1 (Bernardet <i>et al.</i> , 2019). ....	72
<b>Tableau 5.</b>	Résultat d’ANOVAs à deux facteurs sur l’effet de la température et de la condition nuit/jour sur le pHe (Figure 29) et le pH <sub>i</sub> (Figure 30) et d’une ANOVA à un facteur sur la localisation des mesures (dans le MEC, l’eau de mer et la couche limite de diffusion). ....	116
<b>Tableau 6.</b>	Résultat d’une ANOVA à trois facteurs sur l’effet de la température (20°C, 25°C et 31°C), de la condition nuit/jour et des différents gènes sur l’expression relative des gènes (sans SpisCA2) et d’une ANOVA à deux facteurs sur l’effet de la température ....	118
<b>Tableau 7.</b>	Résumé des différences statistiquement significatives dans l’expression des gènes à 20°C et 31°C relative à 25°C pendant la nuit et le jour (Figure 9) déterminée par une ANOVA (Tableau 6) et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent l’augmentation ou la diminution significative de l’expression des gènes relative à 25°C ( $p < 0,01$ ). Les flèches grises représentent les tendances relatives à 25°C ( $p < 0,05$ ). ....	120
<b>Tableau 8.</b>	Résumé des différences statistiquement significatives dans l’expression des gènes à 20°C, 25°C et 31°C le jour relative à la nuit (Figure 30) déterminée par une ANOVA (Tableau 6) et une analyse post-hoc. Les flèches représentent l’augmentation ou la diminution significative de l’expression des gènes relative à la nuit ( $p < 0,01$ ). ....	122
<b>Tableau 9.</b>	Liste des gènes de jonction septées de <i>S. pistillata</i> analysés ici et publiés par Ganot <i>et al.</i> (2015), avec les séquences des amorces et la taille des produits de PCR en temps réel. ....	142

<b>Tableau 10.</b> Résultat d'une ANOVA à deux facteurs sur l'effet de la température et de la condition nuit/jour sur le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC (Figure 44). .....	144
<b>Tableau 11.</b> Résultat du test post-hoc (pairwise.t.test) sur le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC. Les « x » indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) par rapport à 25°C, et entre la nuit et le jour. ....	144
<b>Tableau 12.</b> Résultat d'une ANOVA à trois facteurs sur l'effet de la température (20°C, 25°C et 31°C), de la condition nuit/jour et des différents gènes sur l'expression relative des gènes (Figure 46 et 47).....	146
<b>Tableau 13.</b> Résumé des différences statistiquement significatives dans l'expression des gènes à 20°C et 31°C relative à 25°C pendant la nuit et le jour (Figure 46) déterminée par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent l'augmentation ou la diminution significative de l'expression des gènes relative à 25°C ( $p < 0,01$ ). Les flèches grises représentent les tendances relatives à 25°C ( $p < 0,05$ ).....	148
<b>Tableau 14.</b> Résumé des différences statistiquement significatives dans l'expression des gènes à 20°C, 25°C et 31°C le jour relative à la nuit (Figure 47) déterminée par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches représentent l'augmentation ou la diminution significative de l'expression des gènes relative à la nuit ( $p < 0,05$ ). .....	150

## *Liste des annexes*

- Annexe 1.** Valeurs propres de l'analyse discriminante des gènes de transporteurs ioniques. iii
- Annexe 2.** Variables discriminantes de l'analyse discriminante des gènes de transporteurs ioniques..... iii
- Annexe 3.** Résultats d'une ANOVA à un facteur sur l'effet des traitements (température et condition nuit/jour) sur chacun des axes de l'analyse discriminante des gènes de transporteurs ioniques (DF1, DF2 et DF3) (Figure 31) suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls. .... iv
- Annexe 4.** Mise au point d'un protocole de mesure du taux de calcification avec la méthode d'anomalie d'alcalinité dans un petit volume..... iv
- Annexe 5.** Conception de nouvelles chambres d'incubation pour mesurer l'alcalinité dans des petits volumes. A : Plan de conception des chambres d'incubation, B. et C. Photographie des chambres d'incubations. .... v
- Annexe 6.** Résultats préliminaires des taux de calcification (A) et de respiration (B) de microcolonies à plat..... vi
- Annexe 7.** Valeurs propres de l'analyse discriminante des gènes de jonctions septées. .... vii
- Annexe 8.** Variables discriminantes de l'analyse discriminante des gènes de jonctions septées..... vii
- Annexe 9.** Résultats d'une ANOVA à un facteur sur l'effet des traitements (température et condition nuit/jour) sur chacun des axes de l'analyse discriminante des gènes de jonctions septées (DF1, DF2 et DF3) (Figure 45) suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls. .... viii



## *Liste des communications scientifiques*

### **Communications orales**

**Bernardet, C.,** Techer N., Tambutté, S., et Venn, A. The impact of temperature on transcellular transport of ions for coral calcification. **Society of Experimental Biology (SEB)**. Florence, Italie. 3-6 juillet 2018.

### **Communications affichées**

**Bernardet, C.,** Tambutté, E., Techer N., Segonds, N., Tambutté, S., et Venn, A. The impact of temperature on mechanisms driving coral calcification. **European Coral Reef Symposium (ECRS)**. Oxford, Royaume-Uni. 13-15 décembre 2017.

**Bernardet, C.,** Tambutté, E., Techer N., Segonds, N., Tambutté, S., et Venn, A. Effect of temperature on coral biomineralization: case study of *Stylophora pistillata*. **20<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM)**. Monaco. 21-23 Mars 2018. *Lauréat d'un prix pour le meilleur poster*.

\*\*\*\*\*

## *Liste des publications*

**Bernardet, C.,** Tambutté, E., Techer, N., Tambutté, S., and Venn, A.A. (2019). Ion transport gene expression is linked to the thermal sensitivity of calcification in the reef coral *Stylophora pistillata*. *Scientific reports*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54814-7>

**Bernardet, C.,** Techer, N., Tambutté, S., and Venn, A.A.. Impact of temperature on tissue permeability and pH regulation at the site of calcification in a reef coral. **(En préparation)**

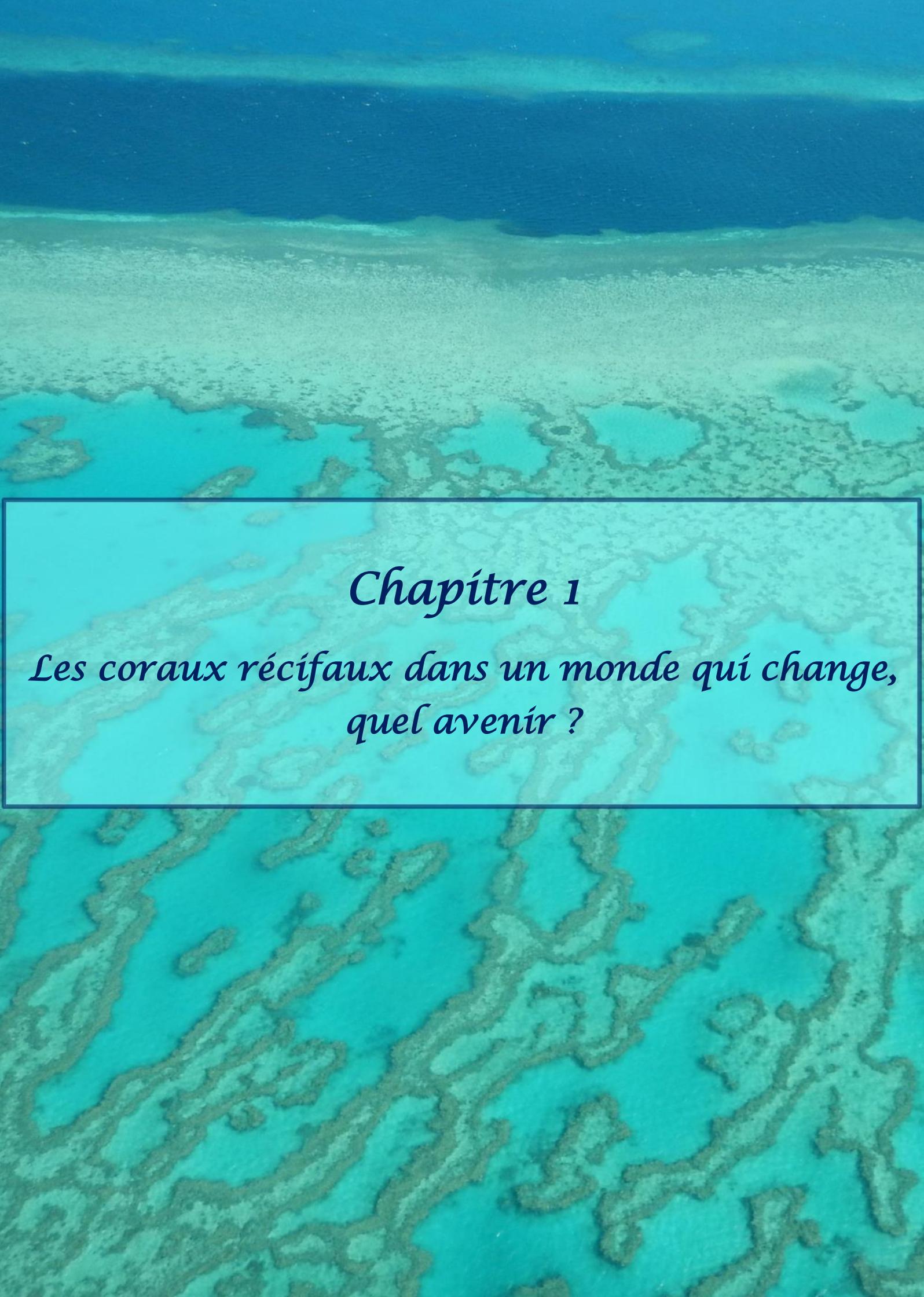
**Bernardet, C.,** Venn, A.A., Tambutté, E., and Tambutté, S. (en préparation). Development of an approach to determine calcification rates by the alkalinity anomaly for coral microcolonies grown for microscopy experiments. **(En préparation)**



## *Liste des abréviations*

AC : Anhydrase carbonique (ou CA, *Carbonic anhydrase*)  
 ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
 ANOVA : *Analysis of variances*  
 ARNm : Acide ribonucléique messenger  
 ATP : Adénosine triphosphate  
 B(OH)<sub>3</sub> : Acide borique  
 B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> : Ion borate  
 Ca<sup>2+</sup> : Ion calcium  
 CaCO<sub>3</sub> : Carbonate de calcium  
 CID : Carbone inorganique dissous  
 Claud : Claudine  
 CLD : Couche limite de diffusion  
 CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> : Carbonate  
 CONT : Contactine  
 CORA : Coracle  
 CPT : Courbe de performance thermique  
 CSM : Centre Scientifique de Monaco  
 DF : *Discriminant Factor*  
 EDM : Eau de mer  
 GES : Gaz à effet de serre  
 GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat  
 H<sup>+</sup> : Proton  
 H<sub>2</sub>O : Eau  
 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Bicarbonate  
 HSP : *Heat shock protein*  
 IPCC : *Intergovernmental Panel on Climate Change*  
 JAM : *Junctional adhesion molecule*  
 LEC : *Light-enhanced calcification*  
 MEC : Milieu extracellulaire calcifiant  
 NBS : *National Bureau of Standards*  
 NHE : Échangeur Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>  
 NRG : Neuroglial  
 NRX : Neurexine  
 PCR : *Polymerisation in chain reaction*  
 pH : potentiel hydrogène  
 pH<sub>e</sub> / pH<sub>i</sub> / pH<sub>T</sub> : pH extracellulaire / intracellulaire / « total scale »  
 PMCA : *Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*  
 ppm : *Part per million*  
 qPCR : PCR quantitative (ou PCR en temps réel)  
 ROI : *Region of interest*  
 ROS : *Reactive oxygen species*  
 RT : *Reverse transcription*  
 SLC : *Solute carrier*  
 t<sub>1/2</sub> : Demi-temps de renouvellement



An aerial photograph of a coral reef system, showing various shades of blue and green. The water is clear, revealing the intricate patterns of the coral. A dark blue line of the open ocean is visible in the distance. A white rectangular box with a thin black border is centered in the lower half of the image, containing text.

## *Chapitre 1*

*Les coraux récifaux dans un monde qui change,  
quel avenir ?*



# CHAPITRE 1

## Les coraux récifaux dans un monde qui change, quel avenir ?

### 1. Du récif corallien au corail récifal

#### 1.1. Les récifs coralliens, des écosystèmes primordiaux

Présents dans de nombreuses régions tropicales de la planète, les récifs coralliens sont l'une des plus impressionnantes constructions biologiques, visible depuis l'espace. L'exemple le plus remarquable est la grande barrière de corail australienne qui s'étend sur plus de 2000 km. Les récifs coralliens sont reconnus et admirés pour l'exceptionnelle beauté des paysages sous-marins qu'ils offrent. Toutefois, bien au-delà de l'aspect esthétique, ils sont l'élément clé d'écosystèmes extrêmement riches et complexes. Bien qu'ils ne recouvrent que 0,1% des océans, les récifs coralliens abritent plus de 30% de la biodiversité marine mondiale (Reaka-Kudla, 1997). Ils sont également convoités par l'Homme pour qui ils représentent une ressource alimentaire et économique importante. Cependant, l'empreinte de l'Homme menace aujourd'hui la santé des récifs coralliens et l'équilibre des écosystèmes qui en dépendent.

##### 1.1.1. Importance écologique des récifs

Les coraux occupent une place centrale au sein des écosystèmes récifaux dont ils constituent avant tout l'architecture. Leur structure tridimensionnelle complexe permet en effet d'offrir une multitude d'abris pour les diverses espèces de poissons, crustacés et autres animaux à la recherche d'un refuge pour se cacher ou vivre. De plus, les barrières récifales permettent la formation de lagons fermés inaccessibles aux grands prédateurs et ainsi utilisés comme nurseries par de nombreuses espèces. Les coraux constituent également un maillon à part entière du réseau trophique et représentent une source de nourriture pour de nombreuses espèces de poissons corallivores comme les poissons perroquets (Scaridae) qui se nourrissent des polypes du corail.

L'importance écologique des récifs coralliens est souvent comparée à celle des forêts tropicales tant la biodiversité que ces deux types d'écosystèmes abritent est remarquable. Aujourd'hui, près de 100 000 espèces ont été décrites au sein des récifs coralliens. Cependant, la difficulté d'étudier ces écosystèmes aquatiques, dont de nombreuses espèces sont extrêmement petites et cryptiques, laisse supposer une grande sous-estimation du nombre réel d'espèces liées aux récifs coralliens. Si la densité de biodiversité par km<sup>2</sup> est la même dans les récifs coralliens que dans les forêts, le nombre d'espèces dans les récifs pourraient se situer en réalité autour de 950 000 (Reaka-Kudla, 1997).

### 1.1.2. Les récifs coralliens et l'Homme

Dans toutes les régions tropicales où ils sont présents, les récifs coralliens occupent une place centrale dans la vie de l'Homme. La richesse de poissons et crustacés au sein des récifs offre une ressource alimentaire abondante pour les communautés humaines locales. La pêche nourrit ainsi plus de 30 millions de personnes (Wilkinson, 2008) et génère 5,7 milliards US\$ chaque année (Cesar *et al.*, 2003). D'autre part, plus de 70 millions de personnes voyagent chaque année dans le but de plonger sur les récifs coralliens et admirer ces extraordinaires paysages sous-marins (Spalding *et al.*, 2017). Cet attrait touristique génère de nombreux emplois et contribue ainsi au développement économique de régions tropicales, souvent pauvres à l'origine. Le bénéfice net produit par le tourisme lié aux récifs coralliens est estimé à 9,6 milliards US\$ chaque année à l'échelle planétaire (Cesar *et al.*, 2003). Par ailleurs, les récifs coralliens constituent une véritable barrière physique contre le déferlement des vagues. Les littoraux abrités derrière les récifs sont alors épargnés lors de tempêtes et ralentissent significativement l'érosion des côtes.

En fin de compte, les récifs coralliens font vivre 500 millions de personnes (Wilkinson, 2008), et génèrent chaque année un bénéfice net à l'économie mondiale de 30 milliards US\$ (Cesar *et al.*, 2003).

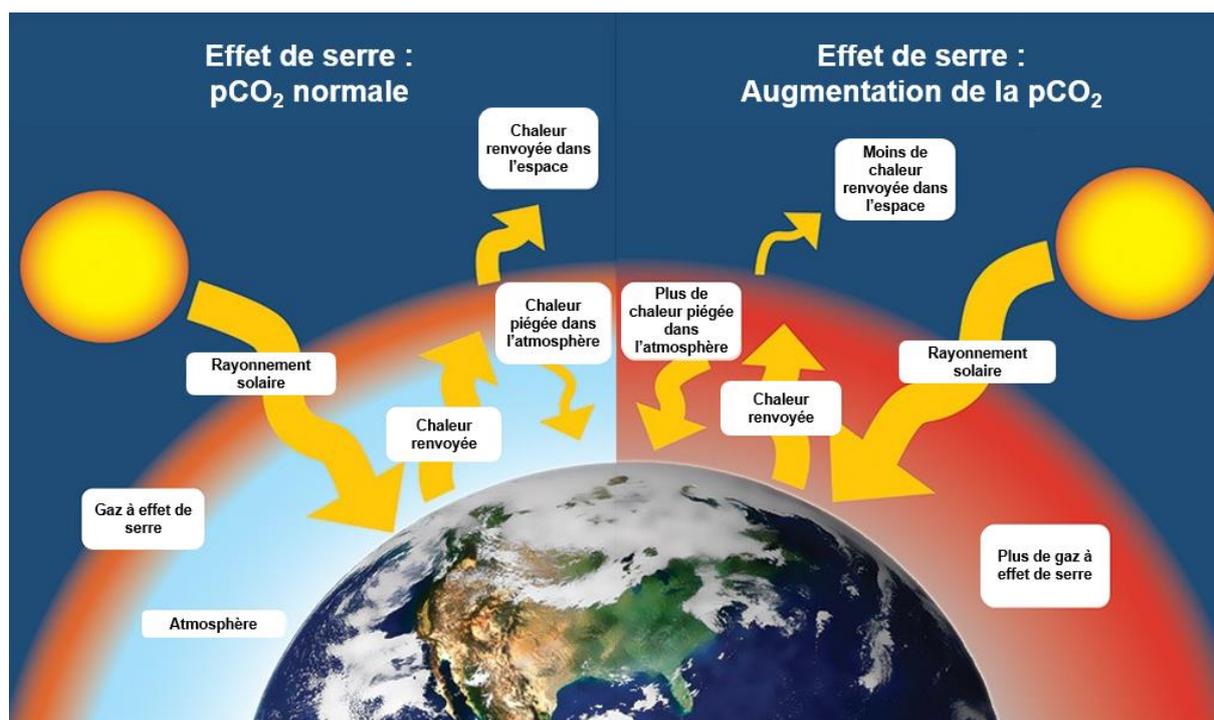
Les récifs coralliens sont aussi convoités pour la découverte de nouvelles molécules qui pourraient être utilisées dans la cosmétique ou la pharmacologie. L'étude des coraux récifaux peut également permettre une meilleure compréhension de certains processus biologiques et physiologiques et être appliquée à la santé humaine. A titre d'exemple, l'association Coral Guardian a soulevé il y a quelques années une piste intéressante sur une possible implication d'une molécule TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) dans le phénomène de blanchissement des coraux. Selon cette étude, la compréhension du rôle du TGF $\beta$  dans la rupture de la symbiose chez le corail en conditions de stress pourrait apporter des perspectives intéressantes quant à l'étude de maladies humaines telles que les cancers où elle est également impliquée. D'autres molécules de la famille TGF $\beta$ , les BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), pourraient aussi ouvrir de nouvelles voies dans la médecine et la chirurgie réparatrice. En effet, une BMP, la *bmp2/4* a été identifiée dans les cellules calcifiantes des coraux et pourrait jouer un rôle dans la formation de leur squelette (Zoccola *et al.*, 2009). Etant donné que les BMPs sont connues chez les vertébrés pour induire la formation de nouveau cartilage et d'os lors d'une greffe, cette découverte chez les coraux pourrait avoir d'importantes implications pour l'utilisation d'implants à partir de squelette de corail.

### 1.1.3. Des écosystèmes menacés

Depuis plusieurs décennies, les récifs coralliens sont victimes de leur succès. Pendant longtemps, ils ont été principalement menacés par les diverses pressions locales liées aux activités de l'Homme (Ateweberhan *et al.*, 2013). La surpêche et certaines techniques de pêche destructrices telles que la pêche à la dynamite ravagent les récifs dans certaines régions depuis des décennies. Le tourisme représente également un problème lorsque les plongées sont trop

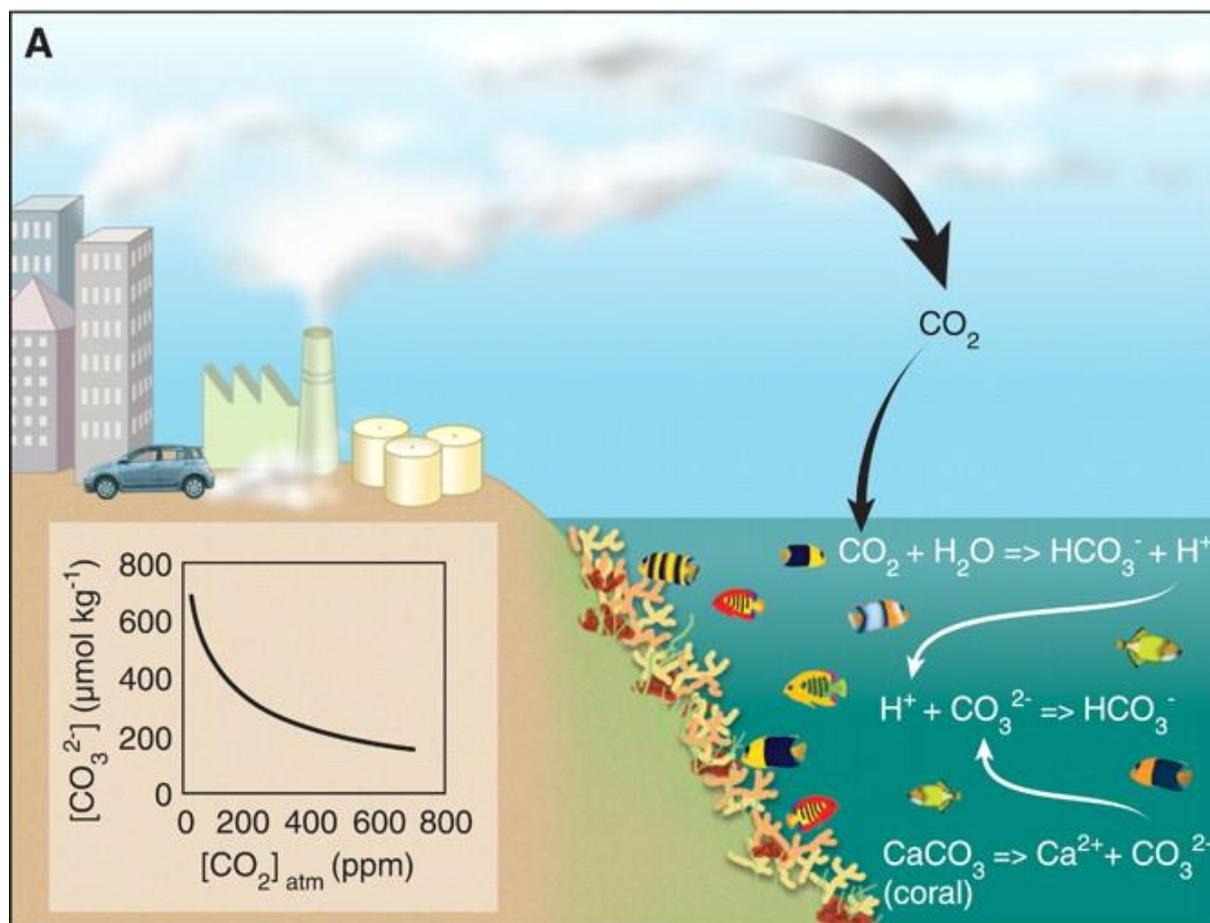
nombreuses. Cette sur-fréquentation provoque des dommages physiques aux colonies et entraîne une augmentation de la sédimentation qui asphyxie les coraux et gêne la photosynthèse de leurs symbiotes. De plus, la démographie croissante sur les littoraux induit une hausse des rejets d'eaux usées et des pollutions telluriques, notamment agricole et industrielle. Enfin, des blooms d'espèces invasives telles que les étoiles de mer *Acanthaster planci* dans certaines zones de l'Océan Pacifique détruisent des zones entières du récif.

Bien que ces pressions locales soient toujours d'actualité, les changements climatiques et l'acidification des océans engendrés par les activités anthropiques constituent à présent les menaces majeures pour les récifs coralliens à l'échelle mondiale. A la suite des Révolutions Industrielles il y a environ 200 ans, les activités anthropiques ont conduit à l'émission de quantités croissantes de gaz à effet de serre (GES) dans l'atmosphère. Depuis les années 1950, ce phénomène s'est encore amplifié avec l'émergence des pays en voie de développement. Ces émissions ajoutent chaque année 8000 millions de tonnes de carbone dans l'atmosphère (Houghton, 2009). Parmi les différents GES, le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) est le principal produit par les activités humaines qui s'accumule dans l'atmosphère (72%) (Houghton, 2009). La concentration de  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère qui était à l'équilibre à 280 ppm au début du 18<sup>ème</sup> siècle, a grimpé aujourd'hui à 400 ppm et continue d'augmenter d'année en année (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014). Plusieurs GES sont déjà naturellement présents dans l'atmosphère tels que le  $\text{CO}_2$ , ainsi que la vapeur d'eau, le méthane ( $\text{CH}_4$ ), le protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ) et l'ozone ( $\text{O}_3$ ). Ceux-ci permettent de maintenir la chaleur issue du rayonnement solaire qui traverse l'atmosphère à la surface de la Terre. Cependant, l'augmentation de la concentration des GES accroît cet effet de serre naturel et engendre un réchauffement global de la surface de la Terre et des océans (Figure 1). Entre 1950 et 2009, la température moyenne des eaux de surface des Océans Indien, Atlantique et Pacifique a déjà augmenté respectivement de 0,65°C, 0,41°C et 0,31°C (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2014). De plus, l'Océan a déjà absorbé 30% des émissions de  $\text{CO}_2$  d'origine anthropique entre 1750 et 2011, dont la moitié lors des 40 dernières années (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014). Le  $\text{CO}_2$  dans l'océan réagit alors avec les molécules d'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et entraîne la formation de protons ( $\text{H}^+$ ) dont la conséquence est une diminution du pH de l'eau de mer et une diminution des carbonates (Figure 2).



**Figure 1.** Représentation schématique de l'effet de serre naturel et suite à une augmentation de l'émission des gaz à effet de serre. pCO<sub>2</sub> désigne la pression partielle du CO<sub>2</sub>. D'après Will Elder (National Park Services).

Ces bouleversements environnementaux rapides génèrent aujourd'hui une véritable inquiétude quant au devenir des récifs coralliens et des écosystèmes qu'ils supportent. Les premiers travaux ayant soulevé le problème datent des années 1980-90 (Roberts, 1987; Cook *et al.*, 1990; Glynn, 1993). Les scientifiques avaient alors observé le blanchissement de colonies de corail à la suite d'épisodes de réchauffement de l'eau de mer. Dans les années suivantes, plusieurs épisodes de réchauffement ont été à l'origine de blanchissements majeurs dans différentes régions du monde. Parmi eux, les épisodes liés aux événements El Niño de 1982–1983, 1997–1998, 2009–2010, et 2015–2016 ont été les plus marquants et ont engendré des mortalités conséquentes sur les récifs (Hughes *et al.*, 2018). Par ailleurs, le réchauffement et l'acidification des océans ont également un impact négatif sur la reproduction sexuée des coraux, ainsi que sur la survie et le recrutement des larves (Paxton *et al.*, 2015; Fabricius *et al.*, 2017). Plusieurs études ont aussi relevé un nombre croissant de maladies sur les colonies coralliennes dont la multiplication serait probablement liée, au moins partiellement, à la hausse des températures (e.g. Bruno *et al.*, 2007; Maynard *et al.*, 2015; Randall et van Woesik, 2015).



**Figure 2. Représentation schématique du phénomène d'acidification des océans.** D'après Hoegh-Guldberg *et al.* (2007).

Divers travaux ont également permis de corrélérer les hausses de température à une diminution du taux de calcification des coraux au sein des récifs (De'ath *et al.*, 2009; Cantin *et al.*, 2010; Carricart-Ganivet *et al.*, 2012). La calcification est un processus majeur pour la bonne santé du récif dans sa globalité puisqu'il est à l'origine de la structure complexe de l'écosystème dont il constitue les fondations. La mécanistique du processus de calcification et l'impact des paramètres environnementaux seront détaillés dans le sous-chapitre suivant (cf 2.).

## 1.2. Le corail constructeur de récif

Le terme « corail » englobe différents groupes taxonomiques possédant chacun leurs propres caractéristiques. Certains vivent dans des eaux tropicales, d'autres dans des eaux tempérées et d'autres encore dans des eaux froides. Tandis que les espèces tropicales vivent généralement près des eaux de surface, les espèces qui s'établissent dans les milieux profonds (jusqu'à plus de 6000 m de profondeur) vivent dans une obscurité totale. Bien que le terme « corail » peut désigner le corail mou tel que les octocoralliaires des familles Alcyoniidae et les Nephtheidae dont les colonies présentent un squelette peu voire non minéralisé, dans le langage courant il désigne plutôt les coraux qualifiés de « durs » qui érigent un exosquelette calcaire. Une multitude de morphologies est associée à ces coraux : branchus, digités, massifs, en plateaux,

foliacés, encroûtants, etc. La majorité des espèces de coraux durs est à l'origine de la construction de récifs, ils sont alors qualifiés de coraux hermatypiques, tels que les genres *Lophelia* et *Desmophyllum* dans les récifs d'eaux profondes, et les genres *Acropora*, *Pocillopora* et *Porites* dans les récifs tropicaux.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à un corail tropical constructeur de récif, *Stylophora pistillata*. Ainsi au cours des paragraphes suivants traitant de la taxonomie, l'anatomie et la symbiose chez les coraux, je donnerai des informations plus spécifiques concernant mon modèle d'étude.

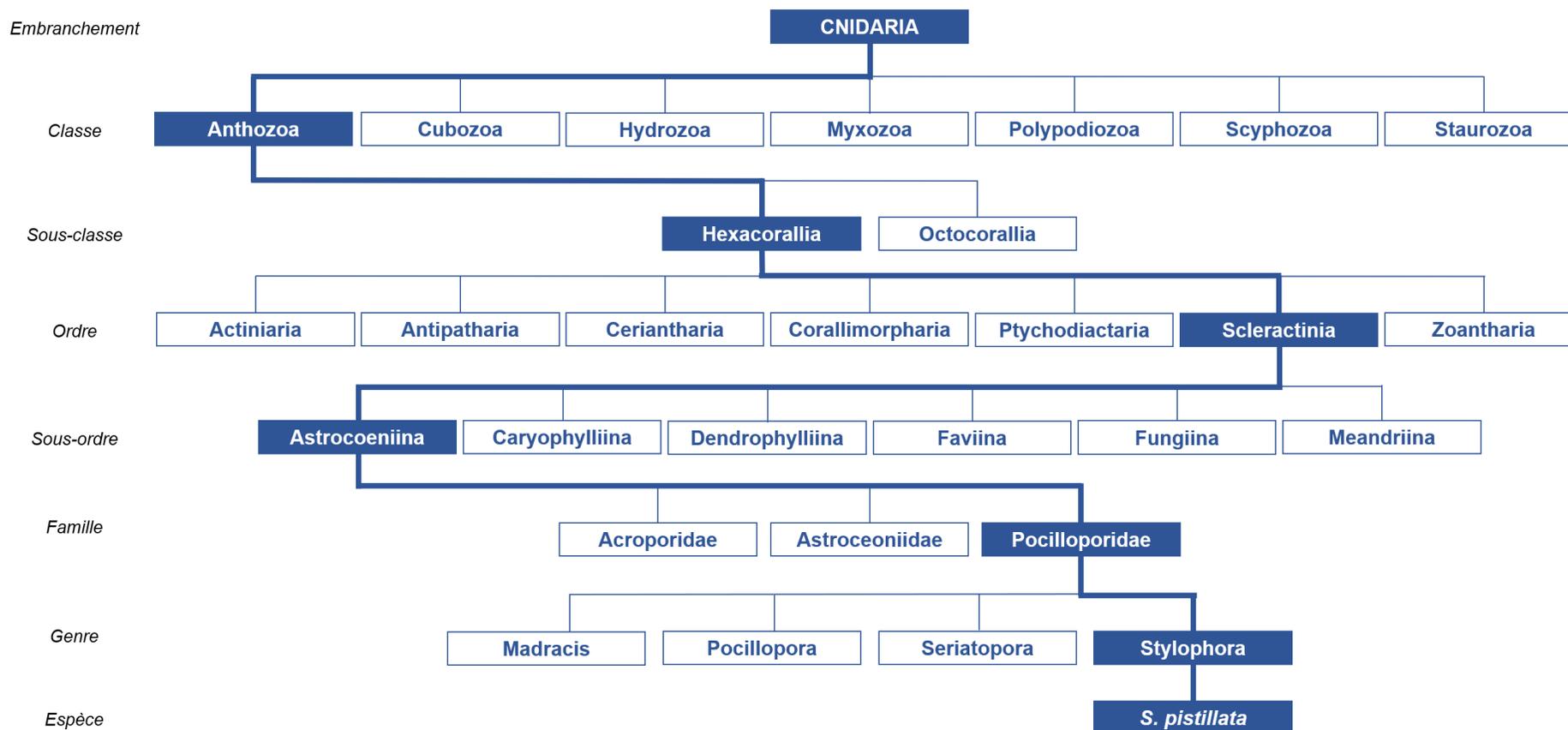
### 1.2.1. Taxonomie

Les coraux, cousins des méduses et des anémones de mer, font partie de l'embranchement des Cnidaires dont le nom provient du grec ancien et signifie « ortie ». Ce nom vient de la particularité des membres de ce groupe qui possèdent des cellules urticantes, les cnidocytes. Les Cnidaires sont des organismes diploblastiques et présentent une symétrie radiale. Deux morphotypes sont retrouvés dans cet embranchement : une forme polype sessile et une forme méduse pélagique.

Au sein des Cnidaires, sont regroupées la super-classe des Médusozoaires, qui inclue plusieurs classes dont chacune comprend une phase méduse au cours du développement des individus, et la classe des Anthozoaires. Les Anthozoaires, dont le nom signifie « animaux-fleurs », ne possèdent qu'une phase polype au cours du développement et regroupent tous les différents types de coraux, ainsi que les anémones de mer.

La classe des Anthozoaires comprend deux sous-classes : les Octocoralliaires et les Hexacoralliaires. Les Octocoralliaires possèdent une symétrie d'ordre 8 et comprennent notamment le corail rouge de Méditerranée *Corallium rubrum*. Les Hexacoralliaires quant à eux présentent une symétrie d'ordre 6 et comprennent sept ordres dont les Scléactiniaires.

Les Scléactiniaires, dont le nom vient du grec « sklêros » qui signifie « dur », rassemblent toutes les espèces de « coraux durs ». C'est à ce groupe de coraux qu'appartiennent les coraux constructeurs de récif dont mon modèle d'étude le corail *Stylophora pistillata*. La position taxonomique de cette espèce, placée au sein de la famille des Pocilloporidae, est présentée en Figure 3.



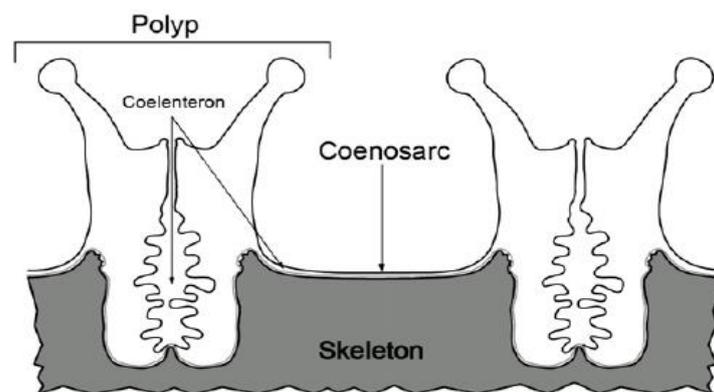
**Figure 3. Position taxonomique de *Stylophora pistillata* au sein de l’embranchement des Cnidaires (phylogénie simplifiée).** D’après le National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>).

### 1.2.2. Cycle de vie et anatomie des coraux Scléactiniaires, exemple de *Stylophora pistillata*

Divers modes de reproduction sexués et asexués existent chez les coraux. Chez les coraux scléactiniaires tels que *S. pistillata* la reproduction sexuée consiste en l'émission de gamètes mâles et femelles en pleine eau. Ces pontes en masse ont lieu une à deux fois par an toujours à la même période, généralement quelques jours après la première pleine lune de l'été, et sont parfaitement synchronisées entre toutes les colonies d'une même espèce. Les gamètes fécondés en pleine eau donnent naissance à une larve pélagique appelée planula. Celle-ci se laisse porter par les courants pendant plusieurs jours jusqu'à atteindre un endroit favorable pour se fixer et se métamorphoser en un polype.

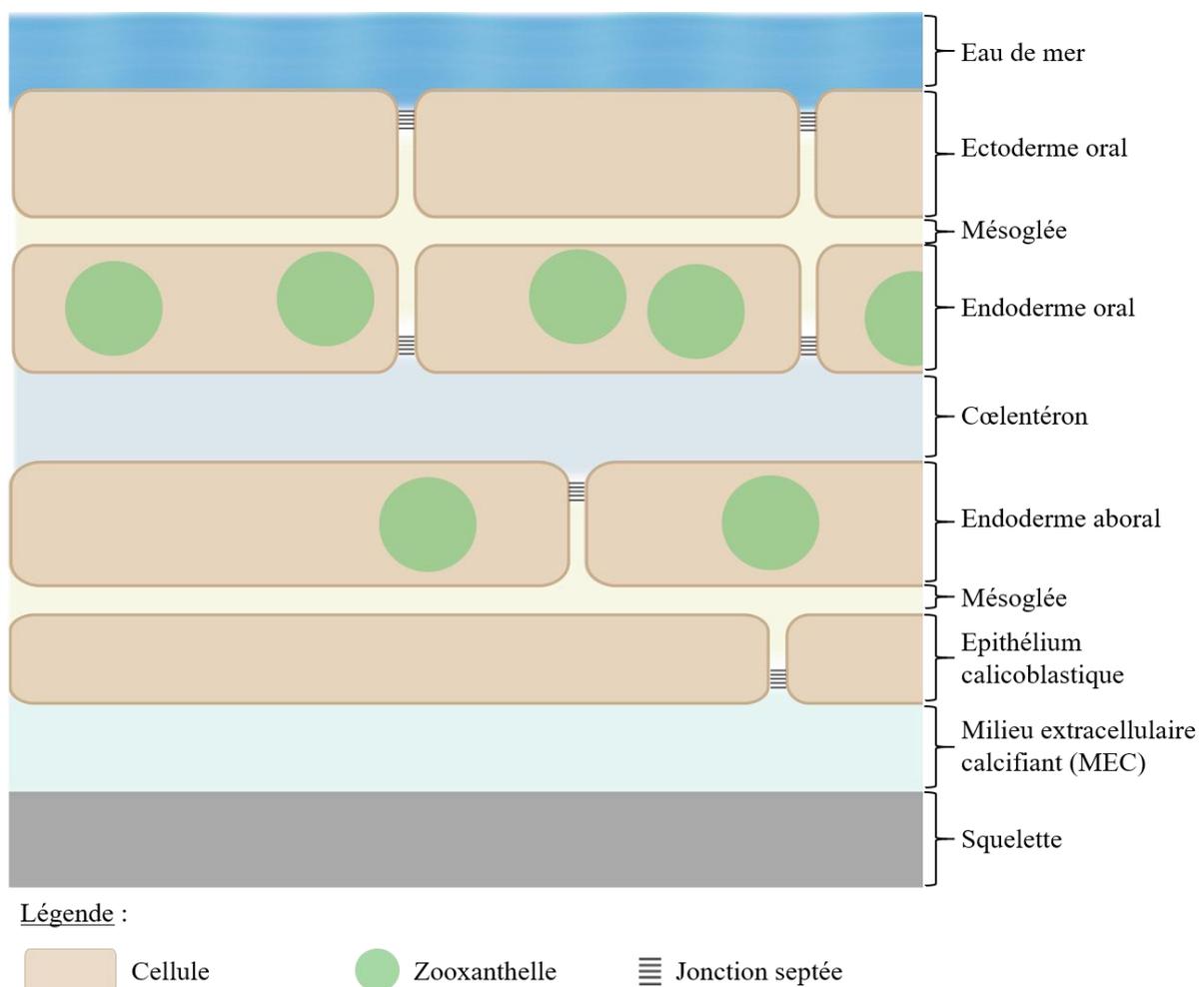
La reproduction asexuée, quant à elle, consiste en la formation d'une nouvelle colonie, dont les individus sont des clones de ceux de la colonie mère. En milieu naturel, elle se produit à la suite de la fragmentation d'une branche qui se sépare de la colonie initiale due à l'action mécanique de prédateurs, d'événements climatiques, tels que des cyclones, ou de l'Homme. Au laboratoire elle peut être réalisée par bouturage en coupant des fragments de branches. Une colonie peut aussi provoquer ce type de reproduction *via* le bourgeonnement d'une excroissance qui finit par se détacher sous l'effet de son poids. Si les conditions sont propices, le fragment ou le bourgeon ainsi dissocié de la colonie mère peut alors se fixer sur un substrat et poursuivre sa croissance pour former une nouvelle colonie.

D'un point de vue anatomique, l'organisation du corps du polype se fait autour d'une cavité gastrique comprenant un pore unique faisant office de bouche et d'anus, autour duquel s'articule une couronne de tentacules. La majorité des coraux sont des espèces coloniales, à l'exception des Fungiidae. Tous les polypes de la colonie sont reliés les uns aux autres par une couche de tissu appelée cœnosarque (Figure 4). Ils partagent également un même squelette externe, fruit d'un travail collectif de l'ensemble des polypes menant à la précipitation de cristaux de carbonate de calcium (selon un processus de calcification qui sera détaillé dans le sous chapitre suivant (2.)). *S. pistillata* est un corail branchu et appartient au clade des coraux dits « robustes ». En comparaison avec le clade des coraux dits « complexes » tels que les Acroporidae, les coraux robustes présentent un squelette plus solide.



**Figure 4.** Représentation schématique de polypes liés par le cœnosarque. D'après Tambutté *et al.* (2011).

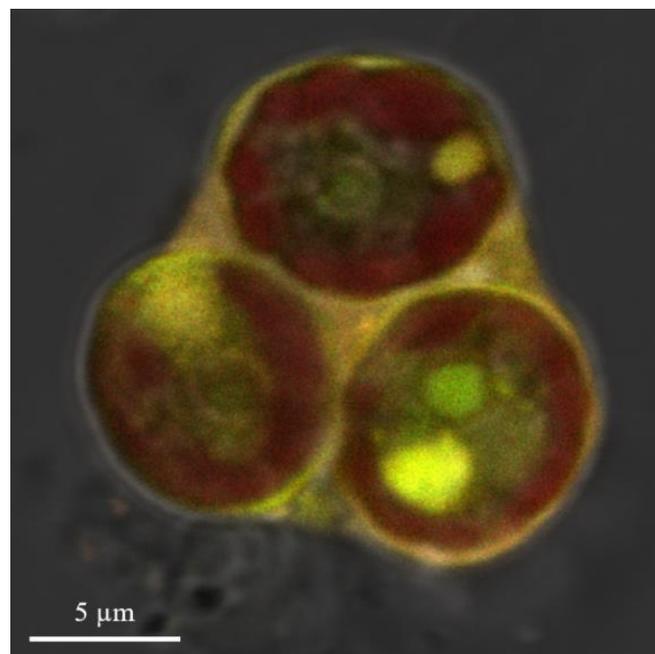
D'un point de vue histologique, le corail est constitué d'un épithélium oral et d'un épithélium aboral séparés par la cavité gastrique, le cœlentéron. L'épithélium oral est composé d'un ectoderme exposé au milieu extérieur et d'un endoderme faisant face au cœlentéron. L'épithélium aboral est également constitué d'un endoderme faisant face au cœlentéron et d'un ectoderme nommé « calicoblastique », face au squelette. L'ectoderme calicoblastique est aussi qualifié de « calcifiant » car il est responsable de la formation du squelette. A l'interface entre l'épithélium calicoblastique et le squelette se trouve le milieu extracellulaire calcifiant (MEC) où sont formés les premiers cristaux du squelette. Bien que la composition exacte du MEC soit toujours soumise à incertitudes, il semblerait qu'il se présente sous la forme d'un hydrogel (Allemand *et al.*, 2011). Nous privilégierons donc l'appellation de « milieu » au détriment de « fluide » extracellulaire calcifiant dans ce manuscrit. Une représentation schématique de l'anatomie de *S. pistillata* est présentée en Figure 5.



**Figure 5. Modèle de l'anatomie de *Stylophora pistillata*.**

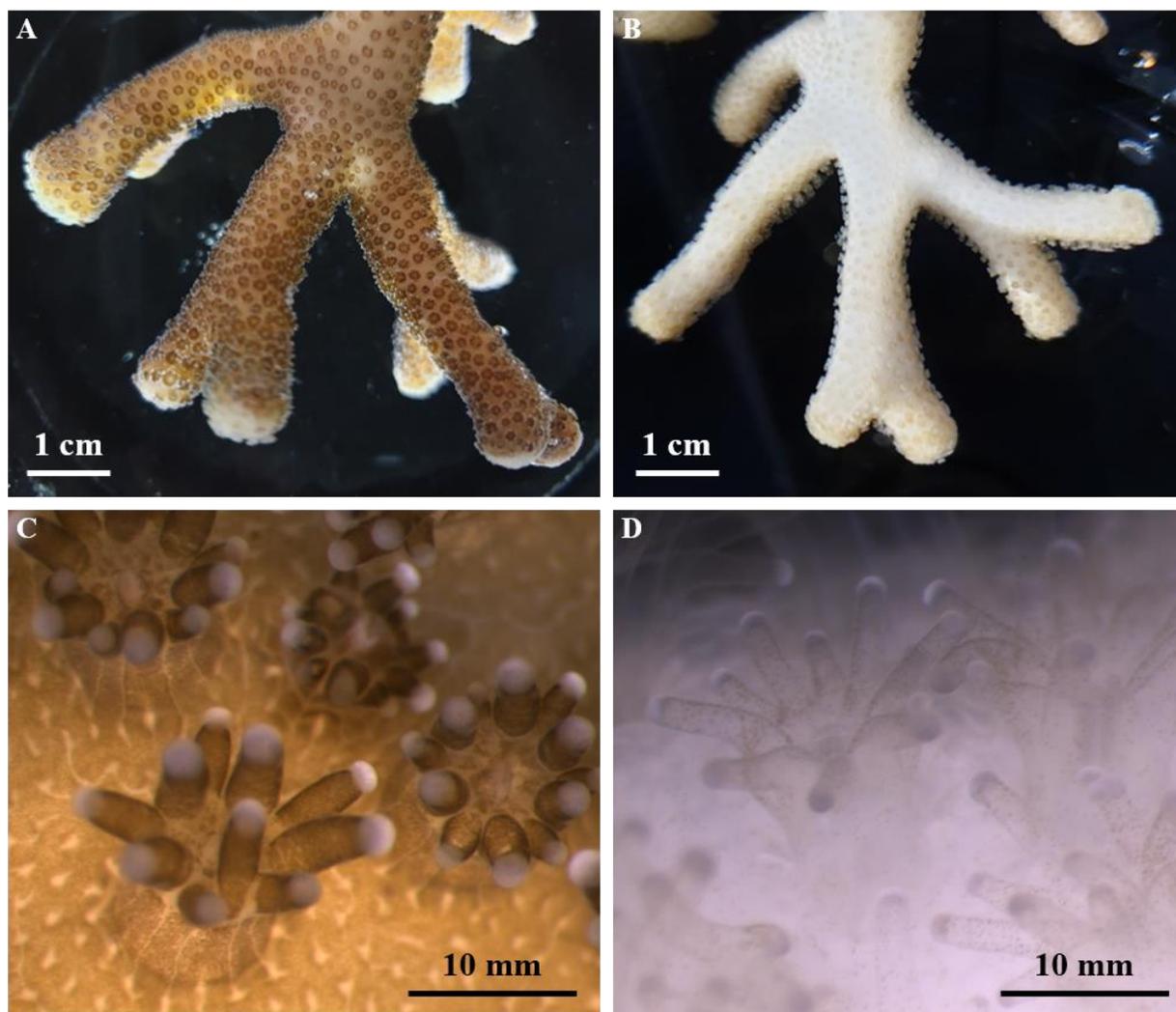
### 1.2.3. Une symbiose mutualiste avec des microalgues

Les coraux tropicaux constructeurs de récifs tels que *S. pistillata* sont tous des coraux symbiotiques. Le terme symbiose provient du grec « sun », ensemble, et « bios », la vie. De Bary l'a défini pour la première fois comme « la vie ensemble d'organismes taxonomiquement différents, qui persiste pour une longue période ». Depuis lors, dans le langage courant, le terme symbiose est souvent utilisé pour désigner le mutualisme. Ce type de symbiose, très répandu dans les règnes biologiques, est équitable puisqu'il bénéficie aux deux partenaires, l'hôte et le symbiote. Dans le cas du corail, les symbiotes sont des microalgues unicellulaires Dinoflagellées de la famille Symbiodiniaceae, communément appelées zooxanthelles, abritées au sein des tissus endodermiques du corail (Figure 6). L'hôte bénéficie des produits issus de la photosynthèse des zooxanthelles. Cette source de nutrition autotrophe est cruciale puisque la photosynthèse représente une source importante de leur apports nutritifs journaliers. Divers auteurs ont évalué que la proportion de produits issus de la photosynthèse transmise par les symbiotes pour répondre aux besoins métaboliques de leur hôte s'élève jusqu'à 90 voire 100% (Muscatine, 1990; Papina *et al.*, 2003; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2016). Chez *Stylophora pistillata*, Ezzat *et al.* (2015) ont estimé que 75% du carbone fixé par les symbiotes est ensuite transféré à l'hôte. Par ailleurs, les déchets cataboliques produits par l'hôte corallien sont recyclés et utilisés par les symbiotes pour leur propre croissance (Muller-Parker *et al.*, 2015). Il est toutefois important de noter que la photosynthèse seule ne suffit pas à maintenir la colonie corallienne dans un état optimal. La capture de proies planctoniques et bactériennes est aussi une source importante d'apports en éléments nutritifs qui favorisent la croissance des tissus et du squelette (Ferrier-Pagès *et al.*, 2003).



**Figure 6. Photographie de trois zooxanthelles dans une cellule endodermique isolée de *S. pistillata*.** Les zones rouges correspondent à la fluorescence de la chlorophylle dans les chloroplastes des zooxanthelles. La cellule, tamponnée à un pH de 7,5, apparaît jaune du fait de la présence de SNARF-1 AM (seminaphthorhodafluor-1 acetoxy-méthyle ester, voir p121). © Coralie Bernardet (CSM)

Lors d'événements de stress environnementaux tels qu'un réchauffement de l'eau de mer, la symbiose peut être rompue notamment en raison d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les symbiotes. Cette rupture de la symbiose conduit à un blanchissement du corail qui peut être dû à une perte des zooxanthelles ou de leurs pigments et conduit, la plupart du temps, à une diminution de l'activité photosynthétique (Figure 7) (Voir Oakley et Davy, 2018). Sans ses microalgues, l'hôte corallien perd une source nutritive majeure et devient vulnérable. L'hétérotrophie lui permet de survivre à court terme mais la ré-acquisition de zooxanthelles dans les semaines qui suivent le blanchissement est capitale pour que la colonie se remette et perdure dans le temps. Les divers épisodes de réchauffement de l'eau aux 20<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> siècles ont entraîné un nombre croissant d'événements de blanchissements sur les récifs du monde entier et suscite aujourd'hui l'inquiétude de la communauté scientifique.



**Figure 7. Photographies de *S. pistillata* en bonne santé et blanchi : A. Colonie, et C. polypes en bonne santé ; B. Colonie, et D. polypes blanchis. © Coralie Bernardet (CSM)**

### 1.3. *Stylophora pistillata*, une espèce d'intérêt

L'étude de l'espèce *Stylophora pistillata* (Figure 8) a débuté dans les laboratoires du CSM il y a une trentaine d'années. Cette espèce est bien caractérisée d'un point de vue anatomique, histologique et surtout de nombreux aspects de sa physiologie sont largement documentés. Il existe près de 8000 publications traitant de *S. pistillata* et son génome a été publié en 2017 (Voolstra *et al.*, 2017). De plus, les techniques de bouturage et de culture de cette espèce sont bien maîtrisées et facilitent son étude.

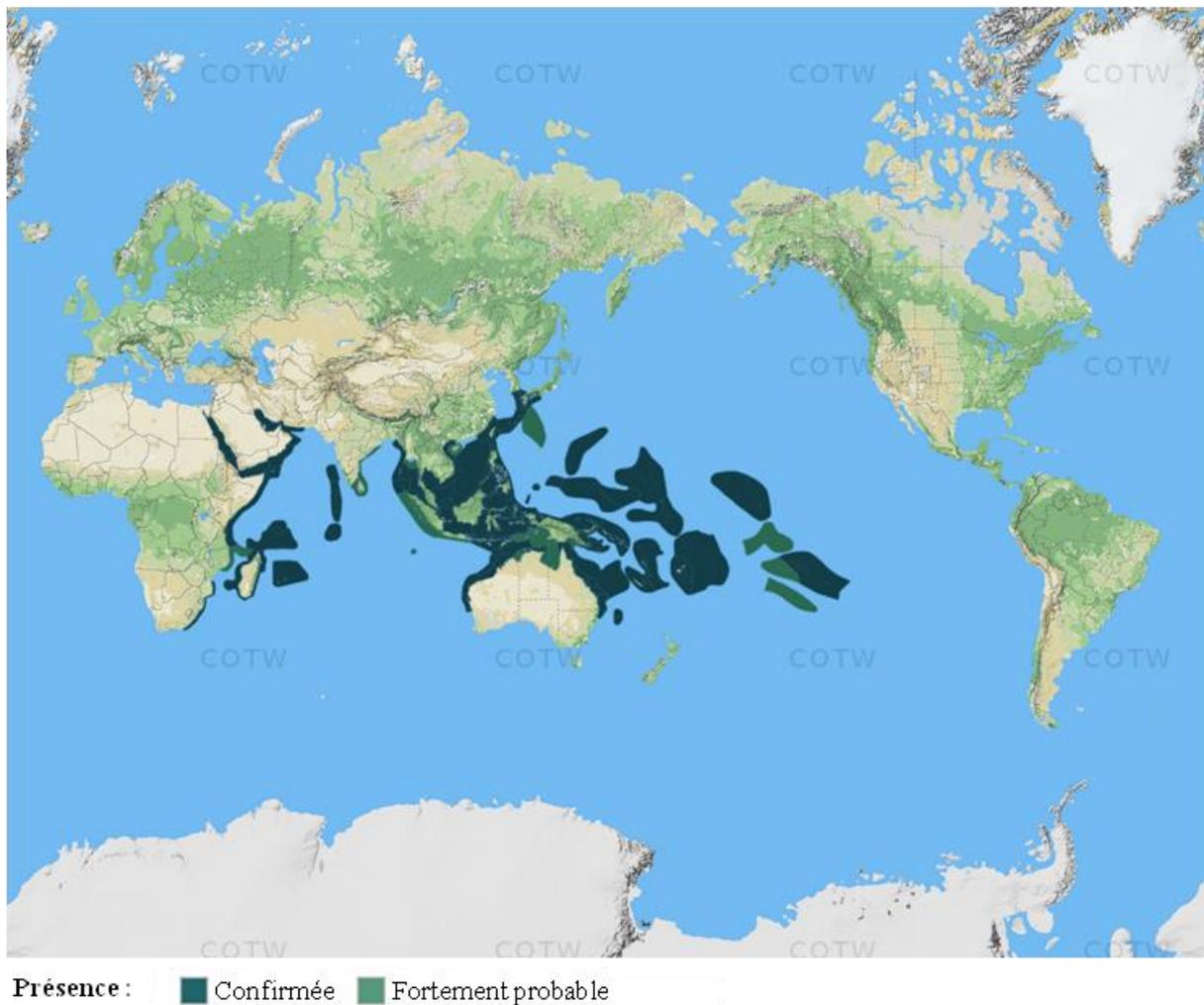


**Figure 8.** Photographie d'une colonie de *Stylophora pistillata*. © Eric Tambutté (CSM)

#### 1.3.1. Origine de *Stylophora pistillata*

La répartition géographique de l'espèce *S. pistillata* est très vaste autour du globe puisqu'elle est distribuée dans de nombreuses régions tropicales, notamment dans l'Indo-Pacifique (Figure 9).

Les colonies de *S. pistillata* utilisées dans le cadre de ma thèse proviennent toutes des aquariums du Centre Scientifique de Monaco (CSM). Celles-ci sont originaires de Mer Rouge et ont été placées dans les aquariums du laboratoire il y a environ 30 ans. Douze des colonies de *S. pistillata* ont été génotypées (identifiées de S1 à S12) et dix d'entre elles sont des clones les unes des autres. Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'utiliser trois colonies mères parmi les huit possédant le même génotype : les colonies S2, S5 et S6.



**Figure 9. Répartition géographique de *S. pistillata*.** D'après Veron *et al.* (2016).

### 1.3.2. *Stylophora pistillata*, une espèce résistante

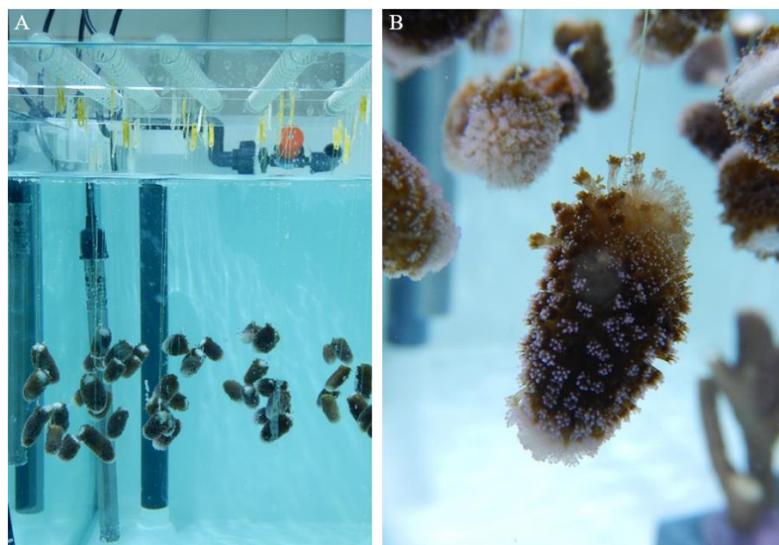
La réponse des coraux récifaux à des stress variés diffère énormément en fonction de l'espèce, de leur morphologie, de leur patrimoine génétique et de leur région géographique. Il est évident par exemple que les coraux massifs ou encroûtants sont bien plus résistants aux cyclones que les coraux branchus, tels *S. pistillata*, dont les branches peuvent aisément se casser sous l'action des vagues. Par ailleurs, les coraux branchus sont généralement plus sensibles aussi au réchauffement de l'eau. L'espèce *S. pistillata* est ainsi parfois utilisée comme espèce sensible à la température dans le cadre d'études comparatives avec des espèces massives, généralement plus résistantes, telles que les genres *Porites* ou *Platygyra* (e.g. Loya *et al.*, 2001; Bhagooli et Hidaka, 2004). Néanmoins, au sein même des coraux branchus, *S. pistillata* est au contraire perçue comme une espèce résistante à la température et au blanchissement (e.g. Loya, 1976; Krueger *et al.*, 2017). En effet, *S. pistillata* présente une tolérance à un réchauffement de l'eau bien supérieure à d'autres espèces tel que le genre *Acropora*, connu à l'inverse pour sa sensibilité à la température (e.g. Loya *et al.*, 2001; Desalvo *et al.*, 2010).

*S. pistillata* est une espèce opportuniste et suit une stratégie de type « r ». En écologie, les stratégies r mobilisent toute leur énergie dans la reproduction pour garantir une progéniture, tandis que les stratégies k économisent leur énergie pour promouvoir une durée de vie plus longue et une reproduction rare mais avec une plus grande survie de la descendance. En tant que stratégie r, *S. pistillata* est ainsi une espèce pionnière qui colonise de nouveaux habitats grâce sa reproduction précoce et massive (Loya, 1976). De cette façon, elle est parvenue à remonter de l’Océan Indien pour coloniser la Mer Rouge malgré une barrière d’eau très chaude dans le Golfe d’Aden, à l’entrée de la Mer Rouge (Fine *et al.*, 2013). Les colonies de *S. pistillata* retrouvées à présent en Mer Rouge sont donc issues de larves sélectionnées grâce à leur résistance et sont donc capables de survivre à des températures élevées, bien supérieures à 30°C (Krueger *et al.*, 2017).

### 1.3.3. Différentes méthodes de culture et de croissance

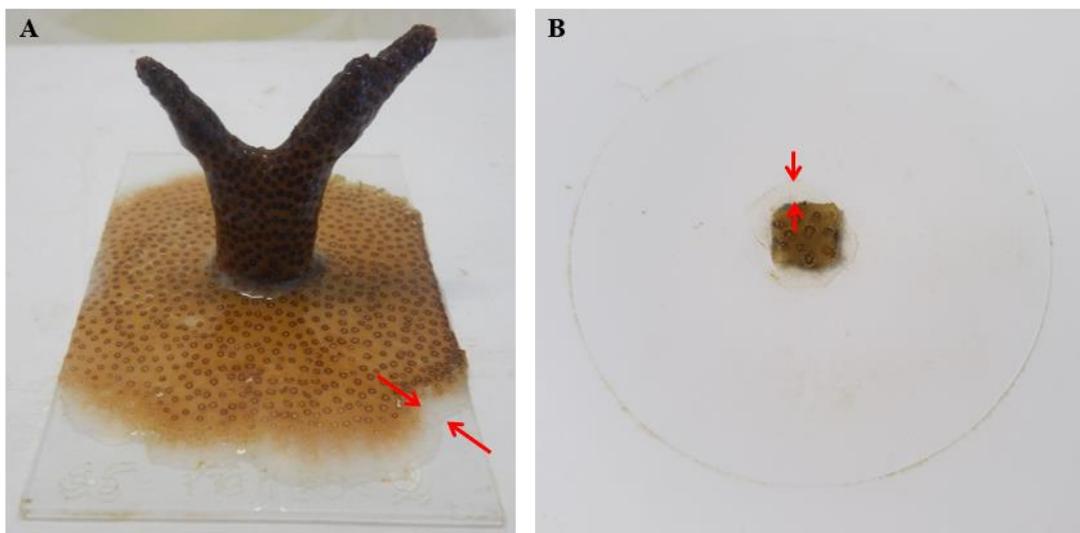
L’étude expérimentale de *S. pistillata* requiert l’utilisation de microcolonies, c’est-à-dire de petits échantillons issus de colonies mères par bouturage. Les microcolonies offrent divers avantages puisqu’elles sont des clones des colonies mères dont elles sont issues et leur taille permet plus aisément la réalisation de mesures physiologiques et la répétabilité des expérimentations (Tambutté, É. *et al.*, 1995). Deux types de microcolonies ont été utilisés dans le cadre de ma thèse : des microcolonies sur fil et des microcolonies à plat.

Le bouturage sur fils consiste à sectionner un fragment de quelques centimètres à l’apex d’une branche de la colonie et à le suspendre à un fil en nylon, tel que décrit par Tambutté *et al.* (1995). Cette technique s’inspire d’une méthode naturelle de reproduction asexuée existante chez les coraux. La capacité de régénération de ces animaux leur permet ainsi de cicatiser et poursuivre leur croissance lorsqu’une branche est arrachée, lors d’un cyclone par exemple. Après trois semaines, l’apex coupé est totalement cicatisé (Figure 10) et présente un taux de calcification stable.



**Figure 10. Bouturage de microcolonies sur fil.** A. Jeunes boutures sur fil placées dans un bac de cicatisation. B. Une microcolonie sur fil après cicatisation. © Coralie Bernardet (CSM)

Une autre technique de bouturage a été utilisée au cours de ma thèse : la croissance de microcolonies à plat. Cette technique a été développée initialement pour analyser la morphologie des desmocytes<sup>1</sup> en microscopie électronique à transmission et à balayage (Muscatine *et al.*, 1997). Les microcolonies à plat sont issues d'un apex préalablement collé sur une lame en verre qui croît latéralement de manière naturelle afin de coloniser la lame (Figure 11A). En poussant latéralement sur la lame en verre, la microcolonie forme ce que l'on appelle un « front de croissance ». Le front de croissance désigne les tissus nouvellement formés qui déposent sur la lame de verre les cristaux nouvellement précipités. Cette zone est reconnaissable car elle est pauvre en zooxanthelles et apparaît donc blanche (Figure 11). Pour les observations en microscopie confocale, des fragments de quelques millimètres carrés sont découpés et collés sur des lamelles en verre (Figure 11B). Les tissus de la microcolonie à plat se présentent de manière fine, lisse et relativement homogène, ce qui permet l'observation des différents épithéliums et du milieu extracellulaire calcifiant. Après trois semaines de cicatrisation, les microcolonies sont totalement cicatrisées et présentent un front de croissance avec de nombreux cristaux isolés de carbonate de calcium, signe de bonne santé. La croissance à plat est également une méthode de croissance naturelle chez les coraux lors des premiers stades de développement de la larve. En effet, lorsque la larve s'est fixée sur un substrat, et se métamorphose en un premier polype puis de nouveaux polypes apparaissent simultanément à la croissance du nouveau squelette ; c'est ainsi que la jeune colonie colonise le substrat. C'est après plusieurs mois que la jeune colonie commence à pousser en hauteur et à former des branches.

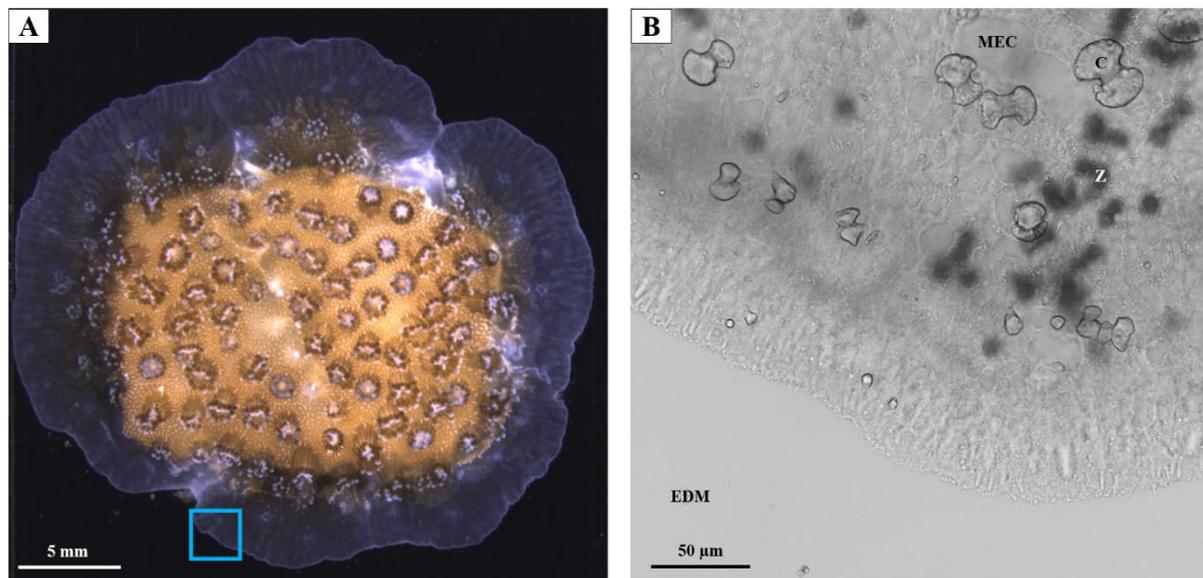


**Figure 11. Microcolonies poussant à plat :** A. sur lame, et B. sur lamelle de verre. Le front de croissance est la zone de l'échantillon situé entre les deux flèches rouges © Coralie Bernardet (CSM)

L'observation du front de croissance des microcolonies à plat en microscopie confocale inversée permet de visualiser les différentes couches de tissus de l'échantillon. Au contact de la lamelle en verre, il est possible d'observer le MEC qui se présente sous la forme de poches d'environ 8  $\mu\text{m}$  de hauteur au maximum (Figure 12). Les cristaux sont déposés et croissent au niveau de ces poches, tout en maintenant un contact avec les cellules calicoblastiques qui les

<sup>1</sup> Cellules permettant l'ancrage de l'épithélium calicoblastique au squelette

entourent. En remontant dans l'épaisseur de l'échantillon, se trouve au-dessus de l'ectoderme calcicoblastique, la mésoglée puis l'endoderme aboral contenant les zooxanthelles, le cœlentéron et enfin le tissu oral (Venn *et al.*, 2011).



**Figure 12.** Morphologie d'une microcolonie de *Stylophora pistillata* ayant poussé à plat. A. Photographie d'une microcolonie observée sous une loupe binoculaire, B. Front de croissance de la microcolonie observée au microscope confocal (Leica SP8). EDM désigne l'eau de mer, MEC une poche de milieu extracellulaire calcifiant, C un cristal de  $\text{CaCO}_3$  et Z les zooxanthelles de l'endoderme aboral. © Coralie Bernardet (CSM)

## 2. La calcification, un enjeu de taille pour les coraux récifaux

### 2.1. Formation d'un exosquelette, structure de la colonie

La croissance des coraux se traduit par la construction d'un exosquelette, structure de la colonie telles les fondations d'un immeuble. Le processus de formation de ce squelette, appelé calcification ou biominéralisation, est crucial pour les coraux puisqu'il va déterminer la robustesse de la colonie au sein du récif face à des événements climatiques tels que les cyclones et le déferlement des vagues. Un taux de calcification rapide permet aussi au corail d'être plus compétitif face aux autres espèces coralliennes et algales et ainsi coloniser plus efficacement l'espace.

L'exosquelette des coraux, tels que *Stylophora pistillata*, est le résultat de la précipitation du carbonate de calcium sous forme d'aragonite. L'observation au microscope de microcolonies poussant à plat révèle que les premiers cristaux sont formés au niveau du MEC, puis grossissent et fusionnent les uns avec les autres pour finalement former l'ensemble du squelette (Venn *et al.*, 2013). Comme décrit dans les paragraphes suivants (2.1.1. et 2.1.2.), la formation de ces cristaux au niveau du MEC implique des ions et une matrice organique constituée de protéines, lipides et sucres.

### 2.1.1. Des ions/molécules essentiels à la calcification

La formation du squelette des coraux implique principalement des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , du carbone inorganique dissous (CID) et des protons ( $\text{H}^+$ ). Le CID se présente sous différentes formes : dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ou bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) dont l'équilibre entre les différentes formes dépend du pH. La réaction de précipitation du carbonate de calcium suit l'équation suivante (1) :



Tandis que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  proviennent du milieu extérieur et sont transportés à travers les quatre couches épithéliales du corail, le CID provient majoritairement de l'ectoderme aboral *via* le  $\text{CO}_2$  émis par les mitochondries lors de la respiration (Furla *et al.*, 2000). Environ 25% du CID provient aussi du milieu environnant, transporté sous la forme de bicarbonate. En fonction de la forme sous laquelle le CID est délivré pour la calcification ( $\text{HCO}_3^-$  ou  $\text{CO}_2$ ), un ou deux protons sont produits lors de leur conversion en carbonate (selon les équations 2 et 3). Ces protons doivent être éliminés du site de calcification afin de maintenir un pH basique et favoriser la réaction de précipitation du carbonate de calcium.



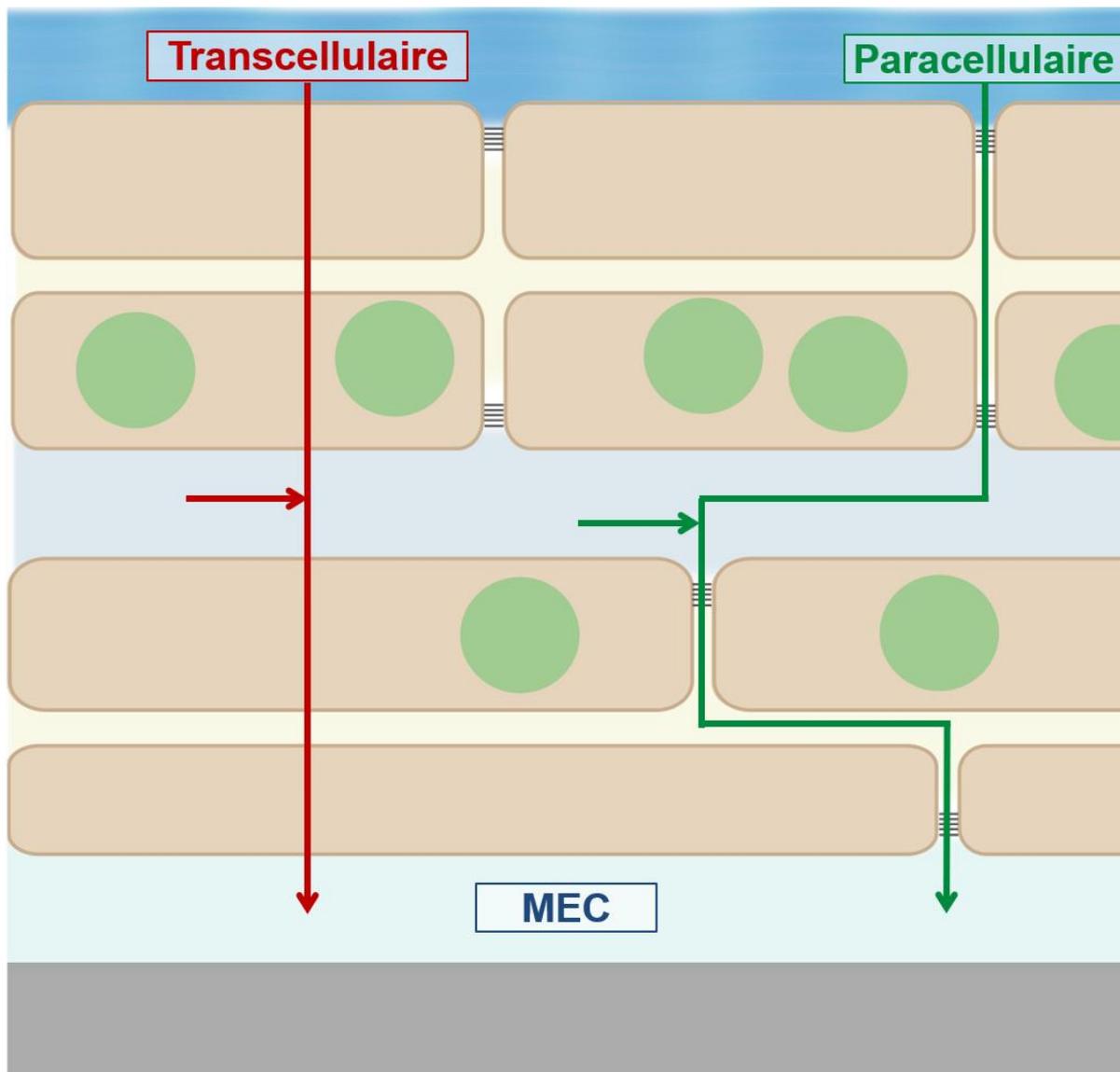
Le transport des ions au niveau d'épithéliums implique deux types de voies : une voie transcellulaire et une voie paracellulaire (Figure 13). Ces deux voies ne sont pas exclusives et peuvent donc être combinées.

Dans le cas du corail, et plus particulièrement de *S. pistillata*, il a été montré que le calcium emprunte une voie transcellulaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  entre dans les cellules à travers un canal calcium, présent notamment dans les cellules calcifiantes calcicoblastiques (Zoccola *et al.*, 1999). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est ensuite transporté hors de la cellule contre son gradient électrochimique grâce à des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. L'une d'entre elle, la PMCA1 (Plasma Membrane Calcium ATPase 1) a été localisée spécifiquement au niveau de l'épithélium calcicoblastique et joue ainsi un rôle dans la calcification (Zoccola *et al.*, 2004). De plus, les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases jouent aussi le rôle d'échangeur de protons ( $\text{H}^+$ ) tout comme d'autres protéines telles que l'échangeur sodium-proton (NHE, famille des SLC9) et la V-ATPase. Ces transporteurs/échangeurs de protons permettent de maintenir un équilibre acido-basique stable dans le MEC et préserver un environnement favorable à la calcification. Le CID quant à lui soit diffuse à travers les membranes lorsqu'il s'agit de  $\text{CO}_2$ , soit est transporté sous forme de bicarbonate grâce à des transporteurs de bicarbonates appartenant aux familles SLC4 et SLC26 (Zoccola *et al.*, 2015). Parmi les différents transporteurs de bicarbonates identifiés chez *S. pistillata*, SLC4 $\gamma$  a été localisé spécifiquement dans les cellules calcicoblastiques (Zoccola *et al.*, 2015). Il est important de noter que SLC4 $\gamma$ , qui résulte d'une duplication de gène, est présent uniquement chez les anthozoaires calcifiants. Cette particularité combinée à sa localisation spécifique dans les cellules

calcifiantes, suggère qu'il joue un rôle majeur dans la calcification. Les autres molécules clé dans le transport du CID sont les anhydrases carboniques (ACs) qui catalysent la réaction d'interconversion entre le  $\text{CO}_2$  et l' $\text{HCO}_3^-$ . Quatre ACs ont été caractérisées chez *S. pistillata* (Moya *et al.*, 2008b; Bertucci *et al.*, 2011; Del Prete *et al.*, 2018) et sont présentes dans toutes les couches de tissus dont certaines sont plus spécifiquement présentes dans les cellules calcifiantes et en tant que molécules organiques dans le squelette (Drake *et al.*, 2013).

En parallèle, une voie paracellulaire permet la diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$  et du CID entre les cellules depuis le milieu extérieur jusque dans le MEC. Longtemps contestée et débattue par une partie de la communauté scientifique, l'existence d'une voie paracellulaire est à présent avérée. Cette voie de passage entre les cellules a pu être visualisée grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes telles que la calcéine pour laquelle les cellules sont totalement imperméables et dont le signal a été perçu entre les cellules jusque dans les poches de MEC et dans le squelette (Tambutté, É. *et al.*, 2012). Cependant, la proportion de la voie paracellulaire dans le transport des ions pour la calcification par rapport à la voie transcellulaire demeure incertaine. Certains auteurs estiment que la voie paracellulaire serait majoritaire et pourrait être à l'origine de 90% des ions apportés au MEC et seulement 10% seraient transportés activement *via* la voie transcellulaire (Gagnon *et al.*, 2012). D'autres en revanche, suggèrent que la voie paracellulaire serait certes importante dans les tissus oraux, mais serait minoritaire au niveau de l'épithélium calicoblastique (Tambutté, É. *et al.*, 2012; Taubner *et al.*, 2019). Pour tenter d'apporter une réponse à ce débat, Hohn et Merico (2015) ont modélisé les différentes hypothèses proposées dans la littérature et ont comparé les résultats obtenus pour chacun de ces modèles aux observations réalisées chez les coraux. Selon les auteurs de cette étude, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et le pH dans le MEC s'expliqueraient majoritairement par la voie transcellulaire mais la voie paracellulaire constituerait également une voie de transport complémentaire indéniable. Bien qu'il soit supposé mineur, le transport par la voie paracellulaire semble donc jouer un rôle dans le transport des ions et molécules pour la calcification. La perméabilité des tissus aux ions et molécules provenant du milieu environnant est régulée par les jonctions présentes entre les cellules. Chez les cnidaires, ces jonctions intercellulaires sont des jonctions septées dont les caractéristiques s'apparentent aux jonctions serrées des vertébrés (Tambutté, É. *et al.*, 2007; Ganot *et al.*, 2015).

En dehors des voies trans- et paracellulaire, il a été montré chez l'oursin que la voie vésiculaire peut fournir des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^-$  sous la forme de carbonate de calcium amorphe pour la calcification (Vidavsky *et al.*, 2014). Les vésicules seraient ensuite transportées vers la membrane plasmique de la cellule et leur contenu serait exocytosé au niveau du MEC où elles délivreraient les particules de  $\text{CaCO}_3$  amorphe. Ces particules seraient utilisées par la suite comme précurseurs pour la formation des cristaux. Récemment, ce mécanisme a été observé chez le corail *S. pistillata* également (Mass *et al.*, 2017).



**Figure 13.** Représentation schématique des voies de transport des ions chez *S. pistillata*. La voie transcellulaire est représentée en rouge et la voie paracellulaire en vert.

### 2.1.2. Le rôle de la matrice organique

La calcification est un processus de biominéralisation où le squelette formé par les organismes calcifiants tels que les coraux comprend, en plus de la fraction minérale de  $\text{CaCO}_3$ , une fraction organique, issue de l'activité biologique. Cette fraction organique est composée de protéines, majoritairement composées d'acides aminés acides tel que l'acide aspartique, ainsi que de glycoprotéines, de polysaccharides et de lipides (voir Tambutté, S. *et al.*, 2007, 2011; Allemand *et al.*, 2011 pour revues). La présence d'eau également suggère que la matrice organique se présente sous la forme d'un hydrogel (Dauphin *et al.*, 2008). Il a été montré que les zooxanthelles jouent un rôle dans la production de matrice organique *via* le transfert des produits issus de la photosynthèse (Muscatine et Cernichiari, 1969) ou en stimulant la synthèse de précurseurs de matrice par les cellules calicoblastiques (Johnston, 1980). Par ailleurs, la nutrition hétérotrophe de l'hôte corallien est également essentielle pour apporter de l'énergie

ainsi que de l'acide aspartique, normalement absent des tissus du corail (Allemand *et al.*, 1998) mais dont l'abondance est majeure au sein de sa matrice organique (Houlbrèque *et al.*, 2004). De plus, cette source hétérotrophique permettrait également de stimuler indirectement la photosynthèse et ainsi l'apport d'acides aminés d'origine autotrophique pour la production de la matrice organique (Houlbrèque *et al.*, 2004). Une étude de Puverel *et al.* (2005) a permis de démontrer que la synthèse de matrice organique a lieu uniquement dans les cellules calicoblastiques, où elle a été localisée spécifiquement en immunochimie.

Bien que le rôle de la matrice organique soit toujours soumis à incertitudes, elle jouerait deux rôles principaux. Dans un premier temps, la matrice organique permettrait de catalyser la précipitation d'un nucléus de  $\text{CaCO}_3$ , notamment grâce à l'action de protéines appelées CARP (*coral acide-rich protein*) (Allemand *et al.*, 2011; Mass *et al.*, 2013). Par la suite, la matrice organique pourrait servir de patron pour donner la structure des cristaux (Clode et Marshall, 2003) et leur positionnement le long des fibres organiques de manière à établir la morphologie globale du squelette (Von Euw *et al.*, 2017). De plus, certains constituants acides présents dans la matrice organique des coraux pourraient également jouer un rôle d'inhibiteur de la calcification tel que montré chez les vertébrés (Tambutté, S. *et al.*, 2007).

## 2.2. Influence des paramètres environnementaux sur la calcification

Différents paramètres environnementaux sont connus pour influencer le processus de calcification chez les coraux tropicaux constructeurs de récifs. Parmi eux, la lumière est un facteur important. La stimulation de la calcification à la lumière est un phénomène largement décrit dans la littérature et défini sous le nom de « *Light-enhanced calcification* » (LEC) (voir Gattuso *et al.*, 1999 pour revue). Bien que ce phénomène ne soit pas encore totalement décortiqué, de nombreuses hypothèses ont été formulées pour l'expliquer. Il a été avancé que l'utilisation de  $\text{CO}_2$  pour la photosynthèse à la lumière augmente l'état de saturation des carbonates (voir Chapitre 3) et le pH dans le coelentéron, ce qui favoriserait le transport du bicarbonate vers le MEC et induirait une hausse de l'état de saturation des carbonates et du pH dans le MEC (Goreau, 1959). Les conditions seraient ainsi plus favorables à la précipitation du  $\text{CaCO}_3$ . Une autre hypothèse suggère que la photosynthèse pourrait aussi favoriser la calcification en neutralisant les  $\text{H}^+$  issus de la précipitation du  $\text{CaCO}_3$  grâce la production de  $\text{OH}^-$ , le pH serait ainsi maintenu à un niveau favorable pour la calcification (Furla *et al.*, 1998; Furla *et al.*, 2000). De plus, les symbiontes fourniraient de l'oxygène et du carbone *via* la photosynthèse qui pourrait promouvoir la respiration de l'hôte corallien (Holcomb *et al.*, 2014). En retour, la respiration, dont le taux est plus élevé à la lumière qu'à l'obscurité, permettrait la production d'ATP utilisé pour les processus coûteux en énergie tels que la synthèse de matrice organique et les mécanismes de transports liés à la calcification (Chalker et Taylor, 1975; Al-Horani *et al.*, 2003). Par ailleurs, les produits issus de la photosynthèse des symbiontes pourraient être transférés dans l'épithélium calicoblastique où ils seraient utilisés comme substrats spécifiques lors de la production de matrice organique (Pearse et Muscatine, 1971; Moya *et al.*, 2006). Ainsi la quantité et la qualité de matrice organique utilisées pour la calcification diffèreraient entre le jour et la nuit (Moya *et al.*, 2006).

Le pH de l'eau de mer est également un paramètre important pour les coraux, comme pour l'ensemble des organismes marins précipitant un squelette en carbonate de calcium. Une étude de Tambutté *et al.* (2015) a montré qu'une diminution du pH de 8,1 à 7,4 ou 7,2 induit des altérations au niveau de la structure du squelette. En effet, une acidification de l'eau de mer engendre la formation d'un squelette plus poreux, et donc potentiellement plus fragile. Dans le milieu naturel, cela pourrait impliquer une sensibilité accrue des colonies coralliennes face aux cyclones et à l'effet des vagues.

Par ailleurs, la température est connue pour influencer de nombreux processus aussi bien biologiques que physico-chimiques. Par exemple, il a été démontré qu'une hausse de la température favorise la précipitation purement physico-chimique de l'aragonite pour un état de saturation des carbonates donné (Burton et Walter, 1987). De plus, la température est liée aux variations saisonnières qui induisent généralement une augmentation de la calcification lors des mois d'été, plus chauds, comparé à l'hiver (Vaughan, 1943; Shinn, 1966; Glynn et Stewart, 1973; De'ath *et al.*, 2009). Indirectement, les changements de températures saisonniers permettent également de contrôler la disponibilité en nutriments et en plancton et donc l'apport de ressources nutritives pour les coraux. Dans leur étude, Courtney *et al.* (2017) ont ainsi déterminé que la température est le premier facteur stimulant la calcification à l'échelle de la colonie et du récif.

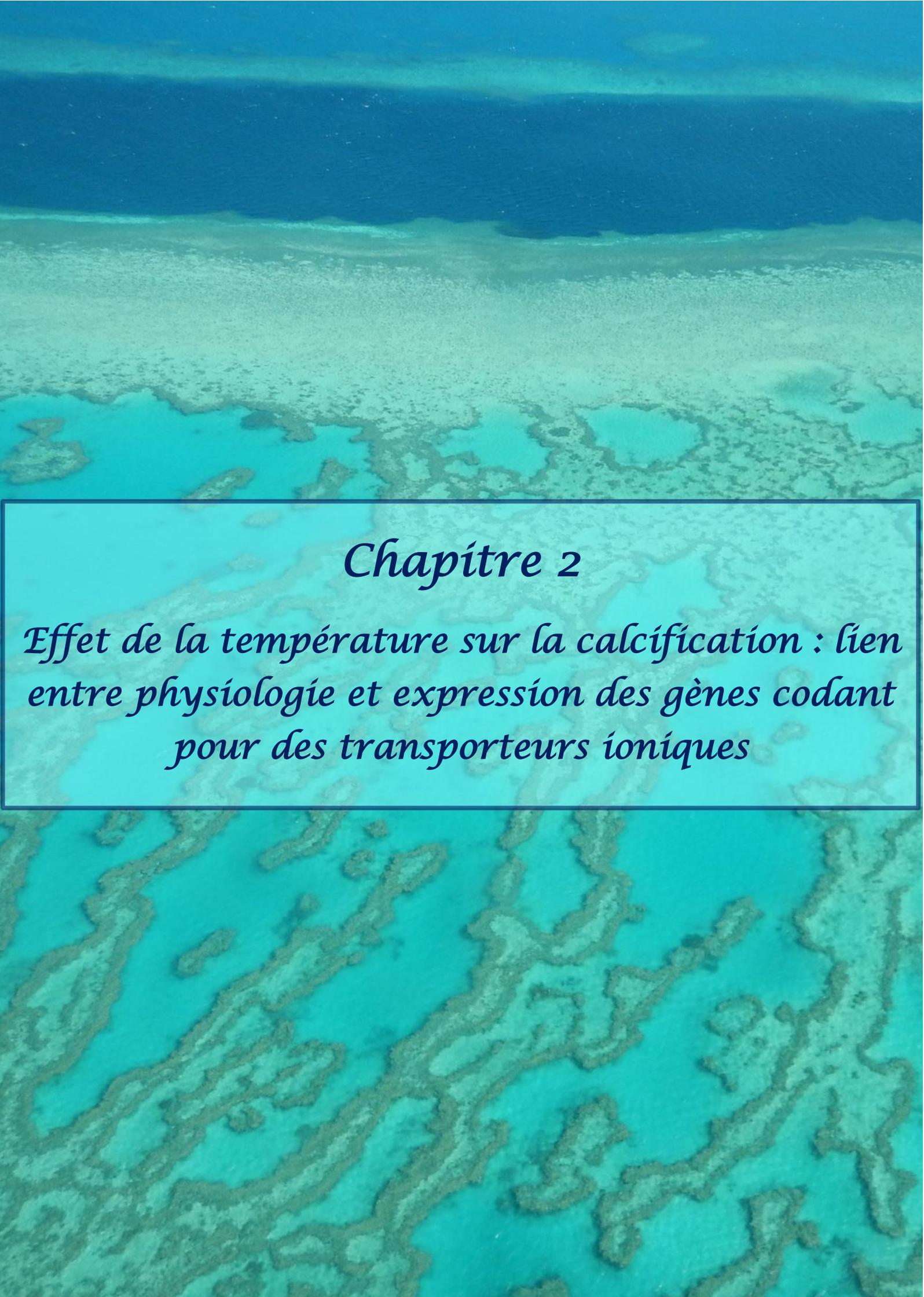
Il est aussi largement reconnu que des changements de température peuvent représenter un stress pour les coraux puisque des événements de réchauffement de l'eau de mer provoquent des épisodes de blanchissement des colonies coralliennes. De très nombreuses études ont ainsi analysé l'impact de changements de température sur la rupture de symbiose entre l'hôte corallien et ses zooxanthelles (e.g. Gates *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2005; Oakley et Davy, 2018). Plusieurs études ont aussi alerté sur l'impact négatif de modifications de la température sur la calcification des colonies au sein des récifs (De'ath *et al.*, 2009; Cantin *et al.*, 2010; Carricart-Ganivet *et al.*, 2012). Pourtant, peu de travaux à ce jour ont examiné l'effet de la température sur les processus menant à la formation du squelette des coraux.

### 3. Problématique de l'étude

Les différents scénarios proposés par le GIEC prédisent tous que l'augmentation de la température sur la surface de la Terre et dans les océans, déjà amorcée, va se poursuivre dans les prochaines années (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014). Selon leur dernier rapport (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014), la température globale pourrait augmenter en moyenne de 1°C, selon le scénario le plus optimiste (*Representative Concentration Pathway 2.6*, RCP2.6), à 3,7°C, si aucune nouvelle action n'est mise en place pour réduire l'impact des activités anthropiques sur le climat (RCP8.5), d'ici 2100. Aujourd'hui, aussi bien scientifiques que politiques se questionnent sur l'avenir de la biodiversité sur Terre. Parmi les préoccupations, les récifs coralliens soulèvent beaucoup d'inquiétude étant donné leur importance écologique et économique. La communauté scientifique tente ainsi de prédire leur devenir et de trouver des solutions pour prévenir leur

disparition. Cependant, pour trouver des solutions efficaces pour la restauration et la sauvegarde des récifs coralliens, il est d'abord primordial de comprendre et connaître précisément la physiologie des coraux et comment les paramètres environnementaux les affectent. Les observations répétées au fil des années de blanchissement des coraux suite aux importants épisodes de réchauffement de l'eau ont mené à de très nombreuses études pour caractériser le processus de rupture de la symbiose dans ces conditions de stress. Quelques travaux ont aussi analysé l'impact de la température sur la calcification. Toutefois, aucune étude à ce jour n'a permis de déceler les mécanismes à l'origine du déclin de la calcification lors de stress thermiques.

Comme décrit plus haut, la calcification est un processus complexe qui implique différents paramètres. Parmi eux, le transport des ions représente un élément crucial auquel nous avons choisi de nous intéresser dans le cadre de ma thèse. Mon travail de thèse a ainsi consisté à déterminer quel est l'impact de variations de la température sur le transport des ions pour la calcification chez les coraux tropicaux, en prenant pour modèle l'espèce *Stylophora pistillata*. Afin de répondre à cette question, j'ai combiné diverses approches de physiologie et de biologie moléculaire de manière à considérer divers aspects du problème de l'échelle de l'animal jusqu'au gène. Le résultat de mes recherches est présenté dans ce manuscrit à travers trois chapitres. Dans le chapitre 2, j'ai caractérisé la fenêtre de performance thermique de *S. pistillata* selon trois paramètres physiologiques : la calcification, la photosynthèse et la respiration ainsi que l'effet de la température sur l'expression des gènes impliqués dans le transport des ions pour la calcification. Ces travaux ont donné lieu à un article publié dans Scientific Reports. Les chapitres 3 et 4 présentent des travaux complémentaires réalisés sur des microcolonies à plat afin de décortiquer les mécanismes physiologiques pouvant expliquer le déclin de la calcification lors de stress thermiques. Dans le chapitre 3 j'ai mesuré le pH dans le MEC et dans les cellules calicoblastiques dans l'objectif de déterminer si des changements de température affectent l'aptitude de *S. pistillata* à réguler son pH. Enfin, au sein du chapitre 4, j'ai analysé l'implication de la voie paracellulaire dans la réponse de *S. pistillata* en condition de stress thermique à travers des mesures de la perméabilité des tissus à une sonde fluorescente, la calcéine. Les travaux issus des chapitres 3 et 4 donneront lieu à deux articles, actuellement en préparation.



## *Chapitre 2*

*Effet de la température sur la calcification : lien entre physiologie et expression des gènes codant pour des transporteurs ioniques*



## CHAPITRE 2

### Effet de la température sur la calcification : lien entre physiologie et expression des gènes codant pour des transporteurs ioniques

#### 1. État des connaissances actuelles

##### 1.1. Impact de la température sur la croissance des coraux

L'existence de tout être vivant est conditionnée par divers facteurs écologiques qui limitent son succès dans la colonisation d'un milieu. Ce phénomène a été défini par Shelford (1931) sous le nom de « loi de tolérance ». Les limites minimales et maximales qu'un organisme peut tolérer pour un paramètre donné déterminent un « intervalle de tolérance » dans lequel il peut vivre. Cet intervalle de tolérance est caractérisé par un optimum en-deçà et au-delà duquel la performance de l'individu est altérée. Chez les animaux ectothermes la température du milieu environnant est un paramètre particulièrement important puisque leurs capacités limitées de thermorégulation impliquent que leur température corporelle dépend directement du milieu extérieur. La caractérisation de courbes de performance thermique (CPT) est un moyen d'observer comment des changements de température peuvent affecter les capacités d'un individu à réaliser les processus physiologiques et comportementaux nécessaires à sa survie et sa croissance (Huey et Stevenson, 1979). Chez les ectothermes, les CPT se traduisent par une augmentation graduelle des performances avec la température puis une chute brutale après avoir atteint la température optimale (Figure 14). Les températures critiques marquent les extrémités de la gamme de tolérance au niveau desquelles la survie de l'animal est menacée.

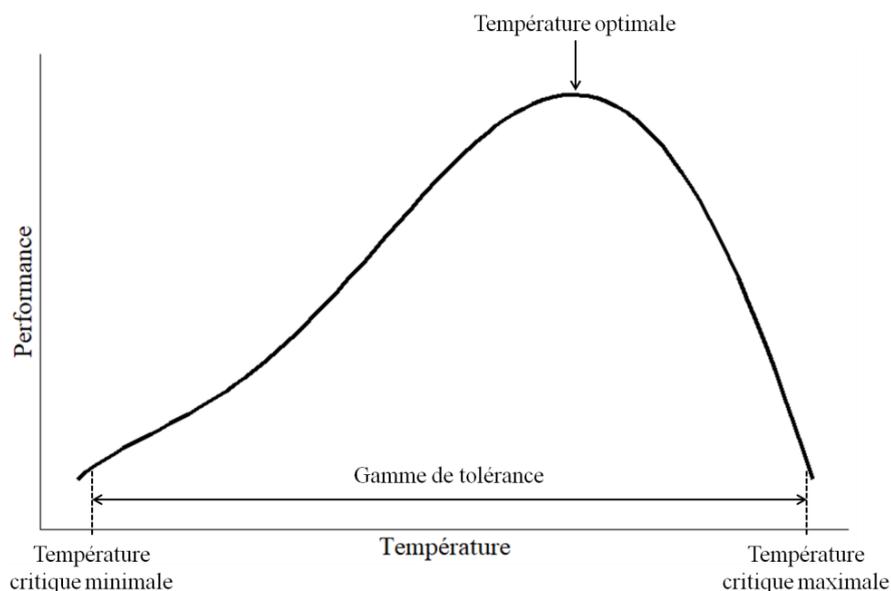


Figure 14. Courbe de performance thermique théorique pour un animal ectotherme.

Au sein du règne animal, les coraux tropicaux constructeurs de récifs sont particulièrement exigeants. Leur subsistance et leur croissance dépend de nombreux facteurs écologiques tels que la température, la salinité, le pH, l'intensité lumineuse et la qualité du spectre lumineux, la turbidité, la sédimentation, les nutriments et l'état de saturation des carbonates (Crabbe, 2008). Ces exigences restreignent ainsi leur aire de répartition aux eaux chaudes (supérieures à 20°C), claires, oligotrophes et peu profondes situées entre les deux tropiques. Parmi les nombreux paramètres requis par les coraux, la température est particulièrement déterminante pour leur état de santé et leur survie. Le blanchissement des coraux est le premier signe apparent d'un déclin de l'état de santé des coraux lors de stress thermiques (cf Chapitre 1). Dans cette situation, la diminution, voire la perte d'activité photosynthétique réduit l'apport nutritif du corail et donc ses réserves énergétiques. Par conséquent, les processus coûteux en énergie tels que la calcification sont ralentis (Fang *et al.*, 1989; Galli et Solidoro, 2018).

La fenêtre de performance thermique varie à la fois en fonction des espèces et des régions géographiques étudiées. Les diverses études menées sur le terrain s'accordent toutefois pour montrer que le taux de calcification des coraux est généralement plus élevé lors des mois d'été où l'eau est naturellement plus chaude, soit pour des températures comprises entre 25 et 30°C (Vaughan, 1943; Shinn, 1966; Glynn et Stewart, 1973; De'ath *et al.*, 2009). Il est avéré que dans la plupart des cas, les coraux tropicaux constructeurs de récifs vivent aujourd'hui dans des régions où les températures maximales atteintes en été sont déjà à la limite de leur tolérance thermique (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007). Les épisodes répétés de réchauffement de l'eau depuis une trentaine d'années amènent donc les coraux à subir de manière récurrente des températures au-delà de leur température optimale et engendrent une diminution conséquente du taux de calcification au sein des récifs (De'ath *et al.*, 2009; Cantin *et al.*, 2010; Carricart-Ganivet *et al.*, 2012). Plusieurs études en laboratoire et sur le terrain ont permis de caractériser la fenêtre de performance thermique au regard de la calcification pour diverses espèces de coraux tropicaux constructeurs de récifs et sont résumées dans le tableau ci-après.

**Tableau 1.** Résumé des différentes études caractérisant des courbes de performance thermique au regard de la calcification pour des espèces de coraux tropicaux constructeurs de récifs.

Article	Espèce	Région	Température optimale	Températures létales	Étude de terrain ou de laboratoire
Shinn (1966)	<i>Acropora cervicornis</i>	Caraïbes	28-30°C	< 13°C	Terrain
Cox (1971)	<i>Montipora verrucosa</i>	Hawaïi	30°C	-	Laboratoire
Glynn et Stewart (1973)	<i>Pocillopora damicornis</i>	Golfe de Panama	29°C	-	Terrain
Clausen et Roth (1975)	<i>Pocillopora damicornis</i>	Hawaïi	27 et 31°C	-	Laboratoire
Jokiel et Coles (1977)	<i>Montipora verrucosa</i>	Hawaïi	26°C	< 18°C > 32°C	Laboratoire
	<i>Pocillopora damicornis</i>				
	<i>Fungia scutaria</i>				
Abramovitch-Gottlib <i>et al.</i> (2002)	<i>Stylophora pistillata</i>	Mer Rouge	22°C	-	Laboratoire
Marshall et Clode (2004)	<i>Galaxea fascicularis</i>	Grande Barrière de Corail (Australie)	25°C	-	Terrain
Cantin <i>et al.</i> (2010)	<i>Diploastrea heliopora</i>	Mer Rouge	Maximum 30,25°C	-	Terrain
Castillo <i>et al.</i> (2014)	<i>Siderastrea siderea</i>	Caraïbes	28°C	-	Laboratoire

## 1.2. Réponse transcriptomique des coraux à un choc thermique et à la lumière

En présence d'un stress, tout être vivant met en place divers processus afin d'y faire face et survivre. Cela implique de réduire les paramètres coûteux en énergie tels que la croissance ou la reproduction, et réaliser des modifications aux niveaux cellulaire et moléculaire pour mieux lutter. L'analyse de l'expression des gènes d'un individu en condition de stress donne un premier aperçu des mécanismes engagés par celui-ci pour répondre à ce stress.

De nombreuses études menées sur diverses espèces de coraux ont ainsi comparé l'expression des gènes de colonies exposées à une température élevée par rapport à des conditions contrôles (e.g. Desalvo *et al.*, 2008, 2010; Barshis *et al.*, 2013; Maor-Landaw *et al.*, 2014). Comme observé pour de nombreux autres organismes, ces études ont révélé que la réponse transcriptomique des coraux exposés à un stress thermique implique principalement des modifications d'expression des gènes codant pour : des protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins, HSPs), des enzymes antioxydantes, des molécules d'adhésion cellulaire, des régulateurs d'apoptose et des protéines impliquées dans le transport des ions, notamment du  $Ca^{2+}$ . Les variations d'expression de ces molécules et protéines témoignent à la fois de dommages au niveau cellulaire, et des mécanismes mis en place par l'animal pour lutter contre ce stress. Parmi ces différents éléments, les HSPs sont connues pour être surexprimées en

présence de stress environnementaux et physiologiques divers et seraient produites lors d'un stress non létal pour protéger l'organisme en prévention d'un éventuel stress supplémentaire dont le cumul avec le précédent pourrait devenir létal. Par ailleurs, la surexpression d'enzymes antioxydantes chez les coraux exposés à des changements de température est également signe de la lutte de l'individu contre un stress oxydatif induit par le stress thermique. En effet, lors d'un stress thermique, aussi bien les symbiotes que l'hôte corallien produisent un excès d'espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species » ou ROS) du fait de dommages causés respectivement au photosystème des zooxanthelles et au niveau des mitochondries de l'hôte (Weis, 2008). Lorsque le niveau de ROS est trop élevé, il devient dangereux pour l'organisme qui produit alors plus d'enzymes antioxydantes pour les neutraliser (Sharma *et al.*, 2012). De plus, Vidal-Dupiol *et al.* (2014) ont aussi relevé la sous-régulation d'un panel de gènes impliqués dans l'immunité innée ainsi que dans l'apoptose lors d'une augmentation de la température qui engendrerait alors une sensibilité accrue aux infections bactériennes.

En plus de la réponse au stress oxydatif et cellulaire, plusieurs études ont indiqué des modifications d'expression de gènes impliqués dans les transports ioniques (Desalvo *et al.*, 2008, 2010; Meyer *et al.*, 2011; Kenkel *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2016). Dans leur étude, Kenkel *et al.* (2013) ont notamment identifié une anhydrase carbonique (AC) et un transporteur de bicarbonate de la famille des « SLC26 » dont les expressions sont sous-régulées lors du blanchissement de coraux exposés à un stress thermique. De même, Meyer *et al.* (2011) ont décelé un groupe de gènes impliqués dans le transport des ions, incluant un canal calcium (*Cacnals*) et deux ACs (CA 2 et 3), dont les expressions sont modifiées lors d'une augmentation de la température à long terme. Bien qu'aucune de ces études n'ait comparé ces observations à des mesures de la calcification, elles soulignent l'importance des transporteurs ioniques dans la réponse des coraux à un stress thermique et suggèrent que des modifications de leur expression pourraient être liées à des perturbations du processus de calcification lors de changements de température. Louis *et al.* (2017) ont d'ailleurs proposé d'utiliser le canal calcium *Cacnals* et le transporteur de bicarbonate *SLC26* comme biomarqueurs du stress thermique chez les coraux. Cependant, tandis que la réponse des coraux au stress oxydatif et cellulaire suite à un stress thermique est très documentée, les liens entre les mécanismes de transports ioniques et la sensibilité thermique des coraux au regard de la calcification n'ont encore jamais été caractérisés.

Par ailleurs, quelques études ont analysé les variations transcriptomiques des coraux entre la nuit et le jour. Ces études ont montré que très peu de gènes (1 à 2% chez *Acropora cervicornis* et *A. hyacinthus* respectivement) interviennent dans la réponse des coraux aux modifications environnementales au cours du cycle journalier (Hemond et Vollmer, 2015; Ruiz-Jones et Palumbi, 2015). Parmi les gènes différentiellement exprimés entre le jour et la nuit se trouvent essentiellement des gènes impliqués dans la régulation du rythme circadien, la photoréception, dans la gestion du stress et l'immunité, dans la production d'ATP, ainsi que le transport et le métabolisme de l'azote, des lipides et des carbohydrates (Hemond et Vollmer, 2015; Ruiz-Jones et Palumbi, 2015). De plus, plusieurs gènes impliqués dans les transports ioniques associés à la calcification ont montré une surexpression le jour par rapport à la nuit, dont l'anhydrase carbonique CA2 chez *A. cervicornis* (Hemond et Vollmer, 2015) et 11 anhydrases carboniques

chez *A. hyacinthus* (Ruiz-Jones et Palumbi, 2015). Ces résultats suggèrent que le transport du CID pour la calcification pourrait être différent entre la nuit et le jour. En revanche, le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  ne serait pas sensible à la condition lumineuse puisqu'il a été montré que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase et le canal calcium maintiendraient un niveau d'expression stable quel que soit le moment de la journée (midi ou minuit) (Moya *et al.*, 2008a; Ruiz-Jones et Palumbi, 2015).

## **2. Résultats personnels : Réponse de *Stylophora pistillata* à un changement de température, de l'animal au gène**

### **2.1. Contexte de l'étude**

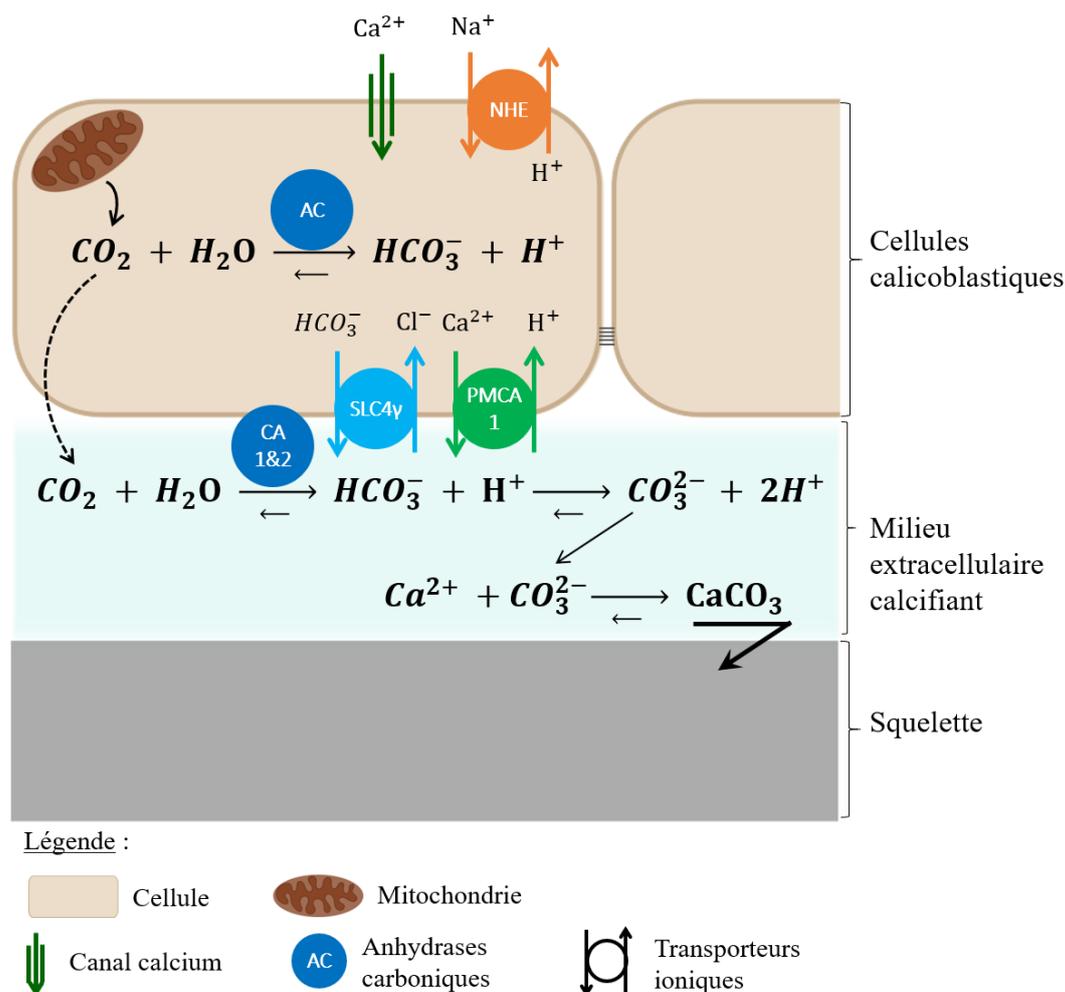
Bien que l'influence de la température sur la calcification des coraux soit avérée, il manque d'informations pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la réponse à un stress thermique. La majorité des études de transcriptomique précédemment citées concernent le blanchissement des colonies et les différences d'expression des gènes potentiellement associés à ce phénomène (e.g. Desalvo *et al.*, 2008, 2010; Maor-Landaw *et al.*, 2014). En revanche, peu d'études ont analysé les mécanismes moléculaires à l'origine du déclin de la calcification lors de changements de température. De plus, l'approche utilisée dans ces études de transcriptomique globale n'a permis d'obtenir qu'une idée générale de l'ensemble des processus biologiques engagés. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser une approche ciblée sur un panel de gènes dont nous connaissons l'importance pour le transport des ions nécessaires à la calcification, la photosynthèse et la respiration. Le but est ainsi d'intégrer les réponses transcriptomiques aux réponses physiologiques de *S. pistillata* soumis à un stress thermique. Par ailleurs, seules quelques études ont analysé l'impact de la lumière sur l'expression des gènes impliqués dans le transport des ions pour la calcification (Moya *et al.*, 2008a; Moya *et al.*, 2008b; Bertucci *et al.*, 2015) et aucune n'a combiné l'impact de la lumière et de la température. C'est pourquoi, nous avons choisi d'ajouter le paramètre nuit/jour à notre étude.

Notre analyse de l'impact de la température sur la calcification chez *S. pistillata* a regroupé des approches multiples allant de l'organisme jusqu'au gène. Dans un premier temps, j'ai caractérisé la fenêtre de performance thermique de *S. pistillata* afin d'observer comment la température affecte la calcification, ainsi que deux autres processus physiologiques clés pouvant être liés à la calcification : la respiration et la photosynthèse. Pour cela, j'ai mesuré les taux de calcification, de photosynthèse et de respiration de colonies exposées à une gamme de dix températures comprises entre 17°C et 33°C, incluant 25°C comme température contrôle. Des mesures de la concentration de zooxanthelles ont également permis de déterminer le niveau de blanchissement des colonies à différentes températures. Dans un second temps, j'ai déterminé si l'expression des gènes de transport ioniques peut expliquer le déclin de la calcification lors d'un stress thermique. J'ai donc analysé l'expression d'un panel de gènes impliqués dans le transport des ions par une approche ciblée de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel. J'ai axé mon étude sur 17 gènes présentés dans le Tableau 2, choisis

pour leur rôle avéré dans le transport et la régulation de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  et de carbone inorganique dissous (CID) pour la calcification, la respiration et la photosynthèse. Les transporteurs identifiés au niveau de l'épithélium calicoblastique et du MEC sont représentés sur un schéma en Figure 15. Cette partie de l'étude a été conduite uniquement à trois températures : 17°C, 25°C et 32°C. Les températures expérimentales (17°C et 32°C) ont été choisies car elles entraînent une réduction significative de l'ensemble des paramètres physiologiques mesurés précédemment et présentent donc un intérêt particulier pour cette étude. En revanche, la température 33°C a été exclue car les colonies présentaient un sévère blanchissement.

**Tableau 2.** Liste des gènes de transport des ions de *S. pistillata* analysés dans cette étude, avec les séquences des amorces et la taille des produits de PCR en temps réel. Des informations supplémentaires peuvent être obtenues dans la base de données des Cnidaires : [www.data.centrescientifique.mc](http://www.data.centrescientifique.mc) (Maor-Landaw *et al.*, 2014). D'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).

Gène d'intérêt	Localisation	Référence	Amorce de PCR en temps réel		Taille des produits
Ca <sup>2+</sup> channel	Epithélium calicoblastique + ectoderme oral	Zoccola <i>et al.</i> (1999)	F	TGCTACAAGATCGCCACCAACAC	82 pb
			R	TCAGCCGCCAGCAGAATACTACTC	
NHE	Inconnue	Capasso <i>et al.</i> (in prep)	F	TCATTCTCCTTGGCTGTTTTACTG	138 pb
			R	CATGAAGAATCCGCACAAGAGGTT	
PMCA1	Forte expression dans le tissu aboral	Zoccola <i>et al.</i> (2004)	F	CCAAAACCTCCAAAACCTTCCT	131 pb
			R	GACCCCTCGCAATCCTCTGG	
PMCA2	Ubiquiste	Wang <i>et al.</i> (in prep)	F	GTACTGGCAAGAGCAACACC	125 pb
			R	AAGACTGGCCCATCATTAGC	
PMCA3	Ubiquiste en petits points		F	TCACTGGAGATCCGCGTTTTTACA	140 pb
			R	ACCGGTTTGCTTTGGGAGACATT	
SpisCA1	Epithélium calicoblastique	Moya <i>et al.</i> (2008b)	F	GGAGGGACCCGACACGTGGAA	110 pb
			R	AGTCGGCAAGTCCCGGTTTCG	
SpisCA2	Tissus oral et aboral	Bertucci <i>et al.</i> (2011)	F	TGCGGCCGAGTGACTGGAGA	91 pb
			R	CGCCACTGAGTTTAGCGCCTCC	
SpisCA3	Ubiquiste	Del Prete <i>et al.</i> (2018)	F	TGGCTCTGGTGGCCCAAATGGT	136 pb
			R	TGCTGGGCACGGTGACAGAGGT	
SpisCA4	Inconnue		F	GGTGCCGCTTGTTTTCAGCGCA	87 pb
			R	TCCGGTTGCGCATGTCCCTGT	
SpisSLC4β	Plus forte expression dans le tissu oral		F	CCAATGTTGCGTTCCGGTAGTCTTT	143 pb
			R	GCCCTGTAGCGCCAATAATAATCA	
SpisSLC4γ	Epithélium calicoblastique		F	CTTGGAGGGCTGTTTCTTGAT	152 pb
			R	TATTTTCCGCTCCCTACCCTGTTC	
SpisSLC4δ	Expression ubiquiste		F	TCTTGCTGGTGAATTGGTGGAGT	150 pb
			R	TAAACGGAATGGCATGTAGTCAAG	
SpisSLC4ε	Inconnue	Zoccola <i>et al.</i> (2015)	F	GGCTGCCTACCCACCAAACCA	113 pb
			R	GGGGCAAATCCAAATCCACATAG	
SpisSLC26α	Plus forte expression dans le tissu oral		F	GCGAAATTTCTGCCATCTA	133 pb
			R	TCGCCACGGTTATCCCTCCTGCTA	
SpisSLC26β	Ubiquiste		F	CATCGCGGCACTTGTCTGTAG	159 pb
			R	GTCCATAACGCGGTGCCTTCTGTC	
SpisSLC26γ	Plus forte expression dans le tissu oral		F	GATTGCCGCGTCATTTCACTG	131 pb
			R	ATCCCTGCATTTCCCCTGTAA	
V-ATPase	Inconnue	Capasso <i>et al.</i> (in prep)	F	GAGGAGTTTGATTTGGGGAAGTA	97 pb
			R	AGTCGCAAATAAGAGGCTGTGTT	



**Figure 15. Représentation schématique de la distribution des transporteurs ioniques au niveau de l'épithélium calcicoblastique et du milieu extracellulaire calcifiant chez *S. pistillata*.**

## 2.2. Impact de la température sur la calcification : réponse physiologique à l'échelle de l'animal

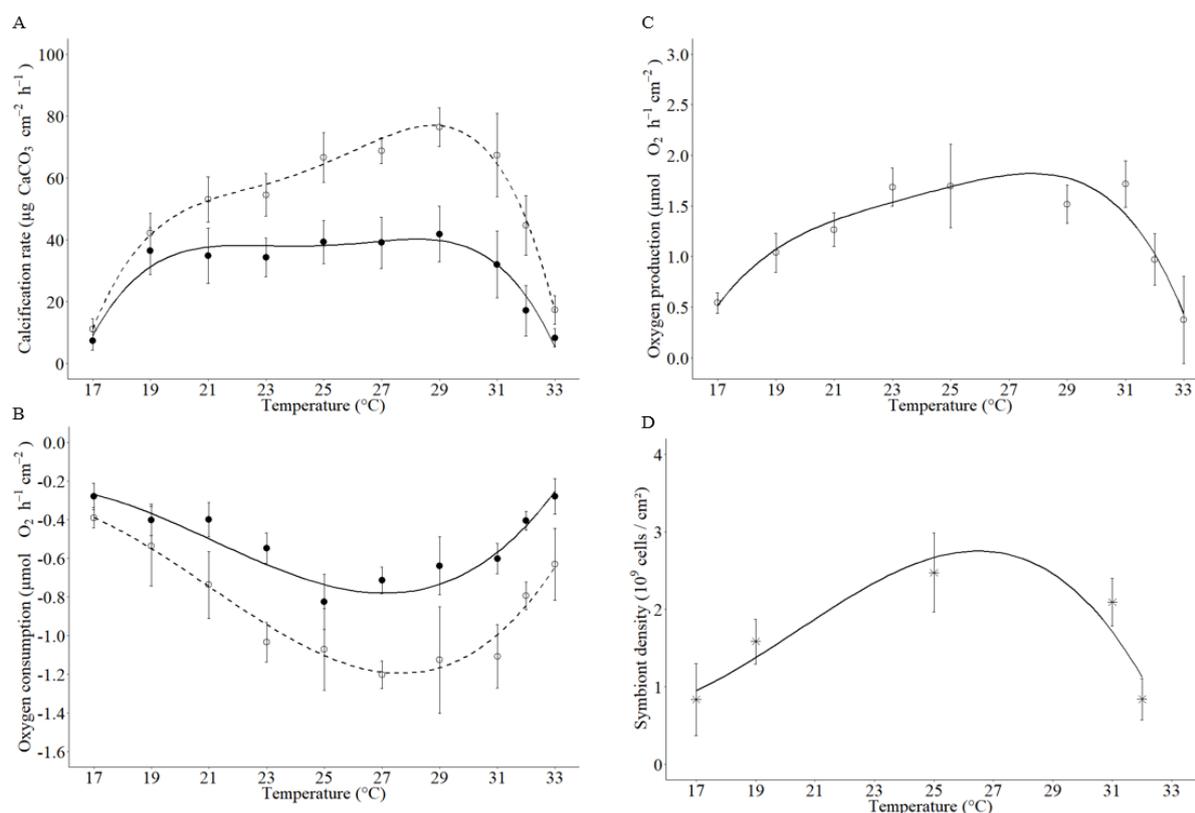
### 2.2.1. Caractérisation des courbes de performance thermique de *S. pistillata*

L'ensemble des paramètres physiologiques mesurés chez *S. pistillata* se présente sous la forme de typiques courbes de performance thermique avec une augmentation graduelle de la performance jusqu'à la température optimale et une chute rapide au-delà (Figure 16). Aux extrémités de la fenêtre thermique, 17°C et 33°C constituent les températures critiques au-delà desquelles la survie des microcolonies est menacée. Un test effectué à 35°C a engendré la mort des coraux en moins de 24h.

Le taux de calcification de nuit est constant sauf aux températures extrêmes (17°C, 32°C et 33°C, Figure 16 A). En revanche, le taux de calcification de jour est à son optimum à 29°C et diminue fortement en-deçà et au-delà de cette température. Cette observation est cohérente avec

la littérature puisque la majorité des études précédentes a déterminé que les températures optimales pour la calcification se situent entre 25°C et 30°C selon les espèces de coraux (Tableau 1). Abramovitch-Gottlib *et al.* (2002) ont cependant trouvé une température optimale plus basse pour la calcification de *S. pistillata* (22°C). L'écart entre cette valeur et la nôtre pourrait être dû aux différences de design expérimental. Par exemple, les colonies utilisées par les auteurs de cette étude ont été prélevées sur le terrain en hiver lorsque l'eau était à 22°C et ont subi une augmentation graduelle de la température jusqu'à atteindre une température de 31°C. De plus, les mesures du taux de calcification ont été conduites sur les mêmes échantillons au fur et à mesure de l'augmentation de température tandis que dans l'étude présentée ici, nous avons utilisé des colonies cultivées en aquarium à 25°C depuis 30 ans et qui ont été acclimatées une semaine à chacune des températures expérimentales avant les mesures.

Par ailleurs, les taux de respiration et de photosynthèse (Figure 16 B et C) suivent des courbes de performance thermique similaires à celle de la calcification mais atteignent des valeurs maximales pour une gamme de températures plus large, comprise entre 23°C et 31°C. De plus, la densité de zooxanthelles (Figure 16 D) est la plus élevée à 25°C et diminue jusqu'à atteindre des niveaux similaires à chacune des extrémités de la fenêtre thermique.



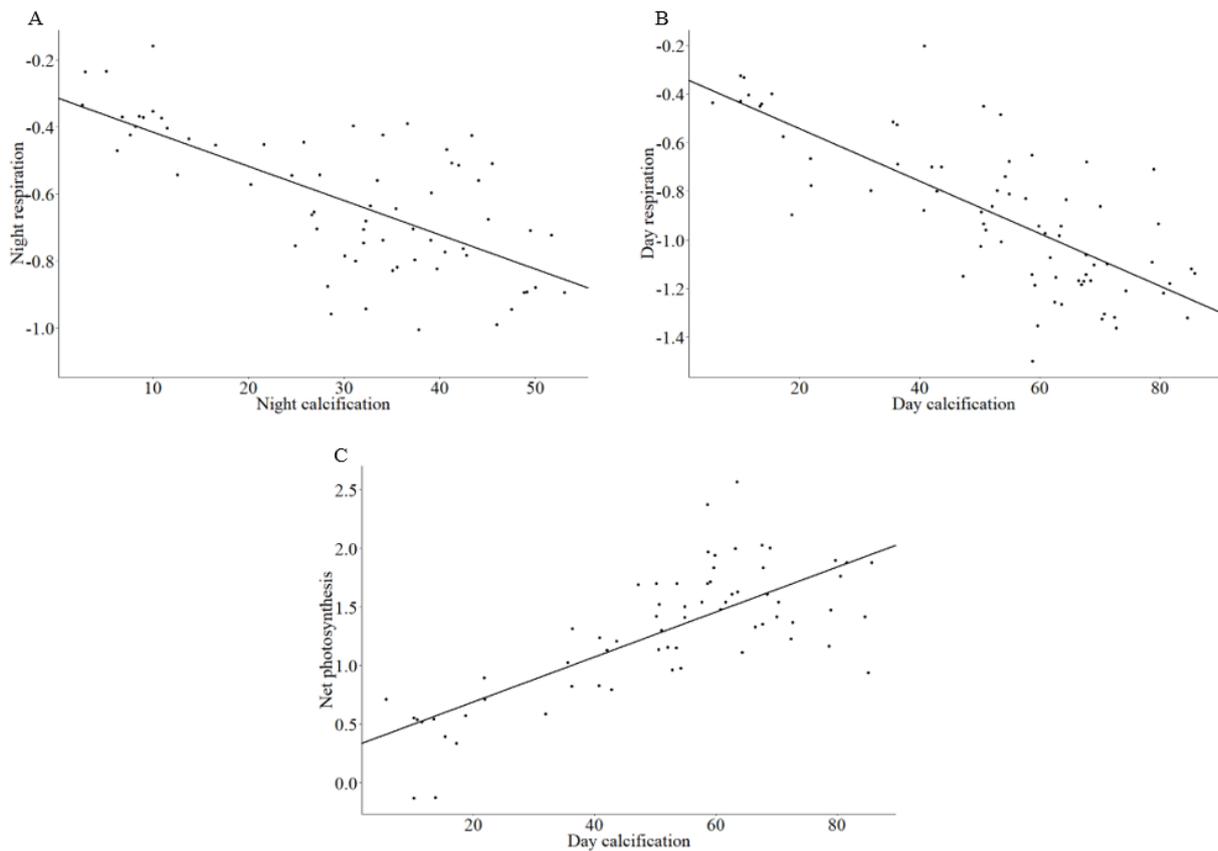
**Figure 16. Courbes de performance thermique de *Stylophora pistillata*.** Les courbes sont issues de régressions polynomiales, les points correspondent aux moyennes et les barres d'erreur sont les écart-types. Les cercles pleins (●) représentent les données de nuit et les cercles vides (○) représentent les données de jour : (A) Taux de calcification (n = 6, nuit P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,71 et jour P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,88), (B) Taux de respiration (n = 6, nuit P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,76 et jour P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,69), (C) Taux de photosynthèse nette (n = 6, P < 0,001, R<sup>2</sup>= 0,68) and (D) Densité de symbiotes (n = 3, P = 0,48, R<sup>2</sup>= 0,85). D'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).

### 2.2.2. Interactions entre les différents paramètres physiologiques en réponse à un stress thermique

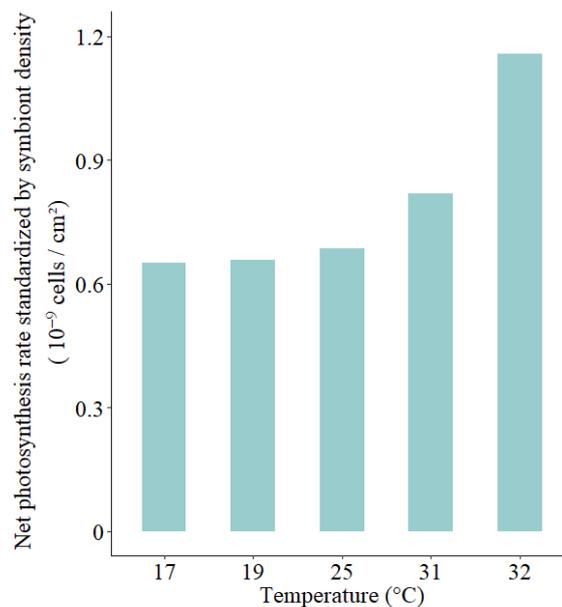
Des corrélations effectuées entre les taux de calcification, de respiration et de photosynthèse (Figure 17) ont montré des interactions significatives entre ces différents paramètres, tout comme l'avaient également observé Galli et Solidoro (2018). Ces fortes interactions entre les différents paramètres physiologiques, laissent supposer que la calcification, la respiration et la photosynthèse représentent les maillons d'une chaîne étroitement liés les uns aux autres.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent, excepté à 17°C et 19°C, une augmentation de tous les paramètres physiologiques le jour par rapport à la nuit (Figure 16 A et B). A 25°C notamment, le taux de calcification est multiplié par 1,7 le jour par rapport à la nuit. La réalisation d'une ANOVA à deux facteurs a permis de révéler une interaction significative entre la température et la condition jour/nuit pour les taux de calcification et de respiration. Il est intéressant de noter en effet, qu'aucune différence jour/nuit n'apparaît à basse température (17°C), tandis qu'à température élevée (32°C) les taux de calcification et de respiration, similaires à ceux de 17°C pendant la nuit, sont bien plus élevés durant le jour. Par ailleurs, le taux de photosynthèse suit une courbe similaire à celle de la calcification et de la respiration de jour dans le sens où il est élevé à 25°C et diminue aux extrémités de la fenêtre thermique, tout en maintenant un niveau plus haut à 32°C qu'à 17°C. L'ensemble de ces informations suggèrent un phénomène de « *light-enhanced calcification* », pour les températures comprises entre 21°C et 32°C. Parmi les diverses hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène et décrites dans le chapitre 1, nos résultats confirment que la respiration et la photosynthèse sont tous deux des paramètres clés à travers les liens étroits qui les unit à la calcification.

Il est intéressant de noter que le taux de photosynthèse normalisé par la densité de zooxanthelles est nettement supérieur à 32°C qu'à 25°C, ce qui suggère une efficacité accrue de l'activité photosynthétique à haute température (Figure 18). Ce résultat pourrait expliquer la stimulation de la calcification observée à 32°C et non pas à 17°C malgré des taux de calcification similaires durant la nuit.



**Figure 17. Corrélations entre les différents paramètres physiologiques mesurés.** Corrélations entre : A. taux de calcification et de respiration de nuit ( $p = 1,6 \cdot 10^{-10}$  et  $R^2 = 0,47$ ) ; B. taux de calcification et de respiration de jour ( $p = 3,1 \cdot 10^{-14}$  et  $R^2 = 0,56$ ) ; C. taux de respiration de jour et de photosynthèse nette ( $p = 3,1 \cdot 10^{-13}$  et  $R^2 = 0,56$ ). Modifiée d'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).



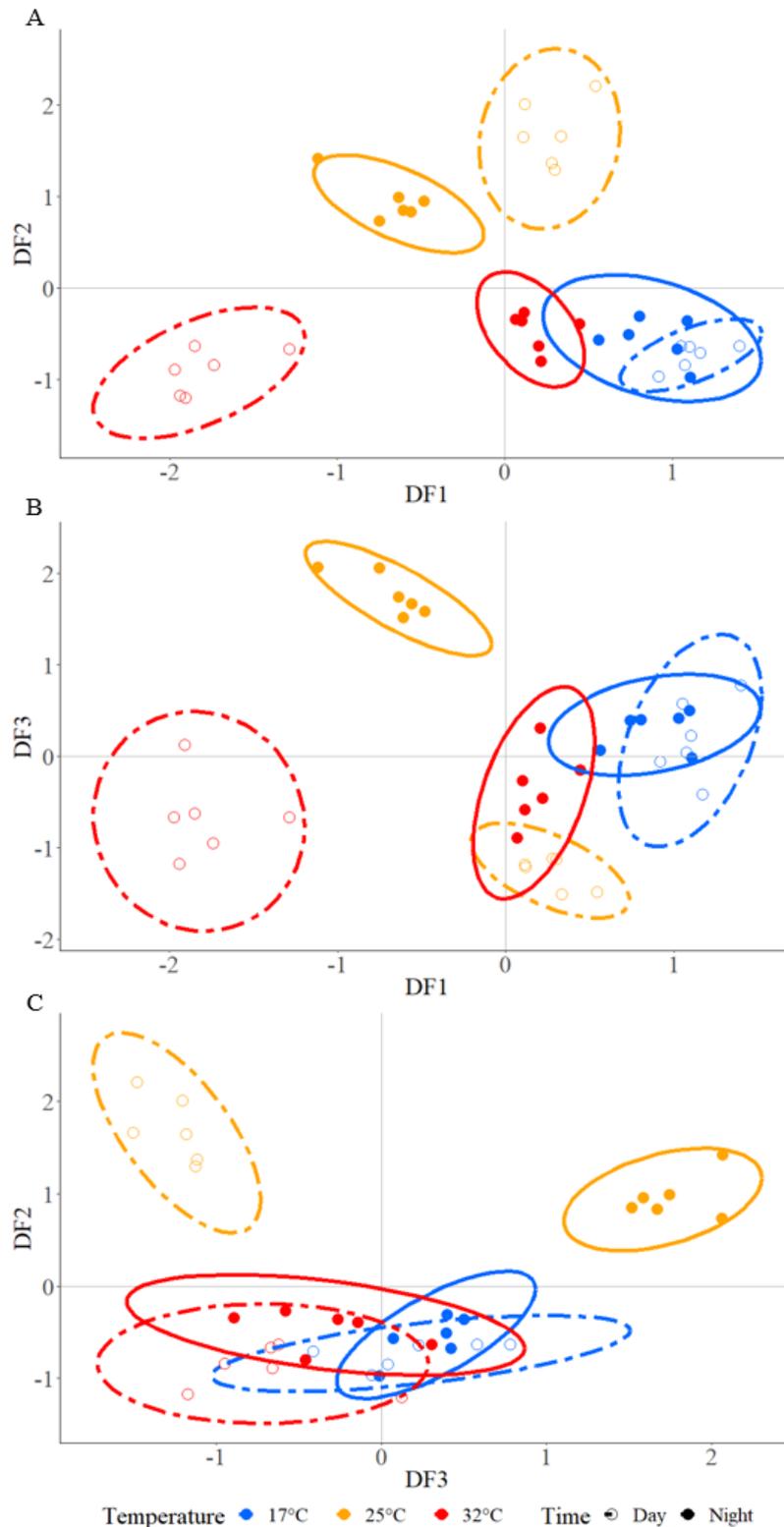
**Figure 18. Taux de photosynthèse normalisé par la densité de zooxanthelles.** Les barres d'erreur ne sont pas représentées sur cette figure car les données concernant le taux de photosynthèse et la densité de zooxanthelles sont issues de deux expériences différentes. Modifiée d'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).

## 2.3. Impact de la température sur la calcification : réponse des transporteurs ioniques à l'échelle des expressions géniques

### 2.3.1. Similitudes entre physiologie et expression des gènes de transports ioniques

L'expression de gènes impliqués dans le transport des ions a été analysée à 17°C, 25°C et 32°C, afin de comprendre les mécanismes à l'origine du déclin de la calcification lors des stress thermiques décrits dans le paragraphe précédent. Les microcolonies à 33°C n'ont pas été considérées pour l'analyse des gènes du fait d'un sévère blanchissement à cette température. Une analyse discriminante réalisée à partir des résultats issus des PCR en temps réel sur l'ensemble des 17 gènes sélectionnés a permis de constituer des groupes selon les profils d'expression génique de chaque individu (Figure 19). Les trois premiers facteurs discriminants (DF1, DF2 et DF3) expliquent 70% des variations des profils d'expression génique des échantillons. Selon ces trois premiers axes, les groupes 25°C jour et 25°C nuit sont systématiquement séparés. De même, à 32°C les groupes jour et nuit sont séparés selon l'axe DF1. En revanche, les groupes 17°C jour et 17°C nuit sont toujours superposés l'un à l'autre et proches du groupe 32°C nuit.

L'allure générale des expressions géniques reflète donc étroitement celle des divers paramètres physiologiques mesurés précédemment. A 17°C, les similitudes observées tant pour les taux de calcification et de respiration que pour les groupes de profils d'expression génique le jour et la nuit suggèrent que le faible taux de photosynthèse durant le jour a peu d'effet sur les profils d'expression génique. De plus, la ressemblance des profils d'expression génique entre les échantillons de 32°C nuit et ceux de 17°C jour et nuit est cohérente avec les paramètres physiologiques qui ont les valeurs les plus basses dans chacun de ces traitements. Par ailleurs, la différence entre les groupes jour et nuit à 25°C et à 32°C semble liée à une augmentation des valeurs des paramètres physiologiques pendant la journée et à une activité photosynthétique des symbiotes plus élevée et plus efficace à 32°C qu'à 17°C. Ces similitudes entre les profils d'expression génique et les courbes de performance thermique indiquent que le transport des ions joue un rôle important dans les paramètres physiologiques mesurés et dans la réponse de *S. pistillata* face au stress thermique.



**Figure 19. Analyse discriminante sur les expressions de 17 gènes de transports ioniques chez *S. pistillata*.** Chaque point représente le profil d'expression génique pour un échantillon, et les ellipses délimitent les différents groupes. Le bleu représente les échantillons à 17°C, le jaune à 25°C et le rouge à 32°C. Les ronds pleins (●) représentent les individus de nuit et les ronds vides (○) représentent les individus de jour. Les graphiques A, B et C sont issus de l'analyse discriminante selon les facteurs discriminants (DF). DF1 explique 24% de variation, DF2 explique 24% et DF3 explique 22%. Des ANOVAs à un facteur réalisées sur chacun des trois axes de l'analyse discriminante montrent des différences significatives entre les groupes ( $P < 0,05$ ). D'après l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).

### 2.3.2. Impact des températures extrêmes sur le transport et la conversion du carbone inorganique dissous

L'analyse de l'expression des gènes à 17°C et à 32°C relative à 25°C a permis de révéler un groupe de gènes significativement sous-régulé aux extrémités de la fenêtre thermique de *S. pistillata*, aussi bien la nuit que le jour (Tableau 3). Ce groupe comprend les quatre anhydrases carboniques (SpisCA1-4) ainsi que deux transporteurs de bicarbonate : SpisSLC4 $\gamma$  et SpisSLC26 $\beta$ . L'ensemble de ces gènes joue un rôle majeur dans le transport et l'inter-conversion du carbone inorganique dissous (CID) pour la calcification. Les anhydrases carboniques (ACs) sont des enzymes qui catalysent la réaction réversible de conversion du CO<sub>2</sub> en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Il a été montré qu'elles interviennent dans l'approvisionnement du milieu extracellulaire calcifiant (MEC) en carbone inorganique dissous (CID) originaire du milieu extérieur et du métabolisme (Furla *et al.*, 2000; Allison *et al.*, 2014). Parmi les différentes ACs identifiées chez *S. pistillata*, les quatre ACs analysées dans cette étude sont sous-exprimées aux températures extrêmes (17°C et 32°C). Les trois premières (SpisCA1-3) ont été localisées et sont toutes retrouvées dans l'épithélium calicoblastique calcifiant. Alors que SpisCA2 et SpisCA3 sont retrouvées uniformément dans l'endoderme oral et les tissus aboraux (Bertucci *et al.*, 2011; Del Prete *et al.*, 2018), SpisCA1 est spécifique de l'épithélium calicoblastique (Moya *et al.*, 2008b). La protéine SpisCA2 est aussi incorporée dans le squelette et fait donc partie des protéines de matrice organique (Drake *et al.*, 2013). De même, les transporteurs de bicarbonate, sont également sous-régulés à 17°C et à 32°C, et sont localisés : dans l'épithélium calicoblastique pour SLC4 $\gamma$  et dans tous les tissus pour SLC26 $\beta$  y compris dans les cellules calicoblastiques (Zoccola *et al.*, 2015). SLC4 $\gamma$  est particulièrement intéressant puisque ce transporteur de bicarbonate est connu pour être spécifique des hexacorallaires calcifiants chez qui il joue un rôle déterminant dans le transport du CID vers le MEC pour la calcification (Zoccola *et al.*, 2015).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres études sur diverses espèces de coraux où il a été montré que les gènes impliqués dans le transport du CID, notamment ceux codant pour les ACs (Edge *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2011; Kenkel *et al.*, 2013; Maor-Landaw *et al.*, 2014) et un transporteur de bicarbonate de la famille SLC26 (Kenkel *et al.*, 2013), sont également sous-régulés en réponse à un stress thermique. Cependant dans ces précédents travaux, les auteurs se sont focalisés uniquement sur une hausse de la température. L'étude présentée dans ce chapitre considère également une baisse de la température ainsi que la condition jour/nuit. Dans tous les traitements (faible et haute température, jour et nuit), la sous-régulation des ACs et des deux transporteurs de bicarbonate va de pair avec le déclin du taux de calcification. Etant donné que le taux de photosynthèse est très faible à 17°C et absent la nuit, la sous-régulation de ces gènes semble liée à la dépression du taux de respiration à faible et haute températures. Sachant qu'une large proportion du CID utilisé pour la calcification provient du métabolisme (Furla *et al.*, 2000; Allison *et al.*, 2014) et que plusieurs des gènes sous-régulés lors d'un stress thermique sont localisés au niveau de l'épithélium calicoblastique, l'apport de CID d'origine respiratoire au niveau du MEC pourrait alors être perturbé.

**Tableau 3.** Résumé des différences statistiques des expressions géniques à 17°C et 32°C comparées à 25°C pendant la nuit et le jour déterminées par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent une augmentation ou diminution d'expression significative par rapport à 25°C ( $p < 0.05$ ). Les flèches grises représentent les tendances relatives à 25°C ( $p < 0.1$ ). Tiré de l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).

Gène	NUIT		JOUR		Fonction
	17°C	32°C	17°C	32°C	
SpisSLC4ε	↗	↗	↗	↗	Transport du CID
SpisSLC4γ	↘	↘	↘	↘	
SpisSLC26β	↘	↘	↘	↘	
SpisCA1	↘	↘	↘	↘	
SpisCA3	↘	↘	↘	↘	
SpisCA2	↘	↘	↘	↘	
SpisCA4	↘	↘	↘	↘	
SpisSLC4β	-	↗	-	↗	
SpisSLC26γ	-	↗	-	↗	
SpisSLC26α	-	↗	-	↗	
SpisSLC4δ	-	↘	↘	↘	
Ca <sup>2+</sup> channel	↘	-	-	↗	Transport du Ca <sup>2+</sup>
PMCA1	-	-	-	-	
PMCA2	-	-	-	-	
PMCA3	↘	↘	-	↗	
NHE	-	-	-	↗	
V-ATPase	-	-	-	-	

### 2.3.3. Effet de la lumière sur l'expression des gènes de transport ioniques

L'analyse de l'expression des gènes le jour relative à la nuit pour chacune des températures a permis de révéler un groupe de gènes sensibles à la condition lumineuse (Tableau 4). La réalisation d'une ANOVA à trois facteurs a permis en effet de déceler une interaction significative entre la température, la condition jour/nuit et les différents gènes étudiés. Tandis qu'à 17°C les niveaux d'expression génique restent inchangés entre le jour et la nuit, des différences significatives apparaissent à 25°C et 32°C. Parmi les différents gènes dont l'expression est modifiée à la lumière se retrouvent des transporteurs de bicarbonate de la famille SLC26, les anhydrases carboniques ainsi que le NHE et la PMCA3. Ces résultats vont de pair avec l'observation d'une stimulation de la calcification à la lumière à ces mêmes températures. De plus, l'absence de stimulation de la calcification à la lumière à 17°C est cohérente avec la stabilité d'expression de ces mêmes gènes le jour et la nuit. La surexpression des ACs associée à un phénomène de LEC a déjà été observé précédemment (Levy *et al.*, 2011; Hemond et Vollmer, 2015; Ruiz-Jones et Palumbi, 2015). Il a été proposé que l'augmentation des ACs à la lumière pourrait être liée à une demande accrue de conversion de

CID en  $\text{HCO}_3^-$  pour la calcification de jour (Ruiz-Jones et Palumbi, 2015) et de  $\text{CO}_2$  pour la photosynthèse des symbiotes (Bertucci *et al.*, 2013).

La diversité de gènes différemment exprimés à la lumière indique une réponse complexe de *S. pistillata* dans le transport du CID, du  $\text{Ca}^{2+}$  et des  $\text{H}^+$ , notamment lors de la combinaison de ce paramètre avec une température élevée ( $32^\circ\text{C}$ ). Si l'on considère que l'expression des gènes reflète les taux de transport des ions depuis et vers le MEC, ces résultats suggèrent alors que la composition ionique du MEC pourrait varier en fonction de la lumière et de la température. Cette interprétation est en accord avec de précédentes études réalisées à partir des signatures isotopiques dans le squelette de *Porites* qui ont montré que lors d'une chute des températures et de la lumière en hiver (McCulloch *et al.*, 2017), ou lors de stress thermiques induisant un blanchissement (D'Olivo et McCulloch, 2017), la réduction de  $\text{CO}_2$  d'origine métabolique induirait une augmentation du pH et modifierait la concentration en CID et l'état de saturation du MEC.

**Tableau 4.** Résumé des différences statistiques des expressions géniques à  $17^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  et  $32^\circ\text{C}$  pendant le jour comparé à la nuit déterminées par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent une augmentation ou diminution d'expression significative le jour par rapport à la nuit ( $p < 0.05$ ). Tiré de l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019).

Gène	JOUR			Fonction
	$17^\circ\text{C}$	$25^\circ\text{C}$	$32^\circ\text{C}$	
SpisSLC4 $\epsilon$	-	-	-	Transport du CID
SpisSLC4 $\gamma$	-	-	-	
SpisSLC26 $\beta$	-	↗	↗	
SpisCA1	-	↗	-	
SpisCA3	-	↗	-	
SpisCA2	-	↗	↗	
SpisCA4	-	↗	↗	
SpisSLC4 $\beta$	-	-	-	
SpisSLC26 $\gamma$	-	-	-	
SpisSLC26 $\alpha$	-	-	↗	
SpisSLC4 $\delta$	-	-	-	
$\text{Ca}^{2+}$ channel	-	-	-	Transport du $\text{Ca}^{2+}$
PMCA1	-	-	-	
PMCA2	-	-	-	
PMCA3	-	↘	↗	
NHE	-	-	↗	
V-ATPase	-	-	-	H <sup>+</sup> transport

## 2.4. Perspectives

Dans cette étude, la caractérisation de la fenêtre thermique de *S. pistillata* a permis de déterminer de fortes interactions entre trois processus physiologiques clés chez les coraux tropicaux constructeurs de récifs : la calcification, la respiration et la photosynthèse. A l'échelle de l'animal, le déclin du taux de calcification observé aux extrémités de la fenêtre thermique semble s'expliquer par la dépression des taux de photosynthèse et de respiration. Ainsi, le manque d'oxygène, de CID métabolique et d'énergie serait à l'origine d'un ralentissement de la croissance de la colonie. L'étude de l'expression des gènes des transports ioniques a permis d'apporter, par la suite, des informations complémentaires à l'échelle moléculaire. Il est tout de même important de garder à l'esprit que les expressions de gènes seules ne permettent pas d'apporter toutes les réponses étant donné que le niveau d'ARNm ne reflète pas nécessairement l'abondance, la localisation ou l'activité des protéines qu'ils codent. Zoccola *et al.* (2016) a montré notamment que l'activité de SpisCA1 et SpisCA2 augmente avec la température alors que l'expression de ces gènes était réduite à 32°C par rapport à 25°C dans les résultats présentés ici. Des recherches complémentaires pourraient ainsi viser les protéines en elles-mêmes. Dans cet objectif, une approche de western blot quantitatif a été envisagée afin de déterminer si la quantité de protéines produites reflète le niveau d'expression des gènes observé. La mise au point du protocole a été initiée par une étudiante en Master, Laura Capasso. J'ai ensuite moi-même réalisé des tests pour SpisCA1, PMCA1 et SpisSLC4 $\gamma$ . Les essais effectués sur PMCA1 et SpisSLC4 $\gamma$  ont échoué du fait de difficultés d'extraction de ces protéines. Le protocole d'extraction doit à présent être adapté à la spécificité des protéines membranaires. En revanche, les essais conduits sur SpisCA1 ont permis d'élaborer une courbe standard de la quantité de protéines déposée en fonction de l'intensité lumineuse des bandes obtenues en western blot. L'idée étant de comparer, par la suite, la bande obtenue en western blot pour des échantillons de coraux exposés à différentes températures à une droite standard établie au préalable de manière à déduire la proportion de protéines réellement produite. Ce travail n'a pu être poursuivi par manque de temps mais constitue une piste intéressante pour de futures recherches afin d'analyser si la quantité de protéines reflète les profils d'expression géniques obtenus ici.

Bien qu'un complément d'informations sur les protéines pourrait permettre une approche plus globale de la réponse de *S. pistillata* sur la régulation du transport transcellulaire des ions, les résultats obtenus dans cette étude sont déjà très instructifs. Le remarquable degré de cohérence dans la réponse de *S. pistillata* entre les paramètres physiologiques et les profils d'expression géniques suggèrent que le transport des ions est impliqué dans la sensibilité de cette espèce à un stress thermique. Notamment, la sous-régulation d'un groupe de gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID semble corrélé à la réduction de la calcification aux températures extrêmes, en parallèle d'une diminution de la respiration. Récemment, de nouveaux outils ont émergé pour mesurer la concentration de CID dans le MEC *in vivo* (Cai *et al.*, 2016; Sevilgen *et al.*, 2019) et pourraient être utilisés afin de déterminer d'éventuels changements dans la composition du MEC lors de stress thermiques et leurs implications dans la calcification. De plus, des modifications dans le transport des ions au niveau du MEC pourrait impliquer des changements dans l'état de saturation des carbonates et le pH. Il est établi que *S.*

*pistillata* élève son pH par rapport à celui de l'eau de mer afin de favoriser la précipitation du CaCO<sub>3</sub> (Venn *et al.*, 2011, 2013; Sevilgen *et al.*, 2019). La suite de mes travaux a donc consisté à mesurer le pH dans le MEC et dans les cellules calicoblastiques et sera présentée dans le chapitre 3.

Par ailleurs, la voie transcellulaire, bien que considérée majeure, n'est pas l'unique voie de transport des ions vers le MEC pour la calcification. Une voie paracellulaire permet également le passage par diffusion des ions et est régulée par les jonctions présentes entre les cellules dont les propriétés peuvent varier selon les conditions environnementales. J'ai donc réalisé des PCR en temps réel afin de déterminer si les gènes de jonctions sont affectés par des changements de température. Les premiers résultats ont ainsi montré que plusieurs gènes structuraux des jonctions sont en effet exprimés différemment à 17°C et 32°C par rapport au contrôle à 25°C. Ces résultats préliminaires indiquent de possibles modifications au niveau des jonctions qui pourraient impliquer une régulation différente du passage des ions via la voie paracellulaire. Une autre piste de recherche s'ouvre ainsi pour comprendre comment le transport paracellulaire des ions impliqués dans la calcification est affecté par des stress thermiques. Les travaux issus de cette piste de recherche seront développés dans le chapitre 4.

## 2.5. Publication

**Bernardet, C., Tambutté E, Techer N, Tambutté S et Venn AA. (2019). Ion transporter gene expression is linked to the thermal sensitivity of calcification in the reef coral *Stylophora pistillata*. *Scientific reports*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54814-7>.**

**OPEN** **Ion transporter gene expression is linked to the thermal sensitivity of calcification in the reef coral *Stylophora pistillata***

C. Bernadet<sup>1,2</sup>, E. Tambutté<sup>1</sup>, N. Techer, S. Tambutté<sup>1</sup> & A. A. Venn<sup>1\*</sup>

Coral calcification underpins biodiverse reef ecosystems, but the physiology underlying the thermal sensitivity of corals to changing seawater temperatures remains unclear. Furthermore, light is also a key factor in modulating calcification rates, but a mechanistic understanding of how light interacts with temperature to affect coral calcification is lacking. Here, we characterized the thermal performance curve (TPC) of calcification of the wide-spread, model coral species *Stylophora pistillata*, and used gene expression analysis to investigate the role of ion transport mechanisms in thermally-driven declines in day and nighttime calcification. Focusing on genes linked to transport of dissolved inorganic carbon (DIC), calcium and H<sup>+</sup>, our study reveals a high degree of coherence between physiological responses (e.g. calcification and respiration) with distinct gene expression patterns to the different temperatures in day and night conditions. At low temperatures, calcification and gene expression linked to DIC transport processes were downregulated, but showed little response to light. By contrast, at elevated temperature, light had a positive effect on calcification and stimulated a more functionally diverse gene expression response of ion transporters. Overall, our findings highlight the role of mechanisms linked to DIC, calcium and H<sup>+</sup> transport in the thermal sensitivity of coral calcification and how this sensitivity is influenced by light.

Increases in seawater temperature driven by global warming are a first-order threat facing coral reef ecosystems worldwide. Together with aspects of global change including ocean acidification and declining water quality, changing seawater temperatures challenge several aspects of reef coral physiology, with severe ramifications at the ecosystem level<sup>1–4</sup>.

Among the impacts of temperature on reef corals, coral bleaching is the most widely studied. In this process, elevated temperatures provoke the breakdown of the symbiosis between corals and their photosynthetic dinoflagellate algae (family Symbiodiniaceae) following cellular stress events occurring in both the coral host and symbiont<sup>5–7</sup>. Additionally, temperature change may impact rates at which corals build their skeletons by calcification<sup>8</sup>. Studies on coral skeletons from several geographical locations indicate that this has become a worldwide problem in the context of climate change in recent decades<sup>9–12</sup>.

The threat of changing seawater temperatures has led to intense research into the mechanisms that determine the thermal sensitivity of corals e.g.<sup>13–18</sup>. By deciphering how and why corals respond to temperature at molecular and cellular scales this work provides insight into their vulnerability and their capacity to acclimatize and tolerate periods of elevated temperature<sup>19</sup>. Ultimately, such information is also important for initiatives that are actively exploring interventions to improve the physiological resilience of corals to future environmental change, including human-assisted evolution and synthetic biology<sup>20,21</sup>.

Much of the previous research into the cellular mechanisms underlying the thermal sensitivity of corals has focused on coral bleaching e.g.<sup>14,16,18</sup>, with less mechanistic work having addressed the thermal sensitivity of coral calcification. Certain studies on bleaching mechanisms have examined gene expression profiles against a backdrop of physiological parameters linked to the bleaching response, such as decreases in photosynthetic efficiency and declines in symbiont numbers<sup>18</sup>. Few studies of this type have been carried out directly on calcification, although there are, however, gene expression studies that have focused on combined thermal and ocean

<sup>1</sup>Centre Scientifique de Monaco, Marine Biology Department, 8 Quai Antoine 1er, Monaco, 98000, Monaco.

<sup>2</sup>Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005, Paris, France. \*email: [avenn@centrescientifique.mc](mailto:avenn@centrescientifique.mc)

acidification stress<sup>22,23</sup>. Nevertheless, one important theme emerging from previous gene expression work on thermal stress on corals is that disruption to ion transport processes may underlie the response of coral calcification to temperature changes<sup>17,24</sup>. Indeed, a review of gene expression biomarkers in corals highlights certain ion transport genes as heat-stress markers<sup>25</sup>. However, the links between ion transport mechanisms and the thermal sensitivity of corals has never been directly investigated.

Even if the coral calcification mechanism itself is not fully understood, the ion transport for calcification is known to be central to the process, particularly movement of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  and dissolved inorganic carbon (DIC)<sup>26–28</sup>. The coral skeleton is separated from the surrounding environment by the coral tissues, which are comprised of oral and aboral epithelia separated by a lumen called the coelenteron. These epithelia regulate the ionic composition of the extracellular calcifying medium (ECM), which lies between the aboral layer's calcifying cells (calicoblastic epithelium) and the skeleton<sup>29</sup>. Research into the ionic composition of the ECM has shown that corals regulate  $\text{Ca}^{2+}$  and dissolved inorganic carbon concentrations, as well as pH in the ECM to levels above that of the exterior seawater<sup>29–34</sup>. The effect of increasing these parameters is to elevate aragonite saturation state which promotes growth of the skeleton<sup>34,35</sup>. The difference in concentration between  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $[\text{H}^+]$ , and  $[\text{DIC}]$  in the ECM and the surrounding seawater implies that these ions are regulated by primary and secondary active transport mechanisms. Research has sought to characterize mechanisms of ion transport to the ECM and the skeleton, and to identify and localize some of the transporters involved<sup>28,36</sup>. This has included studies of  $\text{Ca}^{2+}$  and DIC transport using radiotracer experiments<sup>37,38</sup> and the localization of a calcium channel, calcium ATPase, various carbonic anhydrases and bicarbonate/chloride exchangers<sup>39–42</sup>. Additionally, recent research is beginning to elucidate other steps in calcification including the formation of calcium carbonate particles in intracellular vesicles and the role of organic matrix proteins in catalyzing crystal nucleation and forming a template for skeletal growth<sup>43–48</sup>. While these latter studies are evolving our understanding of coral calcification, it is clear that ion transport remains a fundamental part of the overall mechanism.

Ion transport involved in calcification must be viewed in context with other aspects of coral metabolism including respiration and photosynthesis, as these parameters are intrinsically linked<sup>49</sup>. Indeed, it has long been known that photosynthesis can augment calcification rates in a process known as light-enhanced calcification<sup>40,49–51</sup>. The mechanisms underlying the links are uncertain, but previous research suggests that photosynthesis may increase calcification rates by driving an elevation in pH in the coelenteron which facilitates pH increase in the ECM<sup>52</sup>. Moreover, respiration provides a significant source of DIC for the calcification reaction<sup>38</sup>. Also, it has been proposed that respiration supplies ATP for active transport mechanisms linked to calcification<sup>52</sup>, and that photosynthesis leads to the provision of oxygen and carbon compounds from coral symbionts that may increase respiration rates<sup>53</sup>. It is clear therefore, that investigations into ion transport mechanisms linked to calcification also need to take photosynthesis and respiration into account.

The overarching aim of the current study was to improve mechanistic understanding of how temperature causes declines in coral calcification. We pursued this aim by focusing on the expression of a selected group of genes with functions in the transport and regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  and DIC selected from the genome of our model species *Stylophora pistillata*<sup>54,55</sup>. These genes were chosen from genes described in the existing literature with putative links to calcification, respiration or photosynthesis (see Supplementary Information Table 1 for references). Before gene expression analysis, we first characterized the thermal performance curves (TPCs) of coral calcification, photosynthesis and respiration rates in day and night time conditions over a range of 17–33 °C (one-week exposure). Data from the TPCs allowed us to identify temperatures where calcification rates decreased significantly in distinctly different physiological scenarios (17 and 32 °C relative to 25 °C). Gene expression analysis was then carried out after one week's exposure at these target temperatures.

## Material and Methods

**Biological materials and experimental design.** Experiments were conducted with the tropical symbiotic scleractinian species *Stylophora pistillata* (Esper, 1797) which is kept in long-term culture at the Centre Scientifique de Monaco. Branch tips of 5 cm in length were cut from three mother colonies of a single genotype and kept for three weeks in a 120-L tank supplied with Mediterranean seawater at a temperature of 25 °C, salinity 38,  $\text{pH}_T$   $7.94 \pm 0.02$  and irradiance of  $230 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  on a 12:12 photoperiod. Corals were fed daily with frozen rotifers and twice a week with live *artemia* nauplii.

After three weeks, samples were transferred to 30-L experimental tanks for week-long temperature experiments to characterize TPCs and gene expression. Apart from temperature, conditions in these tanks matched those described above for the 120-L tank.

The experiments were carried out in two steps. In the first step, one set of samples were used to characterize the TPC of physiological parameters after 1-week exposure to the following temperatures: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 32 and 33 °C. Measurements of calcification, photosynthesis and respiration rates were determined under each treatment condition. Night time measurements were conducted in darkness at the end of the night before aquarium lights were switched on. Day time measurements were carried out in the light at midday.

Once we had identified temperatures at which calcification rate was significantly decreased relative to 25 °C from the TPC, another set of samples was used to characterize the expression of genes linked to ion transport in the second step of the investigation. This time, week-long exposures were only carried out at three temperatures: 17, 25 and 32 °C. Samples at 33 °C were not included in gene expression analysis due to the severe bleaching they experienced. Night and day sampling occurred at the same times used in characterization of the TPC in the first part of the study.

**Calcification rate.** Net calcification rate was measured by the alkalinity anomaly method<sup>56</sup>. Briefly, 50-ml closed beakers containing coral samples or blank seawater samples agitated with a magnetic stirrer were kept at the target temperature with a water bath for 30 min. For day-time measurements light was provided at  $230 \mu\text{mol}$

photons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . At the end of the incubation, the water in the beakers was collected to perform titrations as described in Tambutté *et al.* (2015). Titrations were performed in triplicate on each sample to check for measurement precision. Typically, depletion in alkalinity due to calcification was more than 10 fold greater than measurement precision. Calcification rates were calculated from the difference in total alkalinity (TA) between seawater in beakers containing samples and blanks, correcting for sample displacement volume. Calcification rates were determined in eighteen samples at 25 °C and six samples for all other temperatures. Values were normalized to the surface area of the samples.

**Photosynthesis and respiration rates.** Samples were placed in 50-ml closed beakers under agitation in a water bath set at the desired temperature and the concentration of oxygen was measured each 15 seconds for 20 min by an oxygen optode sensor system (oxy-4 mini, PreSens, Regensburg, Germany). Data were recorded with OXY4v2\_09 software (PreSens). Before each measurement, the oxygen sensor was calibrated with a saturated solution of sodium sulfite (0% oxygen) and oxygen-saturated seawater (100%) using seawater from a beaker with  $\text{O}_2$  bubbling.

Night respiration was measured at the end of the night period before aquarium lights switched on, while net photosynthesis and day respiration measurements were conducted at midday. Light was provided at 230  $\mu\text{mol}$  photons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Changes in oxygen concentration with time were determined at all temperatures in light and darkness, except 27 °C in the light where a technical problem prevented acquisition of data. Photosynthesis and respiration rates were determined in eighteen samples at 25 °C and six samples for all other temperatures. Values were normalized by the surface area of the samples.

**Symbiotic dinoflagellate density.** Samples were air-picked with dinitrogen in 10 ml of filtered sea water (FSW). The resulting slurry was then centrifuged (at 1500 g for 10 min) and resuspended in 10 ml of MilliQ water for 15 min, centrifuged a second time (at 1500 g for 10 min) and resuspended in 5 ml of FSW. A 15  $\mu\text{l}$  aliquot was deposited on a Mallassez cell for counting under a Leica DM750P microscope at X40 magnification. Symbiotic dinoflagellate density was determined in three samples per temperature. Values were normalized by the surface area of the samples

**Microcolony surface area.** Colony surface area was measured using the paraffin wax method<sup>57</sup>. Briefly, coral skeletons were coated in paraffin wax by dipping in Paraplast wax (Sigma, France) at 65 °C. Surface area of the specimens was obtained by referring the weight of the paraffin wax coated on the specimen to the standard curve of paraffin wax versus surface area. The standard curve was generated by regressing weight of the paraffin wax to known surface area density blocks<sup>58</sup>.

**RNA extraction.** Samples were flash frozen in liquid nitrogen and placed in a –80 °C freezer before RNA extraction. Samples were air-picked with dinitrogen in 600  $\mu\text{l}$  of RLT buffer (Qiagen). Total RNA was then extracted according to the protocol of RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen). RNA quantification was conducted with a microplate spectrophotometer Epoch (Biotek) using Gen5 2.03 software. Quality of RNA was also checked by running the samples on an agarose gel 1% which was then observed under UV-exposure with Fusion Fx7.

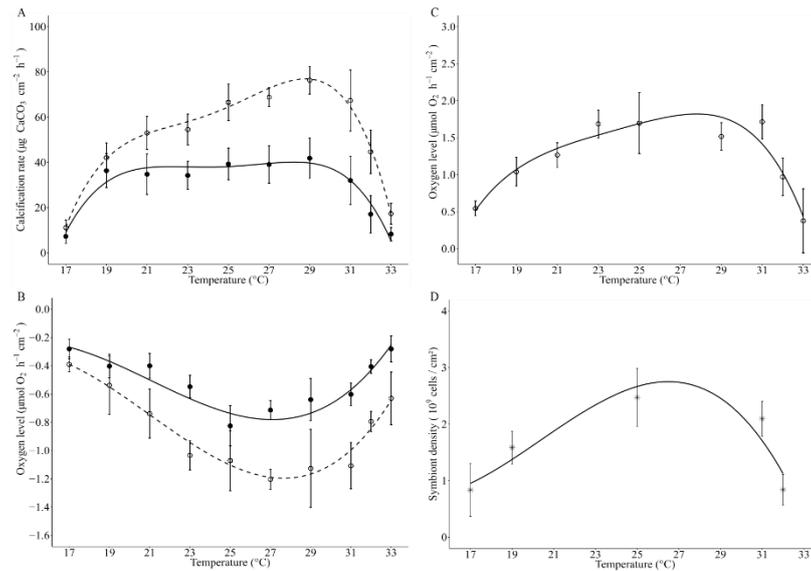
**Reverse transcription and real-time PCR.** Reverse transcription (RT) was carried out according to Invitrogen's SuperScript IV Reverse Transcriptase (2000 U/ $\mu\text{l}$ ) User Guide (Protocol Pub. No. MAN0013443 Rev. A.0), using 1  $\mu\text{g}$  of RNA. The RT was carried out in a PCR machine Eppendorf<sup>®</sup> Mastercycler gradient. A first step at 23 °C allowed random hexamers to bind RNA strands, a second step at 50 °C allowed the reverse transcription and a third step at 80 °C ended the reaction. A control PCR was then conducted to check RT products.

Real-time PCR (qPCR) was used to analyse the expression of a suite of genes linked to ion transport (Table Supplementary Material 1). These included 17 genes coding for: three plasma membrane calcium ATPases (PMCA 1, 2 and 3), four carbonic anhydrases (SpisCA 1 to 4), bicarbonate transporters SpisSLC4  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  and SpisSLC26  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , calcium channel, V-ATPase and a  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger (NHE) (Primer sequences are given in Supplementary Material Table 1).

qPCR was conducted in 96-wells plates with the qPCR machine QuantStudio 3 (Applied Biosystems) using PowerUp<sup>™</sup> SYBR<sup>™</sup> Green Master Mix. Samples were analysed in triplicate using 1 ng of cDNA. Non template controls were included on each reaction plate and an internal standard was also included to test for amplification variability between runs. Primer efficiency and gene expression was analyzed with qBase + software (Biogazelle)<sup>59</sup>. Gene expression was normalized to the geometric mean of expression of two reference genes (36B4 and L22) after these reference genes were determined to have acceptably low M values and coefficient of variations<sup>59</sup>. Gene expression was determined in 6 samples per treatment.

**Statistical analyses.** Statistical analysis was performed using R v3.5.2 software. Data were checked for normality with a normal probability plot of residuals. Calcification and respiration data were analyzed by two-way ANOVA. Photosynthetic rate was analyzed by one-way ANOVA. For calcification and respiration post-hoc analysis was carried out by pairwise t tests. For photosynthesis, a Student-Newman-Keuls test was performed. Polynomial regressions were also carried out for calcification, respiration and photosynthesis data.

For gene expression analysis, we first conducted discriminant analysis to explore global patterns in the data. We followed this with analysis of the gene expression by three-way ANOVA. The factors were as follows: Temperature (17, 25 and 32 °C), time of day (daytime and nighttime) and gene identity (the 17 genes analyzed). Post-hoc analysis was carried out by pairwise t tests to discriminate the genes which were expressed differently at 17 °C and 32 °C compared to 25 °C, both during night and day.



**Figure 1.** Physiological parameters at different temperatures (mean  $\pm$  SD) ( $n = 18$  microcolonies for 25°C and  $n = 6$  microcolonies for other temperatures). Closed circles (●) represent night and open dots (○) day measurements. Polynomial regressions indicate trend of thermal performance curves (TPCs). (A) Calcification rate (night  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.71$  and day  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.88$ ), (B) Respiration rate (night  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.76$  and day  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.69$ ), (C) Net photosynthesis rate ( $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.68$ ) and (D) Symbiont density ( $P = 0.48$ ,  $R^2 = 0.85$ ).

## Results

**Thermal performance curves.** The response of calcification and respiration rates to temperature was assessed across a range of 17°C to 33°C during the night and the day (Fig. 1A,B). Photosynthetic rate was also measured during the day (Fig. 1C) and dinoflagellate symbiont densities were determined at 17, 19, 25, 32 and 33°C (Fig. 1D). All parameters were analyzed by regression analysis to reveal the trend of the data (Fig. 1) and by two or one-way ANOVA (Supplementary Material Table 2–4).

Physiological parameters generally displayed typical TPCs, with rates increasing with temperature until an optimum and declining at higher temperatures. During the night, calcification and respiration rates declined to similar extents at lower and elevated temperatures relative to 25°C (Fig. 1A,B, Supplementary Information Tables 2 and 3) and were significantly correlated (Supplementary Information Fig. 1). Likewise, during the day, calcification, respiration and photosynthesis declined towards the ends of the TPC and were significantly correlated (Supplementary Information Fig. 1) (Supplementary Material Tables 2–4). Analysis by ANOVA (Supplementary Information Tables 2–4) indicated that calcification, respiration and photosynthesis rates were all significantly decreased at 17, 32 and 33°C with respect to 25°C in both day and night conditions.

There was a significant interaction of day/nighttime with temperature for both calcification and respiration (Supplementary Information Tables 2–4). Indeed, day time calcification, respiration and photosynthesis were significantly elevated at higher temperatures (i.e. 32°C) relative to lower temperatures (i.e. 17°C) (Fig. 1A–C). By contrast, nighttime calcification and respiration rates were at similar levels at either end of the TPC.

Measurements of symbiotic dinoflagellate density showed that symbiont numbers significantly changed across the temperature range observed here (Fig. 1D). Symbiont counts of samples taken at 17°C and 32°C were significantly reduced to similar levels with respect to 25°C, indicating these samples had undergone similar levels of bleaching during these temperature treatments (Fig. 1D). Coral colonies at 33°C were noticeably paler than all other colonies and therefore likely to have been severely depleted in symbiont numbers and, as such, these samples were not analyzed.

Normalization of mean photosynthetic rates by symbiont densities (Supplementary Information Fig. 2), indicated that photosynthesis *per se* was not negatively affected by higher and lower temperatures. In fact, higher temperatures (32°C) increased photosynthesis at the level of the symbiont. This indicates that declines in photosynthesis at the level of the colony (i.e. normalized by surface area) were mainly driven by loss of symbionts, but the increased rates of photosynthesis at 32°C relative to 17°C may have occurred through a positive effect of temperature on the photosynthetic reactions.

In summary, characterization of the thermal performance curve allowed us to target 17°C and 32°C as low and high temperatures at which coral calcification was significantly decreased relative to 25°C. These temperatures were selected for gene expression analysis. Samples from 33°C were not included in the gene expression analysis due to severe bleaching.

**Gene expression.** Real-time qPCR analysis was carried out on coral samples in the 17, 25 and 32°C treatments. The expression of a panel of 17 genes was analyzed, chosen for their roles in DIC, H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> transport and regulation, and existing literature that suggests links to calcification, respiration or photosynthesis (Table Supplementary Information 1). First we carried out discriminant analysis of gene expression data which grouped the expression profiles of individual samples into distinct clusters according to temperature (Fig. 2, Supplementary Information Tables 5 and 6). 70% of the variation of the gene expression profiles of the samples was explained by the first three axes. Both 17°C and 32°C were separated from the groups at 25°C. At 25°C, night and day groups were consistently separated. In contrast, the expression profiles of colonies during night and day at 17°C always grouped together. Night and day groups at 32°C overlapped in both DF2 (Discriminant Factor 2) and DF3 axis, but were clearly separated into night and day clusters at 32°C on the DF1 axis. Samples from night time 32°C grouped close to the 17°C day and night groups on all three axes (Fig. 2).

Following discriminant analysis, we performed three-way ANOVA which identified significant effects of night/day, temperature and gene on the expression profile of the coral samples (ANOVA results given in Supplementary Information Table 7). In Figs. 3 and 4 we plot gene expression relative to 25°C and to nighttime expression respectively. Significant interactions were identified between the night/day, temperature and gene, indicating that the genes responded differently during night and day and at different temperatures (Supplementary Material Table 7). Post-hoc analysis identified the expression of which gene responded significantly in the different treatments using an alpha of 0.05 as the statistical cut-off (Tables 1 and 2). In Table 1, we also indicate responses that fell within a cutoff off of  $p < 0.1$  in order to indicate the trend of the response.

Looking at Fig. 3 and Table 1 which compares gene expression between 17°C and 32°C with 25°C, two broad patterns emerged from post-hoc analysis. Firstly, we found that the two ends of the TPC shared a similar core set of genes that were down-regulated in both night and day time conditions. These included the four carbonic anhydrase genes and also the bicarbonate transporters SpisSLC4 $\gamma$  and SpisSLC26 $\beta$ . Secondly, we found that despite similarities between 17°C and 32°C, a larger and functionally more diverse set of genes responded at 32°C in the daytime compared to the 17°C treatment relative to 25°C. Indeed, it can be seen from Table 1, that the expression of almost twice as many genes responded significantly at 32°C in the daytime relative to 17°C (at the alpha 0.05 cut-off). These genes included additional bicarbonate transporters (e.g. genes belonging to the SpisSLC4 and SpisSLC26 families) and also genes involved in proton transport (NHE) and calcium transport (PMCA3) at 32°C in day time conditions.

We also compared gene expression between daytime and nighttime across the three temperatures (Fig. 4, Table 2) to highlight the expression of which genes were responsive to daytime conditions. At 17°C, gene expression did not change significantly in the day or night treatments for any of the genes, however, at 25°C and 32°C the expression of a group of genes was responsive to daytime conditions (Table 2). In agreement with Fig. 3 and Table 1, in the 32°C treatment these genes included SpisSLC26 $\alpha$ , NHE, PMCA genes in addition to both SpisCA2 and SpisCA4.

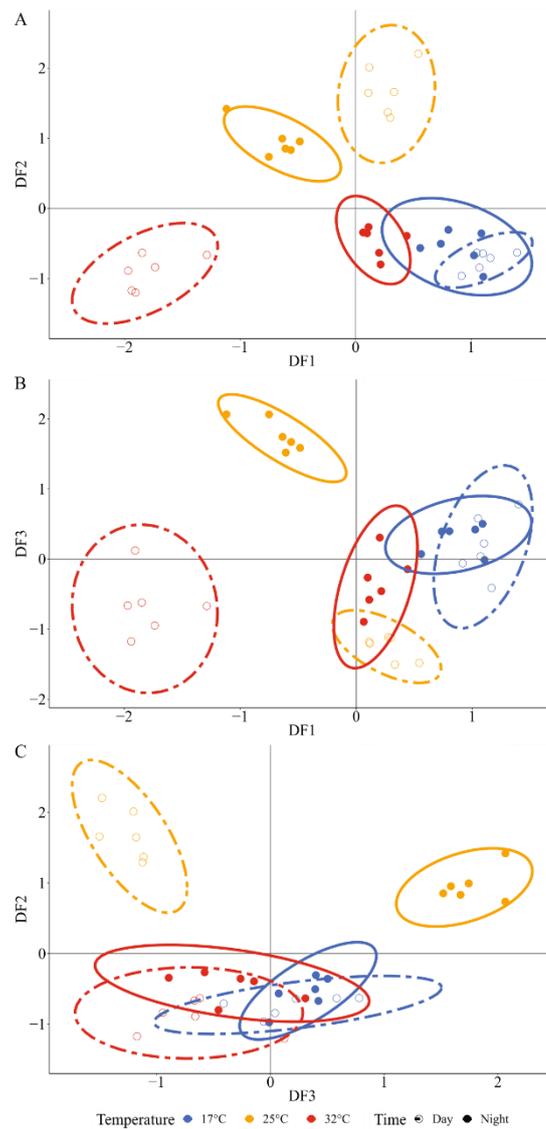
In summary, three-way ANOVA and posthoc analysis reveal firstly the response of the expression of a core group of genes associated with the extremes of the TPC, and secondly a more diverse gene group associated with an interaction between daytime conditions and elevated temperature.

## Discussion

It is widely known that changes in seawater temperature can depress rates of reef coral calcification, but little is understood about how and why. Temperature itself has a direct, abiotic effect on calcification, because precipitation rates of aragonite increase with elevations in temperature<sup>60</sup>. However, the linear relationship of abiotic aragonite precipitation rates with temperature bears little resemblance to the bell-shaped thermal performance curves of calcification observed for *S. pistillata* (see Supplementary Information Fig. 4 for comparison) or similar curves described in previous investigations<sup>8</sup>. This difference underscores the importance of biological factors in shaping the coral calcification response to temperature.

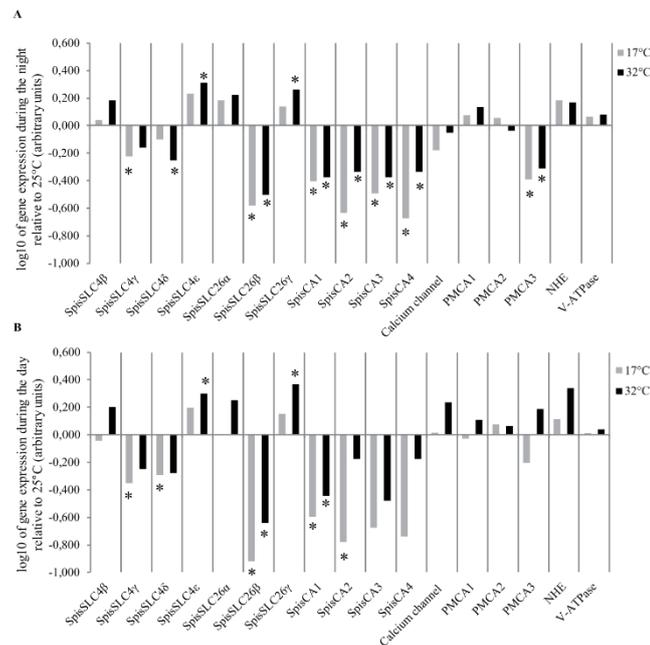
Here, we hypothesized that ion transport mechanisms are among the biological factors that determine how coral calcification responds to temperature. We investigated this hypothesis by targeting our analysis on the expression of a suite of genes with roles in calcium, proton and DIC transport at the extremes of the thermal performance window of *S. pistillata*.

**Coherence of physiology and gene expression.** A number of previous studies have investigated the effects of temperature on coral calcification and other physiological parameters by describing thermal performance curves (TPCs) for several coral species<sup>61–63</sup>, including some of the first work conducted on the thermal response of scleractinians<sup>8,64</sup>. Calcification rates in this previous work and the current study have been observed to follow the TPC trend that is characteristic of most physiological processes, in which rates increase with rising temperatures until an optimum, after which they decline<sup>65,66</sup>. Similarly, in the current study photosynthesis and respiration performed in this manner, although loss of symbiotic dinoflagellates appears to have driven the declines in photosynthesis per unit surface area of the coral colony. In any case, when we consider the physiological parameters together it becomes apparent that we observed distinctly different physiological conditions at each end of the TPCs. At low temperatures (17°C) there was little difference between rates of respiration and calcification between night and daytime conditions, but at elevated temperature (32°C), daytime calcification and respiration were much greater than in the night. It was under these opposing physiological conditions that we sought to profile the expression of the ion transport genes.



**Figure 2.** Discriminant analysis on the gene expression of 17 ion transport genes in *S. pistillata*. Each dot represents the gene expression profiles for each sample, and ellipses show the clusters. Blue denotes samples at 17°C, yellow at 25°C, and red at 32°C. Closed dots (●) represent night individuals and open dots (○) represent day individuals. A, B and C show plots of Discriminant Factors (DF). DF1 explains 24% of variation, DF2 explains 24% and DF3 explains 22%. One-way ANOVAs carried out on each of the three axis of the discriminant analysis showed statistical differences between clusters ( $P < 0.05$ ).

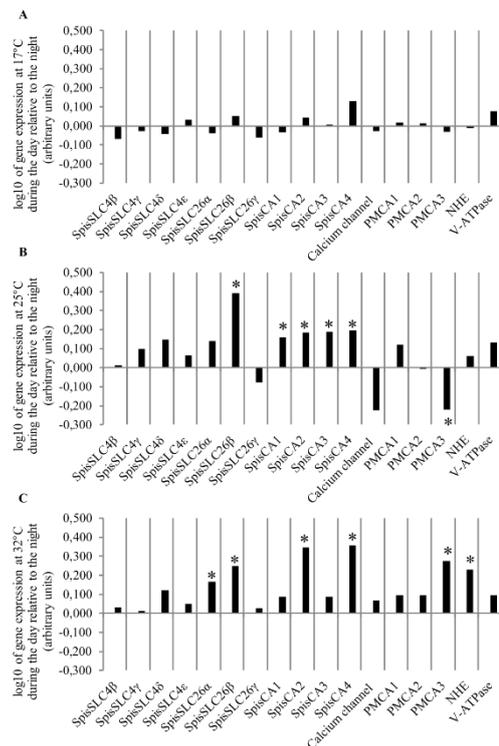
Discriminant analysis of gene expression of ion transporters revealed that the global pattern of gene expression mapped closely with the physiological parameters observed at the extremes of the TPCs by grouping the expression profile of samples according to temperature and to day or night. Discriminant analysis closely grouped



**Figure 3.** Mean gene expression (n = 6) plotted relative to 25°C (log<sub>10</sub> transformation): (A) during the night, and (B) during the day. Grey bars correspond to gene expression at 17°C and black bars at 32°C. Negative values indicate downregulation and positive values upregulation. Asterisks indicate statistical difference (p < 0.05) with gene expression at 25°C. Standard deviation error bars and means (not log transformed) are given in the supplementary material.

samples from treatments from day and night at 17°C in accordance with similar levels of respiration and calcification rates observed in these conditions, indicating that the low rates of photosynthesis in daytime treatments had little effect on gene expression profiles at low temperature. Furthermore, samples from nighttime 32°C were grouped near the 17°C groups on all three discriminant factor (DF) axes, consistent with the fact that similar values of nighttime calcification and respiration rates were observed at 32°C and 17°C. By contrast, discriminant analysis defined separate groups for daytime and nighttime samples at 32°C on DF1, corresponding with higher rates of calcification and respiration in the day versus the night. This suggests that photosynthesis influenced gene expression profiles at 32°C in accordance with the positive effect of photosynthesis on calcification and respiration rates. Additionally, discriminant analysis distinguished separate groups for daytime and nighttime samples at 25°C, which further implies that photosynthesis was important in influencing the pattern of gene expression observed here. Physiological phenotypes are not always easy to predict at the level of gene expression<sup>67,68</sup>, because mRNA levels do not necessarily reflect the expression, localization, activity or behaviour of the proteins they code for. It can also be difficult to assign a gene expression profile to a particular physiological response due to variation among individuals. Work on individual variation in physiological and molecular responses in microcolonies is an avenue of future research. Nevertheless, here we observed an alignment of global patterns of gene expression with patterns of physiological parameters, suggesting a high degree of coherence between the thermal response of *S.pistillata* at the physiological level and the level of the expression of ion transport genes.

**Extremes of the thermal performance curves and dissolved inorganic carbon transport.** Patterns determined by three-way ANOVA and posthoc analysis also corresponded with the physiological responses observed in the TPCs. The down-regulation of a small core group of genes relative to 25°C at both 17°C and 32°C, in the day and night, occurred in parallel with decreases in rates of calcification, and other physiological responses at the extremes of the TPC. Notably, this core group was made up of a set of genes linked to DIC transport and interconversion. Transport of DIC and its interconversion between CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> facilitated by carbonic anhydrases is essential for calcification in which DIC of both seawater and metabolic origin is transported from the calciblastic cells to the ECM<sup>33,38</sup>. Equally, DIC is vital for symbiont photosynthesis for which DIC from the surrounding seawater is transported to symbionts across the oral ectoderm and into the symbiont-containing endoderm, where it is ultimately used in the form of CO<sub>2</sub><sup>38,69</sup>. Here we observed the down-regulation at high and low temperatures in day and night of the four forms of carbonic anhydrase analyzed here



**Figure 4.** Mean daytime gene expression (n = 6) plotted relative to the night (log<sub>10</sub> transformation): (A) 17°C, (B) 25°C, and (C) 32°C. Asterisks indicate statistical difference (p < 0.05) with night time conditions. Negative values indicate downregulation and positive values upregulation. Standard deviation error bars and means (not log transformed) are given in the supplementary material.

(SpisCA1-4). Three of these CAs have been previously localized, including the SpisCA1 gene which is localized to the calcifying calciblastic cell layer<sup>40</sup>, and SpisCA2 and SpisCA3 which are present in oral endoderm and aboral tissue (including the calciblastic layer)<sup>70,71</sup>. Additionally, SpisCA2 protein has also been shown to be incorporated in the coral skeleton<sup>72</sup>. The core group also included representatives of two families of bicarbonate transporters SpisSLC26β and SpisSLC4γ<sup>41</sup> for which there is also localization data from previous work. The bicarbonate transporter SpisSLC4γ has also been localized to the calciblastic cells and is known to be specific to calcifying cnidarians<sup>41</sup>, and SpisSLC26β appears to be expressed ubiquitously in coral tissues including the calcifying cells<sup>41</sup>.

Overall our results are consistent with several previous studies on thermal stress in corals which have also observed downregulation of DIC-related genes at elevated temperature, including carbonic anhydrases in various coral species<sup>15,17,18,24</sup> and a SLC26 gene in the coral *Porites astreoides*<sup>17</sup>. This previous work on thermal stress observed downregulation of DIC transport related genes solely at elevated temperature without taking into account the interaction of light. Here, our study shows that downregulation of genes involved in DIC transport associated with declines in calcification occurs at both low and high temperatures and also in day and nighttime conditions. Our results suggest that temperature-driven downregulation of DIC-related genes is largely independent of photosynthesis (which displayed low rates at 17°C and was absent at night). Instead, our findings suggest that this response is associated with depressed rates of respiration which occur at both cold and warm ends of the TPC. Considering that several of the genes we analysed are localized to the calciblastic layer (e.g. SpisSLC4γ), and that a large proportion of DIC used in calcification comes from metabolism<sup>33,38</sup>, our results may indicate disruption of the supply of DIC from respiration in the calcifying cells to the ECM. Further research is required to explore this possibility.

**Gene expression associated with an interaction of temperature and daytime conditions.** A more diverse group of genes was associated with elevated temperature (32°C) and daytime conditions and coincided with increased daytime calcification and respiration rates relative to the night and relative to 17°C. These

Gene	NIGHT		DAY		Function	
	17°C	32°C	17°C	32°C		
SpisSLC4e	↗	↗	↗	↗	DIC transport	
SpisSLC4γ	↘	↘	↘	↘		
SpisSLC26β	↘	↘	↘	↘		
SpisCA1	↘	↘	↘	↘		
SpisCA3	↘	↘	↘	↘		
SpisCA2	↘	↘	↘	↘		
SpisCA4	↘	↘	↘	↘		
SpisSLC4β	—	↗	—	↗		
SpisSLC26γ	—	↗	—	↗		
SpisSLC26α	—	↗	—	↗		
SpisSLC4δ	—	↘	↘	↘		
Ca <sup>2+</sup> channel	↘	—	—	↗		Ca <sup>2+</sup> transport
PMCA1	—	—	—	—		
PMCA2	—	—	—	—	H <sup>+</sup> transport	
PMCA3	↘	↘	—	↗		
NHE	—	—	—	↗		
V-ATPase	—	—	—	—		

**Table 1.** Summary of statistically significant differences in gene expression at 17°C and 32°C compared to 25°C during night and day (Fig. 3) determined by three-way ANOVA and posthoc analysis. Black arrows represent significant increase or decrease in expression relative to 25°C ( $p < 0.05$ ). Grey arrows represent trends relative to 25°C (i.e.  $p < 0.1$ ).

Gene	DAY			Function	
	17°C	25°C	32°C		
SpisSLC4e	—	—	—	DIC transport	
SpisSLC4γ	—	—	—		
SpisSLC26β	—	↗	↗		
SpisCA1	—	↗	—		
SpisCA3	—	↗	—		
SpisCA2	—	↗	↗		
SpisCA4	—	↗	↗		
SpisSLC4β	—	—	—		
SpisSLC26γ	—	—	—		
SpisSLC26α	—	—	↗		
SpisSLC4δ	—	—	—		
Ca <sup>2+</sup> channel	—	—	—		Ca <sup>2+</sup> transport
PMCA1	—	—	—		
PMCA2	—	—	—	H <sup>+</sup> transport	
PMCA3	—	↘	↗		
NHE	—	—	↗		
V-ATPase	—	—	—		

**Table 2.** Summary of statistically significant differences in gene expression at 17°C, 25°C and 32°C during the day compared to the night (Fig. 4) determined by three-way ANOVA and posthoc analysis. Black arrows represent significant increase or decrease in expression relative to the night (i.e.  $p < 0.05$ ).

genes did not respond to day and night at 17°C. This group included the upregulation of genes from all three ion transport process considered here i.e. DIC transport (e.g. SpisSLC26α, SpisSLC26β and SpisCA2 and SpisCA4), calcium transport and pH regulation (e.g. PMCA3 and the sodium proton exchanger NHE). It was notable that the carbonic anhydrase genes SpisCA2 and SpisCA4 were upregulated in the light, as previous investigations have also observed upregulation of carbonic anhydrases associated with light enhanced calcification<sup>73,74</sup>.

Overall this diverse group of genes suggests DIC, proton and calcium transport are all involved in a complex response specifically linked to elevated temperature stress and its interaction with light. Indeed, these genes may be linked to processes that are involved in keeping light calcification at higher rates at elevated temperature 32°C than at 17°C. This raises the possibility that at either extremes of the TPC the carbonate chemistry of the ECM is distinctly different. This possibility is supported by previous work on isotope signatures in skeletal chemistry, which indicates that increases in temperature can affect ECM chemistry through changes in both pH and DIC concentration<sup>35,75</sup>.

**Consequences of bleaching for calcification and ion transport.** In the daytime at 32 °C, the photosynthetic rates per cm<sup>2</sup> of coral colony were shaped simultaneously by a loss of symbiotic dinoflagellates together with thermally-driven increase in photosynthetic oxygen production rates. This runs contrary to the idea that mechanisms of bleaching at elevated temperature frequently begin with declines in symbiont photosynthetic efficiency<sup>7,76</sup>, but this observation is not inconsistent with previous research, as bleaching has also been suggested to begin with cellular dysfunction at the level of the mitochondria in the coral host<sup>14,77</sup>. Furthermore, in certain cases symbiotic dinoflagellates that have been expelled from the coral host during bleaching, can still be photosynthetically competent, indicating that bleaching may occur through dysfunction of the symbiosis rather than the dinoflagellates themselves<sup>78</sup>. In the context of the current study, we were interested in what this meant for calcification and its associated ion transport. Regardless of whether photosynthetic rates changed *per se* or by decreases in symbiont density, it may have amounted to a similar effect on ion transport for calcification. Indeed, a lower photosynthetic rate per unit of surface area of coral colony may have resulted in less of a pH increase in the coelenteron with a less favorable gradient for pH regulation of the ECM, together with less energy for calcification<sup>50,52,79</sup>. On the other hand, we cannot exclude the possibility that at both higher and lower temperatures the bleaching process may have involved cellular stress mechanisms including oxidative damage<sup>80–82</sup>, that impaired the molecular machinery involved in calcification<sup>14</sup>. Another possibility is that loss of algal symbionts could have reduced the supply of organic matrix precursor compounds that are known to be produced by the algae and are important in calcification<sup>83</sup>. Further research is needed to investigate these possibilities.

**Conclusions and perspectives for future research.** Recent years have seen a succession of thermal stress events that underscore the vulnerability of corals and coral reef ecosystems to climate change<sup>84</sup>. In response, the field of coral research has begun to more actively explore interventions that could be used to enhance the physiological resilience of corals and their capacity to withstand environmental change. Approaches including assisted gene flow between coral populations, assisted evolution and synthetic biology are receiving attention as possible means to manipulate coral physiology to enhance coral survivorship and reproductive success in a rapidly changing ocean<sup>20,21,85</sup>. Putting aside the feasibility and risks of these approaches, their development would benefit from a deeper and more comprehensive understanding of coral physiology at molecular, cellular and organismal levels, and studies such as the current one are becoming more valuable in this context. Rigorously controlled experimental conditions like those used here, do not simulate natural environmental thermal stress, but instead they exclude the covariation of multiple environmental parameters allowing mechanisms to be deciphered that would otherwise be masked by physiological noise. Furthermore, mechanistic studies such as the current one that attempt to align patterns of gene expression with physiology, may highlight certain molecular pathways linked to coral resilience that could later become targets for further investigations using gene editing techniques such as CRISPR/Cas9<sup>85,86</sup>.

The current study was limited to a small set of genes linked to ion transport and in reality these genes operate in the context of a network interacting with higher levels of biological organization that we could not account for. Furthermore, we limited our study to coral host genes and did not consider molecular responses of the symbiotic dinoflagellates, which would be an interesting avenue for future research. Despite these limitations, we observed a remarkable degree of coherence with the global patterns of ion transporter gene expression with the physiological response of *S. pistillata*, suggesting that ion transport mechanisms are involved in the thermal sensitivity of this coral. More specifically, we observed a core response of a set of genes linked to DIC transport under conditions of declines in calcification at both high and low temperatures, concomitant with changes in respiration. Secondly, we observed that the combined effects of elevated temperature and light on calcification coincided with the differential expression of genes linked to calcium, H<sup>+</sup> in addition to DIC transport. Further research needs to be carried out to understand the significance of these observations. One possibility to investigate is that the temperature and light-driven gene expression profiles we observed here point to changes in ion transport to the extracellular calcifying medium (ECM), which could result in changes in ECM composition with knock-on effects to calcification rate. This possibility is supported by previous geochemical investigations of the coral skeleton which indicate that temperature may be an important factor influencing ECM composition<sup>75</sup>. Follow-up work to the current study could employ recently developed *in vivo* approaches<sup>30,34,87</sup> to characterize the effects of temperature on pH, and DIC and calcium concentrations in the ECM in living corals. Research of this kind may prove fruitful for a better understanding of the vulnerability and resilience of corals facing a rapidly changing ocean environment.

Received: 14 June 2019; Accepted: 21 October 2019;

Published online: 10 December 2019

## References

1. Kleypas, J. A. *et al.* Geochemical Consequences of Increased Atmospheric Carbon Dioxide on Coral Reefs. *Science* **284**, 118–120 (1999).
2. Hoegh-Guldberg, O. *et al.* Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* **318**, 1737–1742 (2007).
3. Wild, C. *et al.* Climate change impedes scleractinian corals as primary reef ecosystem engineers. *Mar. Freshw. Res.* **62**, 205 (2011).
4. Kornder, N. A., Riegl, B. M. & Figueiredo, J. Thresholds and drivers of coral calcification responses to climate change. *Glob. Chang. Biol.* **24**, 5084–5095 (2018).
5. Douglas, A. E. Coral bleaching—how and why? *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 385–392 (2003).
6. Weis, V. M., Davy, S. K., Hoegh-Guldberg, O., Rodriguez-Lanetty, M. & Pringle, J. R. Cell biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends Ecol. Evol.*, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.004> (2008).
7. Oakley, C. A. & Davy, S. K. Cell Biology of Coral Bleaching. In *Coral Bleaching* (eds. van Oppen, M. & Lough, J.) 189–211, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75393-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75393-5_8) (Springer Netherlands, 2018).
8. Jokiel, P. L. & Coles, S. L. Effects of temperature on the mortality and growth of Hawaiian reef corals. *Mar. Biol.* **43**, 201–208 (1977).
9. De'ath, G., Lough, J. & Fabricius, K. Declining coral calcification on the Great Barrier Reef. *Science* **342**, 559 (2013).

10. Cantin, N. E., Cohen, A. L., Karnauskas, K. B., Tarrant, A. M. & McCorkle, D. C. Ocean Warming Slows Coral Growth in the Central Red Sea. *Science* **329**, 322–325 (2010).
11. Carricart-Ganivet, J. P., Cabanillas-Terán, N., Cruz-Ortega, I. & Blanchon, P. Sensitivity of Calcification to Thermal Stress Varies among Genera of Massive Reef-Building Corals. *PLoS One* **7**, e32859 (2012).
12. Lough, J. M. & Cantin, N. E. Perspectives on Massive Coral Growth Rates in a Changing Ocean. *Biol. Bull.* **226**, 187–202 (2014).
13. Edge, S. E., Morgan, M. B., Gleason, D. F. & Snell, T. W. Development of a coral cDNA array to examine gene expression profiles in *Montastraea faveolata* exposed to environmental stress. *Mar. Pollut. Bull.* **51**, 507–523 (2005).
14. DeSalvo, M. *et al.* Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular Ecology* **17**, 3952–71 (2008).
15. Rodriguez-Lanetty, M., Harii, S. & Hoegh-Guldberg, O. Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress. *Mol. Ecol.* **18**, 5101–5114 (2009).
16. DeSalvo, M. K., Estrada, A., Sunagawa, S. & Medina, M. Transcriptomic responses to darkness stress point to common coral bleaching mechanisms. *Coral Reefs* **31**, 215–228 (2012).
17. Kenkel, C. D., Meyer, E. & Matz, M. V. Gene expression under chronic heat stress in populations of the mustard hill coral (*Porites astreoides*) from different thermal environments. *Mol. Ecol.* **22**, 4322–4334 (2013).
18. Maor-Landaw, K. *et al.* Gene expression profiles during short-term heat stress in the red sea coral *Stylophora pistillata*. *Glob. Chang. Biol.* **20**, 3026–3035 (2014).
19. Palumbi, S. R., Barshis, D. J., Traylor-Knowles, N. & Bay, R. A. Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science* **344**, 895–898 (2014).
20. van Oppen, M. J. H., Oliver, J. K., Putnam, H. M. & Gates, R. D. Building coral reef resilience through assisted evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 2307–2313 (2015).
21. Anthony, K. *et al.* New interventions are needed to save coral reefs. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 1420–1422 (2017).
22. Rocker, M. M. *et al.* Expression of calcification and metabolism-related genes in response to elevated pCO<sub>2</sub> and temperature in the reef-building coral *Acropora millepora*. *Mar. Genomics* **24**, 313–318 (2015).
23. Kaniewska, P. *et al.* Major Cellular and Physiological Impacts of Ocean Acidification on a Reef Building Coral. *PLoS One* **7**, e34659 (2012).
24. Meyer, E., Aglyamova, G. V. & Matz, M. V. Profiling gene expression responses of coral larvae (*Acropora millepora*) to elevated temperature and settlement inducers using a novel RNA-Seq procedure. *Mol. Ecol.* **20**, 3599–616 (2011).
25. Louis, Y. D., Bhagooli, R., Kenkel, C. D., Baker, A. C. & Dyllal, S. D. Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: Promises and limitations. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **191**, 63–77 (2017).
26. Weis, V. M. & Allemand, D. What Determines Coral Health? *Science* **324**, 1153–1155 (2009).
27. Allemand, D., Tambutté, E., Zoccola, D. & Tambutté, S. Coral Calcification, Cells to Reefs. in *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition* 119–150, [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4_9) (Springer Netherlands, 2011).
28. Tambutté, S. *et al.* Coral biomineralization: From the gene to the environment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **408**, 58–78 (2011).
29. Ries, J. B. A physicochemical framework for interpreting the biological calcification response to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification. *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 4053–4064 (2011).
30. Venn, A., Tambutté, E., Holcomb, M., Allemand, D. & Tambutté, S. Live Tissue Imaging Shows Reef Corals Elevate pH under Their Calcifying Tissue Relative to Seawater. *PLoS One* **6**, e20013 (2011).
31. McCulloch, M., Falter, J., Trotter, J. & Montagna, P. Coral resilience to ocean acidification and global warming through pH up-regulation. *Nat. Clim. Chang.* **2**, 623–627 (2012).
32. Decarlo, T. M., Comeau, S., Cornwall, C. E. & McCulloch, M. T. Coral resistance to ocean acidification linked to increased calcium at the site of calcification. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, 20180564 (2018).
33. Allison, N., Cohen, I., Finch, A. A., Erez, J. & Tudhope, A. W. Corals concentrate dissolved inorganic carbon to facilitate calcification. *Nat. Commun.* **5**, 5741 (2014).
34. Sevilgen, D. S. *et al.* Full *in vivo* characterization of carbonate chemistry at the site of calcification in corals. *Sci. Adv.* **5**, eaau7447 (2019).
35. DeCarlo, T. M. *et al.* Coral calcifying fluid aragonite saturation states derived from Raman spectroscopy. *Biogeosciences* **14**, 5253–5269 (2017).
36. Barott, K. L., Perez, S. O., Linsmayer, L. B. & Tresguerres, M. Differential localization of ion transporters suggests distinct cellular mechanisms for calcification and photosynthesis between two coral species. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **309**, R235–R246 (2015).
37. Tambutté, E., Allemand, M. & Jaubert, A. A compartmental approach to the mechanism of calcification in hermatypic corals. *J. Exp. Biol.* 1029–1041 (1996).
38. Furla, P., Galgani, I., Durand, I. & Allemand, D. Carbon sources for coral calcification and photosynthesis. *J. Exp. Biol.* **203**, 3445–3457 (2000).
39. Zoccola, D. *et al.* Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2004.02.010> (2004).
40. Moya, A. *et al.* Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Characterization, localization, and role in biomineralization. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M804726200> (2008).
41. Zoccola, D. *et al.* Bicarbonate transporters in corals point towards a key step in the evolution of cnidarian calcification. *Sci. Rep.* **5**, 9983 (2015).
42. Zoccola, D. *et al.* Cloning of a calcium channel  $\alpha 1$  subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Gene* **227**, 157–167 (1999).
43. Tambutté, S., Tambutté, E., Zoccola, D. & Allemand, D. Organic Matrix and Biomineralization of Scleractinian Corals. In *Handbook of Biomineralization* 243–259, <https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch14> (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006).
44. Mass, T., Drake, J. L., Heddlestone, J. M. & Falkowski, P. G. Nanoscale Visualization of Biomineral Formation in Coral Proto-Polyps. *Curr. Biol.* **27**, 3191–3196.e3 (2017).
45. Mass, T. *et al.* Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E7670–E7678 (2017).
46. Von Euw, S. *et al.* Biological control of aragonite formation in stony corals. *Science* **356**, 933–938 (2017).
47. Akiva, A. *et al.* Minerals in the pre-settled coral *Stylophora pistillata* crystallize via protein and ion changes. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04285-7> (2018).
48. DeCarlo, T. M. Characterizing coral skeleton mineralogy with Raman spectroscopy. *Nat. Commun.* **9**, 5325 (2018).
49. Gattuso, J., Allemand, D. & Frankignoulle, M. Photosynthesis and Calcification at Cellular, Organismal and Community Levels in Coral Reefs: A Review on Interactions and Control by Carbonate Chemistry. *Am. Zool.* **39**, 160–183 (1999).
50. Goreau, T. The physiology of skeleton formation in corals. I. A method for measuring the rate of calcium deposition by corals under different conditions. *Biol. Bull.* 59–75, <https://doi.org/10.2307/1539156> (1959).
51. Pearce, V. B. & Muscatine, L. Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biol. Bull.* **36**, 157–170 (1971).
52. Al-Horani, F. A., Al-Moghrabi, S. M. & de Beer, D. The mechanism of calcification and its relation to photosynthesis and respiration in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Mar. Biol.* **142**, 419–426 (2003).
53. Holcomb, M., Tambutté, E., Allemand, D. & Tambutté, S. Light enhanced calcification in *Stylophora pistillata*: effects of glucose, glycerol and oxygen. *PeerJ* **2**, e375 (2014).

54. Karako-Lampert, S. *et al.* Transcriptome Analysis of the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*. *PLoS One* **9**, e88615 (2014).
55. Voolstra, C. R. *et al.* Comparative analysis of the genomes of *Stylophora pistillata* and *Acropora digitifera* provides evidence for extensive differences between species of corals. *Sci. Rep.* **7**, 17583 (2017).
56. Chisholm, J. R. M. & Gattuso, J.-P. Validation of the alkalinity anomaly technique for investigating calcification of photosynthesis in coral reef communities. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.6.1232> (1991).
57. Naumann, M. S., Niggli, W., Laforsch, C., Glaser, C. & Wild, C. Coral surface area quantification—evaluation of established techniques by comparison with computer tomography. *Coral Reefs* **28**, 109–117 (2009).
58. Veal, C. J., Carmi, M., Fine, M. & Hoegh-Guldberg, O. Increasing the accuracy of surface area estimation using single wax dipping of coral fragments. *Coral Reefs* **29**, 893–897 (2010).
59. Hellemans, J., Mortier, G., De Paep, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19 (2008).
60. Burton, E. A. & Walter, L. M. Relative precipitation rates of aragonite and Mg calcite from seawater: Temperature or carbonate ion control? *Geology* **15**, 111 (1987).
61. Castillo, K. D., Ries, J. B., Bruno, J. F. & Westfield, I. T. The reef-building coral *Siderastrea siderea* exhibits parabolic responses to ocean acidification and warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**, 20141856–20141856 (2014).
62. Aichelman, H. E., Zimmerman, R. C. & Barshis, D. J. Adaptive signatures in thermal performance of the temperate coral *Astrangia poculata*. *J. Exp. Biol.* **222**, jeb189225 (2019).
63. Marshall, A. T. & Clode, P. Calcification rate and the effect of temperature in a zooxanthellate and an azooxanthellate scleractinian reef coral. *Coral Reefs* **23**, 218–224 (2004).
64. Clausen, C. D. & Roth, A. A. Effect of temperature and temperature adaptation on calcification rate in the hermatypic coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol.* **33**, 93–100 (1975).
65. Huey, R. B. & Stevenson, R. D. Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches. *Am. Zool.* **19**, 357–366 (1979).
66. Portner, H. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **132**, 739–761 (2002).
67. Takagi, Y., Matsuda, H., Taniguchi, Y. & Iwaisaki, H. Predicting the Phenotypic Values of Physiological Traits Using SNP Genotype and Gene Expression Data in Mice. *PLoS One* **9**, e115532 (2014).
68. Ober, U. *et al.* Using Whole-Genome Sequence Data to Predict Quantitative Trait Phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **8**, e1002685 (2012).
69. Furla, P. *et al.* The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 595–604 (2005).
70. Bertucci, A., Tambutté, S., Supuran, C. T., Allemand, D. & Zoccola, D. A New Coral Carbonic Anhydrase in *Stylophora pistillata*. *Mar. Biotechnol.* **13**, 992–1002 (2011).
71. Del Prete, S. *et al.* Comparison of the Anion Inhibition Profiles of the  $\alpha$ -CA Isoforms (SpiCA1, SpiCA2 and SpiCA3) from the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2128 (2018).
72. Drake, J. L. *et al.* Proteomic analysis of skeletal organic matrix from the stony coral *Stylophora pistillata*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3788–3793 (2013).
73. Ruiz-Jones, L. J. & Palumbi, S. R. Transcriptome-wide Changes in Coral Gene Expression at Noon and Midnight Under Field Conditions. *Biol. Bull.* **228**, 227–241 (2015).
74. Hemond, E. M. & Vollmer, S. V. Diurnal and nocturnal transcriptomic variation in the Caribbean staghorn coral, *Acropora cervicornis*. *Mol. Ecol.* **24**, 4460–4473 (2015).
75. McCulloch, M. T., D'Olive, J. P., Falter, J., Holcomb, M. & Trotter, J. A. Coral calcification in a changing World and the interactive dynamics of pH and DIC upregulation. *Nat. Commun.* **8**, 15686 (2017).
76. Venn, A. A., Loram, J. E. & Douglas, A. E. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* **59**, 1069–1080 (2008).
77. Weis, V. M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* **211**, 3059–3066 (2008).
78. Ralph, P., Gademann, R. & Larkum, A. Zooxanthellae expelled from bleached corals at 33°C are photosynthetically competent. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **220**, 163–168 (2001).
79. Allemand, D., Tambutté, E., Zoccola, D. & Tambutté, S. Coral Calcification, Cells to Reefs. in *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition* 119–150, [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4_9) (Springer Netherlands, 2011).
80. Lesser, M. P. Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* **16**, 187–192 (1997).
81. Downs, C. *et al.* Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 533–543 (2002).
82. Nielsen, D. A., Petrou, K. & Gates, R. D. Coral bleaching from a single cell perspective. *ISME J.*, <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0080-6> (2018).
83. Muscatine, L. *et al.* Stable isotopes ( $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ ) of organic matrix from coral skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1525–1530 (2005).
84. Hughes, T. P. *et al.* Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* **543**, 373–377 (2017).
85. Cleves, P. A., Strader, M. E., Bay, L. K., Pringle, J. R. & Matz, M. V. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in a reef-building coral. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 5235–5240 (2018).
86. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096–1258096 (2014).
87. DeCarlo, T. M. *et al.* Investigating marine bio-calcification mechanisms in a changing ocean with *in vivo* and high-resolution *ex vivo* Raman spectroscopy. *Glob. Chang. Biol.* **25**, 1877–1888 (2019).

### Acknowledgements

This research was funded by the Government of the Principality of Monaco. We thank Dominique Desgre for assistance with coral culture and Eric Elia for technical assistance. We also thank Eric Wajnberg for his advice in statistics.

### Author contributions

C.B., S.T., E.T. and A.A.V. designed and conceived the experiments. C.B., E.T. and N.T. performed the experiments. C.B., S.T., E.T. and A.A.V. analyzed data and wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54814-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.A.V.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary information

**Ion transporter gene expression is linked to the thermal sensitivity  
of calcification in the reef coral *Stylophora pistillata***

**Bernardet C<sup>1,2</sup>, Tambutté E<sup>1</sup>, Techer N<sup>1</sup>, Tambutté S<sup>1</sup> and Venn AA<sup>1\*</sup>**

1. Centre Scientifique de Monaco, Marine Biology Department, 8 Quai Antoine 1<sup>er</sup>,  
Monaco 98000
2. Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France

\*Corresponding authors email: [avenn@centrescientifique.mc](mailto:avenn@centrescientifique.mc)

Telephone: + 377 97 77 44 72

Supplementary Table 1. List of *S. pistillata* ion transport genes with RT-PCR primers and product size. Further information can be obtained from the Cnidarian Database [www.data.centrescientifique.mc](http://www.data.centrescientifique.mc) (Karako Lampert et al. 2014).

Target gene	Reference	Real-time PCR primers		Product size	
Ca <sup>2+</sup> channel	Zoccola <i>et al.</i> (1999)	F	TGCTACAAGATCGCCACCAACAC	82 pb	
		R	TCAGCCGCCAGCAGAATACTACTC		
NHE	Capasso <i>et al.</i> (in prep)	F	TCATTCTCCTTGGCTGTTTTACTG	138 pb	
		R	CATGAAGAATCCGCACAAGAGGTT		
PMCA1	Zoccola <i>et al.</i> (2004)	F	CCAAAACCTCCAAAACCTTCCT	131 pb	
		R	GACCCCTCGCAATCCTCTGG		
PMCA2	Wang <i>et al.</i> (in prep)	F	GTAAGTGGCAAGAGCAACACC	125 pb	
		R	AAGACTGGCCATCATTAGC		
PMCA3	Wang <i>et al.</i> (in prep)	F	TCACTGGAGATCCGCGTTTTTACA	140 pb	
		R	ACCGGTTTGCTTTGGGAGACATT		
SpisSLC4β	Zoccola <i>et al.</i> (2015)	F	CCAATGTTGCGTTCGGTAGTCTTT	143 pb	
		R	GCCCTGTAGCGCCAATAATAATCA		
SpisSLC4γ		F	CTTGAGGGCTGTTTCTTGAT	152 pb	
		R	TATTTCCGCTCCCTACCCTGTTC		
SpisSLC4δ		F	TCTTGCTGGTGAATTGGTGGAGT	150 pb	
		R	TAAACGGAATGGCATGTAGTCAAG		
SpisSLC4ε		F	GGCTGCCTACCCACCAAACCA	113 pb	
		R	GGGGCAAATCCAAATCCACATAG		
SpisSLC26α		F	GCGAAATTTCTGCCATCTA	133 pb	
		R	TCGCCACGGTTATCCCTCTGTCTA		
SpisSLC26β		F	CATCGCGGCACTGTCTGTAG	159 pb	
		R	GTCCATAACGCGGTGCCTTCTGTG		
SpisSLC26γ		F	GATTGCCGCGTCATTTCACTG	131 pb	
		R	ATTCCTGCATTTCCCTGTAA		
SpisCA1		Moya <i>et al.</i> (2008)	F	GGAGGGACCCGACACGTGGAA	110 pb
			R	AGTCGGCAAGTCCCGGTTTCG	
SpisCA2		Bertucci <i>et al.</i> (2011)	F	TGCGGCCGAGTGACTGGAGA	91 pb
			R	CGCCACTGAGTTTAGCGCCTCC	
SpisCA3		Del Prete <i>et al.</i> (2018)	F	TGGCTCTGGTGGCCAAATGGT	136 pb
			R	TGCTGGGCACGGTGACAGAGGT	
SpisCA4	Le Goff <i>et al.</i> 2016	F	GGTGCCGCTTGTTCAGCGCA	87 pb	
		R	TCCGGTTGCGCATGTCCCTGT		
V-ATPase	Capasso <i>et al.</i> (in prep)	F	GAGGAGTTTGATTTGGGGAAGTA	97 pb	
		R	AGTCGCAAATAAGAGGCTGTGTT		
L22	Karako Lampert <i>et al.</i> 2014	F	TGATGTGTCCATTGATCGTC	137 pb	
		R	CATAGGTAGCTTGTGCAGATG		
36B4	Moya <i>et al.</i> , 2008	F	AACAAGGTGGCAGCCCCAGC	91 pb	
		R	GTCTTCTCGGACCCAGGCCA		

Supplementary Table 2. Results of two-way ANOVA tests on the effect of temperature and day/night on calcification and respiration rates (Figure 1A and B) and the results of one-way ANOVA tests on the effect of temperature on photosynthetic rate (Figure 1C) and symbiont density (Figure 1D).

Variable	Effect	df	F	P	Post-hoc
Calcification rate	Temperature	9, 118	70.203	< 0.00001	See table S3
	Time	1, 118	285.72	< 0.00001	See table S3
	Temperature x Time	9, 118	7.386	< 0.00001	See table S3
Respiration rate	Temperature	9, 124	36.381	< 0.00001	See table S4
	Time	1, 124	115.537	< 0.00001	See table S4
	Temperature x Time	9, 124	2.292	< 0.05	See table S4
Photosynthetic rate	Temperature	9, 62	18.72	< 0.00001	21,23,25,27,29,31 > 21,27,19,32 > 17,33
Symbiont density	Temperature	4, 10	11.14	< 0.001	25°C ≥ 31°C ≥ 19°C > 17°C, 32°C

Supplementary Table 3. Results of post-hoc pairwise t tests on calcification rate. Letters (x and y) indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ) with respect to 25 °C, and between night and day.

Temperature	Time	25°C		Difference between night / day
		Night	Day	
17°C	Night	x		-
	Day		x	
19°C	Night	-		-
	Day		x	
21°C	Night	-		y
	Day		x	
23°C	Night	-		y
	Day		x	
27°C	Night	-		y
	Day		-	
29°C	Night	-		y
	Day		x	
31°C	Night	-		y
	Day		-	
32°C	Night	x		y

	Day		x	
33°C	Night	x		y
	Day		x	

Supplementary Table 4. Results of post-hoc pairwise t tests on respiration rate. Letters (x and y) indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ) with respect to 25 °C, and between night and day.

Temperature	Time	25°C		Difference between night / day
		Night	Day	
17°C	Night	x		-
	Day		x	
19°C	Night	x		-
	Day		x	
21°C	Night	x		y
	Day		x	
23°C	Night	x		y
	Day		-	
27°C	Night	-		y
	Day		-	
29°C	Night	-		y
	Day		-	
31°C	Night	-		y
	Day		-	
32°C	Night	x		y
	Day		x	
33°C	Night	x		y
	Day		x	

Supplementary Table 5. Eigen values from descriptive discriminant analysis of transcellular transporter genes

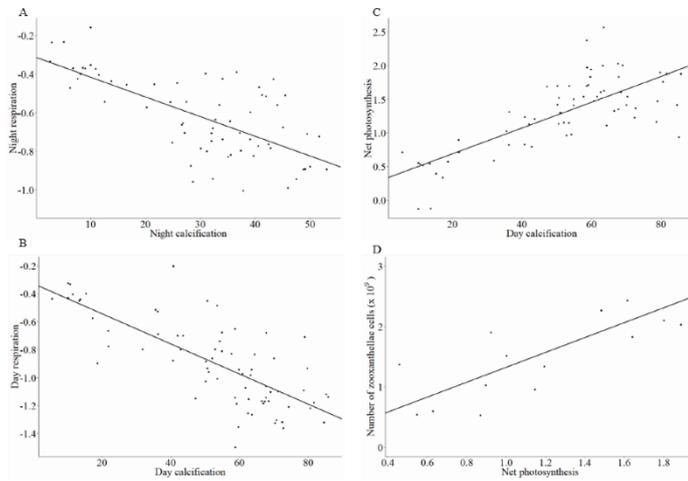
	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
Eigen values	0.967	0.95	0.905	0.776	0.419
Proportion	<b>24.081</b>	<b>23.638</b>	<b>22.536</b>	19.313	10.434
Cumulative Proportion	<b>24.081</b>	<b>47.718</b>	<b>70.254</b>	89.566	100

Supplementary Table 6. Discriminant variables from descriptive discriminant analysis of transcellular transporter genes

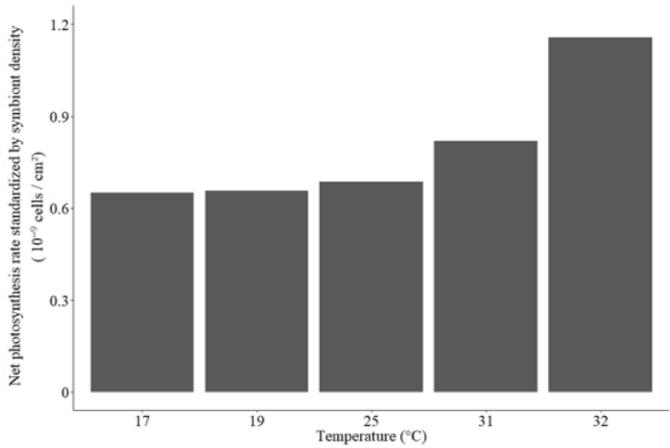
	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
Ca <sup>2+</sup> channel	-1.25174	-0.50275	0.82883	0.92	1.50667
PMCA1	1.49177	2.30532	-2.37027	0.7289	-3.0821
PMCA2	0.84803	0.53783	2.229	-2.0158	-4.70668
PMCA3	-0.412	0.39785	1.07867	-0.6077	1.01399
NHE	-2.04806	-1.61509	-0.80468	-1.4671	-0.78038
SpisSLC4 $\beta$	0.13748	0.39	-0.57168	1.2192	-3.02595
SpisSLC4 $\gamma$	-0.1545	-0.51738	0.27089	3.0924	1.27347
SpisSLC4 $\delta$	0.55733	0.26041	0.22834	-1.1867	-1.45829
SpisSLC4e	0.61186	-0.91709	0.16733	-1.0479	4.7902
SpisSLC4 $\epsilon$	0.14967	-0.02118	-1.00771	1.0861	-1.40355
SpisSLC26b	-0.02647	0.06913	-0.23149	0.1728	0.12823
SpisSLC4 $\epsilon$	-0.41848	-0.03035	0.69804	0.9642	-0.71527
SpisCA1	-0.58458	-0.50437	1.3165	-2.7138	-0.08673
SpisCA2	0.19726	0.62296	-0.3189	0.2463	-1.87507
SpisCA3	0.77479	0.93835	-1.31863	1.9029	0.03303
SpisCA4	-1.0053	-0.57662	0.2773	-1.0983	1.76961
V-ATPase	0.23082	-1.08646	0.07618	-1.0984	6.54858

Supplementary Table 7. Results of three-way ANOVA tests on the effect of temperature (17, 25 and 32°C), time of day (day/nighttime) and gene identity on relative gene expressions (Figures 3 and 4 in main manuscript). Results of posthoc tests are given in main manuscript in Tables 1 and 2.

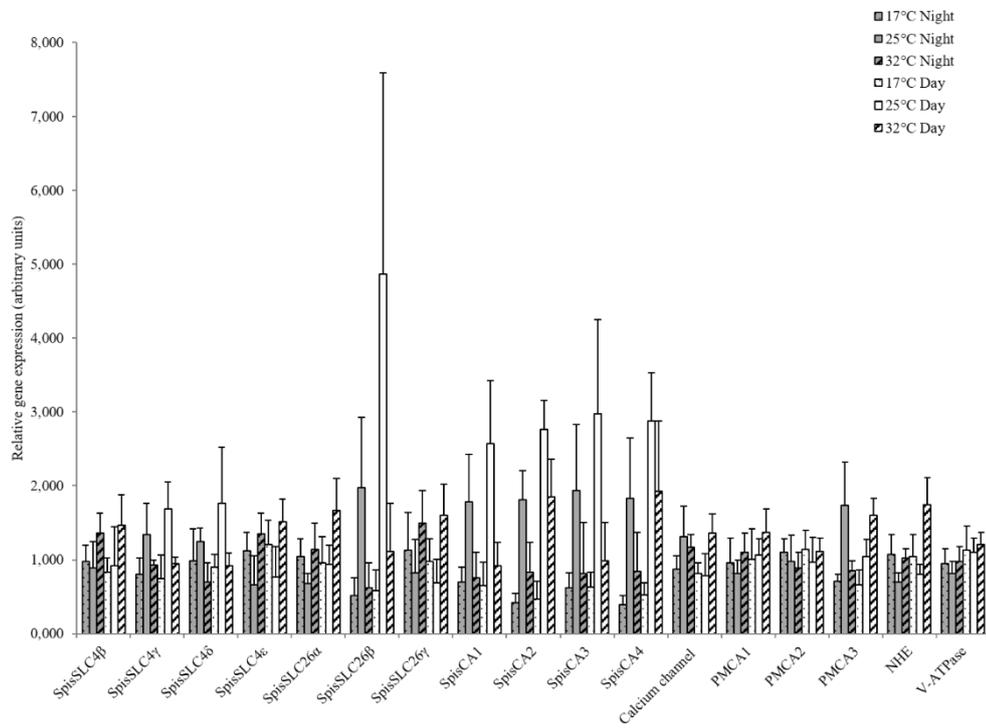
Variable	Effect	df	F	P
gene expression	Temperature	2, 510	85.8017	< 0,00001
	Time	1, 510	46.8169	< 0,00001
	Genes	16, 510	4.1862	< 0,00001
	Temperature*Time	2, 510	12.3359	< 0,00001
	Temperature*Genes	32, 510	16.9948	< 0,00001
	Time*Genes	16, 510	4.0744	< 0,00001
	Temperature*Time*Genes	32, 510	2.8592	< 0,00001



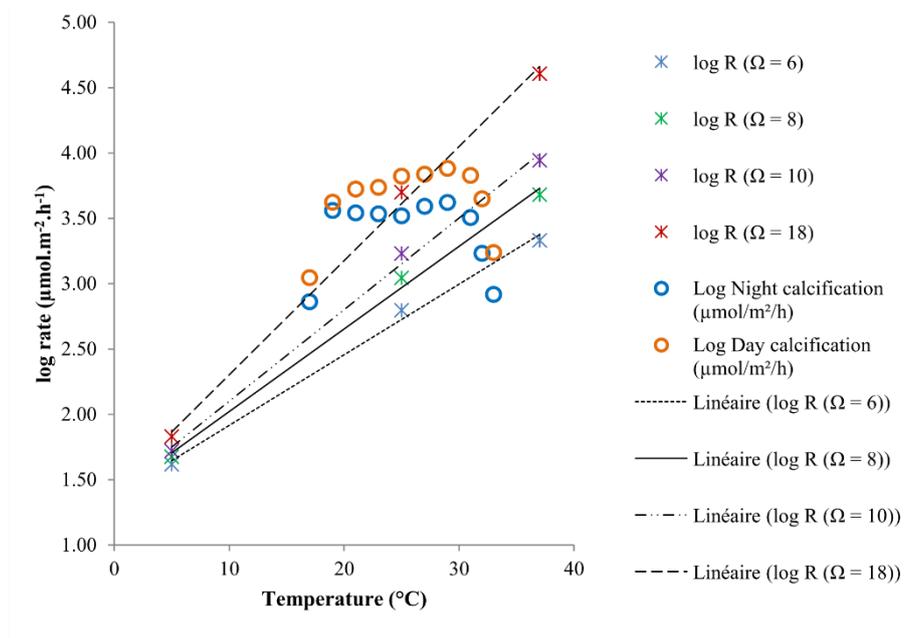
Supplementary Figure 1. Correlation of (A) night respiration to night calcification ( $p = 1.6 \cdot 10^{-10}$  and  $R^2 = 0.47$ ), (B) day respiration to day calcification ( $p = 3.1 \cdot 10^{-14}$  and  $R^2 = 0.56$ ), (C) net photosynthesis to day calcification ( $p = 3.1 \cdot 10^{-13}$  and  $R^2 = 0.56$ ), (D) symbiont density to net photosynthesis ( $p = 4.4 \cdot 10^{-4}$  and  $R^2 = 0.60$ ).



Supplementary Figure 2. Photosynthetic rate normalized to symbiont density.



Supplementary Figure 3. Gene expression (mean  $\pm$ SD) of ion transport genes relative to geometric mean of expression of the reference genes L22 and 36B4. The same data is presented in the main manuscript as log10 transformation plots in Figure 3 and 4 relative to 25°C and nighttime.



Supplementary Figure 4. Abiotic precipitation rate of aragonite as a function of aragonite saturation state at 5°C, 25°C and 37°C in seawater (modified from Burton and Walter, 1987), and precipitation rate of aragonite in *S. pistillata* from 17°C to 33°C during night (blue circles) and day (orange circles).

## References

- Bertucci A, Tambutté S, Supuran CT, Allemand D, Zoccola D (2011) A New Coral Carbonic Anhydrase in *Stylophora pistillata*. *Marine Biotechnology*, **13**, 992–1002.
- Del Prete S, Bua S, Zoccola D et al. (2018) Comparison of the Anion Inhibition Profiles of the  $\alpha$ -CA Isoforms (SpiCA1, SpiCA2 and SpiCA3) from the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 2128.
- Le Goff C, Ganot P, Zoccola D, Caminiti-Segonds N., Allemand D, and Tambutté S. (2016). Carbonic Anhydrases in Cnidarians: Novel Perspectives from the Octocorallian *Corallium rubrum*. *PloS ONE* 11(8): e0160368.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160368>

Karako-Lampert S, Zoccola D, Salmon-Divon M et al. (2014) Transcriptome Analysis of the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata* (ed Voolstra CR). *PLoS ONE*, **9**, e88615.

Laurent J1, Venn A, Tambutté É, Ganot P, Allemand D, Tambutté S. Regulation of intracellular pH in cnidarians: response to acidosis in *Anemonia viridis*. *FEBS J.* 2014 Feb;281(3):683-95. doi: 10.1111/febs.12614. Epub 2013 Dec 10.

Moya A, Tambutté S, Bertucci A et al. (2008) Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Characterization, localization, and role in biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*.

Zoccola D, Tambutté E, Kulhanek E, Puverel S, Scimeca JC, Allemand D, Tambutté S (2004) Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.

Zoccola D, Ganot P, Bertucci A et al. (2015) Bicarbonate transporters in corals point towards a key step in the evolution of cnidarian calcification. *Scientific Reports*, **5**, 9983.

Zoccola D, Tambutté E, Sénégas-Balas F, Michiels J-F, Failla J-P, Jaubert J, Allemand D (1999) Cloning of a calcium channel  $\alpha 1$  subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Gene*, **227**, 157–167.

## Points-clé du chapitre 2

### Objectif : Caractériser la fenêtre de performance thermique de *Stylophora pistillata* et l'expression des gènes impliqués dans le transport transcellulaire d'ions pour la calcification

#### Effet de la température :

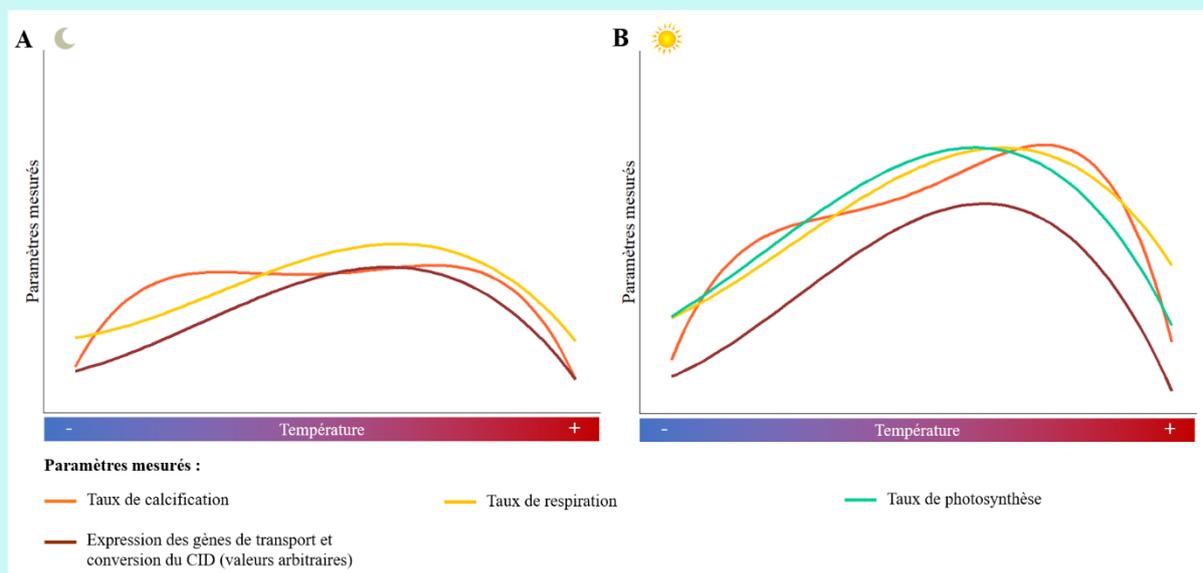
- La gamme de tolérance thermique des colonies de *S. pistillata* est comprise entre 17°C et 33°C
- Les taux de calcification, respiration et photosynthèse sont drastiquement réduits aux extrémités de la fenêtre de performance thermique (17°C et 32-33°C)
- Les fortes corrélations ainsi que les similarités de profils des courbes (Figure 20) témoignent de liens étroits entre la calcification, la respiration et la photosynthèse
- Les gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID sont significativement sous-exprimés à 17°C et 32°C

#### Effet de la lumière :

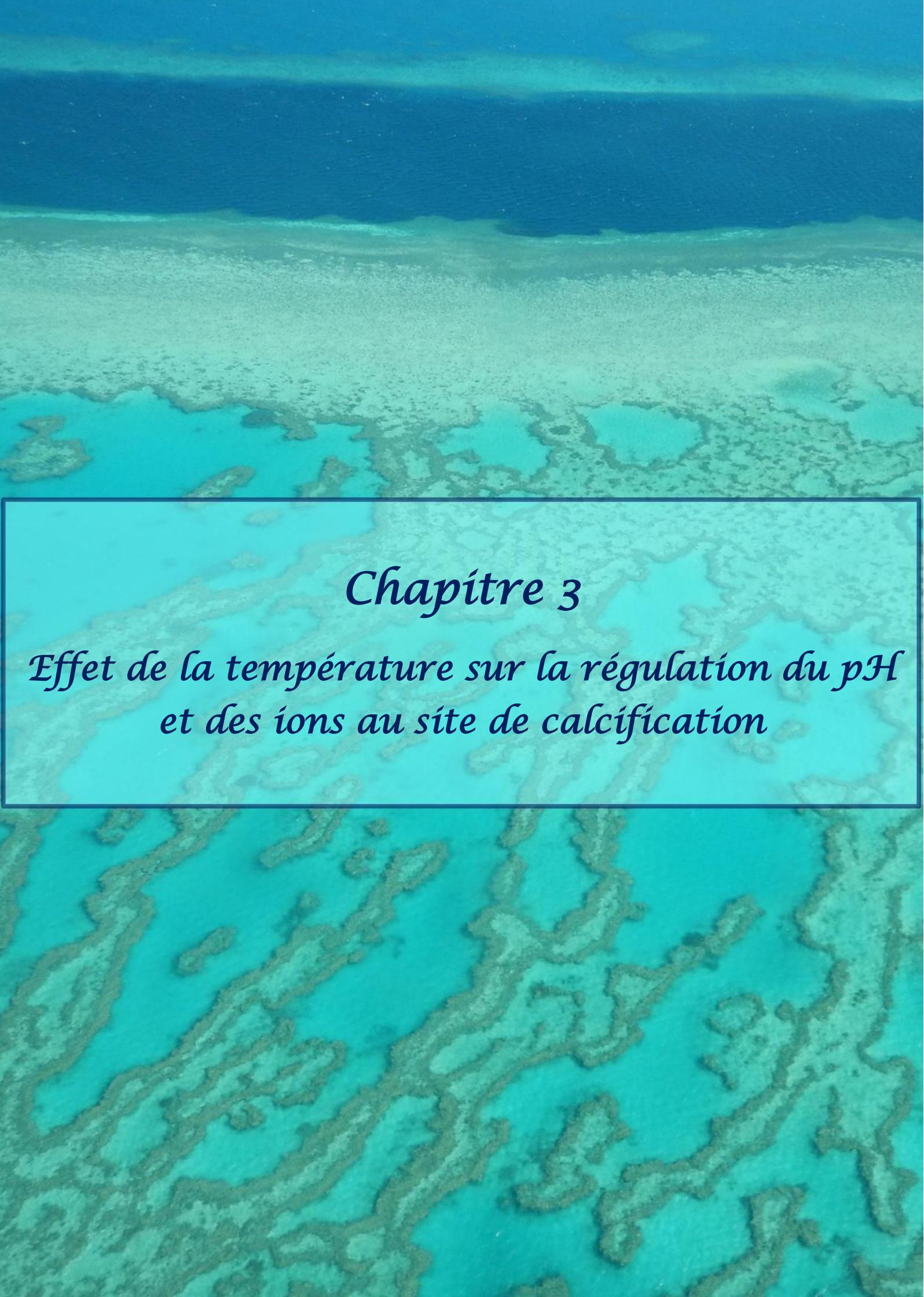
- Observation d'un phénomène de LEC à toutes les températures, excepté à 17°C
- Le jour, les taux de photosynthèse et de respiration sont plus faibles à 17°C qu'à 32°C, d'où probablement l'absence de LEC
- Plusieurs gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID pour la calcification (ACs et SLC4 $\gamma$ ) sont surexprimés à la lumière

#### En résumé :

- ⇒ Il existe une forte cohérence dans les profils d'expression génique et les mesures de paramètres physiologiques (voir analyse discriminante)
- ⇒ L'apport réduit de CID (sous-régulation des gènes) (Figure 20) pourrait être lié à la diminution de calcification à l'obscurité et lors de stress thermiques



**Figure 20. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans le chapitre 2 : A. la nuit, et B. le jour.** L'échelle de l'axe y est arbitraire. Les courbes des taux de calcification (orange), respiration (jaune) et photosynthèse (vert), sont issues des régressions polynomiales présentées dans le chapitre 2. La courbe représentant l'expression des gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID (marron) est tracée de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour.

An aerial photograph of a coral reef system, showing various shades of blue and green. The water is clear, revealing the intricate patterns of the coral. A central text box with a black border contains the chapter title and subtitle.

## *Chapitre 3*

*Effet de la température sur la régulation du pH  
et des ions au site de calcification*



## CHAPITRE 3

### Effet de la température sur la régulation du pH et des ions dans le milieu extracellulaire calcifiant

## 1. La régulation du pH au site de calcification

### 1.1. Le pH : quelques généralités

#### 1.1.1. Définition du pH

La notion de pH, ou potentiel hydrogène, a été découverte et introduite pour la première fois en 1909 par le chimiste danois Søren Sørensen (Sørensen, 1909) alors qu'il étudiait l'effet de certains ions sur les protéines lors de la fabrication de la bière. Le pH mesure l'activité des protons ( $H^+$ ) et permet d'évaluer le niveau d'acidité ou d'alcalinité d'une solution. Il est défini selon l'équation suivante :

$$(Equation 4) \quad pH = -\log_{10}[H^+]$$

Cette équation basée sur un logarithme de base 10 implique que toute augmentation d'une unité de pH résulte d'une diminution de la concentration en protons d'un facteur 10.

Différentes échelles de pH ont été établies en fonction des solutions étalon de référence. Parmi elles, l'échelle du National Bureau of Standards (NBS) a été reconnue par l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) et est couramment utilisée pour les mesures de pH. Cette échelle a été élaborée à partir de solutions étalon de faible force ionique ( $\leq 0,1$ ) et est particulièrement adaptée pour mesurer le pH dans des fluides biologiques. L'échelle NBS n'est cependant pas appropriée pour les mesures de pH dans l'eau de mer dont la force ionique est bien plus élevée (0,7). Une autre échelle, « total scale », a donc été mise au point à partir de solutions étalon à base d'eau de mer artificielle afin de permettre les mesures de pH en eau de mer (Hansson, 1973; Dickson, 1993).

#### 1.1.2. Différentes méthodes de mesures du pH dans le milieu extracellulaire calcifiant

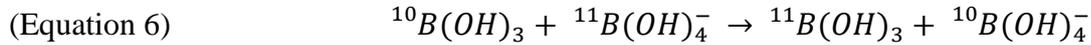
##### **La composition isotopique du bore**

Le principe de cette méthode repose sur le ratio  $\delta^{11}B/\delta^{10}B$  (noté ensuite  $\delta^{11}B$ ) dont la valeur est dépendante du pH. Le bore comprend deux isotopes stables majoritaires,  $^{11}B$  et  $^{10}B$ , et se présente sous la forme de deux espèces dominantes en milieu aqueux : l'acide borique ( $B(OH)_3$ )

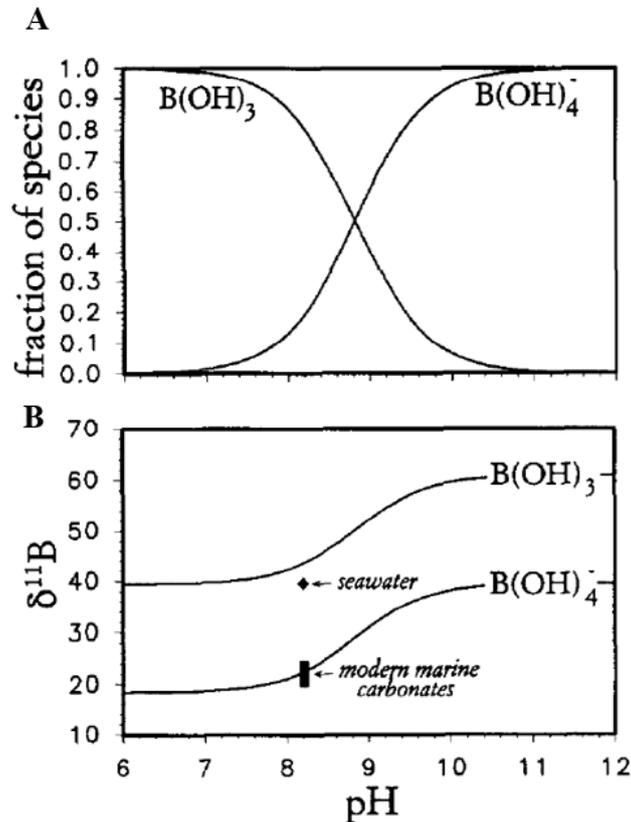
et l'ion borate ( $B(OH)_4^-$ ) (Hemming et Hanson, 1992). La proportion relative de chacune des deux espèces du bore dépend du pH selon la relation :



Ainsi, plus le pH est élevé, plus la proportion de  $B(OH)_4^-$  domine (Figure 21A). En parallèle, les échanges isotopiques entre les deux formes de bore se produisent selon la relation suivante :



Les deux équations (5 et 6) se produisent de manière simultanée de façon à donner la composition isotopique de chacune des deux espèces du bore en fonction du pH (Figure 21B). Dans l'eau de mer, la composition isotopique  $\delta^{11}B$  est à une valeur stable d'environ 40‰ (Spivack, 1986; Hemming et Hanson, 1992).

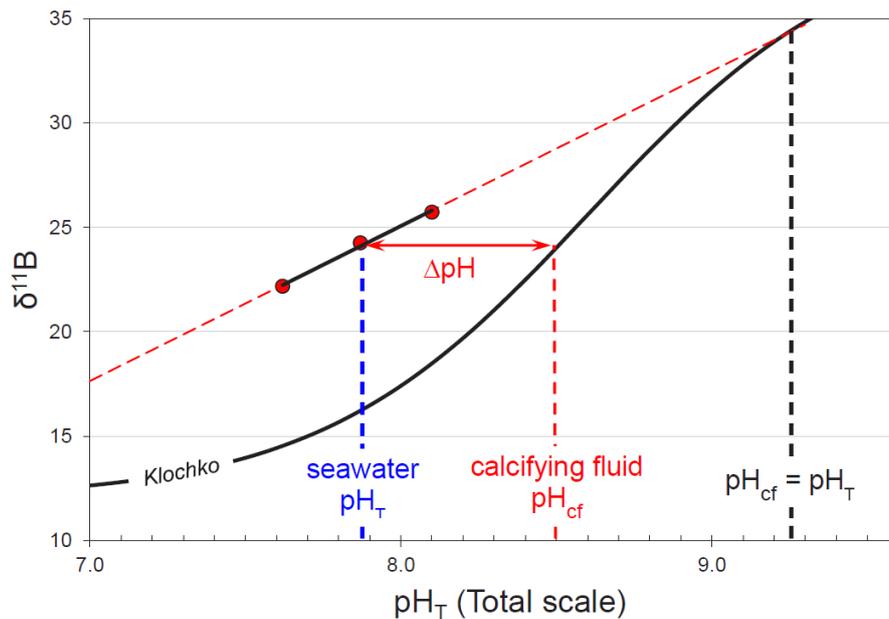


**Figure 21.** A. Distribution des espèces aqueuses du bore en fonction du pH. B.  $\delta^{11}B$  des deux espèces majoritaires du bore en fonction du pH. D'après Hemming et Hanson (1992).

Par ailleurs, il est admis que seules les formes chargées du bore, soit l'ion borate  $B(OH)_4^-$ , sont incorporées dans les carbonates. La composition isotopique du bore intégré dans le squelette des coraux dépend donc du pH du MEC où le  $CaCO_3$  a précipité. Le pH du MEC peut ainsi être déduit à partir de la signature isotopique du bore dans le squelette des coraux selon la courbe de calibration présentée en Figure 22. Reynaud *et al.* (2004) ont ainsi constaté une diminution du  $\delta^{11}B$  dans le squelette d'*Acropora* sp. de 24‰ lorsque le pH environnant était de 8,2 à 22‰

lorsque le pH était de 8,0, reflet de la baisse de régulation du pH dans le MEC lors d'une acidification du milieu. Depuis, cette méthode a été utilisée communément pour estimer le pH dans le MEC (e.g. Trotter *et al.*, 2011; McCulloch *et al.*, 2012a; McCulloch *et al.*, 2012b; D'Olivo et McCulloch, 2017).

L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle implique de sacrifier les échantillons afin de réaliser les analyses sur de la poudre de squelette et ne permet donc pas de mesures *in vivo* du pH dans le MEC.



**Figure 22. Diagramme schématisant comment le pH est calculé à partir des variations dans la composition isotopique du bore. D'après (McCulloch *et al.*, 2012a).**

### Les microélectrodes

Les microélectrodes fonctionnent comme des électrodes classiques pour mesurer le pH mais ont été miniaturisées de manière à ce que le diamètre de celles-ci soit de l'ordre du micromètre. Elles permettent ainsi de mesurer le pH dans des zones extrêmement petites telles que le MEC. L'avantage de cette technique est qu'elle permet des mesures directes du pH *in vivo*. En revanche, chez le corail cette méthode est également critiquée. En effet, certaines des approches employées sont invasives car elles impliquent l'incision des tissus à l'aide d'un scalpel pour insérer la microélectrode (Al-Horani *et al.*, 2003b). D'autres approches sont moins invasives car elles introduisent l'électrode directement à travers les tissus (Ries, 2011; Cai *et al.*, 2016) ou en insérant l'électrode dans la bouche puis la cavité gastrique du polype (Cai *et al.*, 2016), mais sans toutefois vérifier optiquement qu'elle atteint véritablement le MEC. Aujourd'hui, cette méthode a été améliorée au sein du Centre Scientifique de Monaco grâce à la vérification optique de la zone d'insertion de la microélectrode en microscopie confocale (Sevilgen *et al.*, 2019). Nous n'avons cependant pas choisi cette méthode pour mesurer le pH dans le cadre de ma Thèse car cette nouvelle approche a été développée très récemment, en parallèle de mes propres expériences.

### Le SNARF-1

Les mesures de pH à partir du SNARF-1 (seminaphthorhodafluor-1) sont basées sur des techniques de spectroscopie à fluorescence (Buckler et Vaughan-Jones, 1990; Seksek *et al.*, 1991). Le principe de la spectroscopie à fluorescence repose sur l'excitation par un laser à une longueur d'onde donnée d'une sonde fluorescente (ou fluorophore) qui absorbe alors un photon et retourne ensuite à un état stable par la réémission d'un photon à une nouvelle longueur d'onde, plus longue du fait d'une déperdition d'énergie.

Le SNARF-1 est une sonde fluorescente, qui ne pénètre pas dans les cellules et dont la particularité est que son spectre d'émission dépend du pH. Il existe également une autre sonde, le SNARF-1 AM qui, elle, est rendue apolaire grâce à la présence d'un groupe acetoxy-méthyle ester (AM) et peut ainsi traverser les membranes des cellules. Une fois entrée dans les cellules, des estérases intracellulaires viennent cliver le groupement ester de la molécule de SNARF la piégeant ainsi dans le compartiment cytoplasmique (Tsien, 1981). L'accumulation de SNARF à l'intérieur des cellules augmente la fluorescence et permet ainsi les mesures de pH. Le SNARF-1 est donc adapté aux mesures de pH extracellulaires tel que le MEC et le SNARF-1 AM qui est conçu pour les mesures de pH intracellulaires a été utilisé dans cette étude pour les mesures de pH dans les cellules calicoblastiques.

Avec une constante d'acidité (pKa) (soit sa capacité à libérer des protons dans une solution) de 7,5 à température ambiante, le SNARF-1 est un fluorophore idéal pour mesurer des changements de pH compris entre 6 et 9. La longueur d'onde d'excitation du SNARF-1 est comprise entre 488 nm et 552 nm et son spectre d'émission est composé de deux pics, à 585 nm et à 640 nm. Le ratio des intensités de fluorescence des deux pics d'émission permet de calculer le pH du milieu (Figure 23). Ainsi l'intensité de fluorescence émise est plus élevée à 585 nm à pH acide et à 640 nm à pH basique. La mesure du pH avec le SNARF-1 dans le MEC de *Stylophora pistillata* a été développée au laboratoire et fait l'objet de plusieurs publications (Venn *et al.*, 2011, 2013; Tambutté, É. *et al.*, 2015; Sevilgen *et al.*, 2019).

Avant la réalisation des mesures de pH, une calibration doit être effectuée afin d'associer une valeur de ratio d'intensité de fluorescence à une valeur de pH. Pour le SNARF-1, la calibration est réalisée dans de l'eau de mer ajustée à différents pH (de 7 à 9), tandis que pour le SNARF-1 AM, la calibration est menée sur des cellules fraîchement isolées. Pour cela, les cellules sont incubées dans des solutions de SNARF-1 AM ajustées à différents pH (de 6 à 8,5) et complémentées avec un ionophore, tel que la nigéricine, afin d'équilibrer le pH<sub>i</sub> avec le pH de la solution.

Le ratio d'intensité de fluorescence entre 585 nm et 640 nm est lié au pH selon la relation suivante :

(Equation 7) 
$$pH = pKa - \log \left[ \frac{R - R_B}{R_A - R} \times \frac{F_B(\lambda_2)}{F_A(\lambda_2)} \right]$$

où R représente le ratio de fluorescence entre les deux longueurs d'ondes d'émission du SNARF-1 (585 nm et 640 nm), F représente l'intensité de fluorescence mesurée à 640 nm ( $\lambda_2$ ) et les indices A et B correspondent aux valeurs limites des titrations extrêmes acides et basiques (pH 7 et 9). La droite de calibration issue de cette équation permet ainsi de calculer le pH correspondant aux mesures de ratio obtenues dans le MEC des microcolonies (Figure 24).

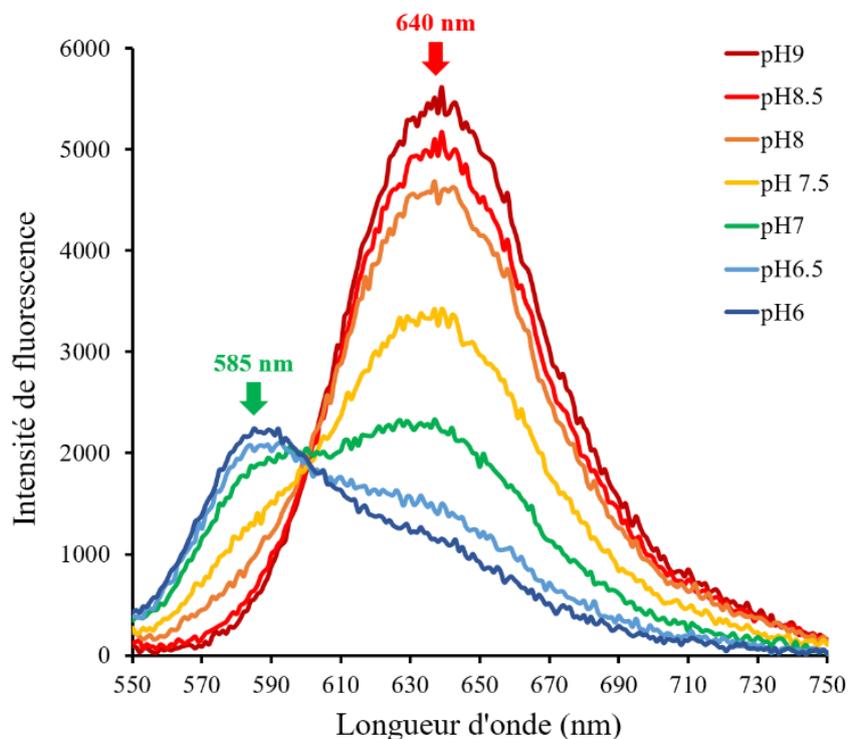


Figure 23. Spectre d'émission de la sonde fluorescente SNARF-1 à différentes valeurs de pH.

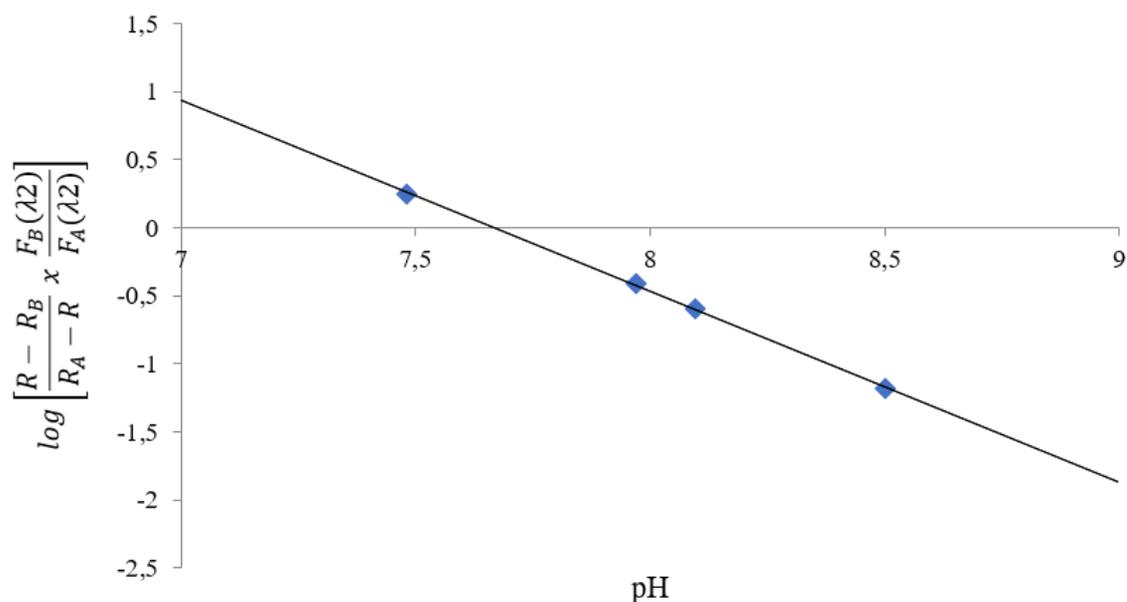


Figure 24. Exemple de courbe de calibration réalisée avec la sonde SNARF-1 dans une eau de mer tamponnée.

La composition du MEC et la valeur de sa force ionique ne sont pas connues. Cependant, le MEC est souvent considéré similaire à de l'eau de mer modifiée et étant donné que les calibrations pour le pH dans le MEC sont réalisées dans de l'eau de mer (Venn *et al.*, 2011), nous avons choisi l'échelle « total scale » pour ces mesures. En revanche, l'échelle NBS, plus appropriée pour les mesures de pH dans les fluides biologiques, a été préférée pour les mesures de pH dans les cellules calicoblastiques.

## 1.2. Les coraux augmentent le pH dans le milieu extracellulaire calcifiant par rapport à l'eau de mer

De nombreuses études, et ce quelle que soit la méthode de mesure (bore, microélectrodes, SNARF), ont montré que le pH du MEC des coraux est plus élevé que le pH de l'eau de mer avec un delta compris entre 0,2 et 1,6 Unités pH (Al-Horani *et al.*, 2003b; Reynaud *et al.*, 2004; Krief *et al.*, 2010; Venn *et al.*, 2011; Holcomb *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2016; Sevilgen *et al.*, 2019), à l'exception d'une étude qui a trouvé une diminution de 0,07 unités pH chez *Galaxea fascicularis* la nuit (Al-Horani *et al.*, 2003a). Cette augmentation de pH permet ainsi de favoriser la conversion de  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_3^{2-}$  et d'accroître l'état de saturation des carbonates de façon à faciliter la précipitation du  $\text{CaCO}_3$ . En effet, la formation du squelette en aragonite des coraux tropicaux constructeurs de récifs est conditionnée par la disponibilité en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{CO}_3^{2-}$  dans le MEC pour précipiter du  $\text{CaCO}_3$ . Elle est également dépendante de l'état de saturation défini selon l'équation suivante :

$$\text{(Equation 8)} \quad \Omega = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{CO}_3^{2-}]}{K_{sp}}$$

où  $K_{sp}$  est la solubilité de la phase précipitée du carbonate de calcium, c'est-à-dire la solubilité de l'aragonite dans le cas des coraux tropicaux constructeurs de récifs. Étant donné que le pH détermine la forme sous laquelle le CID se présente, il joue un rôle clé dans la disponibilité des carbonates pour la précipitation des premiers cristaux de squelette. Les coraux pourraient augmenter le pH dans le MEC notamment grâce à des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases qui, en apportant du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le MEC, extraient en contrepartie les  $\text{H}^+$  issus de la réaction de précipitation du  $\text{CaCO}_3$  et pourraient même alcaliniser le milieu (Al-Horani *et al.*, 2003b; Zoccola *et al.*, 2004).

La régulation du pH dans le MEC peut cependant être modifiée par des paramètres environnementaux. Certaines études ont montré que le pH dans le MEC est plus élevé le jour que la nuit (Al-Horani *et al.*, 2003b; Venn *et al.*, 2011). La régulation plus importante du pH durant le jour pourrait être liée à la hausse du taux de respiration par rapport à la nuit qui génère plus d'ATP et stimule ainsi l'activité des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (Al-Horani *et al.*, 2003b). En parallèle, l'utilisation du  $\text{CO}_2$  pour la photosynthèse durant le jour permettrait d'augmenter le pH et l'état de saturation des carbonates, facilitant la précipitation du  $\text{CaCO}_3$  (Goreau, 1959). Néanmoins, d'autres études ne constatent pas de différence de pH dans le MEC entre le jour et la nuit (Tambutté, É. *et al.*, 2015; Sevilgen *et al.*, 2019; Venn *et al.*, 2019). Ces observations semblent donc varier en fonction des espèces et des méthodes de mesures employées. Par ailleurs, une

étude de Tambutté *et al.* (2015) a montré que lors d'une acidification de l'eau de mer jusqu'à des pH très bas (7,2), le pH dans le MEC de *S. pistillata* diminue mais que l'animal conserve sa capacité à maintenir un pH plus élevé que celui de l'eau de mer.

## 2. Résultats personnels : Mesures du pH et expression des gènes de transports ioniques sur des microcolonies à plat

### 2.1. Contexte de l'étude

La régulation du pH et des ions au site de calcification favorise la précipitation du  $\text{CaCO}_3$  et témoigne d'un contrôle biologique du corail sur le processus de calcification. Les résultats précédents (Chapitre 2) ont montré une forte cohérence dans la réponse de *S. pistillata* à l'échelle physiologique et au niveau de l'expression des gènes de transport ionique. Les modifications de régulation de certains de ces gènes aux extrémités de la fenêtre thermique suggèrent que la chimie et le pH du MEC pourraient être modifiés en condition de stress thermique, tout comme cela a été proposé lors d'études géochimiques (D'Olivo et McCulloch, 2017; McCulloch *et al.*, 2017). De plus, la modification du pH dans le MEC pourrait expliquer la diminution du taux de calcification aux températures extrêmes. L'étude présentée dans ce chapitre vise donc à vérifier ces hypothèses à l'aide d'une approche *in vivo*. Le pH dans le MEC ( $\text{pH}_e$ ) et dans les cellules calicoblastiques ( $\text{pH}_i$ ) ont ainsi été mesurés à trois températures différentes sur des microcolonies à plat, pour lesquelles le MEC est optiquement accessible contrairement aux apex. L'expression des gènes de transport ionique a également été caractérisée sur des microcolonies à plat afin de lier directement l'ensemble des paramètres pour le même type d'échantillon.

### 2.2. Matériel et méthodes

#### 2.2.1. Matériel biologique et design expérimental

Dans cette partie de l'étude, les expériences ont été menées sur des microcolonies à plat de *S. pistillata* dont le MEC est visualisable en microscopie pour les mesures de pH. Les microcolonies ont été préparées selon le protocole décrit dans le Chapitre 1 et ont été laissées pendant quatre semaines dans un bac de 120L alimenté en eau de la Mer Méditerranée à une température de 25°C, une salinité de 38 et un  $\text{pH}_T$  de  $7,93 \pm 0,01$ . La lumière dans le bac était de  $70 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , donc plus faible que pour les expériences précédentes, afin d'éviter tout blanchissement des microcolonies, plus sensibles à la lumière que les apex.

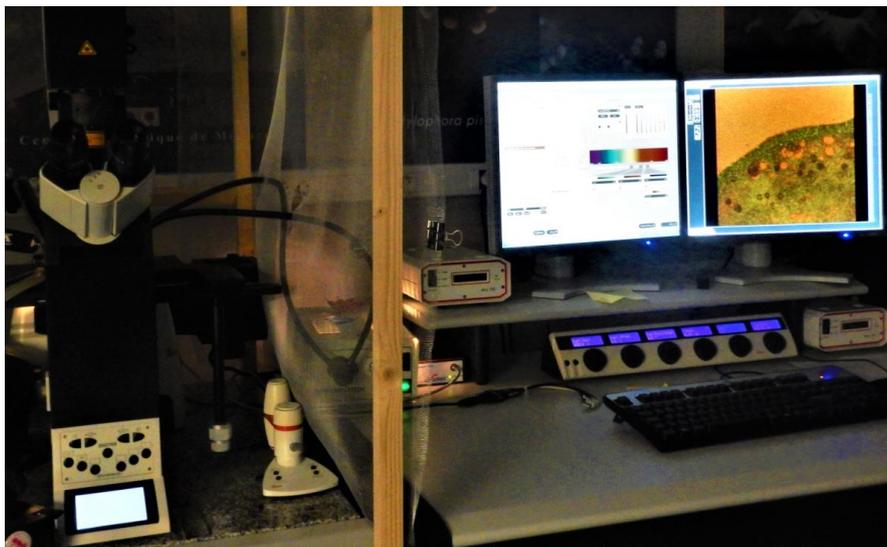
Après quatre semaines, les microcolonies présentent un front de croissance développé et peuvent être placées pendant une semaine dans des bacs expérimentaux de 30L pour les expositions aux différentes températures. Les paramètres des bacs expérimentaux, excepté la température, sont les mêmes que dans le bac de 120L. Des tests préalables ont révélé que les

microcolonies à plat, sont plus sensibles à la température que les apex. Il a donc fallu redéfinir les températures expérimentales pour les expériences sur ce type de microcolonie. Les températures minimales et maximales qui ont été définies sont 20°C et 31°C, températures auxquelles il est possible d'observer un front de croissance avec des cristaux isolés et des poches de MEC pour effectuer les mesures de pH. Les mesures ont donc été réalisées à 25°C pour le contrôle, et 20°C et 31°C pour les températures expérimentales. Les mesures de nuit ont été effectuées dans l'obscurité à la fin de la nuit avant que les lumières ne s'allument, et les mesures de jour ont été réalisées à la lumière à midi. Des microcolonies ont aussi été utilisées à chacune des trois températures (20°C, 25°C et 31°C) pour caractériser l'expression des gènes de transport ioniques sur les microcolonies à plat. Ces microcolonies ont été préparées sur des lames de microscopie en verre, plus solides que les lamelles, afin de pouvoir découper le front de croissance pour les extractions d'ARN sans casser la lame.

### 2.2.2. Mesures du pH dans le MEC et dans les cellules calicoblastiques

#### Dispositif expérimental

Les mesures de pH ont été réalisées *in vivo* sur des échantillons incubés en présence de SNARF-1 (5 (et 6)- carboxysemnaphthorhodafluor-1, Molecular Probes) pour le pH dans le MEC (pH extracellulaire, pHe) et de SNARF-1 AM (5 (et 6)- carboxysemnaphthorhodafluor-1 acetoxymethyl ester, Molecular Probes) pour le pH intracellulaire (pHi). Les échantillons (microcolonies à plat, cellules isolées, ou solutions de calibration) sont placés dans une chambre de perfusion (PeCon), puis installés sur une plaque thermostatée (Temperable Insert P, PeCon) reliée à un bain-marie réglé à la température étudiée (20°C, 25°C ou 31°C). L'ensemble de ce système est mis en place sur la platine du microscope confocal inversé. Toutes les mesures de pHe et les premières mesures de pHi (à 20°C), ont été effectuées en microscopie confocale (Leica SP5) avec un laser d'excitation à 543 nm (Figure 25). Suite à l'achat d'un nouveau confocal, les mesures de pHi (à 25°C et 31°C) ont été réalisées avec un microscope confocal Leica SP8 (laser à 552 nm). Les échantillons sont observés avec un objectif x40 à immersion à l'huile.



**Figure 25.** Photo du microscope confocal Leica SP5 lors de mesures du pH dans le MEC. © Coralie Bernardet (CSM)

### Calibration

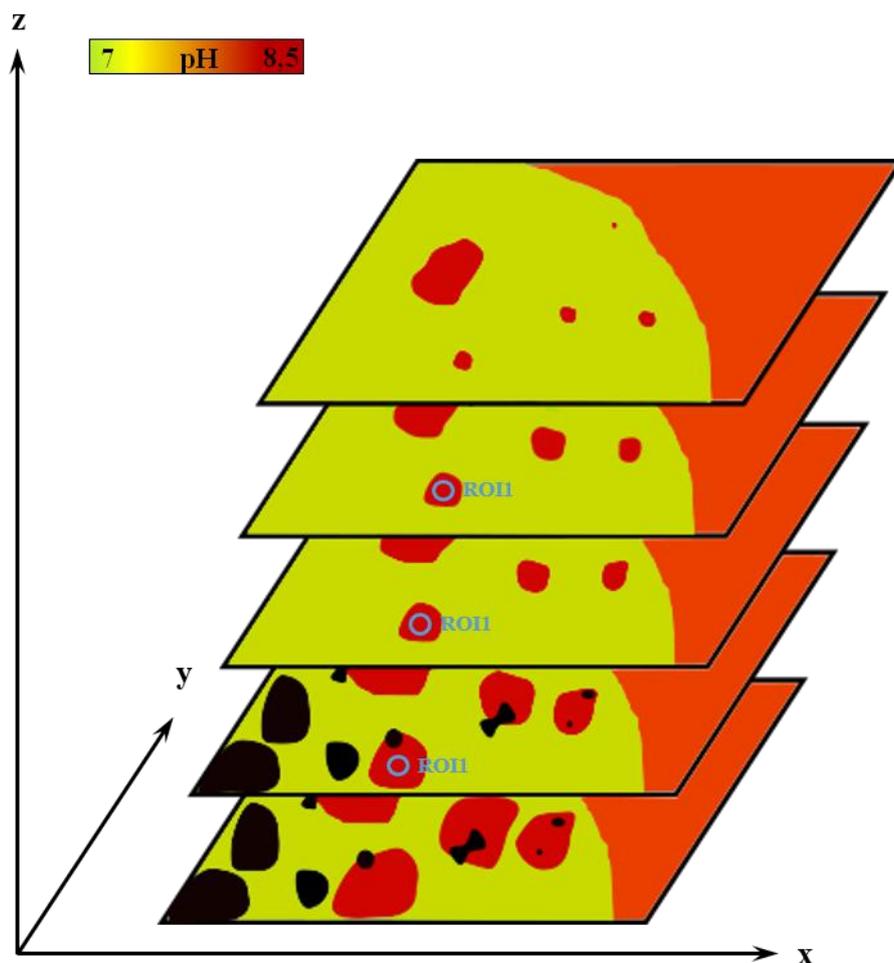
Pour le pHe, le SNARF-1 est calibré à partir de solutions d'eau de mer tamponnées à différents pH, de 7 à 9 à l'aide de NaOH 1N et de HCl 1N. Le pH des solutions est mesuré par une électrode à pH (échelle NBS,  $pH_{NBS}$ ) et vérifié par la méthode de spectrométrie avec du rouge de crésol (échelle « Total scale »,  $pH_T$ ). Ce sont les valeurs de  $pH_T$  qui sont ensuite utilisées pour établir la courbe de calibration de SNARF-1.

Pour le pHi, le SNARF-1 AM est calibré à partir de cellules isolées dont le pH a été stabilisé à l'aide de solutions tampons à différents pH, de 6 à 8,5. Les cellules de *S. pistillata* ont été isolées à partir d'apex dont les tissus ont été brossés dans de l'eau de mer filtrée puis centrifugés pour éliminer un maximum de mucus et de débris. Les cellules isolées sont ensuite re-suspendues dans une solution de SNARF-1 AM et déposées dans la chambre de perfusion du microscope confocal pendant 15 min afin de les charger en SNARF et les laisser sédimenter sur la lamelle. Par la suite, la solution de SNARF est délicatement retirée tout en laissant les cellules reposer sur la lamelle en verre dans la chambre de perfusion et la solution tampon est ajoutée. Les solutions tampons sont préparées de manière à obtenir une concentration finale de 60 mM de NaCl, 130 mM de KCl, 70 mM de KOH, 555 mM de sorbitol et 25 mM de Pipes (pour les pH 6 à 7,5) ou de Tricine (pour les pH 8 et 8,5). Le pH des différentes solutions tampons est ajusté à l'aide de NaOH 1N et de HCl 1N. Avant d'ajouter les solutions tampons aux cellules, de la nigéricine (un ionophore) est ajoutée dans la solution afin d'équilibrer le pH à l'intérieur des cellules avec celui du tampon. Les mesures de ratio d'intensité de fluorescence sont réalisées dans plusieurs cellules chargées de SNARF pour chacun des pH.

Étant donné que la fluorescence du SNARF peut varier en fonction de la température (Seksek *et al.*, 1991), les calibrations de SNARF-1 et de SNARF-1 AM ont été réalisées à chacune des températures utilisées dans cette étude, soit 20°C, 25°C et 31°C. Les calibrations ont été réalisées à plusieurs reprises pour chacune des températures de manière à confirmer les valeurs obtenues.

### Mesures du pH extracellulaire (pHe) et intracellulaire (pHi)

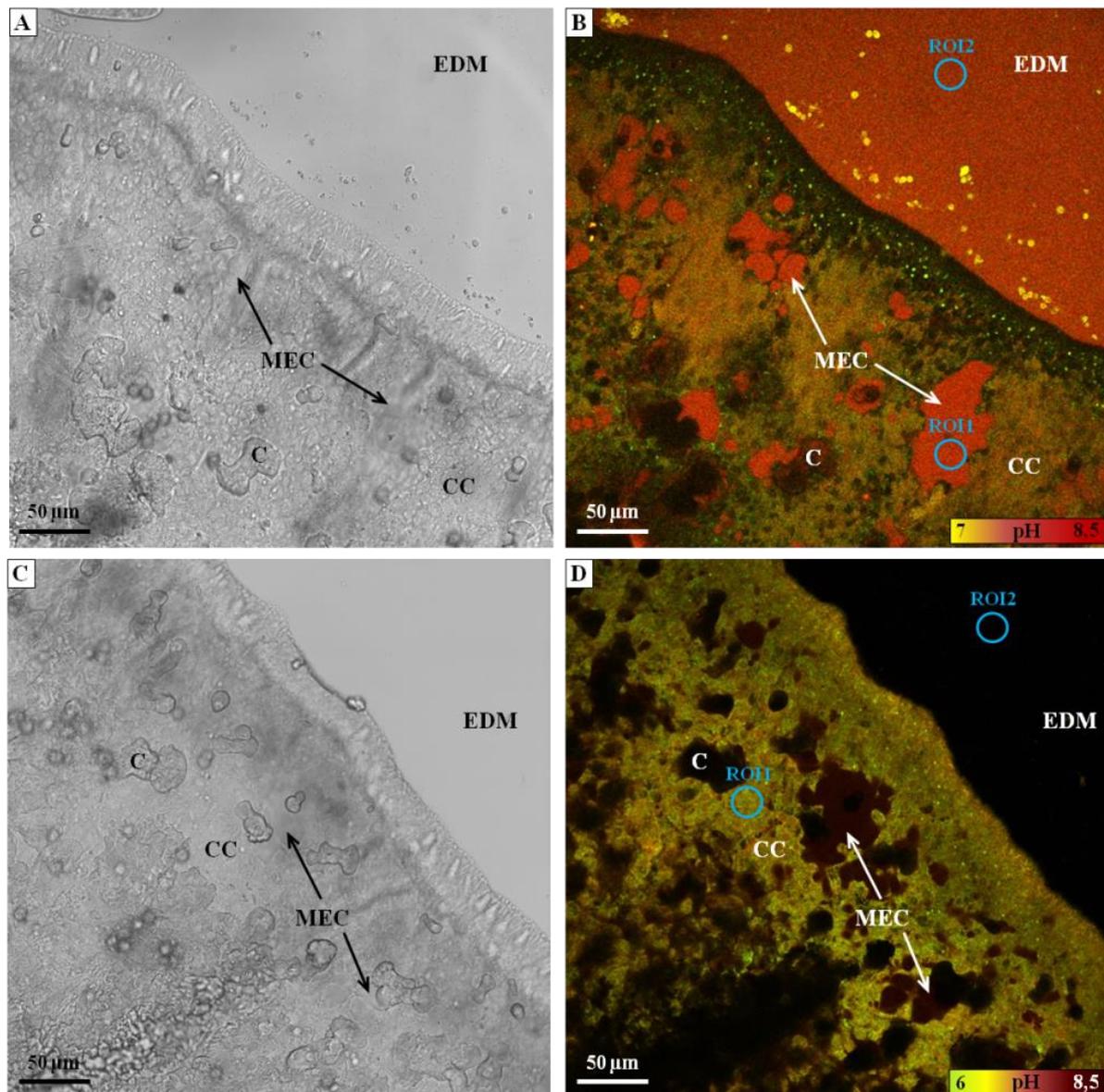
Avant les mesures de pH, les microcolonies sont placées dans la chambre de perfusion du microscope confocal et laissées sous perfusion d'eau de mer pendant 20 min afin qu'elles se remettent d'un éventuel stress causé par les manipulations préalables. Par la suite, la solution de SNARF (SNARF-1 à 45  $\mu$ M pour le pHe, SNARF-1 AM à 10  $\mu$ M pour le pHi) est injectée en perfusion pendant 15 à 25 min, selon le protocole décrit par Venn *et al.* (2011). Le renouvellement dans la chambre de perfusion est de 50% chaque minute, soit 1,25 ml/min. Les mesures de pH sont réalisées dans plusieurs zones de la microcolonie (au minimum 3). Pour le pHe, ces zones sont choisies en fonction de l'état du front de croissance, c'est-à-dire lorsqu'il présente des cristaux isolés et des poches de MEC où les mesures de pH sont possibles. Pour chacune des zones de mesures, une série d'images est capturée à travers l'épaisseur de l'échantillon de manière à obtenir toute la hauteur des poches de MEC ou des cellules calicoblastiques, à raison d'une image tous les 0,70  $\mu$ m d'épaisseur sur un total de 8 à 10  $\mu$ m environ (Figure 26).



**Figure 26. Représentation schématique d'un z-stack.** Les différents plans en z représentent les plans d'observation d'une microcolonie à plat en partant de la lamelle et en remontant dans l'échantillon. Le pHe est mesuré à partir de la moyenne de fluorescence acquise dans 3 plans, au milieu de la poche de MEC dans une zone d'intérêt (ROI). Les cristaux de  $\text{CaCO}_3$  (en noir) sont visibles dans les premiers plans, car proches de la lamelle, et disparaissent ensuite, recouverts par les cellules calicoblastiques (en jaune).

### Analyse des données

Les données ont été collectées et analysées avec le logiciel Leica LAS AF Lite. Des ROIs (*Region Of Interest*) sont tracées avec le logiciel sur les zones d'intérêt (poches de MEC, cellules calicoblastiques ou eau de mer) et permettent d'obtenir le ratio d'intensité de fluorescence entre les longueurs d'ondes d'émission 585 nm et 640 nm dans ces zones (Figure 27). Les valeurs de ratio sont ensuite exportées dans un fichier Excel (Microsoft Office 2013) et comparées à la courbe de calibration de manière à obtenir les valeurs de pH correspondantes. Pour le pHe, une ROI est aussi réalisée dans l'eau de mer (à environ 1 mm de l'échantillon) et une autre dans la couche limite de diffusion (CLD) (dans les 100 premiers  $\mu\text{m}$  autour de la microcolonie) de façon à analyser si les paramètres physiologiques de la microcolonie influent sur le pH environnant. Pour le pH<sub>i</sub>, une ROI est également choisie dans l'eau de mer afin de soustraire la valeur de bruit de fond aux valeurs obtenues pour le pH dans les cellules.



**Figure 27. Front de croissance d'une microcolonie à plat observée au microscope confocal inversé.** A. et C. Images en lumière transmise, B. Incubation dans du SNARF-1 permettant la visualisation des poches de MEC et les mesures de pHe (en rouge), D. Incubation dans du SNARF-1 AM permettant les mesures de pH<sub>i</sub> dans les cellules calicoblastiques (CC) (en jaune). Des régions d'intérêt (ROI) permettent d'obtenir les valeurs de ratio de fluorescence dans les zones d'intérêt et de calculer ensuite le pH. EDM désigne l'eau de mer, et C désigne un cristal de CaCO<sub>3</sub>.

### 2.2.3. Expression des gènes de transport ioniques par PCR en temps réel

#### Extraction d'ARN

Les échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide et placés au congélateur à -80°C avant l'extraction d'ARN. L'ARN a été extrait à partir du front de croissance des microcolonies dont la limite de découpe a été déterminée pour chaque échantillon de manière à ne garder que la partie pauvre en zooxanthelles et sans polypes, correspondant à la zone où les mesures de pH sont réalisées (Figure 28). Le front de croissance de chaque échantillon a été soigneusement découpé à l'aide d'un scalpel avant qu'il ne décongèle et placé dans un eppendorf où il a été

broyé à l'aide d'un piston dans 600 µl de tampon RLT (Qiagen). L'ARN total a été extrait selon le protocole du kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Le dosage d'ARN a été réalisé avec le spectromètre de microplaques Epoch (Bioteck) avec le logiciel Gen5 2.03. La qualité des ARN a été vérifiée en déposant les échantillons sur gel d'agarose 1% ensuite observé par exposition sous UV avec le Fusion Fx7.



**Figure 28.** Photographie d'une microcolonie à plat dont le front de croissance (délimité par la ligne blanche) a été découpé selon la ligne rouge pour en extraire l'ARN. © Coralie Bernardet (CSM)

### Transcription réverse

Les transcriptions inverses (*Reverse Transcription* en anglais, RT) ont été conduites simultanément pour tous les échantillons et réalisées selon le guide d'utilisateur de Invitrogen's SuperScript IV Reverse Transcriptase (2000 U/µl) (Protocol Pub. No. MAN0013443 Rev. A.0) à partir d'1 µg d'ARN. Les RT ont été effectuées dans la machine PCR Eppendorf® Mastercycler gradient. Une PCR de contrôle a ensuite été menée pour vérifier les produits de RT.

### PCR en temps réel

Des PCR en temps réel (qPCR) ont été conduites pour analyser l'expression d'un panel de 17 gènes sélectionnés pour leur implication dans le transport des ions en lien avec la calcification (Chapitre 2, Tableau 2). Les qPCR ont été réalisées avec le PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix dans des plaques de 96 puits avec la machine qPCR QuantStudio3 (Applied Biosystems). Chaque échantillon a été déposé sur les plaques qPCR en triplicats en utilisant 5 ng d'ADNc. Des contrôles négatifs ont été inclus sur les plaques afin de vérifier l'absence de contamination dans les mix. Un contrôle inter-plaque a également été utilisé sur chacune des plaques pour contrôler le niveau de variabilité d'amplification entre les plaques. L'efficacité des amorces et l'expression des gènes ont été analysées avec les applications respectives Standard Curve et

Relative Quantity du logiciel Thermo Fisher Connect™. Les expressions géniques ont été normalisées par rapport à la moyenne d'expression des gènes de référence. Les gènes 36B4 et L22 ont été choisis comme références pour la normalisation des données car la valeur M et le coefficient de variation, calculés au préalable, ont été jugés acceptables car inférieurs respectivement à 0,5 et 0,02 (Hellemans *et al.*, 2007).

#### 2.2.4. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel RStudio (R v3.5.2.). La normalité des données et l'homogénéité des variances ont été vérifiées à l'aide de tests de Shapiro (`shapiro.test`) et de Levene (`levene.test`, package « `car` »).

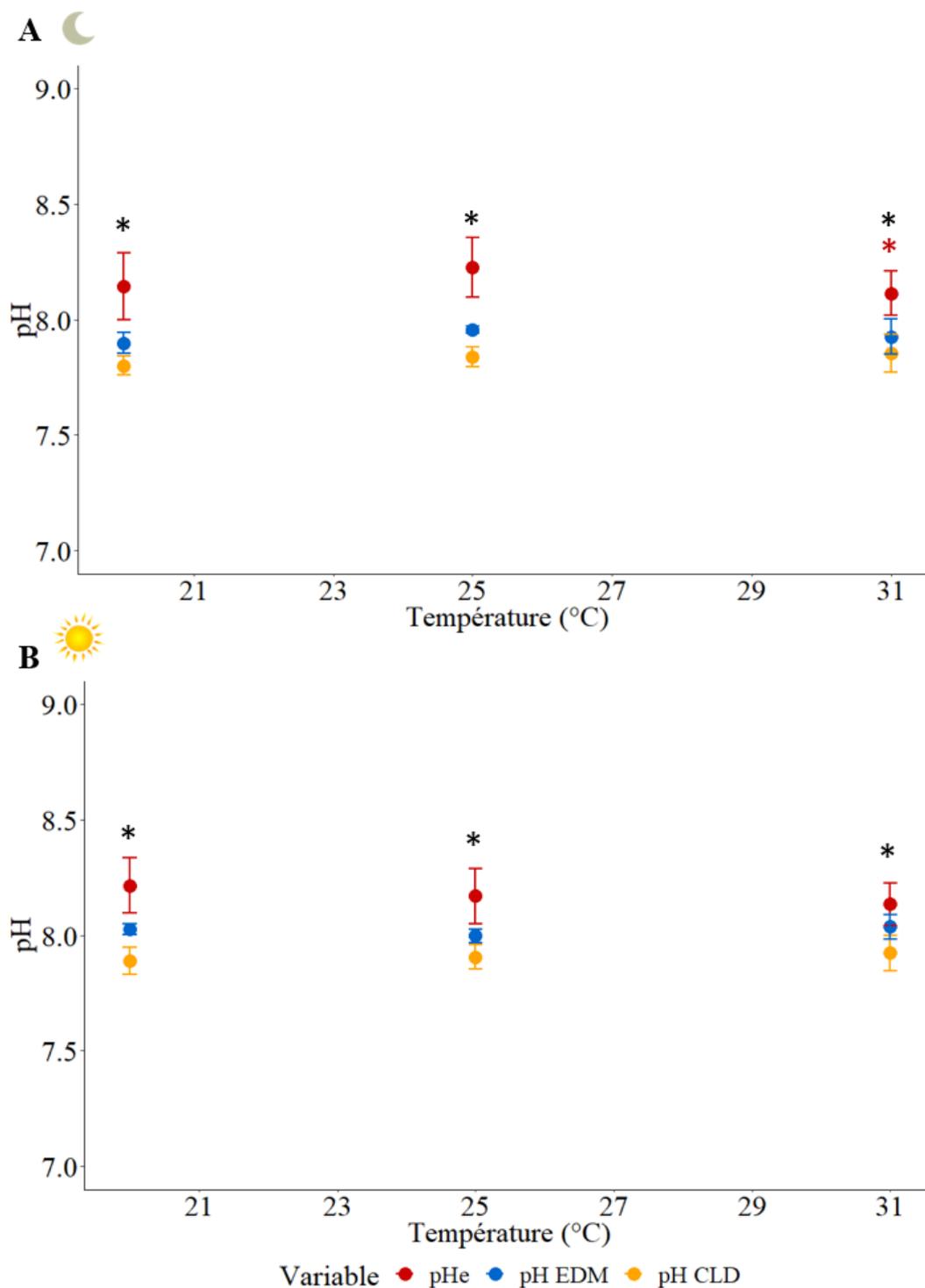
Les mesures de  $pH_e$  et de  $pH_i$  ont été analysées à l'aide d'ANOVAs à deux-facteurs suivies de tests post-hoc (`pairwise.t.test`). La différence entre le pH dans le MEC ( $pH_e$ ), dans l'eau de mer ( $pH_{EDM}$ ) et dans la couche limite de diffusion ( $pH_{CLD}$ ) a également été vérifiée grâce à une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Student-Newman-Keuls (`SNK.test`, package « `agricolae` »).

Les données d'expression géniques ont été explorées dans un premier temps à l'aide d'une analyse discriminante. Etant donné que l'expression de *SpisCA2* est extrêmement dominante et atténue les différences observées pour les autres gènes, j'ai choisi d'analyser ce gène séparément par la suite. Dans un second temps, j'ai conduit une ANOVA à trois facteurs afin d'étudier l'interaction entre la température (20°C, 25°C et 31°C), la condition nuit/jour et les différents gènes (expression de l'ensemble des gènes excepté *SpisCA2*). L'expression génique de *SpisCA2* a été analysée par une ANOVA à deux facteurs pour déterminer l'interaction entre la température et la condition nuit/jour. Des tests post-hoc (`pairwise.t.test`) ont ensuite permis de caractériser les gènes exprimés différemment dans chacun des traitements.

### 2.3. Résultats

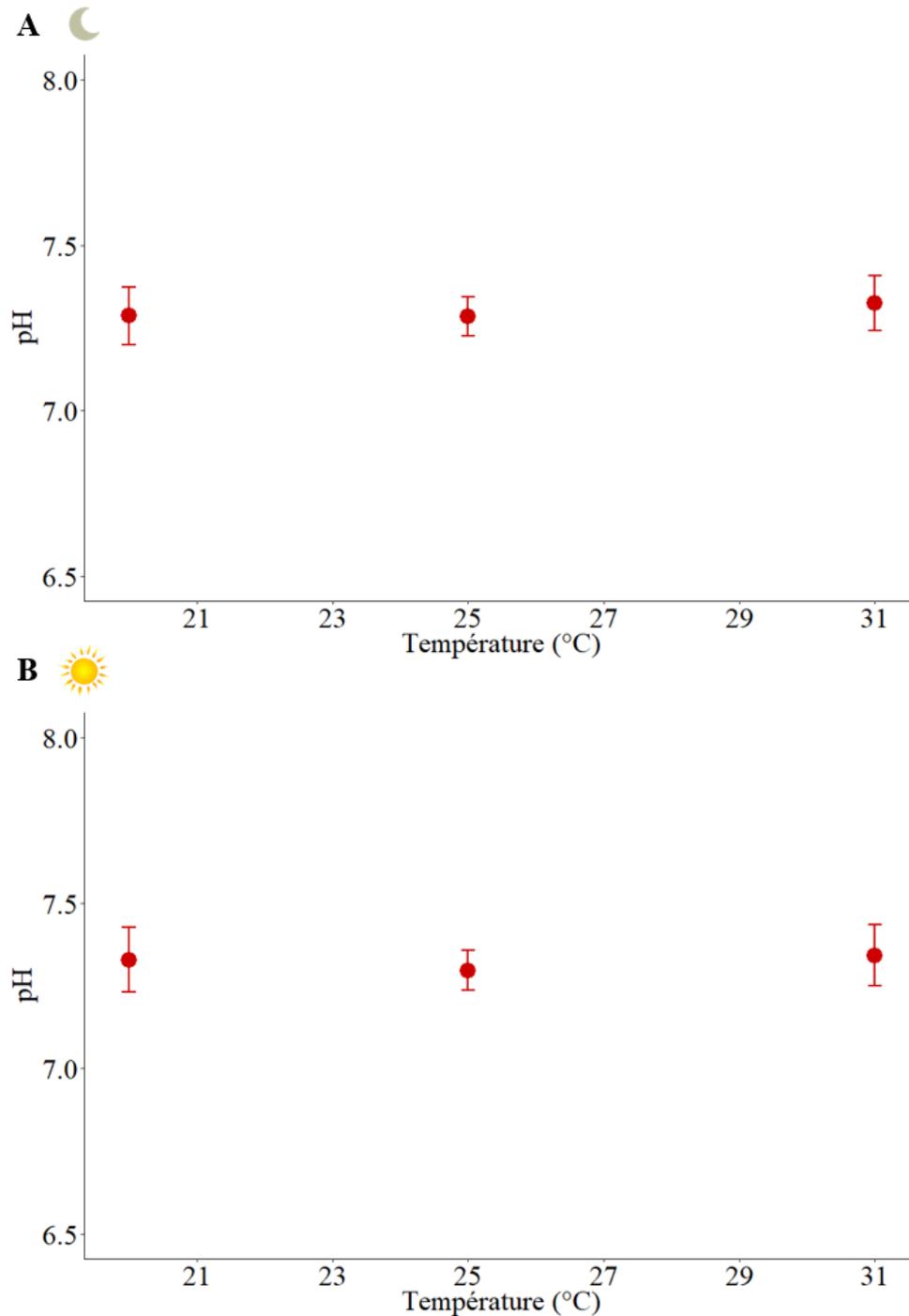
#### 2.3.1. Mesure du $pH_e$ dans le milieu calcifiant et dans les cellules calicoblastiques

Des ANOVAs à deux facteurs ont montré que le  $pH_e$  dans le MEC est significativement plus élevé que le pH de l'eau de mer, de jour comme de nuit selon un delta  $pH_e - pH_{EDM}$  de  $0,2 \pm 0,09$  (Figure 29, Tableau 5). Ce delta est stable avec la température puisque les valeurs de  $pH_e$  dans le MEC sont similaires à chacune des températures étudiées (20°C, 25°C et 31°C) et ne diffère pas non plus entre la nuit et le jour, excepté à 31°C nuit où le pH dans le MEC est légèrement plus bas qu'aux autres températures (Figure 29, Tableau 5). Des mesures de pH ont également été effectuées dans la couche limite de diffusion (CLD) des échantillons et ont montré une légère diminution par rapport au pH de l'eau de mer ( $0,1 \pm 0,04$  Unités pH). Cependant, cette différence est la même pour chacune des trois températures, le jour et la nuit, et ne peut donc pas avoir engendré de biais dans les mesures de  $pH_e$  dans le MEC entre les divers traitements.



**Figure 29. Mesures du pH dans le MEC (points rouges), dans l'eau de mer (points bleus) et dans la couche limite de diffusion (CLD) (points jaunes) : A. le jour, et B. la nuit.** Les points représentent les moyennes et les barres d'erreur correspondent aux écart-types ( $n = 5$ , excepté à  $20^{\circ}\text{C}$  nuit où  $n = 4$ ). Les étoiles noires montrent les différences statistiques entre le pHe et le  $\text{pH}_{\text{EDM}}$ . Des ANOVAs à un facteur ont montré des différences significatives entre le pHe et le  $\text{pH}_{\text{EDM}}$  ( $p < 0,0001$ ). Des ANOVAs à deux facteurs conduites sur les mesures de pHe n'ont montré aucune différence statistique avec la température ( $p = 0,08$ ) et la condition jour/nuit ( $p = 0,32$ ), ni aucune interaction significative entre ces deux paramètres ( $p = 0,34$ ).

Tout comme pour le pHe, le pHi dans les cellules calcicoblastiques est stable dans tous les traitements (Figure 30, Tableau 5). Des ANOVAs à deux facteurs ne montrent en effet aucune différence statistique de pHi entre les températures ni entre le jour et la nuit, avec une valeur de  $7,3 \pm 0,07$ .



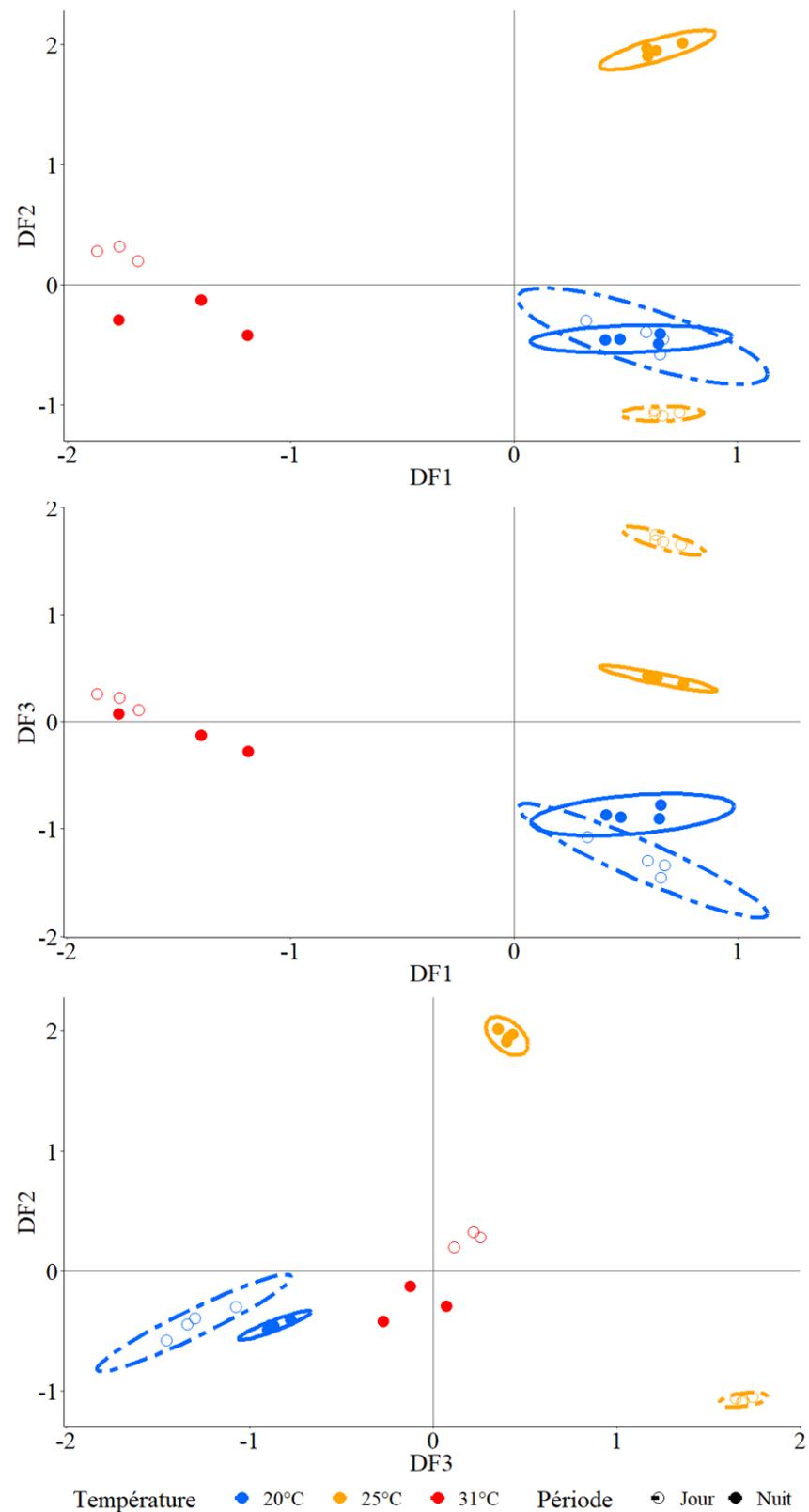
**Figure 30. Mesure de pH intracellulaire dans les cellules calcicoblastiques** : A. le jour, et B. la nuit. Les points représentent les moyennes et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (à 20°C et 25°C : n = 4 ; à 31°C : n = 5). Des ANOVAs à deux facteurs conduites sur les mesures de pHi n'ont montré aucune différence statistique avec la température (p = 0,22) et la condition jour/nuit (p = 0,18), ni aucune interaction significative entre ces deux paramètres (p = 0,38).

**Tableau 5.** Résultat d’ANOVAs à deux facteurs sur l’effet de la température et de la condition nuit/jour sur le  $pH_e$  (Figure 29) et le  $pH_i$  (Figure 30) et d’une ANOVA à un facteur sur la localisation des mesures (dans le MEC, l’eau de mer et la couche limite de diffusion).

Variable	Effet	df	F	P	Post-hoc
$pH_e$	Température	2	2,84	0,08	-
	Période	1	1,01	0,32	
	Température*Période	2	1,12	0,34	
$pH$	Localisation	2	112,2	< 0,0001	$pH_e < pH_{EDM} < pH_{CLD}$
$pH_i$	Température	2	1,64	0,22	-
	Période	1	1,90	0,18	
	Température*Période	2	1,02	0,38	

### 2.3.2. Expression des gènes impliqués dans le transport des ions

Dans un premier temps, j’ai exploré les profils d’expression génique de l’ensemble des échantillons à l’aide d’une analyse discriminante afin de constituer des groupes selon la température (20°C, 25°C et 31°C) et la condition nuit/jour (Figure 31, Annexes 1 et 2). 67% de la variation dans les profils d’expression génique est expliquée par les trois premiers axes (Discriminant Factor 1 à 3, soit DF1 à 3). A 31°C, le nombre limité de réplicats n’a pas permis de tracer d’ellipses pour ces groupes, mais il est tout de même possible de visualiser l’emplacement de chacun des profils d’expression génique des individus à cette température (points rouges sur le graphique, Figure 31). Les différences statistiques entre les groupes ont été testées à l’aide d’une ANOVA à un facteur dont les résultats sont présentés en Annexe 3. A 31°C, les individus sont séparés des individus des deux autres températures, aussi bien le jour que la nuit, selon chacun des trois axes, tandis que les axes DF2 et DF3 permettent la différenciation des groupes de 20°C et 25°C. Par ailleurs, les groupes nuit et jour sont distincts selon les axes DF2 et DF3 à 25°C et pour chacun des trois axes à 31°C, tandis qu’à 20°C seul l’axe DF3 permet de séparer les groupes nuit et jour. Néanmoins, la différence entre les groupes nuit et jour à 20°C et 31°C est nettement moins importante qu’à 25°C.

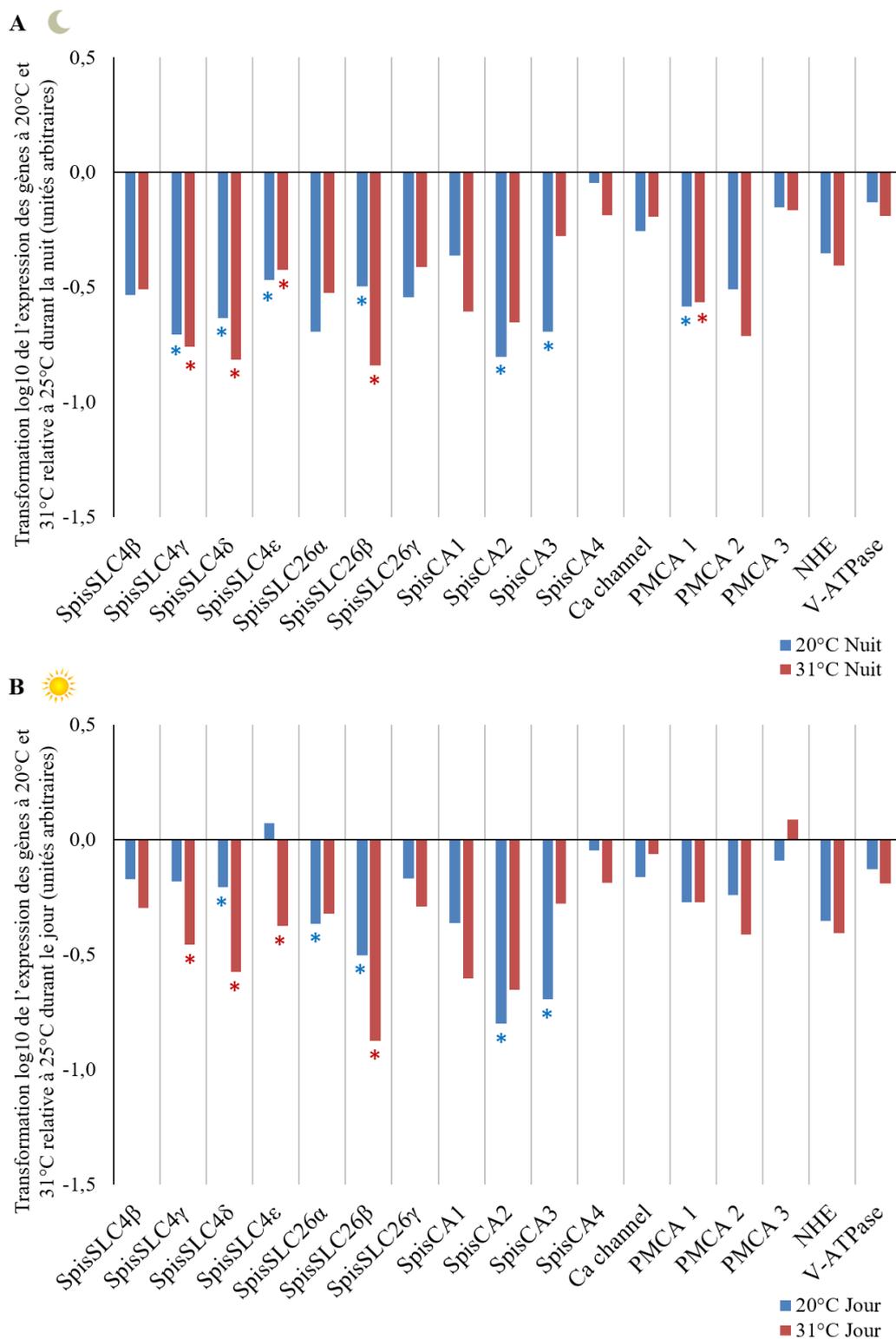


**Figure 31. Analyse discriminante sur l'expression de 17 gènes de transporteurs ioniques chez *S. pistillata*.** Chaque point représente le profil d'expression génique d'un échantillon, et les ellipses les groupes de ressemblance. En bleu sont représentés les échantillons à 20°C, en jaune à 25°C et en rouge à 31°C. Les points pleins correspondent aux individus de nuit, et les points ouverts les individus de jour. A, B et C montrent les représentations graphiques selon les différents Facteurs Discriminants (DF). DF1 explique 25% de variations, DF2 21% et DF3 21%.

**Tableau 6.** Résultat d'une ANOVA à trois facteurs sur l'effet de la température (20°C, 25°C et 31°C), de la condition nuit/jour et des différents gènes sur l'expression relative des gènes (sans SpisCA2) et d'une ANOVA à deux facteurs sur l'effet de la température

Variable	Effet	df	F	P	Post-hoc
Expressions géniques (sauf SpisCA2)	Température	2	173,21	< 0,0001	Voir Tableaux 7 et 8
	Période	1	12,09	< 0,001	
	Gènes	15	203,80	< 0,0001	
	Température* Période	2	37,26	< 0,0001	
	Température*Gènes	30	21,63	< 0,0001	
	Période*Gènes	15	3,67	< 0,0001	
	Température* Période *Gènes	30	10,86	< 0,0001	
Expression génique SpisCA2	Température	2	27,21	< 0,0001	Voir Tableaux 7 et 8
	Time	1	0,00	0,97	
	Température*Time	2	2,89	0,08	

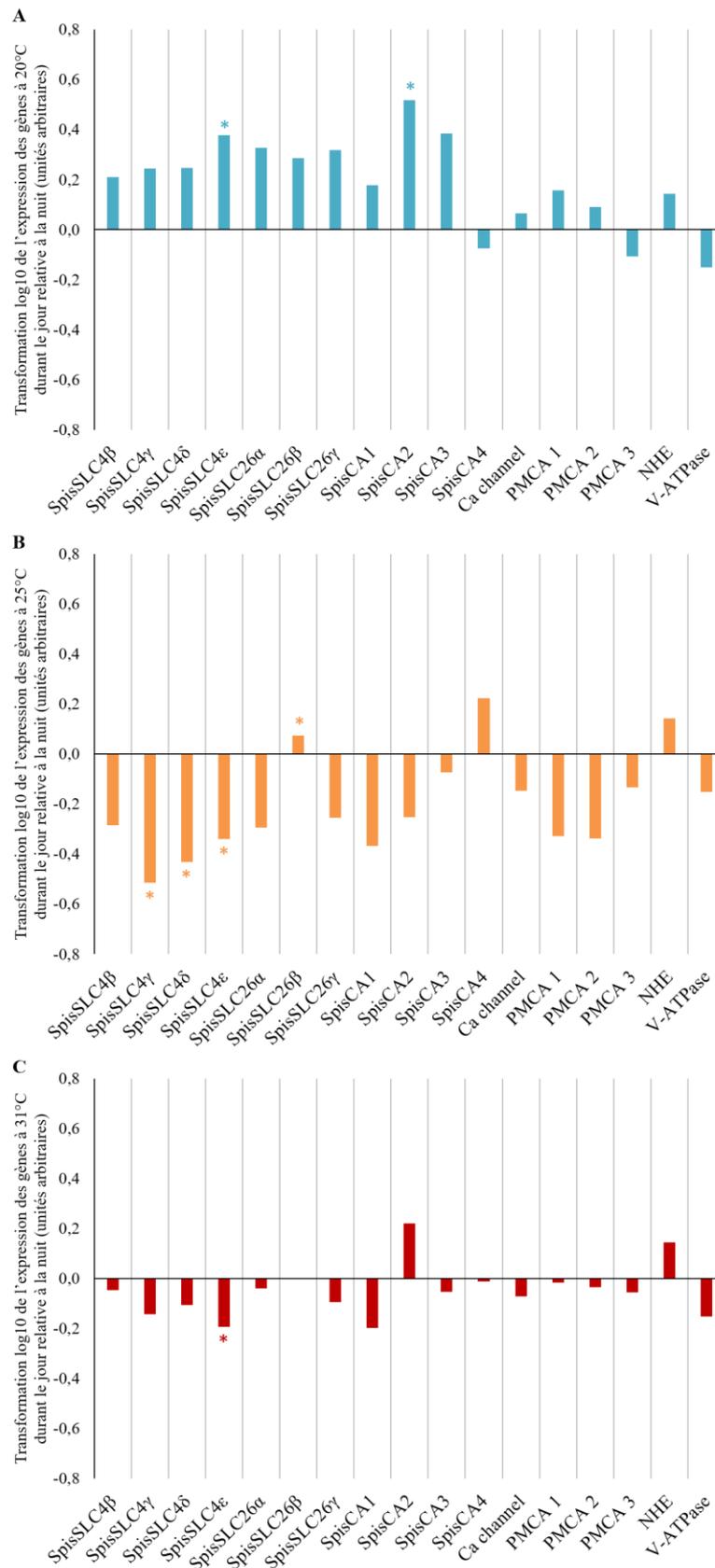
L'expression des différents gènes est représentée graphiquement suite à une transformation en log10 des données de manière à visualiser la sur- ou sous-régulation des gènes par rapport à 25°C (Figure 32) ou des expressions de jour par rapport à la nuit (Figure 33). La réalisation d'une ANOVA à trois facteurs montre une interaction significative entre la température, la condition nuit/jour et les différents gènes (Tableau 6). L'analyse de l'expression des gènes à 20°C et 31°C par rapport à 25°C a permis de caractériser un groupe de gènes impliqués dans la réponse de *S. pistillata* à ces changements de température (Tableau 7). Ce groupe inclut plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la conversion et le transport du CID dont deux ACs (SpisCA2 et 3), et quatre transporteurs de bicarbonate (SpisSLC4 $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  et SLC26 $\beta$ ). Par ailleurs, ces mêmes transporteurs de bicarbonate sont également affectés par la condition lumineuse et montrent des différences d'expression le jour par rapport à la nuit, notamment à 25°C (Tableau 8).



**Figure 32. Représentation graphique de l'expression des 17 gènes étudiés relative à 25°C (transformation log<sub>10</sub>)** : A. pendant la nuit, et B. pendant le jour. Les barres bleues correspondent à l'expression des gènes à 20°C (n = 4) et les barres rouges à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,01$ ) la nuit (en bleu) et le jour (en rouge) avec l'expression des gènes à 25°C.

**Tableau 7.** Résumé des différences statistiquement significatives dans l'expression des gènes à 20°C et 31°C relative à 25°C pendant la nuit et le jour (Figure 9) déterminée par une ANOVA (Tableau 6) et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent l'augmentation ou la diminution significative de l'expression des gènes relative à 25°C ( $p < 0,01$ ). Les flèches grises représentent les tendances relatives à 25°C ( $p < 0,05$ ).

Fonction des gènes		Gène	NUIT		JOUR	
			20°C	31°C	20°C	31°C
Transport de bicarbonate (CID)		SpisSLC4 $\beta$	-	-	-	-
		SpisSLC4 $\gamma$	↘	↘	-	↘
		SpisSLC4 $\delta$	↘	↘	↘	↘
		SpisSLC4 $\epsilon$	↘	↘	↘	↘
		SpisSLC26 $\alpha$	-	-	-	-
		SpisSLC26 $\beta$	↘	↘	↘	↘
		SpisSLC26 $\gamma$	-	-	-	-
Conversion du CID		SpisCA1	-	-	-	-
		SpisCA2	↘	↘	↘	↘
		SpisCA3	↘	-	↘	-
		SpisCA4	-	-	-	-
Transport du Ca <sup>2+</sup>	Régulation acido-basique	Canal Ca <sup>2+</sup>	-	-	-	-
		PMCA1	↘	↘	-	-
PMCA2		↘	↘	-	-	
PMCA3		-	-	-	-	
		NHE	-	-	-	-
		V-ATPase	-	-	-	-



**Figure 33. Représentation graphique de l'expression des 17 gènes étudiés le jour relative à la nuit (transformation log<sub>10</sub>)** : A. à 20°C (n = 4), B. à 25°C (n = 4), et C. à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,01$ ) avec l'expression des gènes durant la nuit pour chacune des températures.

**Tableau 8.** Résumé des différences statistiquement significatives dans l'expression des gènes à 20°C, 25°C et 31°C le jour relative à la nuit (Figure 30) déterminée par une ANOVA (Tableau 6) et une analyse post-hoc. Les flèches représentent l'augmentation ou la diminution significative de l'expression des gènes relative à la nuit ( $p < 0,01$ ).

Fonction des gènes	Gène	JOUR		
		20°C	25°C	31°C
Transport de bicarbonate (CID)	SpisSLC4 $\beta$	-	-	-
	SpisSLC4 $\gamma$	-	↘	-
	SpisSLC4 $\delta$	-	↘	-
	SpisSLC4 $\epsilon$	↗	↘	↘
	SpisSLC26 $\alpha$	-	-	-
	SpisSLC26 $\beta$	-	↗	-
	SpisSLC26 $\gamma$	-	-	-
Conversion du CID	SpisCA1	-	-	-
	SpisCA2	↗	-	-
	SpisCA3	-	-	-
	SpisCA4	-	-	-
Transport du Ca <sup>2+</sup>	Canal Ca <sup>2+</sup>	-	-	-
	Régulation acido-basique	PMCA1	-	-
PMCA2		-	-	-
PMCA3		-	-	-
NHE		-	-	-
V-ATPase		-	-	-

## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Utilisation de microcolonies à plat de *Stylophora pistillata*

Après avoir mesuré plusieurs paramètres physiologiques en réponse à des stress thermiques à l'échelle de la microcolonie (sur fil), l'utilisation de microcolonies à plat de *S. pistillata* nous a permis de zoomer à l'échelle microscopique. Ainsi j'ai pu accéder au MEC, siège du processus de précipitation du squelette, pour tenter de décortiquer les mécanismes à l'origine du déclin de la calcification lors de stress thermiques. Parmi les différents mécanismes à considérer, la régulation du pH dans le MEC et les cellules calcicoblastiques constitue l'objet de ce chapitre. Afin de s'assurer que la réponse aux stress thermiques des microcolonies à plat est comparable à celle des microcolonies sur fil, j'ai réalisé quelques mesures préliminaires des taux de calcification et de respiration sur des microcolonies à plat. Pour cela, j'ai conçu de nouvelles chambres d'incubation et commencé à mettre au point le protocole pour pouvoir mesurer l'alcalinité et la quantité d'oxygène dans un petit volume, adapté à la taille de ce type d'échantillon (voir en Annexes 4 et 5 pour plus d'informations). Les premiers résultats m'ont permis de déterminer que les taux de calcification et de respiration de nuit en fonction de la température (mesurés à 20°C, 25°C et 31°C) suivent en effet des profils similaires à ceux

obtenus avec les microcolonies sur fil puisque les valeurs tendent à décroître aux températures extrêmes par rapport à 25°C (Annexe 6).

Les mesures de pH ont été conduites dans les poches de MEC qui sont visibles au niveau du front de croissance des microcolonies à plat. Comme expliqué dans le Chapitre 1, le front de croissance est la zone où les tissus nouvellement formés colonisent la lamelle en verre et déposent les derniers cristaux précipités. Bien que cette zone présente peu de zooxanthelles, elle est une zone de croissance active importante des microcolonies à plat, tout comme l'est aussi l'apex d'une branche de corail pourtant dénuée de symbiotes (Goreau et Goreau, 1959; Pearse et Muscatine, 1971). L'expression des gènes de transporteurs ioniques a donc également été caractérisée à partir d'ARN extrait au niveau du front de croissance afin de lier directement ces résultats aux mesures de pH.

#### 2.4.2. Impact de la température et de la lumière sur la régulation du pH

Comme décrit précédemment, la régulation du pH dans le MEC est un élément essentiel dans le processus de calcification des coraux. Dans cette étude, j'ai confirmé que *Stylophora pistillata* est capable d'augmenter le pH au site de calcification, avec une élévation de 0,2 Unités par rapport à l'eau de mer. Cette valeur est en accord avec les valeurs reportées dans la littérature qui sont comprises entre 0,2 et 0,5 pour cette espèce (Venn *et al.*, 2011, 2013; Holcomb *et al.*, 2014; Tambutté, É. *et al.*, 2015; Sevilgen *et al.*, 2019). En revanche, je n'ai mesuré aucune différence de pHe entre les différentes températures (20°C, 25°C et 31°C). J'ai également vérifié le pH dans la couche limite de diffusion (CLD) afin d'écartier tout biais dû à des différences de pH dans le milieu environnant la microcolonie. Il est avéré en effet que les coraux peuvent influencer sur la couche d'eau de mer qui les entoure *via* la photosynthèse et la respiration qui impliquent respectivement une augmentation ou une diminution du pH (Shashar *et al.*, 1996). Nos résultats montrent que le pH dans la CLD est extrêmement stable entre tous les traitements (température et nuit/jour) et n'est que légèrement plus faible que le pH dans l'eau de mer. Etant donné que l'épaisseur de la CLD dépend à la fois des processus biologiques et des propriétés hydromécaniques et de diffusion du milieu (Shashar *et al.*, 1996), les valeurs de pH obtenues dans la CLD montrent que le taux de renouvellement important dans la chambre de perfusion a permis de limiter l'influence de la microcolonie sur le milieu environnant. L'éventualité que des différences dans l'activité métabolique et/ou photosynthétique des microcolonies dans certains traitements masquent des différences dans la régulation du pHe a ainsi pu être éliminée.

Dans la littérature, aucune information n'est disponible sur l'effet de la température sur les valeurs de pH dans le MEC des coraux. Seule une étude a montré que le pH dans le MEC de *Porites* spp. est plus bas en été, lorsque la température est élevée, tandis que la disponibilité en CID est accrue, et inversement en hiver (McCulloch *et al.*, 2017). Cependant, les fluctuations de pH observées dans le MEC entre l'été et l'hiver suivent les fluctuations de pH de l'eau de mer. Dans le cas l'étude de McCulloch *et al.* (2017), les changements de pH ne sont donc probablement pas dus à la température mais aux modifications de la chimie de l'eau entre les saisons. Une autre étude sur la moule de Méditerranée, *Mytilus galloprovincialis*, a observé des résultats similaires aux nôtres puisqu'elle n'a pas révélé de modification du pH dans le fluide

extrapalléal, où est formée la coquille, lors d'une augmentation de la température de 3°C au-dessus de la température ambiante (Gazeau *et al.*, 2014).

La régulation du pH intracellulaire est également un paramètre important à prendre en compte car il détermine le bon fonctionnement des cellules. Chez les coraux, le pH intracellulaire peut être modifié par le métabolisme des cellules comme lors de la respiration où la production de CO<sub>2</sub> et sa diffusion dans les cellules peut entraîner une acidose via l'hydratation du CO<sub>2</sub> en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et H<sup>+</sup> (Laurent *et al.*, 2014). Dans les cellules endodermiques où sont contenues les zooxanthelles, le pHi peut aussi être modifié par le prélèvement de CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse qui induit une augmentation du pH à la lumière (Venn *et al.*, 2009; Laurent *et al.*, 2013). L'effet de la température sur les taux de photosynthèse et de respiration peut donc entraîner des modifications du pHi. Bien qu'aucune étude dans la littérature ne reporte l'impact de la température sur la régulation du pHi dans l'épithélium calicoblastique, une étude sur des cellules endodermiques isolées de deux espèces de coraux (*Pocillopora damicornis* et *Montipora capitata*) a observé une diminution du pHi lors d'une augmentation de la température de 23,8°C à 31°C (Gibbin *et al.*, 2015). Dans ces cellules qui abritent les symbiontes, la chute du pHi constatée par les auteurs va de pair avec leurs observations de blanchissement des colonies de *P. damicornis* et de la diminution du contenu en chlorophylle-*a* chez les deux espèces à haute température et pourrait donc être due à des perturbations de l'activité photosynthétique. Cependant, dans ces travaux, le pH environnant était déjà particulièrement bas (7,6) et peut suggérer qu'à pH ambiant de l'eau de mer, la régulation du pHi pourrait être différente. Dans l'étude présente, je me suis intéressée à l'épithélium calicoblastique calcifiant, dépourvu de zooxanthelles, où la respiration est donc le principal facteur pouvant influencer le pHi. Nos résultats montrent que, malgré d'éventuels changements dans le taux de respiration, les valeurs de pHi sont stables (pHi = 7,31 ± 0,07) entre 20°C, 25°C et 31°C. Des changements de température n'affectent donc pas le pHi dans les cellules calicoblastiques. Ces résultats sont cohérents avec la stabilité de pHe observée également dans le MEC aux différentes températures et montrent que la régulation du pH est maintenue en condition de stress thermique et que le déclin de la calcification n'est pas lié à un problème de régulation du pH.

Enfin, je n'ai observé aucune différence de pHe ou de pHi entre la nuit et le jour. Bien qu'une précédente étude sur *S. pistillata* ait reporté des valeurs de pHe plus élevées à la lumière qu'à l'obscurité (Venn *et al.*, 2011), d'autres études, plus récentes, sont en accord avec les résultats présents et ne trouvent pas de différences en fonction de la condition lumineuse (Tambutté, É. *et al.*, 2015; Sevilgen *et al.*, 2019; Venn *et al.*, 2019). Les divergences observées avec Venn *et al.* (2011) pourraient résulter de différences dans la densité de zooxanthelles au niveau du front de croissance des échantillons. La présence accrue de symbiontes dans certains échantillons pourrait en effet induire, grâce à la photosynthèse, une augmentation du pH à la lumière, tel qu'expliqué précédemment (voir sous-chapitre 1.2. + Chapitre 1). L'utilisation d'un plus grand nombre de réplicats pourraient permettre d'augmenter la puissance des tests statistiques et affirmer alors si une différence de pH nuit/jour existe.

En ce qui concerne le pHi, nos observations concordent avec celles trouvées dans la littérature puisque plusieurs études n'ont pas constaté non plus de modification du pHi dans l'épithélium

calicoblastique à la lumière (Venn *et al.*, 2011, 2019), à l'exception d'une étude qui a constaté une différence de pH lumière/obscurité en condition d'acidification (Venn *et al.*, 2019).

### 2.4.3. Implication des gènes de transport ioniques dans la réponse de *S. pistillata* et sa régulation du pH face à un stress thermique

Parmi les gènes de transporteurs ioniques considérés dans cette étude, ceux impliqués dans le transport de protons et donc la régulation du pH comprennent les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (*Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases*, PMCA) et les échangeurs cations/protons  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  (NHE) qui ont été caractérisés d'un point de vue moléculaire chez *S. pistillata* (Zoccola *et al.*, 2004; Capasso *et al.*, in prep ; Wang *et al.*, in prep). D'un point de vue physiologique, il est admis que les PMCA au niveau des cellules calicoblastiques transportent du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le MEC, et retirent en parallèle des  $\text{H}^+$ . Ce transporteur permet ainsi d'augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et le pH dans le MEC, ce qui favorise la précipitation du  $\text{CaCO}_3$  pour le squelette. Les  $\text{H}^+$  qui entrent ainsi dans les cellules calcifiantes par le pôle apical peuvent ensuite être extrudés par un NHE au niveau du pôle basal, évitant ainsi une acidose intracellulaire. D'un point de vue physiologique, il a en effet été montré dans des cellules endodermiques symbiotiques d'anémone de mer que les NHE permettent, comme chez les vertébrés, de réguler le pH<sub>i</sub> en faisant sortir les  $\text{H}^+$  de la cellule en cas d'acidose (Laurent *et al.*, 2014). Ces protéines permettent l'extrusion de  $\text{H}^+$  hors des cellules grâce à l'apport simultané d'ions  $\text{Na}^+$  selon un ratio stœchiométrique 1:1 (Wakabayashi *et al.*, 1997). L'absence de modification d'expression du NHE et des PMCA entre les différentes températures, ainsi qu'entre la nuit et le jour, est cohérente avec la stabilité de pH observée dans le MEC et dans les cellules calicoblastiques. Seule une légère diminution de la PMCA1 la nuit à 20°C et 31°C par rapport à 25°C s'est révélée significative. Cette observation pourrait expliquer une diminution de la calcification à ces températures. Le maintien de la régulation du pH<sub>e</sub> dans le MEC et du pH<sub>i</sub> dans les cellules calicoblastiques lors de modifications de la température suggèrent que 1) l'animal « lutte » pour maintenir cette fonction physiologique clé même en condition de stress, 2) le pH, bien que jouant un rôle important pour supporter la précipitation du  $\text{CaCO}_3$ , n'est pas un facteur pouvant expliquer un déclin de la calcification en condition de stress thermique.

L'analyse discriminante conduite sur l'expression des gènes a cependant permis de distinguer, comme dans le chapitre 2, les groupes comprenant les individus issus des traitements 20°C et 31°C des individus contrôles (25°C). Cette observation est en accord avec les résultats de l'ANOVA qui ont permis de caractériser, comme dans le cas des microcolonies sur fil (voir chapitre 2), un groupe de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport et la conversion du CID dont les expressions sont significativement sous-régulées aux températures expérimentales (20°C et 31°C) par rapport à 25°C. Ce groupe comprend notamment des anhydrases carboniques et plusieurs transporteurs de bicarbonate dont la diminution d'expression refléterait des modifications dans certains processus physiologiques tels que la calcification. La sous-expression de SpisSLC4γ, dont la localisation est spécifique à l'épithélium calicoblastique (Zoccola *et al.*, 2015), pourrait en effet suggérer un transport réduit de CID vers l'épithélium calicoblastique et le MEC et être liée au déclin de la calcification lors

de stress thermiques. De plus, il a été supposé que les transporteurs de bicarbonate SpisSLC4 $\delta$  et SpisSLC26 $\beta$ , dont la répartition est ubiquiste dans les tissus de *S. pistillata*, pourraient être impliqués dans les processus homéostatiques (Zoccola *et al.*, 2015). La sous-expression de ces gènes pourrait alors témoigner de modifications au niveau métabolique telles qu'une diminution de la respiration. Une baisse du taux de respiration induirait en effet une diminution de la production de CO<sub>2</sub> et donc une proportion moindre de CID à transporter vers le MEC.

Il est intéressant de noter également que, comme dans le chapitre 2, les différences de profils d'expression génique observés avec l'analyse discriminante entre le jour et la nuit à 25°C concordent avec des modifications d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le transport de bicarbonate, tel que SpisSLC26 $\beta$  dont l'expression est augmentée à la lumière. Bien que d'autres de ces gènes (SpisSLC4 $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) soient toutefois sous-régulés dans le cas présent tandis qu'ils étaient stables pour les microcolonies sur fil, ces résultats montrent tout de même l'importance des transporteurs de CID dans la réponse de *S. pistillata* à la lumière en condition contrôle. Par ailleurs, à 20°C et 31°C, la faible séparation des groupes de profils d'expression génique nuit et jour issus de l'analyse discriminante est cohérente avec le nombre réduit de gènes différentiellement exprimés en fonction de la condition lumineuse. A 20°C, cette observation est donc similaire à celle qui avait été réalisée pour les microcolonies sur fil à 17°C. En revanche la réponse des microcolonies à plat à 31°C diffère de celle des microcolonies sur fil à 32°C pour lesquelles une réelle différence distinguait les profils d'expression de nuit et de jour. Les gènes différemment exprimés à la lumière chez les microcolonies sur fil mais qui voient leur expression inchangée chez les microcolonies à plat comprennent notamment le transporteur de bicarbonate SLC26 $\alpha$ , qui aurait vraisemblablement un lien avec la photosynthèse, et les ACs. Il est donc possible que la différence observée entre ces deux types de microcolonies soit due à une présence moindre de zooxanthelles au front de croissance des microcolonies à plat.

## 2.5. Perspectives

Les résultats obtenus dans cette partie de ma thèse montrent que le pH dans les cellules calicoblastiques et dans le MEC ne varie pas lors de changements de température. Ces observations peuvent s'expliquer d'un point de vue mécanistique par le fait que l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport des protons (le NHE et des Ca<sup>2+</sup>-ATPases) ne varie pas non plus dans ces conditions. En revanche, l'expression de certains gènes codant pour des transporteurs et enzymes impliqués dans l'apport en carbone inorganique pour la calcification et d'autres processus physiologiques (anhydrases carboniques et transporteurs de bicarbonate) varie sous l'effet de la température. Au vu des résultats préliminaires de mesures de calcification sur des microcolonies à plat et des résultats obtenus pour les microcolonies sur fil présentés dans le chapitre 2, nous pouvons considérer que ces changements de température (20°C et 31°C) affectent la calcification. Il nous est donc possible de déduire, comme dans le chapitre précédent, que la sous-expression des gènes impliqués dans la conversion et le transport du carbone inorganique peuvent expliquer ce déclin de la calcification, tandis que la régulation du pH n'en est pas responsable. Il sera toutefois

intéressant à l'avenir de mesurer le taux de calcification sur les microcolonies à plat aux différentes températures de jour et de nuit, ainsi que les taux de respiration et de photosynthèse (une fois la mise au point du protocole finalisée) afin de comparer les résultats à ceux obtenus pour les microcolonies sur fil. De plus, il serait également instructif de mesurer la calcification d'un point de vue local *via* des mesures directes de croissance des cristaux. Pour cela, Venn *et al.* (2013) ont mis au point un protocole selon lequel les microcolonies sont incubées en présence d'une sonde fluorescente, la calcéine, dont la particularité est qu'elle est intégrée au squelette lors de sa formation. La différence de taille d'un cristal entre le  $t_0$  où il a été marqué à la calcéine et le temps  $t$  où il a été à nouveau observé (quelques heures plus tard) permet de calculer un pourcentage d'accroissement de ce cristal et d'en déduire un taux de calcification. Cette technique permettrait ainsi de déterminer l'impact de la température sur la croissance des premiers cristaux dans la zone où est aussi mesuré le pH.

Par ailleurs, la sous-expression des gènes codant pour des transporteurs de bicarbonate et des anhydrases carboniques en condition de stress thermique suggère que la composition du MEC en CID pourrait être modifiée à 20°C et 31°C. Il serait donc intéressant dans le futur de mesurer la concentration en carbonates dans le MEC à l'aide de microélectrodes et d'en déduire l'état de saturation dans le MEC aux différentes températures étudiées ici. Cette technique a été développée au sein du laboratoire (Sevilgen *et al.*, 2019) et apporterait des informations complémentaires importantes pour mieux comprendre l'effet de la température sur les mécanismes physiologiques à l'origine du déclin de la calcification.

Les résultats obtenus (chapitres 2 et 3) sur les taux de calcification, de respiration, de photosynthèse et la régulation du pH combinés aux expressions différentielles des gènes lors de stress thermiques apportent des informations sur les liens qui existent entre ces paramètres physiologiques et les acteurs moléculaires impliqués dans le transport des ions par la voie transcellulaire. Cependant, la voie paracellulaire doit également être considérée afin d'acquérir une vision plus globale de l'impact de la température sur le transport des ions et a fait l'objet de l'étude décrite dans le chapitre suivant.

## Points-clé du chapitre 3

### Objectif : Déterminer le pH dans le MEC et les cellules calcicoblastiques calcifiantes lors de stress thermiques et en condition nuit /jour

#### Effet de la température :

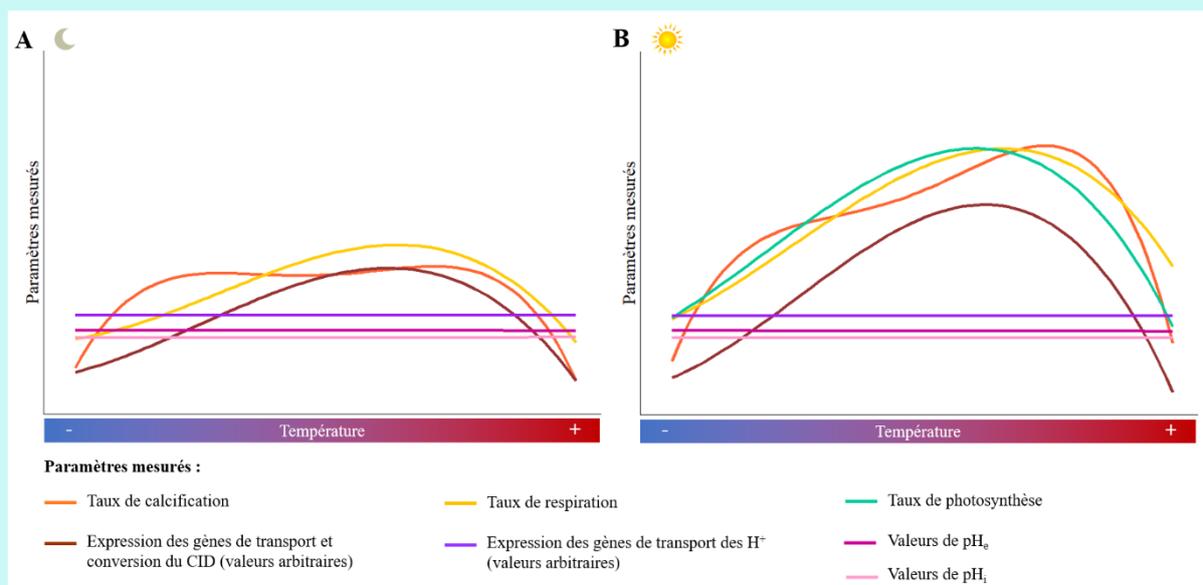
- Le  $pH_e$  dans le MEC est plus élevé que le pH dans l'eau de mer
- Les valeurs de  $pH_e$  et de  $pH_i$  sont stables à 20°C, 25°C et 31°C (Figure 34)
- L'expression des gènes impliqués dans le transport de protons (NHE et PMCA) est stable lors d'un stress thermique
- Les gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID sont significativement sous-exprimés à 20°C et 31°C

#### Effet de la lumière :

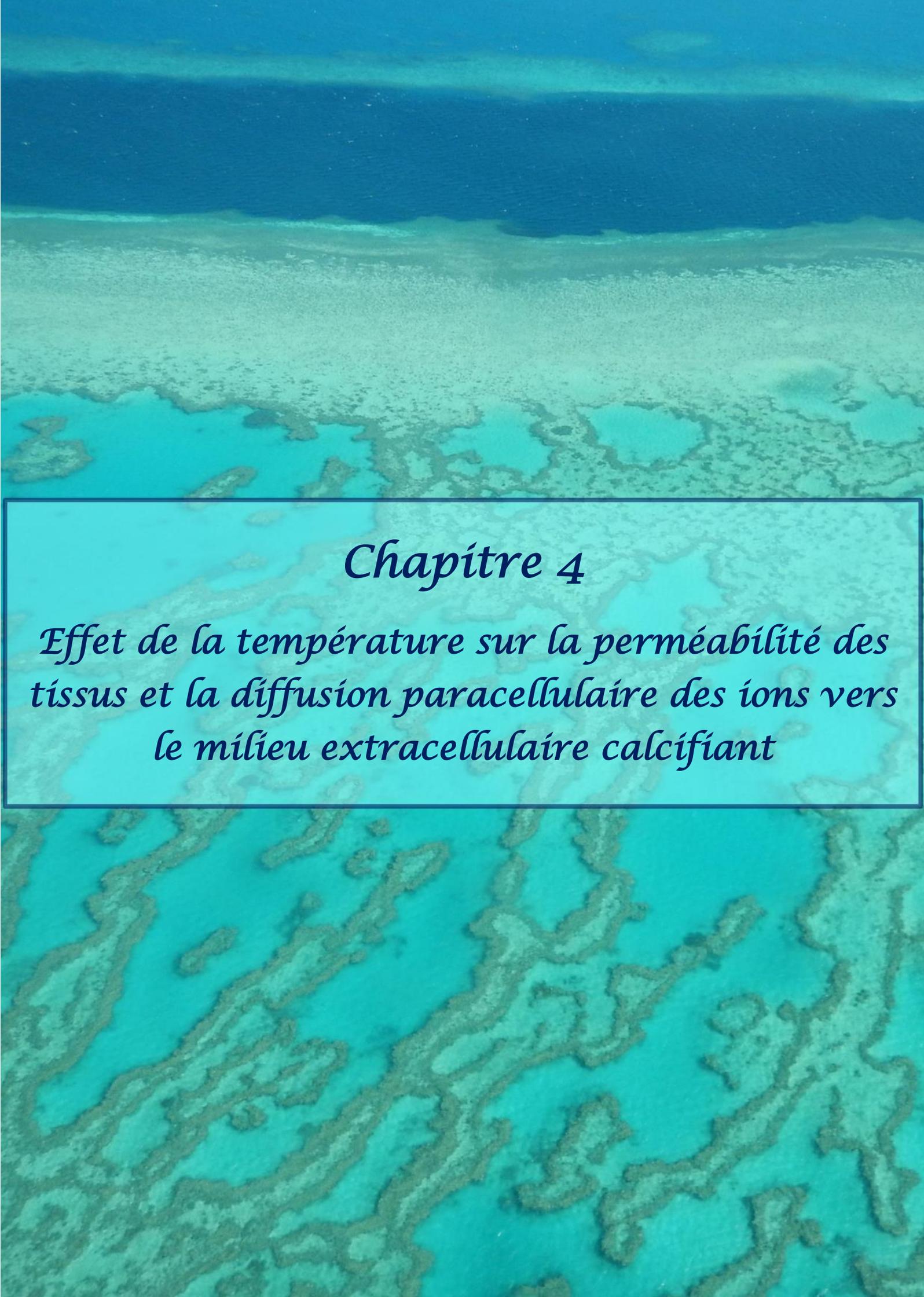
- Les valeurs de  $pH_e$  et de  $pH_i$  ne diffèrent pas entre le jour et la nuit
- L'expression des gènes impliqués dans le transport de protons est stable entre le jour et la nuit
- Plusieurs gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID présentent des niveaux d'expression différents entre le jour et la nuit à 25°C

#### En résumé :

- ⇒ La capacité à réguler le pH dans le MEC et les cellules calcifiantes est maintenue sous l'effet de stress thermiques
- ⇒ La stabilité d'expression des transporteurs de protons pourrait expliquer l'absence d'effet de la température sur le pH
- ⇒ D'autres facteurs que le  $pH_e$  sont susceptibles d'influencer le taux de calcification
- ⇒ Bien que d'un point de vue moléculaire, le transport et la conversion du CID varient sous l'effet du stress thermique et de la condition lumineuse, le pH (dans le MEC et les cellules calcicoblastiques) est maintenu à un niveau similaire
- ⇒ L'apport du CID dans le MEC n'influence pas le  $pH_e$  mais semble jouer un rôle essentiel dans la réponse de la calcification de *S. pistillata* à des stress thermiques et à la lumière



**Figure 34. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans les chapitres 2 et 3 :** A. la nuit, et B. le jour. La courbe représentant l'expression des gènes impliqués dans le transport des protons (violet) est tracée de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour. Les droites montrant les valeurs de  $pH_e$  (magenta) et de  $pH_i$  (rose clair) sont extrapolées en fonction des valeurs mesurées à 20°C, 25°C et 31°C.

The background of the slide is a photograph of a coral reef. The water is a deep blue, and the reef structure is visible in shades of light blue and white. A white rectangular box with a thin black border is centered on the slide, containing the chapter title and subtitle in a black serif font.

## Chapitre 4

*Effet de la température sur la perméabilité des  
tissus et la diffusion paracellulaire des ions vers  
le milieu extracellulaire calcifiant*



## CHAPITRE 4

### Effet de la température sur la perméabilité des tissus et la diffusion paracellulaire des ions vers le milieu extracellulaire calcifiant

#### 1. Généralités sur les jonctions intercellulaires et la perméabilité des épithéliums

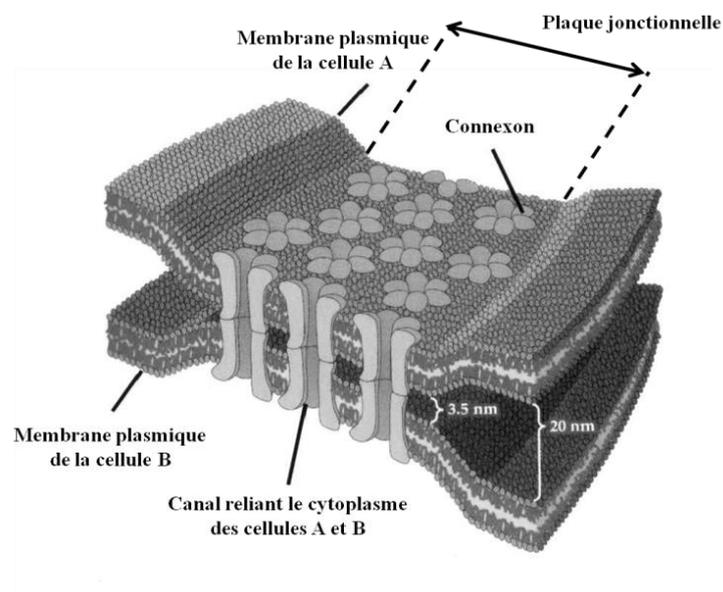
L'apparition de la multicellularité il y a 2,1 milliards d'années, largement répandue après l'explosion Cambrienne 1,5 milliards d'années plus tard, a induit la nécessité d'organiser les cellules les unes par rapport aux autres au sein des organismes (Albani *et al.*, 2010). Deux catégories principales d'organisation cellulaire existent chez les animaux : l'épithélium et le mésenchyme (Tyler, 2003). Tandis que les mésenchymes sont composés de cellules souvent isolées et en contact avec la matrice extracellulaire au niveau d'un voire de tous les côtés, les épithéliums quant à eux forment des tissus de cellules alignées selon une polarité apicale/basale et sont en contact avec la matrice extracellulaire uniquement au niveau de leurs faces basale (lame basale) et parfois apicale (cuticule) (Tyler, 2003). Chez les Bilatériens, les interactions entre les mésenchymes et les épithéliums au cours du développement sont à l'origine des réorganisations cellulaires pour la compartimentalisation de l'organisme et la formation d'organes (Magie et Martindale, 2008). Les Cnidaires, quant à eux, possèdent deux types d'épithéliums, l'épiderme (ou ectoderme) et le gastroderme (ou endoderme) (Tyler, 2003) ainsi qu'une couche de mésoglée. Au sein de l'épithélium, les cellules sont liées les unes aux autres par des structures complexes appelées jonctions intercellulaires dont les caractéristiques et le rôle est développé ci-après. Chez les Métazoaires, ces jonctions permettent le contact entre des cellules adjacentes ou entre les cellules et la matrice extracellulaire, et contrôlent la perméabilité paracellulaire de l'épithélium. Divers types de jonctions existent et sont classés selon leur fonction et leur structure morphologique et moléculaire. Se retrouvent ainsi des jonctions : communicantes, d'ancrage et d'occlusion. Les particularités de chacun de ces types de jonctions sont détaillées ci-après.

##### 1.1. Les jonctions intercellulaires chez les Métazoaires

###### 1.1.1. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (*gap junctions* en anglais) permettent la connexion directe entre le cytoplasme de deux cellules voisines afin de transférer des ions, petites molécules et impulsions électriques de l'une à l'autre. Elles permettent par exemple la synchronisation de l'ensemble des cellules musculaires du cœur lors de la contraction de celui-ci (e.g. Kanno et Saffitz, 2001) ou encore la coordination du mouvement sinusoïdal chez les nématodes

(Simonsen *et al.*, 2014). Les jonctions communicantes sont retrouvées dans la majorité des organes de nombreux Métazoaires et jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de nombreux processus physiologiques et le développement de l'organisme tout au long de sa vie. Chez les vertébrés, les jonctions communicantes se présentent sous la forme de plaques comprenant de nombreux canaux qui relient une cellule A à une cellule B (Evans et Martin, 2002). Chacun de ces canaux est constitué d'un pore central autour duquel s'articule un hexamère de protéines transmembranaires appelées connexines, le connexon (Figure 35). Chez les invertébrés, les connexines présentes de part et d'autre des canaux sont remplacées par des innexines (Simonsen *et al.*, 2014). Bien que la séquence protéique des innexines diffère en grande partie de celle des connexines, leur structure et leur fonction sont semblables (Evans et Martin, 2002). Au sein des Cnidaires, des jonctions communicantes ont été observées chez *Hydra* et d'autres hydrozoaires, mais aucune jonction de ce type n'a été identifiée chez l'anémone *Nematostella* ou tout autre anthozoaire (Mackie *et al.*, 1984).



**Figure 35. Modèle de jonction communicante.** Modifié d'après Evans et Martin (2002).

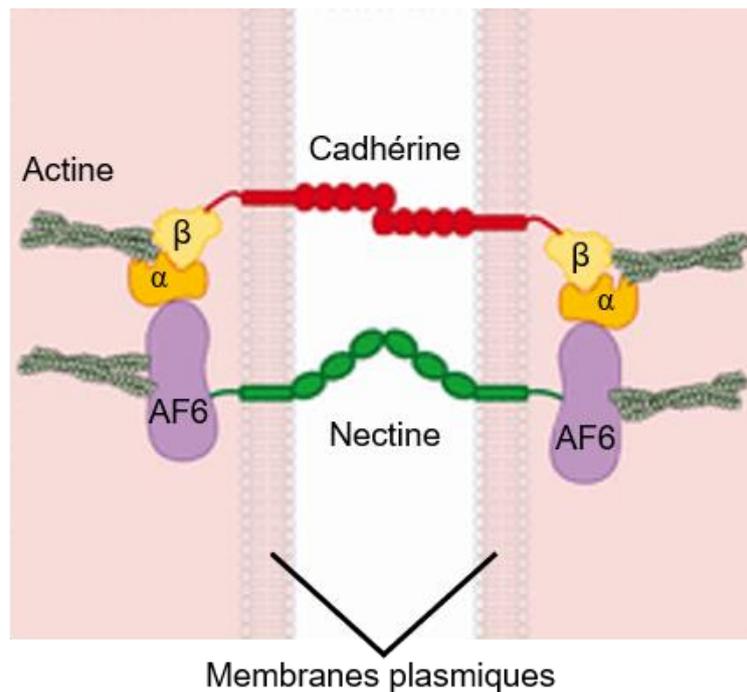
### 1.1.2. Les jonctions d'ancrage

Les jonctions d'ancrage permettent d'attacher mécaniquement les cellules voisines entre elles ou à la matrice extracellulaire. Elles forment une structure solide attachée aux filaments d'actine de cytosquelette, résistants aux tensions, à l'intérieur de chacune des cellules (Alberts *et al.*, 2002). Il existe plusieurs catégories de jonctions d'ancrage : les jonctions d'adhérence (*adherens junction* en anglais), les desmosomes et les héli-desmosomes.

Les jonctions d'adhérence peuvent se présenter sous deux formes différentes. La première se présente de manière discontinue, punctiforme, tandis que la seconde, mieux caractérisée, consiste en un anneau encerclant la cellule (*zonula adherens*, ou ceinture d'adhérence) et permet la coordination des mouvements des feuilletts épithéliaux dans leur ensemble (Niessen et

Gottardi, 2008). Chez les Cnidaires, des jonctions d'adhérence ont été observées en microscopie électronique chez l'anémone *Nematostella vectensis* (Kraus et Technau, 2006). Elles sont trouvées sous la forme de points dans les premiers stades de divisions cellulaires puis sous la forme de *zonula adherens* à partir du stade blastula<sup>2</sup>.

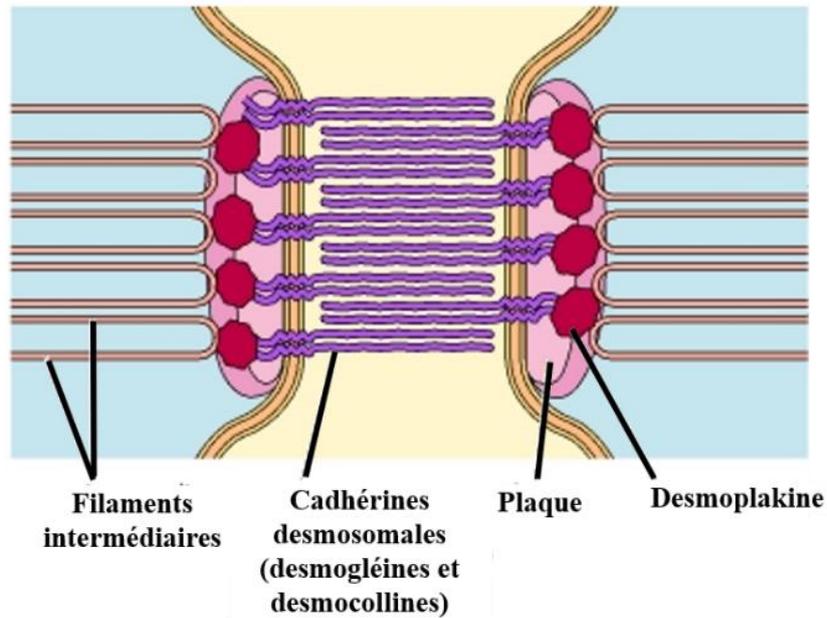
Les jonctions d'adhérence sont composées de deux complexes de protéines : un complexe cadhérine/caténine et un complexe nectine/afadine (Figure 36). Les cadhérines se lient aux  $\beta$ -caténines qui interagissent avec les  $\alpha$ -caténines, lesquelles s'attachent aux filaments d'actine (Mateo *et al.*, 2015). De même, les protéines de nectine sont liées aux filaments d'actine à travers les afadines (Mateo *et al.*, 2015).



**Figure 36. Modèle de jonction d'adhérence.**  $\alpha$  et  $\beta$  représentent les caténines, et AF6 sont les afadines. Modifié d'après Mateo *et al.* (2015).

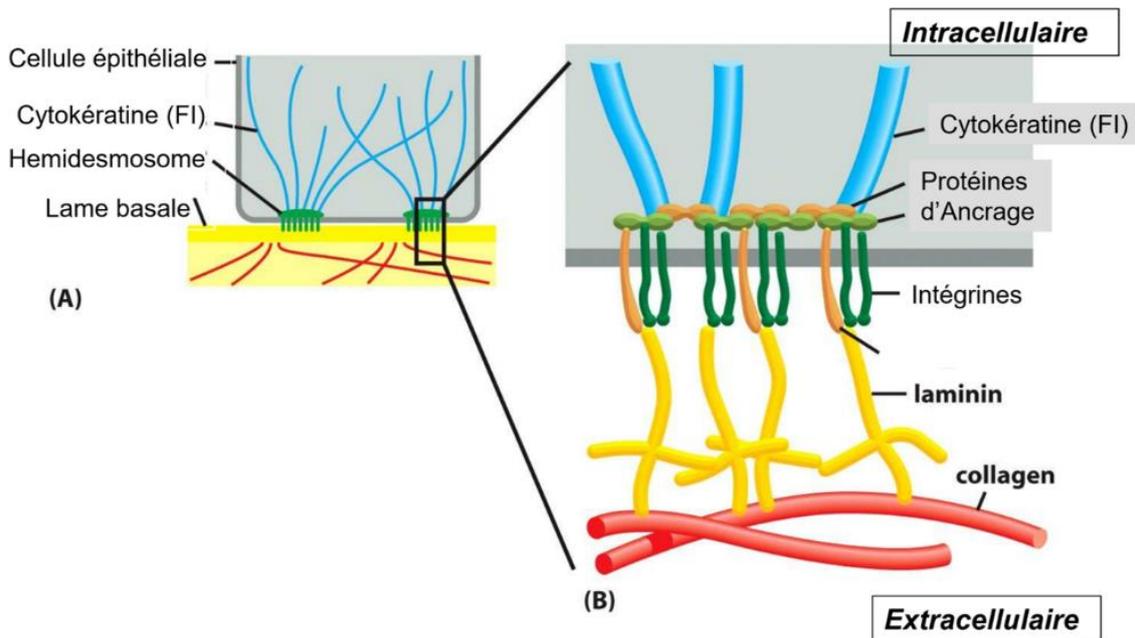
Les desmosomes exercent un rôle similaire aux jonctions d'adhérence étant donné qu'ils permettent une forte adhésion cellule-cellule. Ils diffèrent cependant dans leur composition puisqu'ils sont constitués de cadhérines qui leur sont spécifiques (desmoglérines et desmocollines) et qui s'attachent à des filaments intermédiaires, et non pas à des filaments d'actine comme dans le cas des jonctions d'adhérence (Nekrasova et Green, 2013) (Figure 37).

<sup>2</sup> La blastula est un stade précoce du développement embryonnaire situé entre les stades morula et gastrula. Au cours du stade blastula, une cavité appelée blastocœle se forme entre les cellules, appelées blastomères, de façon à former une sphère creuse.



**Figure 37. Modèle de desmosome.** Modifié d'après Cooper (Cooper, 2000).

Les hémidesmosomes, quant à eux, permettent l'attachement solide des cellules à la matrice extracellulaire. Pour cela ils établissent un lien entre les filaments intermédiaires de kératine à l'intérieur des cellules épithéliales basales et une couche de la matrice extracellulaire appelée lame basale (Walko *et al.*, 2015) (Figure 38). Bien que non caractérisées d'un point de vue moléculaire, chez les coraux, des structures ressemblant à des hémidesmosomes ont été observées du côté basal (côté mésoglée) des desmocytes, cellules qui sont des zones d'ancrage de l'ectoderme aboral au squelette (Muscatine *et al.*, 1997; Tambutté, É. *et al.*, 2007).

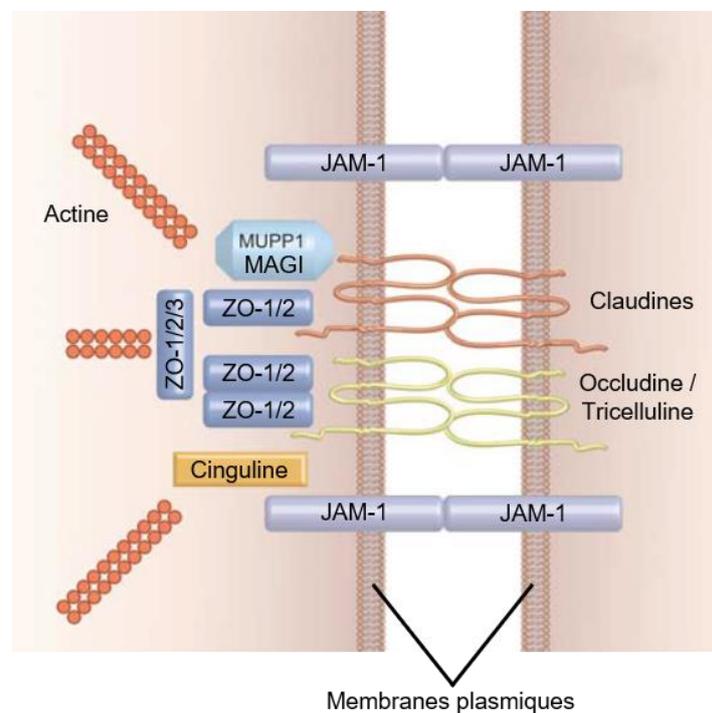


**Figure 38. Modèle d'hémidesmosome.** D'après Alberts *et al.* (2008)

### 1.1.3. Les jonctions d'occlusion

Les jonctions d'occlusion (ou *zonula occludens*) jouent un rôle de barrage dans le sens où elles contrôlent le passage paracellulaire de certains ions et molécules de manière sélective (Furuse et Tsukita, 2006; Hartsock et Nelson, 2008; Steed *et al.*, 2010). Chez les vertébrés ces jonctions sont qualifiées de « jonctions serrées », tandis que chez les invertébrés il s'agit de « jonctions septées ». Dans ce paragraphe, je vais me concentrer sur les caractéristiques des jonctions serrées puisque les jonctions septées seront détaillées dans le sous-chapitre 1.2.

Les jonctions serrées sont composées de plusieurs types de protéines transmembranaires, dont les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAMs) (Figure 39). Ensemble, ces protéines forment la structure de la jonction et permettent l'adhésion de deux cellules adjacentes (Niessen, 2007). Les occludines présentent deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire et permettent de réguler la perméabilité paracellulaire via une sélection selon la taille des molécules (Hartsock et Nelson, 2008). Les claudines présentent une structure similaire à celles des occludines, bien que leurs séquences diffèrent, et régulent directement le passage des ions selon leur charge, leur concentration et probablement leur taille (Furuse et Tsukita, 2006; Hartsock et Nelson, 2008). Les JAMs, quant à elles, servent à l'adhésion des cellules (Steed *et al.*, 2010). Ces protéines sont associées à des protéines cytoplasmiques à l'intérieur de la cellule, telles que les protéines *Zonula Occludens* (ZO-1 à 3), afin d'ancrer la jonction au niveau des filaments d'actine du cytosquelette (Niessen, 2007; Hartsock et Nelson, 2008; Steed *et al.*, 2010).



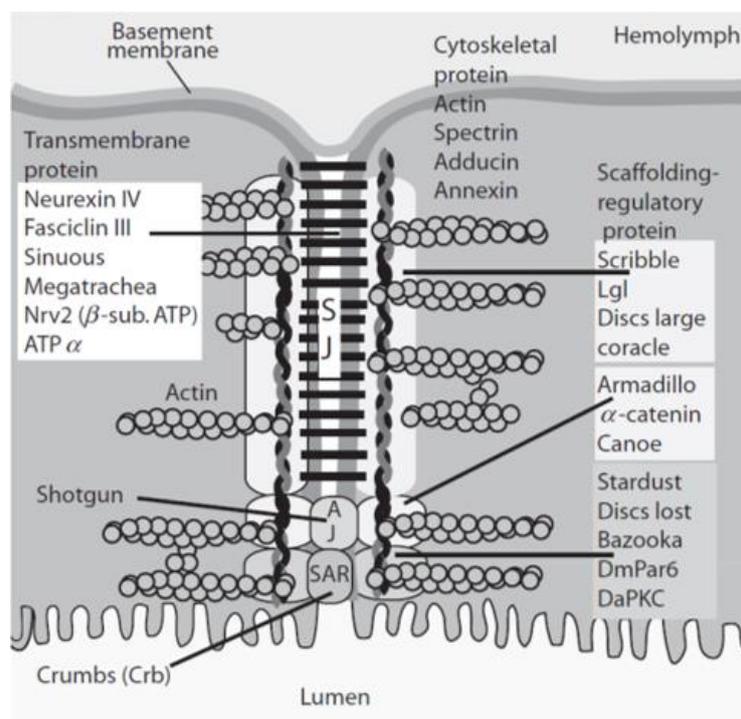
**Figure 39. Modèle de jonction serrée chez les vertébrés.** Modifié d'après Niessen (2007).

## 1.2. Les jonctions septées : régulation de la perméabilité des tissus chez les invertébrés, dont les coraux

### 1.2.1. Structure des jonctions septées

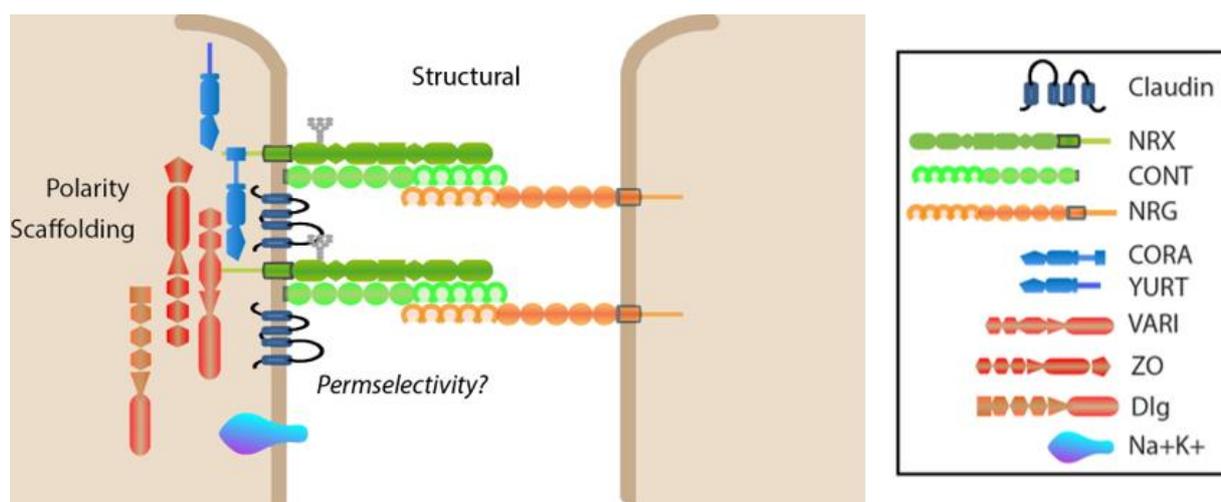
Les jonctions septées constituent, chez les invertébrés, les analogues des jonctions serrées des vertébrés. Elles ont donc été classées dans la catégorie des jonctions d'occlusion car, bien qu'elles diffèrent des jonctions serrées aux niveaux moléculaire et morphologique, elles présentent des fonctionnalités similaires. En effet, tout comme les jonctions serrées, les jonctions septées restreignent la diffusion paracellulaire d'ions et molécules à travers les épithéliums au niveau desquels elles sont présentes (Magie et Martindale, 2008). Ce type de jonction a été découvert chez *Hydra* (Cnidaires) et avait alors été qualifié de « desmosomes septés » (Wood, 1959), avant d'être renommé en tant que « jonctions septées ».

Les jonctions septées se présentent telles des échelles à plusieurs barreaux d'origine protéique (septes) dans l'espace entre deux cellules adjacentes (Figure 40). Chez la drosophile, la structure des jonctions septées comprend un complexe tripartite composé des protéines contactine (CONT), neurexine IV (NRX IV) et neuroglian (NRG) (Faivre-Sarrailh *et al.*, 2004). De plus, des claudines ont aussi été identifiées, tout comme dans les jonctions serrées, et pourraient jouer un rôle similaire dans la perméabilité des tissus, bien que leur rôle demeure incertain (Furuse et Tsukita, 2006). Par ailleurs, d'autres protéines, telles que les protéines Discs-large (Dlg) de la famille MAGUK, Ezrin-moesin-radixin et Scribble, interagissent avec la face cytoplasmique des jonctions septées de manière à ancrer et positionner correctement les jonctions dans les cellules (revu par Magie et Martindale, 2008).



**Figure 40. Modèle de jonction septée chez les insectes.** D'après Beyenbach et Piermarini (2011).

Chez les coraux, plusieurs études ont révélé la présence de jonctions septées dans la région apicale des cellules de toutes les couches cellulaires (Johnston, 1980; Clode et Marshall, 2002; Tambutté, É. *et al.*, 2007). Il a été montré chez *S. pistillata* que le diamètre des jonctions septées est compris entre quelques Amstrong et 20 nm et qu'elles limitent ainsi le passage des ions et molécules dont la taille est supérieure (Tambutté, É. *et al.*, 2012). Bénazet-Tambutté *et al.* (1996) et Taubner *et al.* (2019) ont observé aussi que les cations tout comme les anions peuvent traverser ces jonctions, bien que la perméabilité des tissus des coraux soit différente entre ces deux types de charges. Une étude conduite sur plusieurs cnidaires dont *S. pistillata* a permis de caractériser la structure moléculaire de ces jonctions (Ganot *et al.*, 2015). Tout comme chez la drosophile, le cœur de la jonction septée des Cnidaires est composé des protéines de neurexine (NRX), contactine (CONT), neuroglian (NRG) et de claudines (Claud). Le répertoire de gènes codant ces protéines est diversifié et comprend des différentes isoformes de NRXs et NRGs en fonction des tissus où ils sont exprimés. De plus, chez *S. pistillata*, StpNRX1 a été colocalisée avec le réseau de F-actine, ce qui suggère que les jonctions septées sont attachées au cytosquelette, à travers des protéines cytoplasmiques adaptatrices, telles que les coracles (CORA) et Yurt. Les CORAs et Yurt, avec les protéines de la famille MAGUK, servent donc à ancrer la jonction dans la cellule, et leur positionnement basolatéral permet de polariser les cellules. Un modèle des jonctions septées chez les Cnidaires est présenté en Figure 41.



**Figure 41. Modèle euristique de jonction septée chez les Cnidaires.** Modifié d'après Ganot *et al.* (2015)

### 1.2.2. La perméabilité des tissus chez les coraux

Chez les invertébrés, les jonctions septées contrôlent le passage paracellulaire d'ions et molécules (perméabilité) à travers les épithéliums. L'intégrité des jonctions détermine ainsi le niveau de perméabilité des tissus. Etant donné que la voie paracellulaire permet un transport passif des ions et molécules, leur diffusion à travers les épithéliums dépend aussi du gradient électrochimique, c'est-à-dire des gradients de concentration entre le milieu extérieur et l'organisme et des gradients de charge électrique de part et d'autre de l'épithélium (pour les ions) (Allemand *et al.*, 2011). Les ions et molécules ne peuvent donc entrer dans l'organisme

qu'à condition qu'ils soient plus concentrés dans le milieu extérieur et qu'ils suivent un gradient de concentration décroissant.

Les épithéliums sont définis comme « serrés » lorsque qu'ils sont peu perméables, ou « lâches » lorsqu'à l'inverse ils sont très perméables aux ions et molécules. Afin de déterminer si un épithélium est serré ou lâche, des expériences « voltage-clamp » sont conduites et permettent de déterminer la résistance électrique des tissus (e.g. Bénazet-Tambutté *et al.*, 1996; Tambutté, É. *et al.*, 2012). Plus la valeur est élevée, plus le tissu est résistant et donc la perméabilité est faible, témoin d'un épithélium serré, et inversement.

Une des façons de visualiser la voie paracellulaire pour le transport des ions chez les coraux repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes, telles que la calcéïne, qui ne peuvent pas traverser les membranes cellulaires et dont le signal a pu être détecté lors de leur passage entre les cellules et de leur incorporation dans le squelette (Tambutté, É. *et al.*, 2012). Des analyses électrophysiologiques sur les tentacules (tissus oral) de l'anémone *Anemonia viridis* ont montré des valeurs de résistance comprises entre 15 et 23 Ohm cm<sup>2</sup>, soit dans la gamme observée pour des épithéliums lâches (Bénazet-Tambutté *et al.*, 1996; Tambutté, É. *et al.*, 2012). Ces valeurs, bien qu'obtenues chez l'anémone, peuvent être rapportées également au tissu oral des coraux du fait de la forte ressemblance morphologique des tissus oraux entre ces deux Anthozoaires (Allemand, Furla, *et al.*, 1998). De plus, Bénazet-Tambutté *et al.* (1996) ont démontré que les flux de Ca<sup>2+</sup> à travers les tissus oraux de *A. viridis* et du corail calcifiant *Heliofungia actiniformis* ne nécessitent pas d'énergie, sont corrélés de manière linéaire à la concentration en Ca<sup>2+</sup> du milieu extérieur et sont insensibles à l'inhibition des canaux calcium. L'ensemble de ces observations suggèrent donc que les tissus oraux des Cnidaires, dont les coraux, se comportent comme des épithéliums lâches et que le transport de calcium est permis par une diffusion passive paracellulaire. En revanche, des analyses électrophysiologiques conduites sur des microcolonies de *S. pistillata* ont montré que la résistance des tissus (oraux + aboraux) est de 477 Ohm cm<sup>2</sup>, valeur comprise dans la gamme de valeurs correspondant à des épithéliums serrés (Tambutté, É. *et al.*, 2012). Cette valeur supérieure à celle obtenue pour les tissus oraux suggèrent que les tissus aboraux, en particulier l'épithélium calicoblastique, sont plus résistants au passage des ions que les tissus oraux et seraient donc moins perméables (Tambutté, É. *et al.*, 2012; Taubner *et al.*, 2019). De plus, il a été montré que le transport de Ca<sup>2+</sup> au niveau de l'épithélium calicoblastique requiert de l'énergie (Tambutté, É. *et al.*, 1996) et qu'il a lieu de manière active *via* la voie transcellulaire grâce à des canaux calcium (Zoccola *et al.*, 1999) et des Ca<sup>2+</sup>-ATPases (Zoccola *et al.*, 2004).

## 2. Résultats personnels : Mesure de la perméabilité des tissus et expression des gènes de jonctions sur des microcolonies à plat

### 2.1. Contexte de l'étude

Même si l'importance relative de la voie paracellulaire par rapport à la voie transcellulaire dans des conditions contrôlées fait toujours l'objet de débats (voir chapitre 1), il est essentiel de déterminer si la voie paracellulaire de transport des ions pour la calcification est affectée lors de stress thermiques. Dans cette optique, la perméabilité des tissus a été évaluée grâce à la mesure du demi-temps ( $t_{1/2}$ ) de renouvellement d'une sonde fluorescente, la calcéine, dans le MEC, soit le temps nécessaire pour renouveler la moitié d'une poche de MEC. Des sondes fluorescentes, telles que le jaune lucifer et la fluoescéine, ont été largement employées chez les vertébrés et a permis d'améliorer la compréhension du fonctionnement des jonctions serrées et de la perméabilité des tissus (Helms *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017, 2018). Cette approche constitue donc une méthode fiable pour étudier la voie de transport paracellulaire. Chez les coraux, la calcéine a déjà été utilisée dans plusieurs travaux pour étudier la calcification et visualiser la voie de passage paracellulaire puisqu'elle ne peut pas traverser les membranes cellulaires et se dirige jusqu'au MEC où elle est intégrée aux cristaux lors de la formation du squelette (e.g. Tambutti, É. *et al.*, 2012; Venn *et al.*, in prep). Les mesures de  $t_{1/2}$  ont été conduites au niveau du front de croissance de microcolonies à plat, comme pour les mesures de pH, afin de visualiser comment la perméabilité paracellulaire des tissus est affectée par des changements de température. Les expériences ont été menées aux mêmes températures que dans le Chapitre 3, soit 20°C, 25°C et 31°C puisqu'il a été estimé précédemment que 20°C et 31°C représentent les températures limites pour lesquelles la croissance des cristaux et la visualisation de poches de MEC sont possibles (voir Chapitre 3). En parallèle, l'expression des gènes de jonctions septées a été analysée au niveau du front de croissance des microcolonies où sont réalisées les mesures de  $t_{1/2}$  afin de déterminer si les modifications éventuelles de perméabilité pourraient être liées à des modifications dans la composition de ces jonctions.

### 2.2. Matériel et méthodes

#### 2.2.1. Matériel biologique et design expérimental

Tout comme dans le chapitre 3, le matériel biologique utilisé pour les expériences dans ce chapitre sont des microcolonies à plat qui ont été exposées une semaine à chacune des trois températures étudiées (20°C, 25°C et 31°C). Les conditions des bacs de cicatrisation et expérimentaux sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre 3. Comme dans les chapitres précédents, les mesures de nuit ont été effectuées dans l'obscurité à la fin de la nuit avant que les lumières ne s'allument, et les mesures de jour ont été réalisées à la lumière à midi.

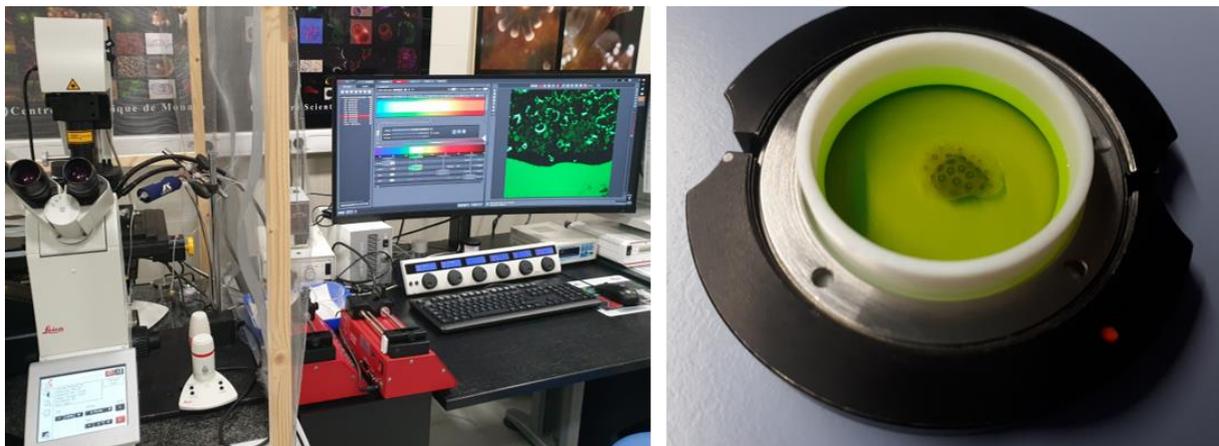
## 2.2.2. Mesure de la perméabilité des tissus

### Dispositif expérimental

Les mesures du demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC ont été réalisées *in vivo* sur des échantillons incubés en présence de calcéine (Sigma-Aldrich) (solution stock à 3,21 mM), selon le protocole développé par Venn *et al.* (in prep). Tout comme pour les mesures de pHe et pHi, les microcolonies à plat sont placées dans une chambre de perfusion (PeCon), puis installées sur une plaque thermostatée (Temperable Insert P, PeCon) reliée à un bain-marie réglé à la température étudiée (20°C, 25°C ou 31°C). Toutes les mesures ont été réalisées en microscopie confocale (Leica SP8) avec un laser d'excitation à 488 nm. La longueur d'onde à laquelle la fluorescence de calcéine est observée est de  $530 \pm 20$  nm. Les échantillons sont observés avec un objectif x40 à immersion à l'huile.

### Perfusion de calcéine et acquisition des images en microscopie confocale

Avant les mesures, deux solutions de calcéine sont préparées : une solution de perfusion à 100  $\mu$ M et une solution à 300  $\mu$ M (Venn *et al.*, in prep). Les solutions de calcéine sont tamponnées avec du NaOH 0,1N de manière à atteindre un pH<sub>NBS</sub> d'environ 8,15. Avant le début des mesures, la microcolonie est placée dans la chambre de perfusion en présence de 2 ml d'eau de mer. Une zone du front de croissance de la microcolonie est choisie préalablement aux mesures dès lors qu'elle présente des cristaux isolés et des poches de MEC et un premier z-stack (capture d'une série d'images à différentes épaisseurs, z, de l'échantillon) est réalisé en absence de calcéine ( $t_{-2min}$ ). Dès le démarrage de la perfusion de calcéine, 1 ml de la solution de calcéine à 300  $\mu$ M est injectée dans la chambre de perfusion de manière à obtenir un volume total de 3 ml et une concentration de 100  $\mu$ M et un second z-stack est effectué ( $t_0$ ) (Figure 42). Par la suite, la microcolonie est placée en perfusion pendant 65 min avec la solution à 100  $\mu$ M de calcéine. Le renouvellement dans la chambre de perfusion est de 50% chaque minute, soit 1,5 ml/min. Un z-stack est réalisé toutes les 3 min pendant les 15 premières minutes à partir du  $t_0$ , puis toutes les 5 min pendant les 50 minutes suivantes.



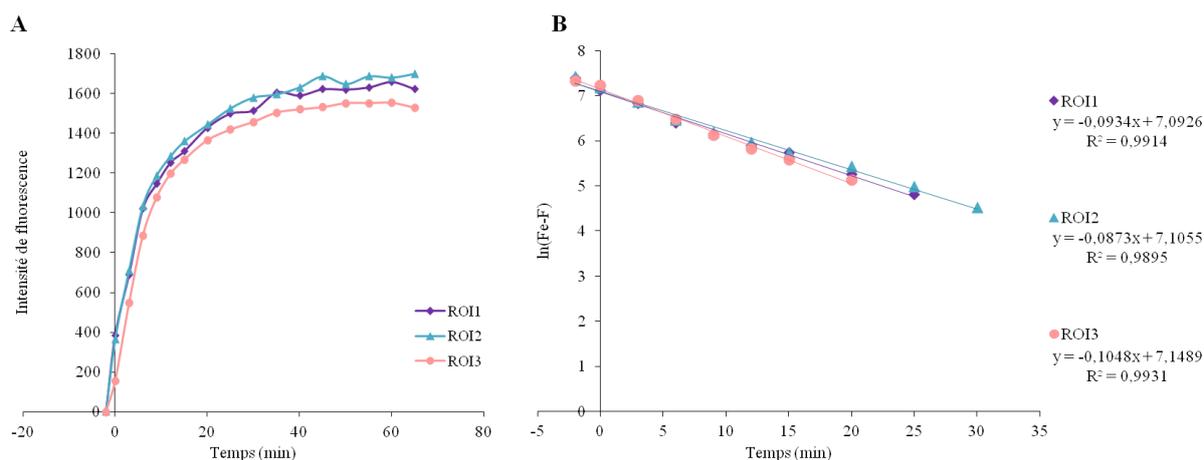
**Figure 42. Photographies :** A. du microscope confocal (Leica SP8), B. d'une microcolonie incubée en présence de calcéine dans une chambre de perfusion. © Coralie Bernardet (CSM)

### Détermination du taux de renouvellement ( $t_{1/2}$ ) dans le MEC

Comme dans le chapitre 3, les données ont été collectées et analysées avec le logiciel Leica LAS X. Des ROIs (Region Of Interest) sont tracées avec le logiciel dans les poches de MEC et permettent d'obtenir une valeur de fluorescence pour la calcéine. Pour chaque poche de chacun des z-stacks, trois valeurs en z sont utilisées pour calculer une moyenne de fluorescence dans la poche de MEC. Ces valeurs sont ensuite exportées dans un fichier Excel (Microsoft Office 2019) et permettent d'établir une courbe de l'intensité de fluorescence dans les poches en fonction du temps (Figure 43 A). Le logarithme de la différence d'intensité de fluorescence à l'équilibre ( $F_e$ ) (au plateau) et de fluorescence à un temps  $t$  ( $F$ ), selon l'équation  $\ln(F_e - F)$ , permet de réaliser une régression linéaire tel que présenté en Figure 43 B. La pente des régressions linéaires permet ensuite de calculer le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans les poches de MEC ( $t_{1/2}$ ) selon l'équation :

$$(Equation\ 9) \quad t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{a}$$

où  $a$  est la pente de la régression linéaire. La valeur  $t_{1/2}$  obtenue en minutes décimales est ensuite convertie en minutes réelles.



**Figure 43. Exemples de courbes d'intensité de fluorescence (A) et du  $\ln(F_e - F)$  (B) dans les poches de MEC en fonction du temps.**  $F_e$  désigne l'intensité de fluorescence à l'équilibre et  $F$  l'intensité de fluorescence à un temps  $t$ .

### 2.2.3. Expression des gènes des jonctions septées

L'expression des gènes de jonctions a été déterminée grâce à des PCR en temps réel sur un panel de 17 gènes identifiés dans la structure et l'ancrage des jonctions septées de *S. pistillata* (Tableau 9). Les PCR en temps réel ont été conduites sur les mêmes transcriptions réverses (ADNc) que dans le Chapitre 3.

**Tableau 9.** Liste des gènes de jonction septées de *S. pistillata* analysés ici et publiés par Ganot *et al.* (2015), avec les séquences des amorces et la taille des produits de PCR en temps réel.

Gène d'intérêt	Rôle	Amorce de PCR en temps réel	
StpClaud3	Structure	F	CAGGCTTGACGGTTTTTCGT
		R	ACTTCGGGACTATCCCATCC
StpClaud4		F	GGTGCACTATTCCCTGCACA
		R	TGTCACAAGTCCCGGATGTA
StpClaud5		F	TAGGAATCGGTTGTGGGTTC
		R	ACACTTCCCCAGCCTGAAG
StpClaud6		F	ATGGCGAGCTTGTCTGTTTT
		R	CAGCCAGCAGGGTAGAGAAC
StpClaud7		F	AACCGAAATGGCTTCACATC
		R	AATCCAGCAAACAGGCAAAC
StpClaudAS1		F	CATTACCGAGGTTTGTTCAGG
		R	GCACAGAAGAATCCGCCTAC
StpClaudAS2		F	GCCGATAGCTGCACAACAT
		R	CAGATGAGGGCCAGAAACAT
StpCONT		F	TGACAGCAATCCACAAATGAG
		R	TGCAAGGAGCTTCTCCAGTT
StpNRG1		F	TTACAGTGCTGCCGTGAAAG
		R	ATGAGAGGCCGTCATACTCG
StpNRG2		F	TAGGACCATCGGAAGAAACG
		R	ACAAGGAGCAGGACAGCAAT
StpNRX1	F	GTCTTTGTCCCCTGCTTGAA	
	R	ACCAATGAGTTGCCTTTTGG	
StpNRX2	F	ATGAGGTGTGCATGTGGTGT	
	R	ATTCCAGTGGCCCAACAGTA	
StpNRX3	F	GCATGTGGAGAGACGAACAG	
	R	CTTGGCATCCGAATTGAACT	
StpCORA1	Ancrage	F	GTGGGAGAGGAAACAAGCTG
		R	AGTTGTTCCCTCCAGGAGCTG
StpCORA2		F	CTCCCAAAGATGTTCGCATTC
		R	TGATGAAAAGCGTTTGCTTG
StpCORA3		F	TGTCCCAGTTACGGGTCCTA
		R	GAGGGCTGGACCTTGATGT
StpYURT		F	GGTGA CTGGTCTGGGAGAAA
		R	AATCACCTTCCCAGACAGCTT

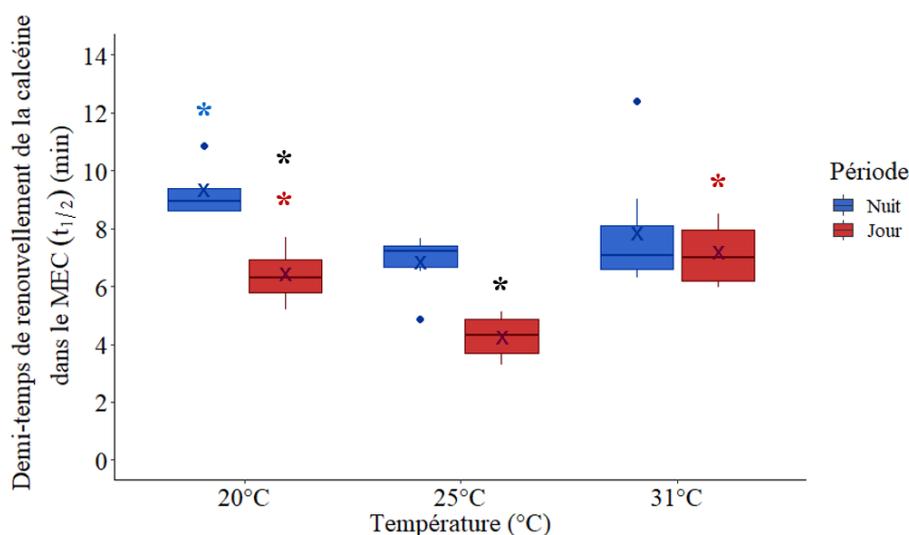
## 2.2.4. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel RStudio (R v3.5.2.). La normalité des données et l'homogénéité des variances ont été vérifiées à l'aide de tests de Shapiro (`shapiro.test`) et de Levene (`levene.test`, package `car`). Les mesures de demi-temps de renouvellement du MEC ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test post-hoc (`pairwise.t.test`). En ce qui concerne l'expression des gènes, j'ai d'abord effectué une analyse discriminante afin d'explorer l'ensemble des données. Par la suite, j'ai réalisé une ANOVA à trois facteurs pour analyser l'interaction entre la température (20°C, 25°C, et 31°C), la condition nuit/jour et les différents gènes (expression des 17 gènes étudiés). Un test post-hoc « pairwise t test » a ensuite permis de caractériser les gènes exprimés différemment dans chacun des traitements.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Calcul du demi-temps de renouvellement ( $t_{1/2}$ ) du milieu extracellulaire calcifiant

Le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC a été mesuré à 20°C, 25°C et 31°C, le jour et la nuit (Figure 44). Une ANOVA à deux facteurs a permis de montrer une influence significative de la température et de la condition nuit/jour, mais pas d'interaction significative de la combinaison de ces deux facteurs (Tableau 10). Le  $t_{1/2}$  est significativement plus long à 20°C et 31°C par rapport à 25°C le jour, ainsi que la nuit à 20°C. Le  $t_{1/2}$  est également significativement plus long la nuit que le jour à 20°C et 25°C (Tableau 11).



**Figure 44. Demi-temps de renouvellement de la calcéine dans les poches de MEC ( $t_{1/2}$ ) à 20°C, 25°C et 31°C.** Les boîtes à moustaches bleues correspondent aux mesures de nuit et les rouges aux mesures de jour (n = 4-7). Les boîtes à moustaches sont délimitées par le premier et le troisième quartile, les croix représentent la moyenne, les barres du milieu sont les médianes, les points représentent chacune des valeurs et les barres d'erreur sont les écart-types. Les étoiles montrent les différences statistiques par

rapport à : 25°C nuit (en bleu), 25°C jour (en rouge), à la nuit (en noir), selon une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post-hoc (pairwise.t.test).

**Tableau 10.** Résultat d'une ANOVA à deux facteurs sur l'effet de la température et de la condition nuit/jour sur le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC (Figure 44).

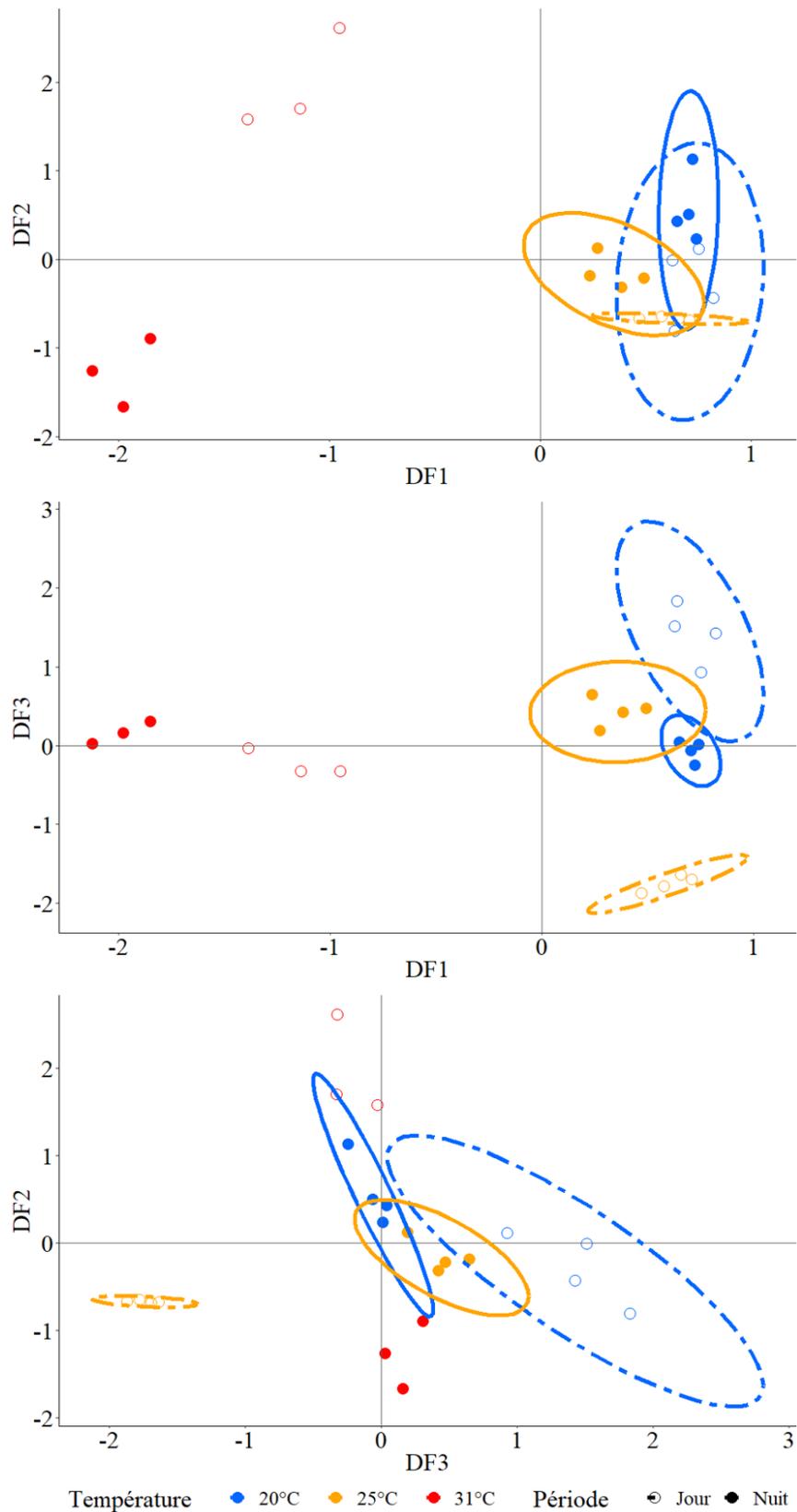
Variable	df	F	P	Post-hoc
Température	2	6,705	< 0,01	Voir Tableau 11
Temps	1	19,576	< 0,001	Voir Tableau 11
Température x Temps	2	0,242	0,79	Voir Tableau 11

**Tableau 11.** Résultat du test post-hoc (pairwise.t.test) sur le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC. Les « x » indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) par rapport à 25°C, et entre la nuit et le jour.

Température	Temps	25°C		Différence nuit/jour
		Nuit	Jour	
20°C	Nuit	x		x
	Jour		x	
25°C	Nuit			x
	Jour			
31°C	Nuit	-		-
	Jour		x	

### 2.3.2. Expression des gènes des jonctions septées

Dans un premier temps, j'ai effectué une analyse discriminante sur l'ensemble des données d'expression génique afin d'explorer les données et constituer des groupes selon les profils d'expression génique des individus en fonction de la température et de la condition nuit/jour (Figure 45, Annexes 7 et 8). 66% de la variation dans les profils d'expression génique est expliquée par les trois premiers axes (Discriminant Factor 1 à 3, soit DF1 à 3). Les différences statistiques entre les groupes ont été testées à l'aide d'une ANOVA à un facteur dont les résultats sont présentés en Annexe 9. A 31°C, le nombre limité de réplicats n'a pas permis de tracer d'ellipses pour ces groupes, mais il est tout de même possible de visualiser l'emplacement de chacun des profils d'expression génique des individus à cette température (ronds rouges sur le graphique). Les profils d'expression génique des individus à 31°C, jour et nuit, sont significativement séparés de ceux des individus à 20°C et 25°C selon l'axe DF1, tandis que ces derniers sont, eux, regroupés. Par ailleurs les profils d'expression des individus jour et nuit sont séparés à 20°C et 25°C selon l'axe DF3.

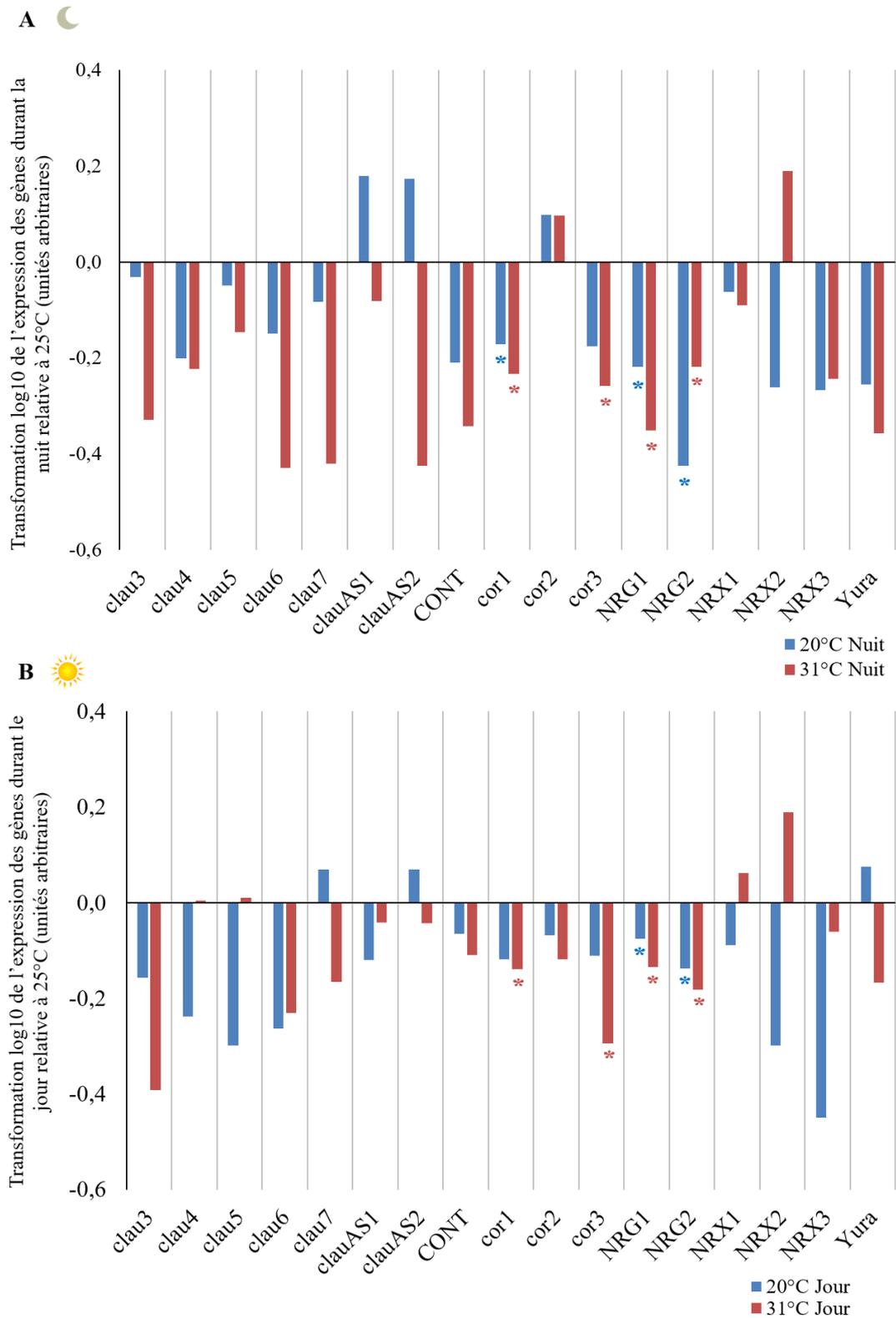


**Figure 45.** Analyse discriminante sur l'expression de 17 gènes de jonctions chez *S. pistillata*. Chaque point représente le profil d'expression génique d'un échantillon, et les ellipses les groupes de ressemblance. En bleu sont représentés les échantillons à 20°C, en jaune à 25°C et en rouge à 31°C. Les points pleins correspondent aux individus de nuit, et les points ouverts les individus de jour. A,B et C montrent les représentations graphiques selon les différents Facteurs Discriminants (DF). DF1 explique 24% de variations, DF2 23% et DF3 19%.

L'expression des différents gènes est représentée graphiquement suite à une transformation en  $\log_{10}$  des données de manière à visualiser la sur- ou sous-régulation des gènes par rapport à 25°C (Figure 46) ou des expressions de jour par rapport à la nuit (Figure 47). Cependant, ce type de transformation peut accentuer visuellement des différences qui sont en réalité négligeables lorsque les gènes sont faiblement exprimés. Les différences significatives ont donc été calculées à l'aide de tests statistiques et sont indiquées sur les graphiques. La réalisation d'une ANOVA à trois facteurs a permis d'identifier un effet significatif de la condition nuit/jour, la température et l'expression génique, ainsi qu'une interaction significative entre ces trois facteurs (Tableau 12). L'analyse de l'expression des gènes à 20°C et à 31°C relative à 25°C a permis de révéler un groupe de gènes significativement sous-exprimé, aussi bien la nuit que le jour (Figure 46, Tableau 13). Ce groupe comprend deux gènes codant pour deux protéines structurales des jonctions septées, StpNRG1 et 2, et deux gènes codant pour des protéines impliquées dans l'ancrage de la jonction dans la cellule, StpCORA1 et 3. De plus, j'ai comparé l'expression des gènes à chacune des températures (20°C, 25°C et 31°C) le jour par rapport à la nuit (Figure 47, Tableau 14). A nouveau, un groupe de gènes se démarque par une différence d'expression entre le jour et la nuit et comprend, à 20°C et à 25°C, StpNRG1 et 2 et StpCORA1. A 31°C, en revanche, seule StpCORA1 voit son expression modifiée entre le jour et la nuit.

**Tableau 12.** Résultat d'une ANOVA à trois facteurs sur l'effet de la température (20°C, 25°C et 31°C), de la condition nuit/jour et des différents gènes sur l'expression relative des gènes (Figure 46 et 47).

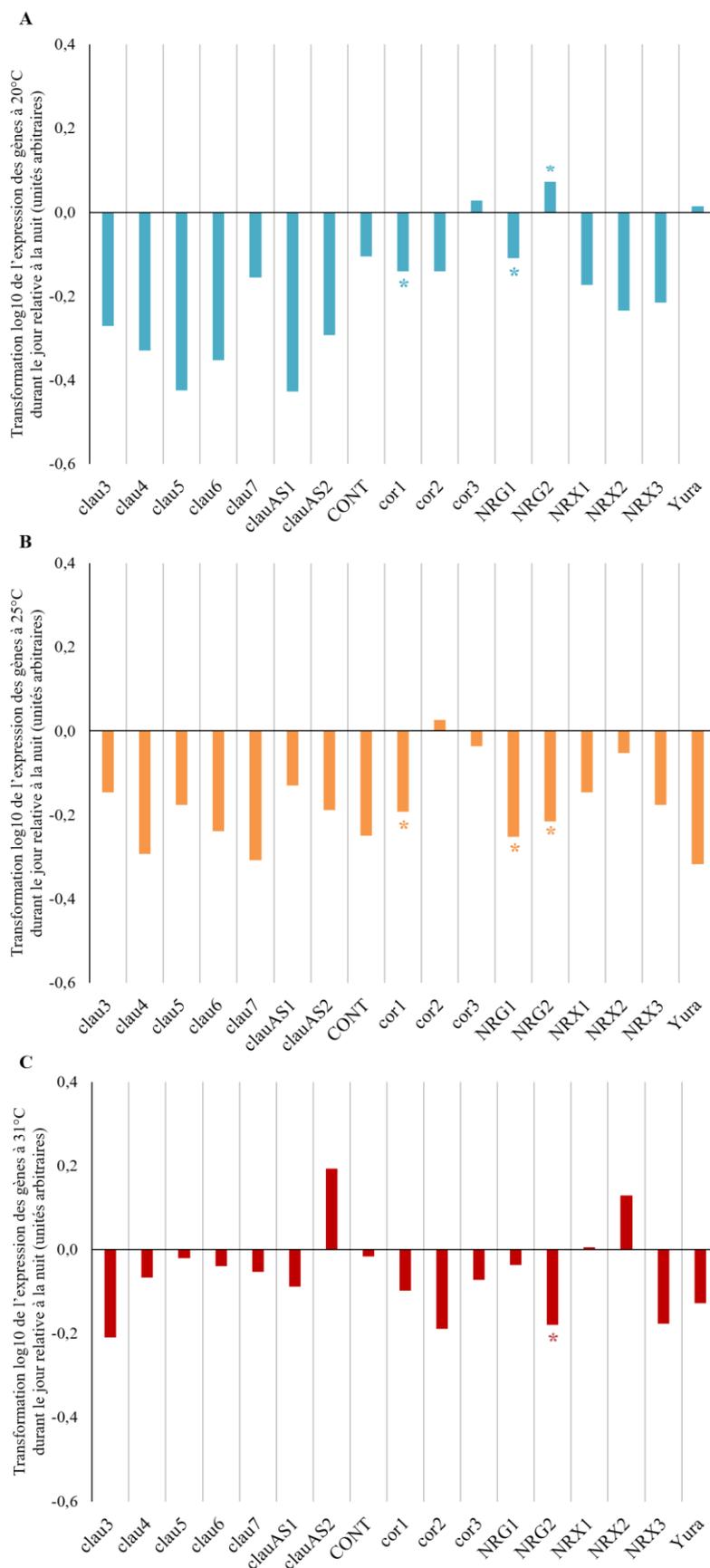
Variable	df	F	P	Post-hoc
Température	2	59,32	< 0,0001	Voir Tableaux 13 et 14
Temps	1	59,06	< 0,0001	
Gènes	16	477,74	< 0,0001	
Température x Temps	2	14,44	< 0,0001	
Température x Gènes	32	17,14	< 0,0001	
Temps x Gènes	16	14,49	< 0,0001	
Température x Temps x Gènes	32	5,86	< 0,0001	



**Figure 46. Représentation graphique de l'expression des gènes de jonctions relative à 25°C (transformation log<sub>10</sub>)** : A. pendant la nuit, et B. pendant le jour. Les barres bleues correspondent à l'expression des gènes à 20°C (n = 4) et les barres rouges à 31°C (n = 4). Les étoiles indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) à 20°C (en bleu) et à 31°C (en rouge) avec l'expression des gènes à 25°C.

**Tableau 13.** Résumé des différences statistiquement significatives dans l'expression des gènes à 20°C et 31°C relative à 25°C pendant la nuit et le jour (Figure 46) déterminée par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches noires représentent l'augmentation ou la diminution significative de l'expression des gènes relative à 25°C ( $p < 0,01$ ). Les flèches grises représentent les tendances relatives à 25°C ( $p < 0,05$ ).

Fonction des gènes	Gène	NUIT		JOUR	
		20°C	31°C	20°C	31°C
Structure	StpClaud3	-	-	-	-
	StpClaud4	-	-	-	-
	StpClaud 5	-	-	-	-
	StpClaud 6	-	-	-	-
	StpClaud 7	-	-	-	-
	StpClaud AS1	-	-	-	-
	StpClaud AS2	-	-	-	-
	StpCONT	-	-	-	-
	StpNRG1	↘	↘	↘	↘
	StpNRG2	↘	↘	↘	↘
	StpNRX1	-	-	-	-
	StpNRX2	-	-	-	-
	StpNRX3	-	-	-	-
Ancrage	StpCORA1	↘	↘	↘	↘
	StpCORA2	-	-	-	-
	StpCORA3	↘	↘	-	↘
	YURT	-	-	-	-



**Figure 47. Représentation graphique de l'expression des gènes de jonctions le jour relative à la nuit (transformation log<sub>10</sub>) :** A. à 20°C (n = 4), B. à 25°C (n = 4), et C. à 31°C (n = 4). Les étoiles

indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) avec l'expression des gènes durant la nuit pour chacune des températures.

**Tableau 14.** Résumé des différences statistiquement significatives dans l'expression des gènes à 20°C, 25°C et 31°C le jour relative à la nuit (Figure 47) déterminée par une ANOVA à trois facteurs et une analyse post-hoc. Les flèches représentent l'augmentation ou la diminution significative de l'expression des gènes relative à la nuit ( $p < 0,05$ ).

Fonction des gènes	Gène	JOUR		
		20°C	25°C	31°C
Structure	StpClaud3	-	-	-
	StpClaud4	-	-	-
	StpClaud 5	-	-	-
	StpClaud 6	-	-	-
	StpClaud 7	-	-	-
	StpClaud AS1	-	-	-
	StpClaud AS2	-	-	-
	StpCONT	-	-	-
	StpNRG1	↘	↘	-
	StpNRG2	↗	↘	↘
	StpNRX1	-	-	-
	StpNRX2	-	-	-
	StpNRX3	-	-	-
Ancrage	StpCORA1	↘	↘	-
	StpCORA2	-	-	-
	StpCORA3	-	-	-
	YURT	-	-	-

## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Influence des paramètres environnementaux sur la perméabilité des tissus : implications dans le processus de calcification

La détermination du demi-temps ( $t_{1/2}$ ) de renouvellement de la calcéine dans le MEC a été utilisée comme indicateur de la perméabilité des tissus de microcolonies exposées à 20°C, 25°C et 31°C. Il est important de garder à l'esprit que les valeurs de demi-temps de renouvellement calculées avec la calcéine ne correspondent pas nécessairement aux valeurs qui pourraient être obtenues pour le  $Ca^{2+}$  ou d'autres ions. En effet, il est possible que le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC, dont la taille est supérieure au  $Ca^{2+}$  et dont la charge est opposée, pourrait différer de celui des ions  $Ca^{2+}$ . Ces mesures permettent donc de déduire la perméabilité des tissus à la calcéine en particulier et sont utilisées dans cette étude

afin de comparer l'importance de la voie paracellulaire entre différents traitements (température et nuit/jour).

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du  $t_{1/2}$  à 20°C et 31°C, soit un renouvellement plus lent du MEC indiquant une diminution de la perméabilité des tissus à ces températures par rapport à 25°C, aussi bien le jour que la nuit. En plus de l'effet de la température, j'ai observé une diminution significative du  $t_{1/2}$ , soit une augmentation de la perméabilité, le jour par rapport à la nuit à 20°C et 25°C. A 31°C, en revanche, la grande variabilité entre les échantillons n'a pas permis de distinguer de différence statistique entre la nuit et le jour. La réalisation d'une ANOVA à deux facteurs n'a cependant pas révélé d'interaction entre la température et la condition nuit/jour et ne montre donc pas de différence de réponse de la perméabilité à la lumière en fonction de la température. L'ensemble de ces résultats montre que la perméabilité diminue dans les conditions où la calcification est réduite, c'est-à-dire aux températures extrêmes (20°C et 31°C) et durant la nuit. Etant donné que le MEC est enrichi en  $\text{Ca}^{2+}$  et en CID par rapport à l'eau de mer (Sevilgen *et al.*, 2019), il est possible que dans des conditions moins favorables à la calcification, les épithéliums deviennent moins perméables de manière à concentrer plus aisément les ions et limiter leur fuite vers le milieu extérieur. De même, la diminution de la perméabilité pourrait aussi permettre de faciliter le maintien d'un pH élevé dans le MEC en laissant moins de  $\text{H}^+$  entrer. Le manque d'informations sur les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  et DIC sous l'effet de la température et des concentrations ioniques dans le cœlentéron, qui est le compartiment extérieur le plus proche du MEC, nous empêche toutefois de conclure quant au sens de transfert des ions. Une autre possibilité serait, à l'inverse, que le fait d'augmenter la perméabilité dans les conditions les plus favorables (25°C et le jour), soit bénéfique à la calcification. En effet, un renouvellement important du MEC pourrait constituer un moyen pour le corail d'apporter plus régulièrement des ions et/ou d'éliminer plus efficacement les produits dérivés de la calcification. L'augmentation de la perméabilité dans les conditions optimales pourrait aussi constituer un moyen d'apporter des nutriments ou d'autres éléments nécessaires à la production d'énergie par le métabolisme pour stimuler la calcification. Ces résultats ouvrent donc des pistes de réflexion très intéressantes pour de futures expériences qui permettront de valider/invalidier ces différentes hypothèses.

#### 2.4.2. Déclin de la perméabilité à l'obscurité et lors de stress thermiques : implications de la régulation des gènes de jonctions septées

Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la perméabilité observée suite à un choc osmotique est due à des altérations voire à la disparition des jonctions septées chez divers invertébrés, tels que les planaires et les embryons d'étoiles de mer (Lord et Dibona, 1976; Dan-Sohkawa *et al.*, 1995), ou des jonctions serrées chez les vertébrés (e.g. Fowler *et al.*, 1977). Chez les moustiques, les changements de perméabilité paracellulaire peuvent aussi être contrôlés directement *via* la régulation des jonctions septées (Beyenbach et Piermarini, 2011). Dans l'étude présente, j'ai donc analysé l'expression des gènes de jonctions septées de *S.*

*pistillata* afin de déterminer si les changements de perméabilité lors de changement de température ou de condition lumineuse sont associés à des modifications des jonctions septées.

La réalisation d'une analyse discriminante sur les profils d'expression des gènes de jonctions septées a permis de distinguer différents groupes en fonction de la température et de la condition nuit/jour. De manière générale, les groupes correspondant aux individus à 20°C et 25°C sont souvent proches, tandis que les groupes jour et nuit sont séparés pour chacune de ces températures selon l'axe DF3. Ces observations sont intéressantes car elles semblent faire écho à la différence de  $t_{1/2}$  observée entre la nuit et le jour à ces mêmes températures. L'analyse de l'expression des gènes a ensuite permis de faire émerger un groupe de quatre gènes qui sont tous sous-exprimés à 20°C et 31°C par rapport à 25°C, à savoir StpNRG1 et 2 et StpCORA1 et 3. Ces mêmes gènes (excepté StpCORA3) sont également sous-exprimés le jour par rapport à la nuit, à l'exception de StpNRG2 qui montre une légère augmentation le jour à 20°C. Chez la drosophile, NRG a été identifiée comme une des trois molécules des jonctions septées, avec NRX IV et CONT, responsable de l'adhésion cellulaire (Hortsch et Margolis, 2003). De plus, il a été démontré chez la drosophile que COR (coracle) se lie à la queue cytoplasmique de NRX (Ward IV *et al.*, 2001) qui s'attache à son tour à NRG pour former un complexe multiprotéique au cœur de la jonction septée (Genova et Fehon, 2003). Ainsi, Genova et Fehon (2003) ont remarqué qu'une mutation au niveau du gène COR induit une réduction du marquage de cette protéine et une mauvaise localisation de plusieurs protéines structurant la jonction, dont NRG. Le rôle de COR avait déjà été constaté auparavant pour la localisation de NRX (Lamb *et al.*, 1998) et prouve l'importance de cette protéine pour la formation des jonctions septées. Par ailleurs, des études ont relevé que les embryons de drosophiles homozygotes pour des mutations de COR (Lamb *et al.*, 1998) ou de NRG (Genova et Fehon, 2003) présentent une altération de la barrière paracellulaire au niveau de l'épithélium de la glande salivaire. Les individus concernés parviennent à maintenir un espace régulier entre les membranes des cellules adjacentes, comme les individus non mutants, cependant le nombre de septes composant les jonctions intercellulaires est réduit voire nul, ce qui altère alors la fonctionnalité des jonctions. Il est étonnant de remarquer en revanche que les claudines, dont le rôle dans la perméabilité paracellulaire est avéré au sein des jonctions serrées des vertébrés (Furuse et Tsukita, 2006; Hartsock et Nelson, 2008), ne sont pas différentiellement exprimées dans les conditions où la perméabilité des tissus de *S. pistillata* est modifiée. Il est important de considérer cependant que les claudines *sensu stricto* sont spécifiques aux vertébrés et que les autres types de claudines trouvées chez les invertébrés appartiennent à des groupes distincts (Ganot *et al.*, 2015). Il est donc envisageable que les claudines présentes dans la structure des jonctions septées des coraux aient des propriétés diverses et jouent un rôle différent de celles des jonctions serrées des vertébrés.

Il est surprenant de noter que, selon mes résultats, la sous-régulation des StpNRGs et StpCORAs est constatée dans les conditions où la température diminue la perméabilité mais où la lumière l'augmente. Il semble donc que la température et la lumière agissent différemment sur les jonctions septées et impliquent des processus différents pour modifier la perméabilité des épithéliums.

### Effet de la lumière

Il n'existe à ce jour aucune information sur l'effet de la lumière sur la perméabilité des tissus ou les jonctions septées. Néanmoins, il est reconnu que la lumière joue un rôle important dans divers processus physiologiques des coraux, dont la calcification à travers le processus de « *light-enhanced calcification* ». Notre observation d'une augmentation de la perméabilité durant le jour pourrait être due à la photosynthèse et à l'augmentation de la respiration par rapport à la nuit qui permettraient d'accroître la production d'énergie. Cette énergie pourrait permettre en retour d'accélérer les mouvements péristaltiques et des cils mésentériques dans le coelentéron, dont un des rôles proposés est l'homogénéisation des fluides dans ce compartiment (Shick, 1991). Une meilleure homogénéisation du milieu coelentérique favoriserait alors le passage des ions, ou de la calcéine dans le cas de nos expériences.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'augmentation de la perméabilité le jour a lieu conjointement à une sous-expression des StpNRGs et StpCORA 1, à 25°C notamment. Au vu de ces résultats et des précédentes observations quant au rôle de NRG et COR chez la drosophile, il est possible de suggérer qu'à la lumière la sous-expression des StpNRGs et StpCORA 1 pourrait déstabiliser l'ensemble du complexe multiprotéique formant le cœur des jonctions septées ainsi que l'adhésion intercellulaire et relâcher alors la force de permselectivité. La modification de la structure des jonctions septées pourrait alors être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité et témoigner d'un contrôle du corail sur sa barrière paracellulaire comme observé chez les moustiques (Beyenbach et Piermarini, 2011). Il est possible que la lumière en elle-même agisse sur la conformation des épithéliums et/ou des jonctions *via* la réception de signaux lumineux par des photorécepteurs, entraînant des modifications de la perméabilité. Deux études ont en effet démontré que la lumière peut influencer directement certains processus physiologiques des coraux en tant que facteur abiotique, et ce sans impliquer le processus de photosynthèse. Ces deux études ont montré un effet positif significatif de la lumière bleue (longueur d'onde de 450-455 nm) sur la calcification (Cohen *et al.*, 2016) et sur le transport actif de cations en direction du squelette (Taubner *et al.*, 2019), tandis que la photosynthèse est réduite par cette lumière dans le cas de la première étude, et bloquée par des inhibiteurs dans la seconde. Par ailleurs, Taubner *et al.* (2019) n'ont relevé aucune différence de résistance des épithéliums à la lumière lorsque la photosynthèse, les échanges d'anions ou encore le métabolisme aérobie et anaérobie sont bloqués par des inhibiteurs. Ces résultats pourraient suggérer que cette hypothèse selon laquelle la lumière influencerait directement sur la perméabilité des tissus soit vraisemblable. Toutefois, aucun élément ne nous permet actuellement de valider ou d'écarter d'hypothèses et davantage de recherches sont nécessaires.

### Effet de la température

Dans notre étude, la diminution de la perméabilité lors de stress thermiques est accompagnée d'une sous-expression des gènes de jonctions septées StpNRGs et StpCORAs. Cette observation est surprenante dans la mesure où, comme indiqué dans le paragraphe précédent, une sous-expression de ces gènes s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité la nuit.

Ce résultat suggère que les propriétés de perméabilité ne s'expliquent pas uniquement par le différentiel d'expression de ces trois gènes et que des processus différents sont impliqués en l'absence de lumière ou lors de changements de température. Aucune étude à ce jour n'a étudié l'impact de la température sur la perméabilité des tissus et l'intégrité des jonctions septées. Dans le cas de stress thermiques, bien que nos résultats suggèrent que la structure et l'ancrage de la jonction ainsi que l'adhésion cellulaire sont affectées, la perméabilité en demeure réduite. Il est donc possible d'envisager que la forme ou la taille des cellules est modifiée sous l'effet du stress thermique, resserrant les épithéliums et réduisant alors l'espace intercellulaire. Il a été montré, en effet, qu'une diminution de la température engendre une augmentation de la taille des cellules épidermiques chez la drosophile (Azevedo *et al.*, 2002) et des globules rouges chez une espèce de poisson (Van Voorhies, 1996). Etant donné que la taille des cellules est inversement corrélée à la température, les individus maintenus à température élevée devraient posséder des cellules plus petites que les individus maintenus à une faible température, ce qui pourrait alors avoir pour conséquence d'augmenter l'espace intercellulaire et la perméabilité et aboutir sur des réponses opposées à faible et haute température, ce qui n'est pas le cas. Une autre explication possible serait qu'un stress thermique engendre un ralentissement des mouvements péristaltiques et des cils mésentériques dans le cœlentéron (Shick, 1991) et donc une moins bonne homogénéisation des fluides cœlentériques. Par conséquent, le passage paracellulaire des ions vers le MEC serait moindre. Des recherches supplémentaires sont cependant nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de nos observations.

## 2.5. Perspectives

Les résultats novateurs obtenus dans cette partie de ma Thèse apportent des éléments cruciaux pour une meilleure compréhension de la physiologie de *S. pistillata* et de l'impact de facteurs environnementaux sur la voie de passage paracellulaire des ions.

Il est important de noter que la perméabilité des tissus est diminuée dans les conditions où la calcification de *S. pistillata* est également réduite : dans l'obscurité (la nuit) et lors de stress thermiques (20°C et 31°C). En parallèle, le pH dans le MEC et dans les cellules calcicoblastiques quant à lui reste stable dans ces mêmes conditions (voir chapitre 3). Bien qu'il soit risqué d'établir un lien direct entre ces diverses observations, nos résultats semblent suggérer que l'altération des jonctions septées et les modifications de perméabilité n'influent pas sur l'équilibre acido-basique dans le MEC. Il semble donc que le MEC soit très tamponné pour pouvoir maintenir un pH stable malgré un renouvellement du milieu plus ou moins fréquent selon les conditions environnementales. L'observation d'une possible corrélation entre la perméabilité des tissus et la calcification soulève une question sur l'importance que représente la voie paracellulaire pour la calcification. Il est possible d'envisager que (1) la réduction de la voie paracellulaire la nuit et lors de stress thermiques pourrait permettre, dans des conditions moins favorables de transport transcellulaire des ions, de moins renouveler le MEC et maintenir une concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et CID permettant la précipitation du  $\text{CaCO}_3$ , (2) l'augmentation de la perméabilité dans les conditions les plus favorables (à 25°C et à la lumière) constituerait un moyen d'apporter plus de nutriments ou d'autres éléments permettant la production d'énergie

pour supporter les processus physiologiques, dont la calcification, (3) un renouvellement plus important du MEC serait favorable à un apport plus important d'ions ou l'élimination plus efficace des produits dérivés de la calcification. Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la perméabilité et la concentration en CID et en  $\text{Ca}^{2+}$  au site de calcification, il serait nécessaire de mesurer ces paramètres dans le MEC avec la technique des microélectrodes.

Pour mieux décrypter le rôle de la lumière dans la perméabilité des tissus, il serait judicieux par la suite de réaliser à nouveau des mesures du  $t_{1/2}$  sur des microcolonies incubées en présence d'un inhibiteur de la photosynthèse, tel que le DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea), ou en présence de lumière bleue. L'influence éventuelle de la photosynthèse serait alors dissociée de celle de la lumière et permettrait de déterminer l'implication de l'un ou l'autre de ces paramètres.

## Points-clé du chapitre 4

**Objectif : Déterminer l'effet de stress thermiques et de la lumière sur la diffusion paracellulaire des ions vers le MEC et l'implication de cette voie de sur la calcification**

Effet de la température :

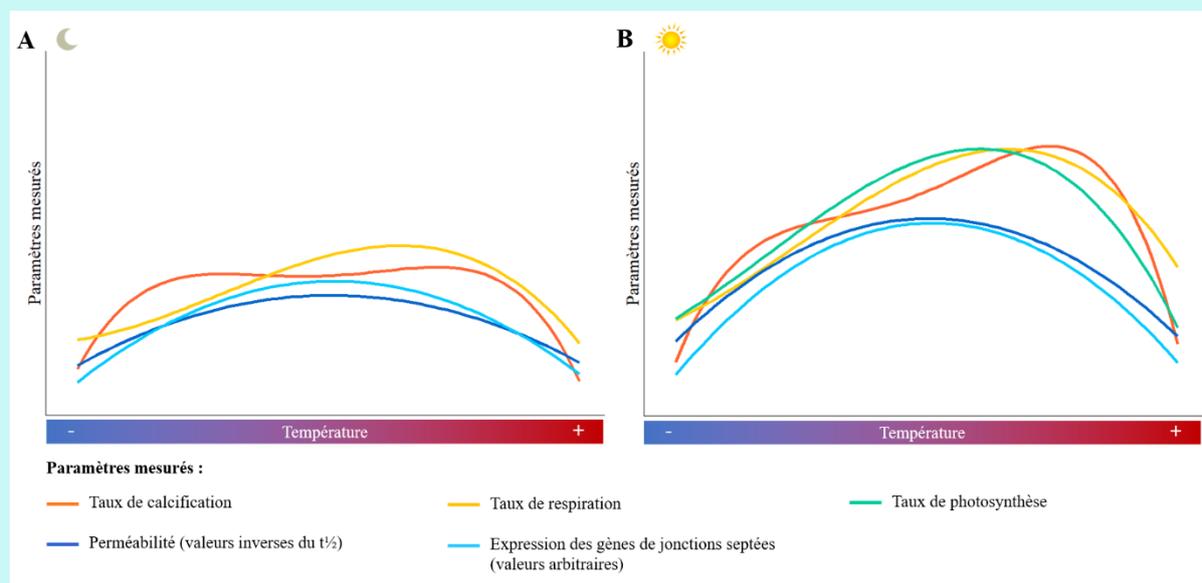
- Le  $t_{1/2}$  augmente, donc la perméabilité diminue, à 20°C et 31°C par rapport à 25°C
- Les gènes de structure StpNRGs et les gènes d'ancrage StpCORAs 1 et 3 des jonctions septées sont sous-exprimés à 20°C et 31°C par rapport à 25°C

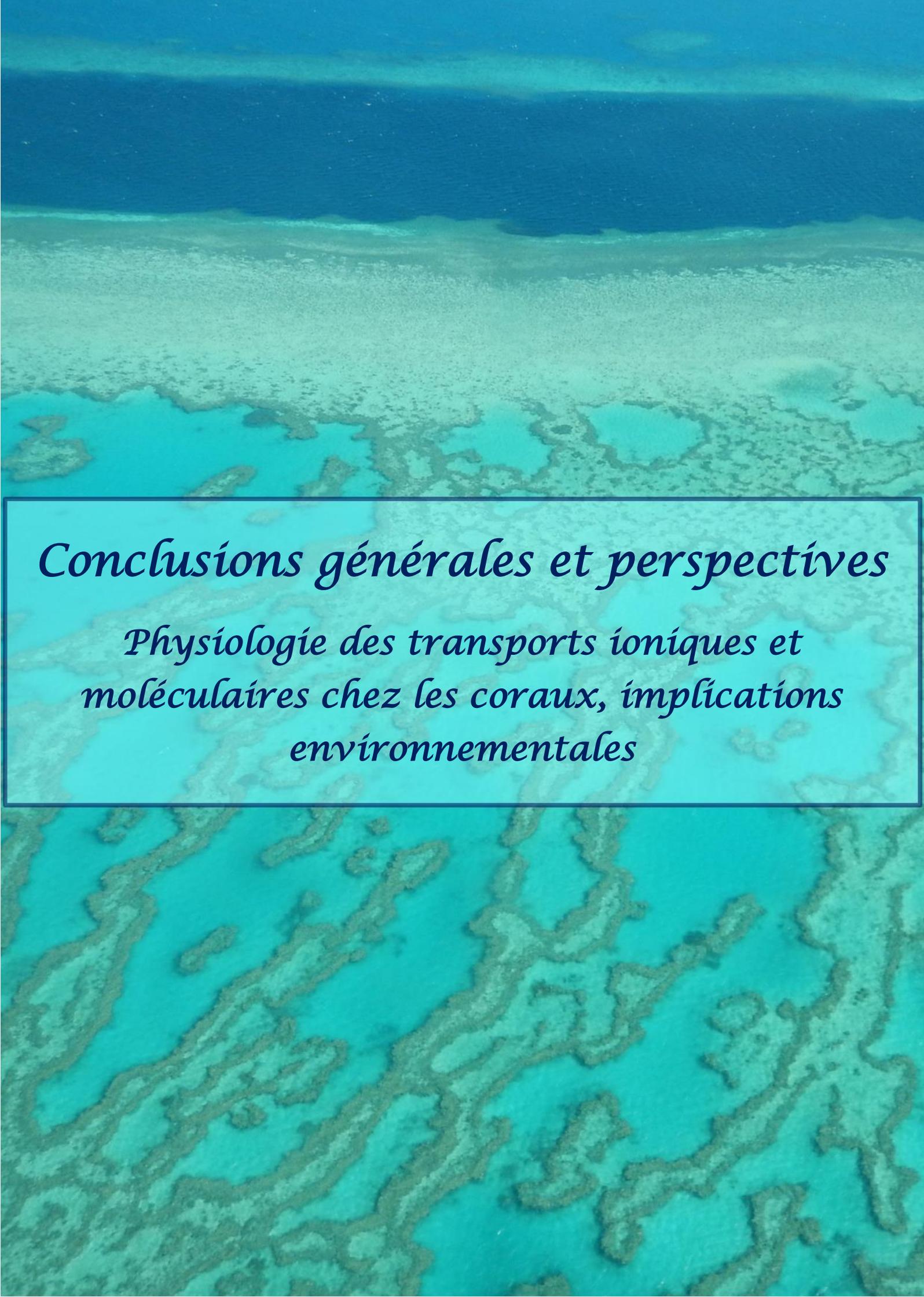
Effet de la lumière :

- Le  $t_{1/2}$  diminue, donc la perméabilité augmente, le jour par rapport à la nuit
- Les gènes de structure StpNRGs et le gène d'ancrage StpCORAs 1 des jonctions septées sont sous-exprimés le jour par rapport à la nuit

En résumé :

- ⇒ La perméabilité diminue dans les conditions où la calcification est réduite (températures extrêmes et la nuit) (Figure 48)
- ⇒ Le jour, la sous-expression des StpNRGs et StpCORAs est cohérente avec une augmentation de la perméabilité liée à une modification structurale de la jonction
- ⇒ Lors de stress thermiques, la sous-expression de ces mêmes gènes ne semble pas expliquer la diminution de perméabilité et impliquerait que d'autres mécanismes sont à l'origine de cette observation
- ⇒ La diminution de la perméabilité dans les conditions où la calcification est moins favorable pourrait être un moyen de mieux contrôler la concentration de  $Ca^{2+}$  et de CID
- ⇒ L'augmentation de perméabilité dans les conditions plus favorables permettrait l'apport d'ions, l'élimination de produits dérivés de la calcification, ou l'apport de ressources nutritives favorisant la production d'énergie pour supporter la calcification



An aerial photograph of a coral reef system, showing various coral structures and shallow water areas. The image is overlaid with a semi-transparent white box containing text.

# *Conclusions générales et perspectives*

*Physiologie des transports ioniques et  
moléculaires chez les coraux, implications  
environnementales*



## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

### Physiologie des transports ioniques et moléculaires chez les coraux, implications environnementales

La rapidité des changements climatiques est sans précédent dans l'histoire de la Terre. La communauté scientifique alerte donc sur les menaces qui pèsent sur les divers écosystèmes, terrestres et aquatiques. Parmi eux, les écosystèmes marins, dont les récifs coralliens, sont particulièrement vulnérables. L'acidification et le réchauffement des océans soulèvent des préoccupations majeures pour la santé et le devenir des coraux constituant les fondations de ces récifs. C'est pourquoi il est crucial de caractériser les limites de tolérance des coraux récifaux et de comprendre les mécanismes physiologiques à l'origine de leur perte de performance en condition de stress. L'objectif de ma thèse était ainsi de déterminer quel est l'impact de la température sur la calcification des coraux tropicaux constructeurs de récifs. En plus de cet aspect environnemental, l'intérêt d'une telle approche est d'apporter des informations sur la physiologie du corail et en particulier les mécanismes de calcification. Mon travail s'est concentré sur le transport des ions qui représente une étape clé du processus de calcification et sur l'espèce *Stylophora pistillata*, pour laquelle de nombreuses données moléculaires et physiologiques sont disponibles, permettant ainsi une approche intégrée du gène à l'organisme.

#### Effet de la température

Dans un premier temps, j'ai déterminé la fenêtre de performance thermique de *S. pistillata*, qui se situe entre 17°C et 33°C, températures respectivement en deçà et au-delà desquelles le taux de calcification est drastiquement réduit, et la survie des colonies menacée. Aux extrémités de la fenêtre de performance thermique, les taux de photosynthèse et de respiration sont également significativement diminués. Les fortes corrélations établies entre les taux de calcification et les taux de photosynthèse et de respiration témoignent des liens étroits qui unissent ces paramètres physiologiques clés chez les coraux.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du rôle de la respiration dans la réponse de *S. pistillata* lors de stress thermiques, il serait intéressant d'étudier plus spécifiquement l'activité métabolique de l'animal *via* une quantification des mitochondries et/ou de leur activité. Pour cela, des sondes telles que MitoTracker<sup>TM</sup> existent et peuvent être utilisées sur des microcolonies à plat *in vivo* en microscopie confocale, comme cela a déjà été fait chez l'oursin par exemple (Agnello *et al.*, 2008). Ces sondes ont pour particularité de traverser les membranes cellulaires et s'accumuler dans les mitochondries actives. En fonction des spécificités de chacune de ces sondes, il est possible d'estimer la masse et la distribution des mitochondries dans les tissus (e.g. MitoTracker<sup>TM</sup> Green) ou encore leur activité oxydative (e.g. MitoTracker<sup>TM</sup> Orange CMTMRos). Chez les coraux, la localisation et l'abondance des mitochondries a également déjà été analysée grâce à l'immunomarquage des tissus avec un

anticorps contre le Complexe IV (cytochrome c oxydase), protéine terminant la chaîne respiratoire mitochondriale (Barott *et al.*, 2015). Ces techniques pourraient donc constituer des pistes pour des recherches complémentaires.

A l'échelle moléculaire, l'étude des profils d'expression génique des transporteurs ioniques montre une forte cohérence dans la réponse des paramètres physiologiques de *S. pistillata* à des stress thermiques. Notamment, la sous-expression d'un groupe de gènes impliqués dans le transport et la conversion du carbone inorganique aux extrémités de la fenêtre thermique de *S. pistillata* (17°C et 32°C pour les microcolonies sur fil, ou 20°C et 31°C pour les microcolonies à plat), suggère que des perturbations dans l'apport de CID pour la calcification constituent un des éléments importants dans la réponse de cette espèce à des stress thermiques.

Toutefois, la transcription des ARNm, sur laquelle s'est basée notre étude des expressions géniques, ne reflète pas nécessairement la totalité du processus de régulation des gènes. Il a été démontré par exemple que l'activité enzymatique des SpisCAs augmente avec la température (Zoccola *et al.*, 2016). C'est pourquoi, il serait intéressant d'évaluer la quantité de protéines produites *in fine*, ainsi que leur activité afin d'apporter des informations complémentaires sur leur rôle dans la réponse de *S. pistillata* à des changements de température.

Par la suite, j'ai mesuré l'impact des stress thermiques sur le  $\text{pH}_e$  dans le MEC et le  $\text{pH}_i$  dans les cellules calicoblastiques. Mes résultats montrent que le  $\text{pH}_e$  dans le MEC est maintenu au-dessus du pH de l'eau de mer, à des valeurs similaires pour chacune des températures. De même, le  $\text{pH}_i$  dans les cellules calicoblastiques ne présente pas de différences avec la température. Ces observations sont cohérentes avec l'absence de modification d'expression des gènes impliqués dans l'extrusion des protons (NHE et PMCAs). Il est admis que la régulation du  $\text{pH}_e$  dans le MEC à un niveau élevé favorise la réaction de précipitation du  $\text{CaCO}_3$ . Le maintien de la capacité à réguler le pH même en condition de stress thermique confirme que cette régulation constitue un élément important du processus de calcification. Cependant, la stabilité du  $\text{pH}_e$  lors de changements de température ne permet pas d'expliquer le déclin de la calcification et suggère que d'autres facteurs peuvent en être responsables. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui montrent en effet que non seulement le pH, mais également le  $\text{Ca}^{2+}$  ou le CID dans le MEC sont des paramètres importants pour la calcification. Etant donné que les mesures de  $\text{pH}_e$  et de  $\text{pH}_i$  ont été effectuées dans une zone particulière des microcolonies, à savoir le front de croissance, il serait intéressant dans le futur de lier les résultats obtenus à des mesures locales de la calcification. Pour cela, il serait utile de déterminer le taux de croissance des cristaux à proximité des poches de MEC lors de stress thermiques. Ces informations seraient complémentaires aux données de taux de calcification caractérisées sur les microcolonies dans leur ensemble *via* la technique d'anomalie d'alcalinité.

Enfin, j'ai évalué l'impact de la température sur la voie paracellulaire en étudiant la perméabilité des tissus à la calcéine. Le demi-temps de renouvellement de la calcéine dans le MEC est plus long aux températures extrêmes et indique une diminution de la perméabilité lors de stress thermiques. Cette réduction de la perméabilité lors de changements de température, en l'occurrence à 20°C et 31°C, se produit conjointement à la diminution du taux de calcification attendue à ces mêmes températures. Ces résultats m'ont permis de suggérer qu'une

perméabilité paracellulaire moindre aux ions et molécules en conditions moins favorables pourraient permettre de contrôler la chimie du MEC comme un moyen pour le corail de lutter et tenter de maintenir la calcification. Il est aussi possible que la diminution de la perméabilité soit à l'origine du déclin de la calcification en condition de stress thermiques. A l'inverse, l'augmentation de la perméabilité en condition contrôle (25°C), où la calcification est optimale, pourrait indiquer que le renouvellement du MEC est bénéfique à la calcification. Il pourrait s'agir d'un moyen pour l'animal d'apporter plus régulièrement depuis l'eau de mer des ions, ou des éléments nutritifs essentiels à la production d'énergie, ou encore d'éliminer les produits dérivés de la calcification. Les changements de perméabilité ne s'expliquent cependant pas uniquement par la sous-expression de gènes structuraux (StpNRGs) et d'ancrage (StpCORAs). Il est envisageable que d'autres paramètres puissent influencer la perméabilité, tels que les mouvements péristaltiques et des cils dont un ralentissement pourrait induire une homogénéisation moindre des fluides et ainsi diminuer l'apport en ions disponibles pour la voie paracellulaire. Nos résultats ouvrent de nouvelles pistes de réflexion sur le rôle de la voie paracellulaire dans la calcification. Depuis de nombreuses années, un débat oppose les géochimistes qui suggèrent que le MEC doit être en relation et en équilibre avec le milieu environnant (eau de mer) pour expliquer la calcification, et les physiologistes qui décrivent le MEC comme un milieu relativement isolé de l'eau de mer. Même si les résultats de mon étude ne permettent pas de clore ce débat, ils suggèrent un lien entre perméabilité paracellulaire et calcification.

De manière générale, nos résultats suggèrent que la chimie du MEC pourrait être modifiée en condition de stress thermique. Les modifications d'expression des gènes impliqués dans le transport du CID et la diminution de la perméabilité aux températures extrêmes pourraient indiquer en effet des modifications dans l'apport en ions pour la calcification. L'importance du CID dans la réponse au stress et son lien avec la calcification ont déjà été montrés dans d'autres études et il sera intéressant dans le futur de mesurer les concentrations en DIC et en  $Ca^{2+}$  dans le MEC sous l'effet de stress thermiques.

### **Effet de la lumière**

Au cours des divers travaux effectués dans cette thèse, j'ai identifié, en plus de l'effet de la température, un effet notable de la lumière sur les processus physiologiques et l'expression des gènes de *S. pistillata*. J'ai observé une augmentation du taux de calcification le jour par rapport à la nuit à toutes les températures expérimentées, excepté à 17°C et 19°C. Ce phénomène est largement décrit dans la littérature sous le nom de « *light-enhanced calcification* » (LEC). A la lumière, la photosynthèse et la respiration permettraient en effet de stimuler la calcification notamment grâce à la synthèse par les zooxanthelles de produits servant de précurseurs à la formation de matrice organique, à l'établissement d'un environnement favorable à la calcification (pH et état de saturation élevés) grâce au prélèvement de  $CO_2$  pour la photosynthèse, ainsi qu'à la production d'énergie *via* l'activité métabolique des mitochondries. En effet, mes observations concernant la hausse de la calcification le jour s'accompagnent d'une augmentation du taux de respiration par rapport à la nuit, ainsi que d'un niveau élevé de photosynthèse contrairement à 17°C où aucun phénomène de LEC n'apparaît. De plus, j'ai

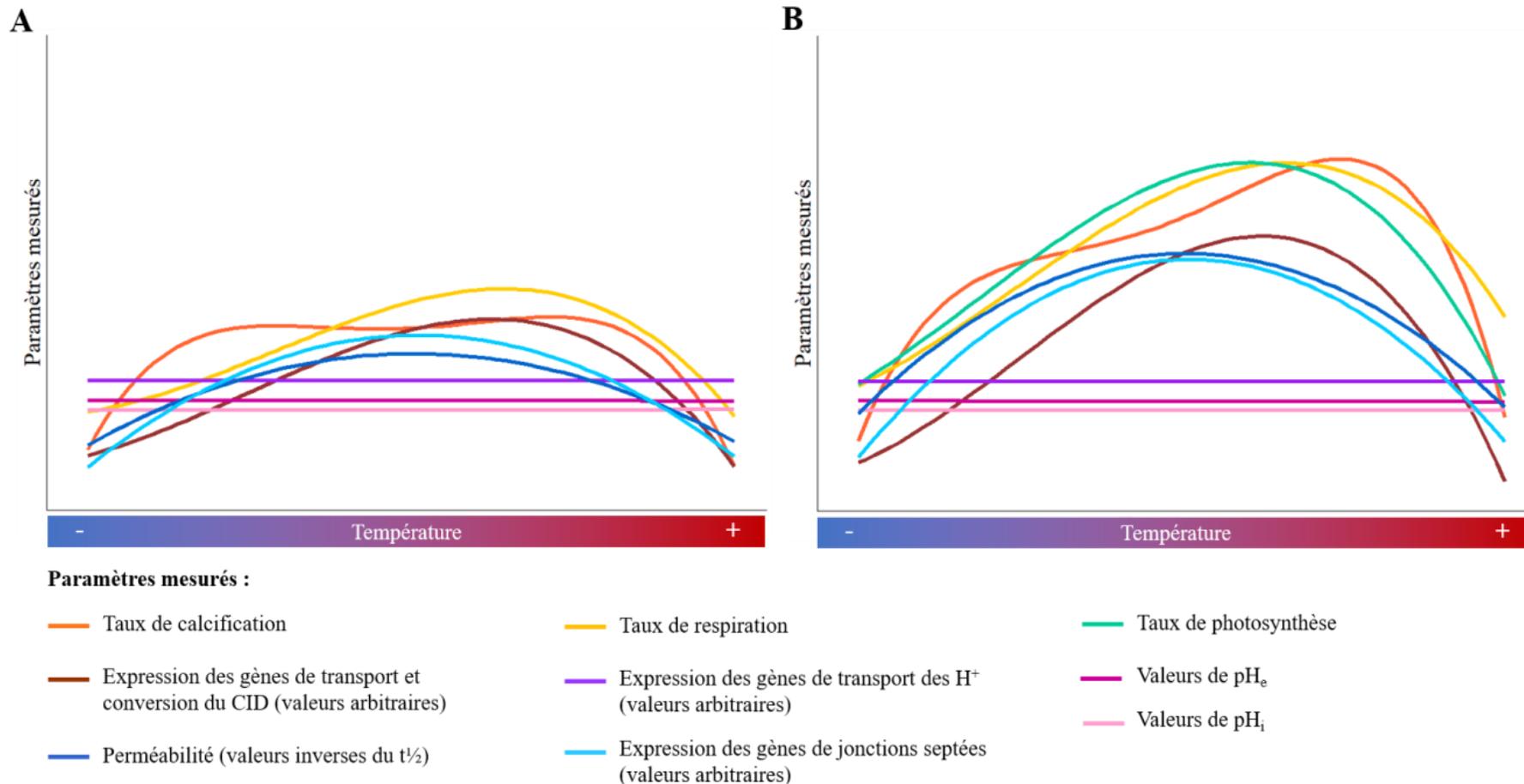
identifié un groupe de gènes impliqués dans le transport et la conversion de CID (transporteurs de bicarbonate et anhydrases carboniques) dont l'expression diffère entre le jour et la nuit à 25°C (microcolonies sur fil et à plat), ainsi qu'à 32°C pour les microcolonies sur fil. Il semble donc que, comme lors de changements de température, le transport de CID joue un rôle important dans la réponse de *S. pistillata* à la lumière. Par ailleurs, comme pour la température, la perméabilité paracellulaire des tissus de *S. pistillata* est plus élevée à la lumière où le taux de calcification est également plus élevé. Cette observation semble ainsi confirmer que l'augmentation de la perméabilité pourrait être bénéfique à la calcification, tandis que la diminution de perméabilité pourrait être le signe d'une lutte de l'animal pour maintenir plus aisément des conditions propices à la précipitation du CaCO<sub>3</sub>. En revanche, contrairement aux conditions de stress thermique, les gènes de jonctions StpNRGs et StpCORAs voient leur expression diminuée le jour, lorsque la perméabilité est augmentée. Les modifications de perméabilité semblent donc être corrélées à la structure et l'ancrage des jonctions. Dans la condition nuit/jour, il est important de considérer que les changements de lumière ont lieu de manière naturelle chaque jour et ne représentent pas un stress pour l'animal. Si les résultats observés résultaient d'une régulation volontaire des jonctions septées entre le jour et la nuit, cela signifierait que l'animal est capable d'adapter la voie paracellulaire aux besoins de la calcification.

Bien que l'influence de la lumière sur la physiologie des coraux tropicaux constructeurs de récifs tels que *S. pistillata* soit avérée, de nombreuses incertitudes perdurent sur la façon dont elle permet de stimuler la calcification. Les différences de perméabilité entre le jour et la nuit interrogent également sur une influence de la photosynthèse et/ou un impact de la lumière en tant que telle. Une meilleure caractérisation de l'effet de la lumière sur la physiologie des coraux est donc un enjeu important pour l'avenir afin de comprendre le fonctionnement de ces espèces.

### **Conclusion générale**

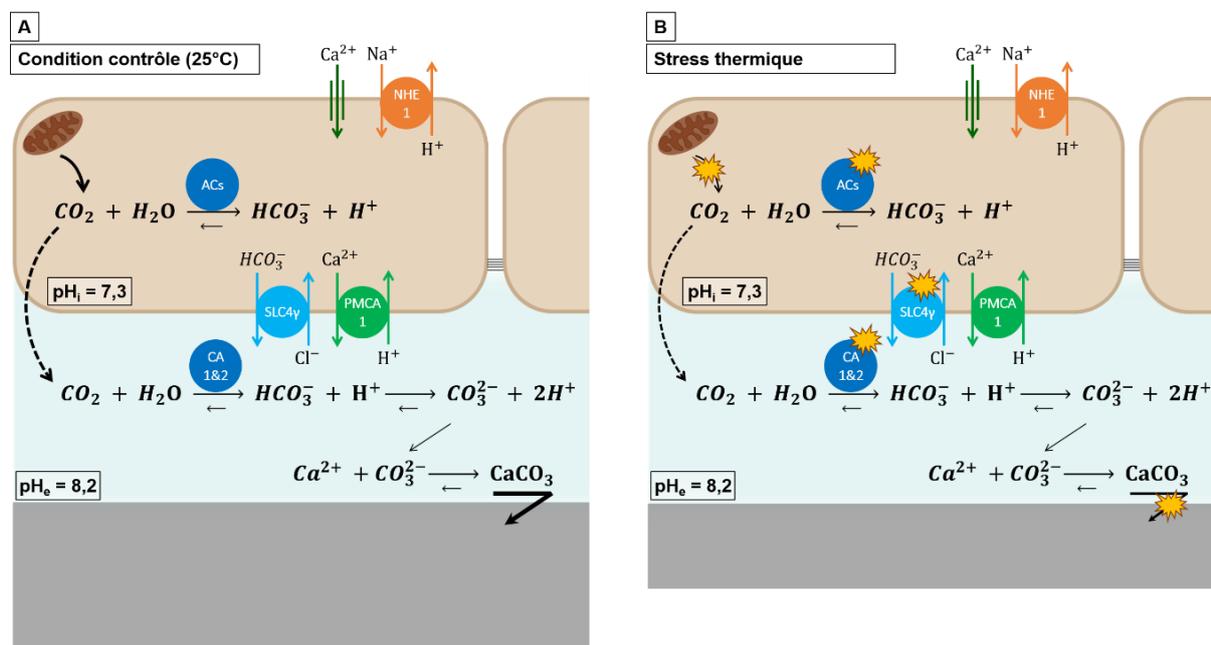
Les travaux conduits au cours de ma thèse ont permis de confirmer l'importance de divers processus physiologiques tels que la respiration, la photosynthèse et la régulation du pH<sub>e</sub> dans le MEC pour favoriser la calcification chez *S. pistillata*. De plus, mes résultats ont permis d'apporter de nouveaux éléments pour une meilleure compréhension des processus physiologiques et moléculaires régissant la formation du squelette de *S. pistillata* et sa réponse lors de changements de température ou de condition lumineuse. Un résultat particulièrement intéressant de mon étude concerne la voie paracellulaire et les différences de perméabilité observées chez *S. pistillata* entre le jour et la nuit et lors de stress thermiques. L'augmentation de la perméabilité dans les conditions optimales (25°C et le jour) suggère que la voie paracellulaire serait nécessaire à la calcification et remet ainsi en question la vision de nombreux physiologistes.

Les profils de l'ensemble des paramètres mesurés au cours de ma thèse en réponse à la température sont représentés graphiquement sur la Figure 49.



**Figure 49. Représentation des profils de chacun des paramètres mesurés dans les chapitres 2, 3 et 4 en réponse à la température** : A. la nuit, et B. le jour. L'échelle de l'axe y est arbitraire. Les courbes des taux de calcification (orange), respiration (jaune) et photosynthèse (verte), sont issues des régressions polynomiales présentées dans le chapitre 2. Les courbes représentant l'expression des gènes impliqués dans le transport et la conversion du CID (marron) et dans le transport des protons (violet), ainsi que des gènes de jonctions septées (bleue turquoise) sont tracées de manière arbitraire de façon à refléter les différences de niveaux d'expression observés en fonction de la température et de la condition nuit/jour. Les droites montrant les valeurs de pH<sub>e</sub> (magenta) et de pH<sub>i</sub> (rose clair) sont extrapolées en fonction des valeurs mesurées à 20°C, 25°C et 31°C. La courbe de perméabilité (bleue) est tracée à partir de valeurs arbitraires de perméabilité reflétant le profil inverse des mesures de t<sup>1/2</sup>.

Les mécanismes impliqués dans la réponse de *S. pistillata* à un stress thermique sont également résumés dans le modèle heuristique présenté ci-après (Figure 50). Ce modèle est basé sur les données obtenues durant la nuit afin d'exclure l'effet de la lumière et de la photosynthèse.



**Figure 50. Modèle heuristique des mécanismes impliqués dans la formation de la fraction minérale du squelette en carbonate de calcium de *S. pistillata* durant la nuit :** (A) en condition contrôle, et (B) lors d'un stress thermique. Les étoiles jaunes représentent les processus affectés lors d'un stress thermique selon les résultats obtenus au cours de cette thèse.

## Perspectives

A l'avenir, des recherches complémentaires seront nécessaires pour approfondir notre connaissance de la réponse de *S. pistillata* à des changements de la température. Dans notre étude, nous souhaitons comprendre la cause d'un déclin de la calcification lors de changements de température et déceler les mécanismes régissant la réponse de *S. pistillata*. Par la suite, il pourrait aussi être instructif de déterminer quels mécanismes sont à l'origine d'une stimulation de la calcification lorsque la température est optimale (29°C pour les microcolonies sur fil). De plus, l'ensemble de notre étude a été conduite sur des modifications de la température à court terme (une semaine). La question se pose alors de savoir si à plus long terme, la réponse de cette espèce serait différente. Lors d'une exposition prolongée à un stress, il est possible que les individus s'acclimentent ou, à l'inverse, que ce stress continu les affaiblisse. Afin d'explorer cette piste, j'ai encadré une stagiaire de Master 1, Estelle Bapst, qui a caractérisé la fenêtre de performance thermique de *S. pistillata* après une exposition de 4 mois à 20°C, 25°C, 29°C et 31°C. Ces températures ont été ciblées en fonction de mes propres résultats. Ainsi, 20°C et 31°C sont les températures que j'ai utilisées pour mes propres expériences (mesures du pH et de la perméabilité) et qui sont moins favorables aux divers processus physiologiques que la température contrôle de 25°C. Nous avons également choisi de réaliser des expériences à 29°C afin d'étudier si cette température, optimale pour la calcification des microcolonies sur fil à

court terme, demeure favorable à long terme. Les analyses d'Estelle sur les taux de calcification, de respiration et de photosynthèse ont montré qu'après 4 mois d'exposition aux différentes températures, 25°C constitue la température optimale, tandis 29°C devient néfaste. En-deçà et au-delà de 25°C tous les paramètres physiologiques de *S. pistillata* mesurés sont ainsi réduits. A 31°C, les microcolonies présentent même des signes visuels de nécrose des tissus, témoignant d'un impact hautement négatif d'une exposition à cette température à long terme. Il pourrait être utile par la suite d'analyser l'expression des gènes de transporteurs ioniques afin d'observer si le transport de CID est impliqué dans la réponse de *S. pistillata* à ces stress thermiques de la même manière qu'à court terme. Il serait intéressant aussi d'étudier si la régulation du pH et des transports de protons sont perturbés après plusieurs mois de stress thermique.

Les travaux issus de ma thèse ont été centrés sur l'influence de stress thermiques et de la lumière sur les transports des ions et molécules en lien avec le processus de calcification chez *S. pistillata*. Néanmoins, d'autres paramètres sont cruciaux dans la formation du squelette des coraux, tel qu'évoqué dans le chapitre 1, et mériteraient d'être analysés également.

Etant donné le rôle crucial de la matrice organique en tant que précurseur de la formation des cristaux et leur croissance, il serait important de caractériser l'influence de la température sur les protéines la composant. Une précédente étude a relevé que 12 gènes codant pour des protéines de la matrice organique squelettique chez *S. pistillata* sont sous-régulés lors d'une élévation de la température (Maor-Landaw *et al.*, 2014). Dans une autre étude, Ruiz-Jones *et al.* (2015) ont remarqué, quant à eux, une surexpression de deux galaxines et de six autres protéines de matrice organique le jour par rapport à la nuit. Il est donc possible que les protéines de matrice organique soient stimulées dans les conditions optimales de calcification (température contrôlée et à la lumière), grâce notamment à la photosynthèse. Lors de stress thermiques, la sous-expression des gènes codant pour des protéines de matrice organique pourrait induire des perturbations dans la production des nucléus de CaCO<sub>3</sub> et/ou dans la morphologie et la croissance des cristaux. Cette piste pourrait donc faire l'objet de plus amples recherches dans le futur.

D'un point de vue environnemental, il est primordial de garder à l'esprit que nos travaux réalisés en laboratoire ne peuvent pas être directement extrapolés à la réalité du terrain. Dans les aquariums, les coraux sont soumis à des paramètres environnementaux (température, pH, salinité, intensité lumineuse, photopériode), ainsi qu'à une alimentation, extrêmement contrôlés et stables. Cette régularité est un atout en laboratoire puisqu'il permet de choisir le(s) paramètre(s) dont nous souhaitons étudier l'effet, indépendamment de tous les autres. Cependant, dans le milieu naturel, l'ensemble de ces paramètres fluctuent au fil de la journée, d'un jour à l'autre et d'une saison à une autre et peuvent induire des réponses différentes lorsque ces divers facteurs sont combinés. Plusieurs études ont relevé notamment que la combinaison d'une hausse de la température avec une acidification de l'eau amplifie l'effet négatif de chacun de ces paramètres sur la santé, voire la survie, des coraux (e.g. Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007 ; Rodolfo-Metalpa *et al.*, 2011). Notre travail a donc permis d'améliorer la compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la calcification et leur réponse à des changements de température. Les résultats obtenus pourront être des outils utiles pour le développement, par

la suite, d'études sur le terrain visant à évaluer la santé des coraux et prédire l'impact des changements climatiques sur leur devenir au sein des récifs.

An aerial photograph of a coral reef system. The water is a vibrant turquoise color, and the coral structures are visible as darker, textured patches. A white rectangular box with a thin black border is centered in the middle of the image, containing the text 'Références bibliographiques' in a black, italicized serif font.

*Références bibliographiques*



## Références bibliographiques

### A

- Abramovitch-Gottlib, L., Katoshevski, D., et Vago, R. (2002). A computerized tank system for studying the effect of temperature on calcification of reef organisms. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50(2-3), 245-252. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00236-6](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00236-6)
- Agnello, M., Morici, G., et Rinaldi, A. M. (2008). A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, 56(3), 145-149. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9143-2>
- Al-Horani, F. A., Al-Moghrabi, S. M., et De Beer, D. (2003a). Microsensor study of photosynthesis and calcification in the scleractinian coral, *Galaxea fascicularis*: Active internal carbon cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 288(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00578-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00578-6)
- Al-Horani, F. A., Al-Moghrabi, S. M., et De Beer, D. (2003b). The mechanism of calcification and its relation to photosynthesis and respiration in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Marine Biology*, 142(3), 419-426. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0981-8>
- Albani, A. El, Bengtson, S., Canfield, D. E., Bekker, A., Macchiarelli, R., Mazurier, A., ... Meunier, A. (2010). Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature*, 466, 100. Consulté à l'adresse <https://doi.org/10.1038/nature09166>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. In *Garland Science New York*.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* 5th edition. In *Garland Science*.
- Allemand, D., Furla, P., et Bénazet-Tambutté, S. (1998). Mechanisms of carbon acquisition for endosymbiont photosynthesis in Anthozoa. *Canadian Journal of Botany*, 76(6), 925-941. <https://doi.org/10.1139/cjb-76-6-925>
- Allemand, D., Tambutté, É., Girard, J.-P., et Jaubert, J. (1998). Organic matrix synthesis in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Role in biomineralization and potential target of the organotin tributyltin. *Journal of Experimental Biology*, 201(13), 2001-2009.
- Allemand, D., Tambutté, É., Zoccola, D., et Tambutté, S. (2011). Coral calcification, cell to reefs. In *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4>
- Allison, N., Cohen, I., Finch, A. A., Erez, J., et Tudhope, A. W. (2014). Corals concentrate dissolved inorganic carbon to facilitate calcification. *Nature Communications*, 5, 1-6. <https://doi.org/10.1038/ncomms6741>

Ateweberhan, M., Feary, D. A., Keshavmurthy, S., Chen, A., Schleyer, M. H., et Sheppard, C. R. C. (2013). Climate change impacts on coral reefs: Synergies with local effects, possibilities for acclimation, and management implications. *Marine Pollution Bulletin*, 74(2), 526-539. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.011>

Azevedo, R. B. R., French, V., et Partridge, L. (2002). Temperature modulates epidermal cell size in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 48(2), 231-237. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00168-8)

## **B**

Barott, K. L., Perez, S. O., Linsmayer, L. B., et Tresguerres, M. (2015). Differential localization of ion transporters suggests distinct cellular mechanisms for calcification and photosynthesis between two coral species. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 309(3), R235-R246. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00052.2015>

Barshis, D. J., Ladner, J. T., Oliver, T. A., Seneca, F. O., Traylor-Knowles, N., et Palumbi, S. R. (2013). Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1387-1392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210224110>

Bénazet-Tambutté, S., Allemand, D., et Jaubert, J. (1996). Permeability of the oral epithelial layers in cnidarians. *Marine Biology*, 126, 43-53.

Bernardet, C., Tambutté, E., Techer, N., Tambutté, S., and Venn, A. A. (2019). Ion transporter gene expression is linked to the thermal sensitivity of calcification in the reef coral *Stylophora pistillata*. *Scientific Reports*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54814-7>

Bertucci, A., Forêt, S., Ball, E. E., et Miller, D. J. (2015). Transcriptomic differences between day and night in *Acropora millepora* provide new insights into metabolite exchange and light-enhanced calcification in corals. *Molecular Ecology*, 24(17), 4489-4504. <https://doi.org/10.1111/mec.13328>

Bertucci, A., Moya, A., Tambutté, S., Allemand, D., Supuran, C. T., et Zoccola, D. (2013). Carbonic anhydrases in anthozoan corals - A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(6), 1437-1450. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.10.024>

Bertucci, A., Tambutté, S., Supuran, C. T., Allemand, D., et Zoccola, D. (2011). A New Coral Carbonic Anhydrase in *Stylophora pistillata*. *Marine Biotechnology*, 13(5), 992-1002. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9363-x>

Beyenbach, K. W., et Piermarini, P. M. (2011). Transcellular and paracellular pathways of transepithelial fluid secretion in Malpighian (renal) tubules of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 202(3), 387-407. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02195.x>

Bhagooli, R., et Hidaka, M. (2004). Photoinhibition, bleaching susceptibility and mortality in two scleractinian corals, *Platygyra ryukyuensis* and *Stylophora pistillata*, in response to thermal and light stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and*

*Integrative Physiology*, 137(3), 547-555. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.008>

Bruno, J. F., Selig, E. R., Casey, K. S., Page, C. A., Willis, B. L., Harvell, C. D., ... Melendy, A. M. (2007). Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. *PLoS Biology*, 5(6), 1220-1227. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050124>

Buckler, K. J., et Vaughan-Jones, R. D. (1990). Application of a new pH-sensitive fluoroprobe (carboxy-SNARF-1) for intracellular pH measurement in small, isolated cells. *Pflügers Archiv*, 417(2), 234-239.

Burton, E. A., et Walter, L. M. (1987). Relative precipitation rates of aragonite and Mg calcite from seawater: temperature or carbonate ion control? *Geology*, 15(2), 111-114. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1987\)15<111:RPROAA>2.0.CO](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1987)15<111:RPROAA>2.0.CO)

## C

Cai, W. J., Ma, Y., Hopkinson, B. M., Grottoli, A. G., Warner, M. E., Ding, Q., ... Wang, Y. (2016). Microelectrode characterization of coral daytime interior pH and carbonate chemistry. *Nature Communications*, 7, 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms11144>

Cantin, N. E., Cohen, A. L., Karnauskas, K. B., Tarrant, A. M., et McCorkle, D. C. (2010). Ocean Warming Slows Coral Growth in the Central Red Sea. *Science*, 329, 322-324. <https://doi.org/10.1126/science.1190182>

Carricart-Ganivet, J. P., Cabanillas-Teran, N., Cruz-Ortega, I., et Blanchon, P. (2012). Sensitivity of Calcification to Thermal Stress Varies among Genera of Massive Reef-Building Corals. *PLoS ONE*, 7(3), e32859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032859>

Castillo, K. D., Ries, J. B., Bruno, J. F., et Westfield, I. T. (2014). The reef-building coral *Siderastrea siderea* exhibits parabolic responses to ocean acidification and warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1797), 20141856. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1856>

Cesar, H., Burke, L., et Pet-Soede, L. (2003). The economics of worldwide coral reef degradation. *Cesar environmental economics consulting (CEEC)*, 24. Consulté à l'adresse <http://pdf.wri.org/cesardegradationreport100203.pdf>

Chalker, B. E., et Taylor, D. L. (1975). Light-enhanced calcification, and the role of oxidative phosphorylation in calcification of the coral *Acropora cervicornis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 190(1100), 323-331. <https://doi.org/10.1098/rspb.1975.0096>

Chisholm, J. R. M., et Gattuso, J.-P. (1991). Validation of the alkalinity anomaly technique for investigating calcification and photosynthesis in coral reef communities. *Limnology and Oceanography*, 36, 1232-1239. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.6.1232>

Clausen, C. D., et Roth, A. A. (1975). Effect of temperature and temperature adaptation on calcification rate in hermatypic coral. *Marine Biology*, 33, 93-100. Consulté à l'adresse <http://www.springerlink.com/index/U3817617254804G1.pdf>

Clode, P. L., et Marshall, A. T. (2002). Low temperature FESEM of the calcifying interface of

a scleractinian coral. *Tissue and Cell*, 34(3), 187-198.

Clode, P. L., et Marshall, A. T. (2003). Calcium associated with a fibrillar organic matrix in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Protoplasma*, 220(3-4), 153-161. <https://doi.org/10.1007/s00709-002-0046-3>

Cohen, I., Dubinsky, Z., et Erez, J. (2016). Light Enhanced Calcification in Hermatypic Corals: New Insights from Light Spectral Responses. *Frontiers in Marine Science*, 2(January), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00122>

Cook, C. B., Logan, A., Ward, J., Luckhurst, B., et Berg, C. J. (1990). Elevated temperatures and bleaching on a high latitude coral reef: the 1988 Bermuda event. *Coral Reefs*, 9(1), 45-49. <https://doi.org/10.1007/BF00686721>

Cooper, G. M. (2000). Cell-cell interactions. In *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9851/>

Courtney, T. A., Lebrato, M., Bates, N. R., Collins, A., De Putron, S. J., Garley, R., ... Andersson, A. J. (2017). Environmental controls on modern scleractinian coral and reef-scale calcification. *Science Advances*, 3(11). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701356>

Cox, W. W. (1971). *The relation of temperature to calcification in Montepora verrucosa*. Loma Linda University.

Crabbe, M. J. C. (2008). Climate change, global warming and coral reefs: Modelling the effects of temperature. *Computational Biology and Chemistry*, 32(5), 311-314. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.04.001>

## D

D'Olivo, J. P., et McCulloch, M. T. (2017). Response of coral calcification and calcifying fluid composition to thermally induced bleaching stress. *Scientific Reports*, 7(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02306-x>

Dan-Sohkawa, M., Kaneko, H., et Noda, K. (1995). Paracellular, transepithelial permeation of macromolecules in the body wall epithelium of starfish embryos. *Journal of Experimental Zoology*, 271(4), 264-272. <https://doi.org/10.1002/jez.1402710404>

Dauphin, Y., Cuif, J. P., et Williams, C. T. (2008). Soluble organic matrices of aragonitic skeletons of Merulinidae (Cnidaria, Anthozoa). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.002>

Davies, S. W., Marchetti, A., Ries, J. B., et Castillo, K. D. (2016). Thermal and pCO<sub>2</sub> Stress Elicit Divergent Transcriptomic Responses in a Resilient Coral. *Frontiers in Marine Science*, 3(June), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00112>

De'ath, G., Lough, J. M., et Fabricius, K. E. (2009). Declining Coral Calcification on the Great Barrier Reef. *Science*, 323(July), 116-119. <https://doi.org/10.1126/science.1165283>

Del Prete, S., Bua, S., Zoccola, D., Alasmay, F. A. S., Alothman, Z., Alqahtani, L. S., ...

- Capasso, C. (2018). Comparison of the Anion Inhibition Profiles of the  $\alpha$ -CA Isoforms (SpiCA1, SpiCA2 and SpiCA3) from the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2128. <https://doi.org/10.3390/ijms19072128>
- Desalvo, M. K., Sunagawa, S., Voolstra, C. R., et Medina, M. (2010). Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, 402(2006), 97-113. <https://doi.org/10.3354/meps08372>
- Desalvo, M. K., Voolstra, C. R., Sunagawa, S., Schwarz, J. A., Stillman, J. H., Coffroth, M. A., ... Medina, M. (2008). Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular ecology*, 17(17), 3952-3971.
- Dickson, A. G. (1993). The measurement of sea water pH. *Marine Chemistry*, 44(2-4), 131-142. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(93\)90198-W](https://doi.org/10.1016/0304-4203(93)90198-W)
- Drake, J. L., Mass, T., Haramaty, L., Zelzion, E., Bhattacharya, D., et Falkowski, P. G. (2013). Proteomic analysis of skeletal organic matrix from the stony coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 3788-3793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301419110>

## E

- Edge, S. E., Morgan, M. B., Gleason, D. F., et Snell, T. W. (2005). Development of a coral cDNA array to examine gene expression profiles in *Montastraea faveolata* exposed to environmental stress. *Marine pollution bulletin*, 51(5-7), 507-523.
- Evans, W. H., et Martin, P. E. M. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Molecular Membrane Biology*, 19(2), 121-136. <https://doi.org/10.1080/09687680210139839>
- Ezzat, L., Maguer, J. F., Grover, R., et Ferrier-Pagès, C. (2015). New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral–dinoflagellate symbiosis under  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  supply. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1812).

## F

- Fabricius, K. E., Noonan, S. H. C., Abrego, D., Harrington, L., et De'ath, G. (2017). Low coral recruitment due to altered settlement substrata as bottleneck for coral reefs under ocean acidification. *Proceedingd of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284, 20171536. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1536>
- Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M., et Bhat, M. A. (2004). *Drosophila* contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development*, 131(20), 4931-4942. <https://doi.org/10.1242/dev.01372>
- Fang, L. -s., Chen, Y. -w. J., et Chen, C. -s. (1989). Why does the white tip of stony coral grow so fast without zooxanthellae? *Marine Biology*, 103(3), 359-363. [https://doi.org/10.1016/0264-8172\(84\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0264-8172(84)90127-2)

- Ferrier-Pagès, C., Witting, J., Tambutté, É., et Sebens, K. P. (2003). Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, 22(3), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s00338-003-0312-7>
- Fine, M., Gildor, H., et Genin, A. (2013). A coral reef refuge in the Red Sea. *Global Change Biology*, 19(12), 3640-3647. <https://doi.org/10.1111/gcb.12356>
- Fowler, N., Gonzalez, E., Rawlins, F. A., Giebisch, G. H., et Whittembury, G. (1977). Effect of hypertonic urea and mannitol on distal nephron permeability. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 368(1-2), 3-11. <https://doi.org/10.1007/BF01063448>
- Furla, P., Bénazet-Tambutté, S., Jaubert, J., et Allemand, D. (1998). Functional polarity of the tentacle of the sea anemone *Anemonia viridis*: Role in inorganic carbon acquisition. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274(2), R303-R310.
- Furla, P., Galgani, I., Durand, I., et Allemand, D. (2000). Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. *The Journal of experimental biology*, 203(Pt 22), 3445-3457. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11044383>
- Furuse, M., et Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology*, 16(4), 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.02.006>

## G

- Gagnon, A. C., Adkins, J. F., et Erez, J. (2012). Seawater transport during coral biomineralization. *Earth and Planetary Science Letters*, 329-330, 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2012.03.005>
- Galli, G., et Solidoro, C. (2018). ATP Supply May Contribute to Light-Enhanced Calcification in Corals More Than Abiotic Mechanisms. *Frontiers in Marine Science*, 5(March). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00068>
- Ganot, P., Zoccola, D., Tambutté, É., Voolstra, C. R., Aranda, M., Allemand, D., et Tambutté, S. (2015). Structural Molecular Components of Septate Junctions in Cnidarians Point to the Origin of Epithelial Junctions in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 44-62. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu265>
- Gates, R. D., Baghdasarian, G., et Muscatine, L. (1992). Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biological Bulletin*, 182(3), 324-332. <https://doi.org/10.2307/1542252>
- Gattuso, J.-P., Allemand, D., et Frankignoulle, M. (1999). Photosynthesis and Calcification at Cellular, Organismal and Community Levels in Coral Reefs: A Review on Interactions and Control by Carbonate Chemistry. *American Zoologist*, 39(August), 160-183.
- Gazeau, F., Alliouane, S., Bock, C., Bramanti, L., Lopez Correa, M., Gentile, M., ... Ziveri, P. (2014). Impact of ocean acidification and warming on the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Frontiers in Marine Science*, 1(November), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00062>

- Genova, J. L., et Fehon, R. G. (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 161(5), 979-989. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212054>
- Gibbin, E. M., Putnam, H. M., Gates, R. D., Nitschke, M. R., et Davy, S. K. (2015). Species-specific differences in thermal tolerance may define susceptibility to intracellular acidosis in reef corals. *Marine Biology*, 162(3), 717-723. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2617-9>
- Glynn, P. W. (1993). Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs*, 12(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/BF00303779>
- Glynn, P. W., et Stewart, R. H. (1973). Distribution of coral reefs in the Pearl Islands (Gulf of Panama) in relation to thermal conditions. *Limnology and Oceanography*, 18(3), 367-379.
- Goreau, T. F. (1959). The physiology of skeleton formation in corals. I. A method for measuring the rate of calcium deposition by corals under different conditions. *The Biological Bulletin*, 116(1), 59-75. <https://doi.org/10.2307/1539156>
- Goreau, T. F., et Goreau, N. I. (1959). The physiology of skeleton formation in corals. II. Calcium deposition by hermatypic corals under various conditions in the reef. *Biological Bulletin*, 117(2), 239-250.

## H

- Hansson, I. (1973). A new set of pH-scales and standard buffers for sea water. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 20(5), 479-491. Elsevier.
- Hartsock, A., et Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 660-669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., et Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P. O., Deli, M. A., ... Brodin, B. (2015). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(5), 862-890. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>
- Hemming, N. G., et Hanson, G. N. (1992). Boron isotopic composition and concentration in modern marine carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(1), 537-543. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90151-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90151-8)
- Hemond, E. M., et Vollmer, S. V. (2015). Diurnal and nocturnal transcriptomic variation in the Caribbean staghorn coral, *Acropora cervicornis*. *Molecular Ecology*, 24(17), 4460-4473. <https://doi.org/10.1111/mec.13320>
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E.,

- ... Hatziolos, M. E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318(December 2007), 1737-1743. <https://doi.org/10.1126/science.1152509>
- Hoegh-Guldberg, O., Rongshuo, C., Poloczanska, E. S., Brewer, P. G., Sundby, S., Hilmi, K., ... Jung, S. (2014). The Ocean. In V. R. Barros, C. B. Field, D. J. Dokken, M. D. Mastrandrea, K. J. Mach, T. E. Bilir, ... L. L. White (Éd.), *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (p. 1655-1731). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Hohn, S., et Merico, A. (2015). Quantifying the relative importance of transcellular and paracellular ion transports to coral polyp calcification. *Frontiers in Earth Science*, 2(January), 1-11. <https://doi.org/10.3389/feart.2014.00037>
- Holcomb, M., Tambutté, É., Allemand, D., et Tambutté, S. (2014). Light enhanced calcification in *Stylophora pistillata*: effects of glucose, glycerol and oxygen. *PeerJ*, 2:e375, 1-18. <https://doi.org/10.7717/peerj.375>
- Hortsch, M., et Margolis, B. (2003). Septate and paranodal junctions: kissing cousins. *Trends in cell biology*, 13(11), 557-561.
- Houghton, J. (2009). Malestrom 14-7-2009. *Bulletin of the American Meteorological Society*.
- Houlbrèque, F., Tambutté, É., Allemand, D., et Ferrier-Pagès, C. (2004). Interactions between zooplankton feeding, photosynthesis and skeletal growth in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Journal of Experimental Biology*, 207(9), 1461-1469. <https://doi.org/10.1242/jeb.00911>
- Huey, B., et Stevenson, R. D. (1979). Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *American Zoologist*, 19, 357-366.
- Hughes, T. P., Anderson, K. D., Connolly, S. R., Heron, S. F., Kerry, J. T., Lough, J. M., ... Wilson, S. K. (2018). Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science*, 359(6371), 80-83. <https://doi.org/10.1126/science.aan8048>

## I

- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]*, 151. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324>

## J

- Johnston, I. S. (1980). The ultrastructure of skeletogenesis in hermatypic corals. In *International review of cytology* (Vol. 67, p. 171-214). Elsevier.
- Jokiel, P. L., et Coles, S. L. (1977). Effects of temperature on the mortality and growth of Hawaiian reef corals. *Marine Biology*, 43(3), 201-208.

<https://doi.org/10.1007/BF00402312>

## K

- Kanno, S., et Saffitz, J. E. (2001). The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology*, 10(4), 169-177. [https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(01\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(01)00078-3)
- Kenkel, C. D., Meyer, E., et Matz, M. V. (2013). Gene expression under chronic heat stress in populations of the mustard hill coral (*Porites astreoides*) from different thermal environments. *Molecular Ecology*, 22(16), 4322-4334. <https://doi.org/10.1111/mec.12390>
- Kraus, Y., et Technau, U. (2006). Gastrulation in the sea anemone *Nematostella vectensis* occurs by invagination and immigration: An ultrastructural study. *Development Genes and Evolution*, 216(3), 119-132. <https://doi.org/10.1007/s00427-005-0038-3>
- Krief, S., Hendy, E. J., Fine, M., Yam, R., Meibom, A., Foster, G. L., et Shemesh, A. (2010). Physiological and isotopic responses of scleractinian corals to ocean acidification. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(17), 4988-5001. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.05.023>
- Krueger, T., Horwitz, N., Bodin, J., Giovani, M.-E., Escrig, S., Meibom, A., et Fine, M. (2017). Common reef-building coral in the Northern Red Sea resistant to elevated temperature and acidification. *Royal Society Open Science*, 4(5), 170038. <https://doi.org/10.1098/rsos.170038>

## L

- Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L., et Fehon, R. G. (1998). Drosophila coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(December), 3505-3519.
- Laurent, J., Tambutté, S., Tambutté, É., Allemand, D., et Venn, A. A. (2013). The influence of photosynthesis on host intracellular pH in scleractinian corals. *Journal of Experimental Biology*, 216(8), 1398-1404. <https://doi.org/10.1242/jeb.082081>
- Laurent, J., Venn, A. A., Tambutté, É., Ganot, P., Allemand, D., et Tambutté, S. (2014). Regulation of intracellular pH in cnidarians: Response to acidosis in *Anemonia viridis*. *FEBS Journal*, 281(3), 683-695. <https://doi.org/10.1111/febs.12614>
- Levy, O., Kaniewska, P., Alon, S., Eisenberg, E., Karako-Lampert, S., Bay, L. K., ... Hoegh-Guldberg, O. (2011). Complex Diel Cycles of Gene Expression in Coral-Algal Symbiosis. *Science*, 331(6014), 175-175. <https://doi.org/10.1126/science.1196419>
- Lord, B. A. P., et Dibona, D. R. (1976). Role of the septate junction in the regulation of paracellular transepithelial flow. *The Journal of Cell Biology*, 71, 967-972.
- Louis, Y. D., Bhagooli, R., Kenkel, C. D., Baker, A. C., et Dyall, S. D. (2017). Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: Promises and limitations. *Comparative*

*Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 191, 63-77.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.007>

Loya, Y. (1976). The Red Sea coral *Stylophora pistillata* is an r strategist. *Nature*, 259(5543), 478-480. <https://doi.org/10.1038/259478a0>

Loya, Y., Sakai, K., Yamazato, K., Nakano, Y., Sambali, H., et van Woesik, R. (2001). Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecology Letters*, 4(2), 122-131. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00203.x>

## M

Mackie, G. O., Anderson, P. A. V., et Singla, C. L. (1984). Apparent absence of gap junctions in two classes of Cnidaria. *The Biological Bulletin*, 167(1), 120-123.

Magie, C. R., et Martindale, M. Q. (2008). Cell-Cell Adhesion in the Cnidaria: Insights Into the Evolution of Tissue Morphogenesis. *Biological Bulletin*, 214(3), 218-232.

Maor-Landaw, K., Karako-Lampert, S., Ben-Asher, H. W., Goffredo, S., Falini, G., Dubinsky, Z., et Levy, O. (2014). Gene expression profiles during short-term heat stress in the red sea coral *Stylophora pistillata*. *Global Change Biology*, 20(10), 3026-3035. <https://doi.org/10.1111/gcb.12592>

Marshall, A. T., et Clode, P. L. (2004). Calcification rate and the effect of temperature in a zooxanthellate and an azooxanthellate scleractinian reef coral. *Coral Reefs*, 23(2). <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0369-y>

Mass, T., Drake, J. L., Haramaty, L., Kim, J. D., Zelzion, E., Bhattacharya, D., et Falkowski, P. G. (2013). Cloning and characterization of four novel coral acid-rich proteins that precipitate carbonates in vitro. *Current Biology*, 23(12), 1126-1131. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.007>

Mass, T., Giuffre, A. J., Sun, C. Y., Stifler, C. A., Frazier, M. J., Neder, M., ... Gilbert, P. U. P. A. (2017). Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(37), E7670-E7678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707890114>

Mateo, M., Generous, A., Sinn, P. L., et Cattaneo, R. (2015). Connections matter— how viruses use cell–cell adhesion components. *Journal of Cell Science*, 128(3), 431-439.

Maynard, J., Van Hooidek, R., Eakin, C. M., Puotinen, M., Garren, M., Williams, G., ... Harvell, C. D. (2015). Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. *Nature Climate Change*, 5(7), 688-694. <https://doi.org/10.1038/nclimate2625>

McCulloch, M. T., D'Olivo, J. P., Falter, J. L., Holcomb, M., et Trotter, J. A. (2017). Coral calcification in a changing World and the interactive dynamics of pH and DIC upregulation. *Nature Communications*, 8(May), 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15686>

McCulloch, M. T., Falter, J., Trotter, J. A., et Montagna, P. (2012a). Coral resilience to ocean

- acidification and global warming through pH up-regulation. *Nature Climate Change*, 2(8), 623-627. <https://doi.org/10.1038/nclimate1473>
- McCulloch, M. T., Trotter, J. A., Montagna, P., Falter, J., Dunbar, R. B., Freiwald, A., ... Taviani, M. (2012b). Resilience of cold-water scleractinian corals to ocean acidification: Boron isotopic systematics of pH and saturation state up-regulation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 87, 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.03.027>
- Meyer, E., Aglyamova, G. V., et Matz, M. V. (2011). Profiling gene expression responses of coral larvae (*Acropora millepora*) to elevated temperature and settlement inducers using a novel RNA-Seq procedure. *Molecular Ecology*, 20(17), 3599-3616. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05205.x>
- Moya, A., Tambutté, S., Béranger, G. E., Gaume, B., Scimeca, J. C., Allemand, D., et Zoccola, D. (2008a). Cloning and use of a coral 36B4 gene to study the differential expression of coral genes between light and dark conditions. *Marine Biotechnology*, 10(6), 653-663. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9101-1>
- Moya, A., Tambutté, S., Bertucci, A., Tambutté, É., Lotto, S., Vullo, D., ... Zoccola, D. (2008b). Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Characterization, localization, and role in biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25475-25484. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804726200>
- Moya, A., Tambutté, S., Tambutté, É., Zoccola, D., Caminiti, N., et Allemand, D. (2006). Study of calcification during a daily cycle of the coral *Stylophora pistillata*: Implications for « light-enhanced calcification ». *Journal of Experimental Biology*, 209(17), 3413-3419. <https://doi.org/10.1242/jeb.02382>
- Muller-Parker, G., D'Elia, C. F., et Cook, C. B. (2015). Interactions Between Corals and Their Symbiotic Algae. In C. Birkeland (Éd.), *Coral Reefs in the Anthropocene* (p. 99-116). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5_5)
- Muscatine, L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Ecosystems of the world. Coral Reefs*.
- Muscatine, L., et Cernichiari, E. (1969). Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. *Biological Bulletin*, 137(3), 506-523.
- Muscatine, L., Tambutté, É., et Allemand, D. (1997). Morphology of coral desmocytes, cells that anchor the calicoblastic epithelium to the skeleton. *Coral Reefs*, 16(4), 205-213. <https://doi.org/10.1007/s003380050075>

## N

- Nekrasova, O., et Green, K. J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol.*, 23(11), 537-546. <https://doi.org/10.1039/b800799c.O>
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2525-2532. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700865>

Niessen, C. M., et Gottardi, C. J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 562-571. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.015>

## O

Oakley, C. A., et Davy, S. K. (2018). Cell Biology of Coral Bleaching. In M. van Oppen & J. M. Lough (Éd.), *Coral Bleaching*. Springer, Cham.

## P

Papina, M., Meziane, T., et Woesik, R. Van. (2003). Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 135, 533-537. <https://doi.org/10.1016/S1096-4959>

Paxton, C. W., Baria, M. V. B., Weis, V. M., et Harii, S. (2015). Effect of elevated temperature on fecundity and reproductive timing in the coral *Acropora digitifera*. *Zygote*, 24(4), 511-516. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000477>

Pearse, V. B., et Muscatine, L. (1971). Role of Symbiotic Algae (Zooxanthellae) in Coral Calcification. *Biological*, 141(2), 350-363.

Puverel, S., Tambutté, É., Zoccola, D., Domart-Coulon, I., Bouchot, A., Lotto, S., ... Tambutté, S. (2005). Antibodies against the organic matrix in scleractinians: a new tool to study coral biomineralization. *Coral Reefs*, 24(1), 149-156.

## R

Randall, C. J., et van Woesik, R. (2015). Contemporary white-band disease in Caribbean corals driven by climate change. *Nature Climate Change*, 5(4), 375-379. <https://doi.org/10.1038/nclimate2530>

Reaka-Kudla, M. L. (1997). The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. In *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources* (Vol. 2, p. 551).

Reynaud, S., Hemming, N. G., Juillet-Leclerc, A., et Gattuso, J.-P. (2004). Effect of pCO<sub>2</sub> and temperature on the boron isotopic composition of the zooxanthellate coral *Acropora* sp. *Coral Reefs*, 23(4), 539-546. <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0399-5>

Ries, J. B. (2011). A physicochemical framework for interpreting the biological calcification response to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(14), 4053-4064. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.04.025>

Roberts, L. (1987). Coral bleaching threatens Atlantic reefs. *Science*, 238, 1228-1229.

Ruiz-Jones, L. J., et Palumbi, S. R. (2015). Transcriptome-wide changes in coral gene expression at noon and midnight under field conditions. *Biological Bulletin*, 228(3), 227-241. <https://doi.org/10.1086/BBLv228n3p227>

## S

- Seksek, O., Henry-Toullmé, N., Sureau, F., et Bolard, J. (1991). SNARF-1 as an intracellular pH indicator in laser microspectrofluorometry: a critical assessment. *Analytical biochemistry*, 193, 49-54.
- Sevilgen, D. S., Venn, A. A., Hu, M. Y., Tambutté, É., de Beer, D., Planas-Bielsa, V., et Tambutté, S. (2019). Full in vivo characterization of carbonate chemistry at the site of calcification in corals. *Science Advances*, 5(1), eaau7447. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7447>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., et Pessaraki, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shashar, N., Kinane, S., Jokiel, P. L., et Patterson, M. R. (1996). Hydromechanical boundary layers over a coral reef. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 199(1), 17-28. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00156-5)
- Shelford, V. E. (1931). Some Concepts of Bioecology. *Ecology*, 12(3), 455-467. <https://doi.org/10.2307/1928991>
- Shick, J. M. (1991). *A functional biology of sea anemones* (Chapman &).
- Shinn, E. A. (1966). Coral growth-rate, an environmental indicator. *Journal of Paleontology*, 40(2), 233-240.
- Simonsen, K. T., Moerman, D. G., et Naus, C. C. (2014). Gap junctions in *C. elegans*. *Frontiers in Physiology*, 5(40). <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00040>
- Smith, D. J., Suggett, D. J., et Baker, N. R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology*, 11(1), 1-11.
- Sørensen, S. P. L. (1909). *Enzymstudien II: Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen*. Springer-Verlag.
- Spalding, M., Burke, L., Wood, S. A., Ashpole, J., Hutchison, J., et zu Ermgassen, P. (2017). Mapping the global value and distribution of coral reef tourism. *Marine Policy*, 82(January), 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.05.014>
- Spivack, A. J. (1986). *Boron Isotope Geochemistry*. *Ph.D Thesis* (p. 186). p. 186.
- Steed, E., Balda, M. S., et Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. *Trends in Cell Biology*, 20(3), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.002>

## T

- Tambutté, É., Allemand, D., et Jaubert, J. (1995). The *Stylophora pistillata* microcolony: a model for studying calcium transport process during coral biomineralization. *Bulletin de l'Institut océanographique - Numéro spécial*, 14, 79-88.

- Tambutté, É., Allemand, D., Mueller, E., et Jaubert, J. (1996). A compartmental approach to the mechanism of calcification in hermatypic corals. *The Journal of experimental biology*, 199, 1029-1041.
- Tambutté, É., Allemand, D., Zoccola, D., Meibom, A., Lotto, S., Caminiti, N., et Tambutté, S. (2007). Observations of the tissue-skeleton interface in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, 26(3), 517-529. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0263-5>
- Tambutté, É., Tambutté, S., Segonds, N., Zoccola, D., Venn, A. A., Erez, J., et Allemand, D. (2012). Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1726), 19-27. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733>
- Tambutté, É., Venn, A. A., Holcomb, M., Segonds, N., Techer, N., Zoccola, D., ... Tambutté, S. (2015). Morphological plasticity of the coral skeleton under CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification. *Nature communications*, 6, 7368. <https://doi.org/10.1038/ncomms8368>
- Tambutté, S., Holcomb, M., Ferrier-Pagès, C., Reynaud, S., Tambutté, É., Zoccola, D., et Allemand, D. (2011). Coral biomineralization: From the gene to the environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408(1-2), 58-78. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.026>
- Tambutté, S., Tambutté, É., Zoccola, D., et Allemand, D. (2007, mai 25). Organic Matrix and Biomineralization of Scleractinian Corals. *Handbook of Biomineralization*, p. 243-259. <https://doi.org/doi:10.1002/9783527619443.ch14>
- Taubner, I., Hu, M. Y., Eisenhauer, A., et Bleich, M. (2019). Electrophysiological evidence for light-activated cation transport in calcifying corals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1896). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2444>
- Trotter, J. A., Montagna, P., McCulloch, M. T., Silenzi, S., Reynaud, S., Mortimer, G., ... Rodolfo-Metalpa, R. (2011). Quantifying the pH « vital effect » in the temperate zooxanthellate coral *Cladocora caespitosa*: Validation of the boron seawater pH proxy. *Earth and Planetary Science Letters*, 303(3-4), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.01.030>
- Tsien, R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290(5806), 527-528. <https://doi.org/10.1038/290527a0>
- Tyler, S. (2003). Epithelium — The Primary Building Block for Metazoan Complexity. *Integrative and Comparative Biology*, 43, 55-63.
- ∇
- Van Voorhies, W. A. (1996). Bergmann size clines: A simple explanation for their occurrence in ectotherms. *Evolution*, 50(3), 1259-1264. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02366.x>
- Vaughan, T. W. (1943). Revision of the suborders, families and genera of the Scleractinia. *Geol Soc Am Special Paper*, 44, 1-363.

- Venn, A. A., Tambutté, É., Caminiti-Segonds, N., Techer, N., Allemand, D., et Tambutté, S. (2019). Effects of light and darkness on pH regulation in three coral species exposed to seawater acidification. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38168-0>
- Venn, A. A., Tambutté, É., Holcomb, M., Allemand, D., et Tambutté, S. (2011). Live tissue imaging shows reef corals elevate pH under their calcifying tissue relative to seawater. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020013>
- Venn, A. A., Tambutté, É., Holcomb, M., Laurent, J., Allemand, D., et Tambutté, S. (2013). Impact of seawater acidification on pH at the tissue–skeleton interface and calcification in reef corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1634-1639. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216153110>
- Venn, A. A., Tambutté, É., Lotto, S., Zoccola, D., Allemand, D., et Tambutté, S. (2009). Imaging intracellular pH in a reef coral and symbiotic anemone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), 16574-16579. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902894106>
- Veron, J. E. N., Stafford-Smith, M. G., Turak, E., et DeVantier, L. M. (2016). Corals of the World. Consulté 7 septembre 2019, à l'adresse [http://www.coralsoftheworld.org/species\\_factsheets/species\\_factsheet\\_distribution/stylophora-pistillata/?version=0.01](http://www.coralsoftheworld.org/species_factsheets/species_factsheet_distribution/stylophora-pistillata/?version=0.01)
- Vidal-Dupiol, J., Dheilily, N. M., Rondon, R., Grunau, C., Cosseau, C., Smith, K. M., ... Mitta, G. (2014). Thermal stress triggers broad *Pocillopora damicornis* transcriptomic remodeling, while *Vibrio coralliilyticus* infection induces a more targeted immunosuppression response. *PLoS ONE*, 9(9), e107672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107672>
- Vidavsky, N., Addadi, S., Mahamid, J., Shimoni, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., ... Addadi, L. (2014). Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 39-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312833110>
- Von Euw, S., Zhang, Q., Manichev, V., Murali, N., Gross, J., Feldman, L. C., ... Falkowski, P. G. (2017). Biological control of aragonite formation in stony corals. *Science*, 356(6341), 933-938. <https://doi.org/10.1126/science.aam6371>
- Voolstra, C. R., Li, Y., Liew, Y. J., Baumgarten, S., Zoccola, D., Flot, J. F., ... Aranda, M. (2017). Comparative analysis of the genomes of *Stylophora pistillata* and *Acropora digitifera* provides evidence for extensive differences between species of corals. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17484-x>

## W

- Wakabayashi, S., Shigekawa, M., et Pouyssegur, J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Physiological reviews*, 77(1), 51-74.
- Walko, G., Castañón, M. J., et Wiche, G. (2015). Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and tissue research*, 360(3), 529-544.

Ward IV, R. E., Schweizer, L., Lamb, R. S., et Fehon, R. G. (2001). The protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of drosophila coracle, a cytoplasmic component of the septate junction, provides functions essential for embryonic development and imaginal cell proliferation. *Genetics*, *159*(1), 219-228.

Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, *211*(19), 3059-3066. <https://doi.org/10.1242/jeb.009597>

Wilkinson, C. (2008). *Status of coral reefs of the World: 2008*.

Wood, R. L. (1959). Intercellular Attachment in the Epithelium of Hydra As Revealed by Electron Microscopy. *The Journal of Cell Biology*, *6*(3), 343-352. <https://doi.org/10.1083/jcb.6.3.343>

## Y

Yang, S., Jin, H., et Zhao, Z. (2018). Paracellular tightness and the functional expression of efflux transporters P-gp and BCRP in bEnd3 cells. *Neurological Research*, *40*(8), 644-649. <https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1460701>

Yang, S., Mei, S., Jin, H., Zhu, B., Tian, Y., Huo, J., ... Zhao, Z. (2017). Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS ONE*, *12*(10), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187017>

## Z

Zoccola, D., Ganot, P., Bertucci, A., Caminiti-Segonds, N., Techer, N., Voolstra, C. R., ... Tambutté, S. (2015). Bicarbonate transporters in corals point towards a key step in the evolution of cnidarian calcification. *Scientific Reports*, *5*(1), 9983. <https://doi.org/10.1038/srep09983>

Zoccola, D., Innocenti, A., Bertucci, A., Tambutté, É., Supuran, C. T., et Tambutté, S. (2016). Coral carbonic anhydrases: Regulation by ocean acidification. *Marine Drugs*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/md14060109>

Zoccola, D., Moya, A., Béranger, G. E., Tambutté, É., Allemand, D., Carle, G. F., et Tambutté, S. (2009). Specific expression of BMP2/4 ortholog in biomineralizing tissues of corals and action on mouse BMP receptor. *Marine Biotechnology*, *11*(2), 260-269. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9141-6>

Zoccola, D., Tambutté, É., Kulhanek, E., Puverel, S., Scimeca, J. C., Allemand, D., et Tambutté, S. (2004). Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1663*(1-2), 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.02.010>

Zoccola, D., Tambutté, É., Sénégas-Balas, F., Michiels, J.-F., Failla, J.-P., Jaubert, J., et Allemand, D. (1999). Cloning of a calcium channel  $\alpha 1$  subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Gene*, *227*(2), 157-167. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00602-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00602-7)

An aerial photograph of a coral reef system. The water is a vibrant turquoise color, and the reef structures are visible as darker, textured patches. A white rectangular box with a thin black border is centered in the middle of the image, containing the word "Annexes" in a black, italicized serif font.

*Annexes*



## Annexes

**Annexe 1.** Valeurs propres de l'analyse discriminante des gènes de transporteurs ioniques.

	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
Valeurs propres	0,918	0,752	0,746	0,691	0,511
Proportion	<b>25,371</b>	<b>20,779</b>	<b>20,63</b>	19,102	14,118
Proportion cumulée	<b>25,371</b>	<b>46,15</b>	<b>66,78</b>	85,882	100

**Annexe 2.** Variables discriminantes de l'analyse discriminante des gènes de transporteurs ioniques.

	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
Ca <sup>2+</sup> channel	-10,694966	15,4675	0,46706	-1,12324	14,1893
NHE	-3,080636	-4,7236	-5,7165	-5,429	-15,163
PMCA1	-20,717179	28,3384	-1,934	59,38005	59,0433
PMCA2	24,594086	-23,7929	-0,46087	-24,39161	-36,4319
PMCA3	-8,847916	15,5788	6,02866	47,70116	60,3594
SpisSLC4 $\beta$	5,144749	4,7056	3,4149	2,41585	2,6525
SpisSLC4 $\gamma$	1,536614	-2,5363	0,55952	-12,33544	-9,7606
SpisSLC4 $\delta$	-0,54441	0,5018	-0,10592	1,34472	1,586
SpisSLC4 $\epsilon$	-0,230295	0,753	-0,52864	1,15644	2,4429
SpisSLC26 $\alpha$	-1,217538	1,8577	0,54096	-7,18371	-13,662
SpisSLC26 $\beta$	-0,261162	0,1832	0,73831	-0,05325	1,0824
SpisSLC26 $\gamma$	48,696717	-119,0814	22,11929	-223,00689	-248,1892
SpisCA1	1,233195	10,4148	-0,57223	42,31536	19,6564
SpisCA2	-0,001286	0,0266	0,02982	0,02812	0,1953
SpisCA3	0,494598	-2,8902	0,53158	-3,59205	-3,351
SpisCA4	1,742739	-1,0802	-2,31121	-0,98802	-3,0357
V-ATPase	8,282215	-17,0624	-5,79534	-55,13415	-65,1961

**Annexe 3.** Résultats d'une ANOVA à un facteur sur l'effet des traitements (température et condition nuit/jour) sur chacun des axes de l'analyse discriminante des gènes de transporteurs ioniques (DF1, DF2 et DF3) (Figure 31) suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

Variable	Effet	df	F	p	Post-hoc	
DF1	Traitement	5	205,8	> 0,0001	a	25°C Jour, 25°C Nuit, 20°C Jour, 20°C Nuit
					b	31°C Nuit
					c	31°C Jour
					d	-
					e	-
					f	-
DF2	Traitement	5	676,4	> 0,0001	a	25°C Nuit
					b	31°C Jour
					c	31°C Nuit
					d	20°C Jour, 20°C Nuit
					e	25°C Jour
					f	-
DF3	Traitement	5	429,6	> 0,0001	a	25°C Jour
					b	25°C Nuit
					c	31°C Jour
					d	31°C Nuit
					e	20°C Nuit
					f	20°C Jour

**Annexe 4.** Mise au point d'un protocole de mesure du taux de calcification avec la méthode d'anomalie d'alcalinité dans un petit volume.

La méthode d'anomalie d'alcalinité est une méthode reconnue pour mesurer le taux de calcification chez les coraux (Chisholm et Gattuso, 1991). Cette méthode consiste à mesurer l'alcalinité totale de l'eau contenue dans une chambre d'incubation où les échantillons ont été incubés pendant un temps donné et la comparer à un blanc (eau incubée sans échantillon). Sachant que toute précipitation d'une mole de  $\text{CaCO}_3$  correspond à une diminution de l'alcalinité de deux équivalents, la différence d'alcalinité entre l'échantillon et le blanc (appelée anomalie d'alcalinité) permet de calculer la quantité de  $\text{CaCO}_3$  précipitée pendant la durée de l'incubation et d'en déduire ainsi un taux de calcification. Cette méthode est couramment utilisée pour des microcolonies de coraux sur fil mesurant au minimum 2 cm de long. Cependant, il n'existe pas à ce jour de méthode pour mesurer le taux de calcification sur des microcolonies à plat dont la surface est largement inférieure. C'est pourquoi, j'ai commencé à mettre au point un protocole pour mesurer l'alcalinité de l'eau pour des microcolonies incubées dans des petits volumes.

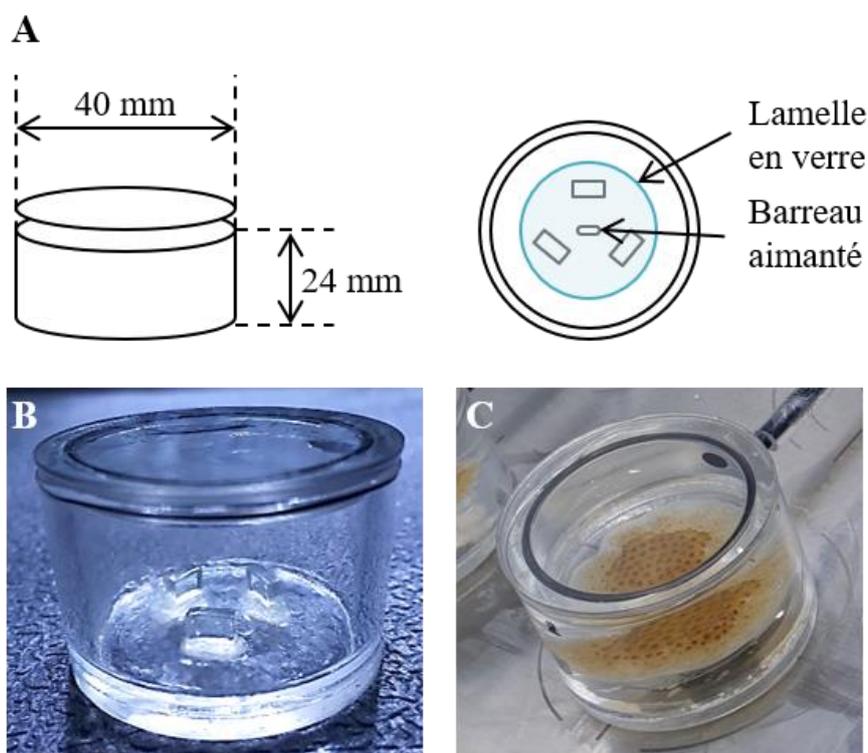
Pour cela, j'ai conçu de nouvelles chambres d'incubation afin d'adapter le volume d'incubation à la taille des échantillons. Etant donné que 12 ml sont nécessaires pour les titrations de l'eau (4 ml en triplicat), j'ai conçu des chambres d'incubation de 16 ml, dont le diamètre permet également de pouvoir placer la lamelle en verre sur lesquelles sont fixées les microcolonies à

plat (Annexe 5). Au fond des chambres d'incubation, des petits « pieds » permettent de surélever la lamelle en verre afin de placer en-dessous un barreau aimanté.

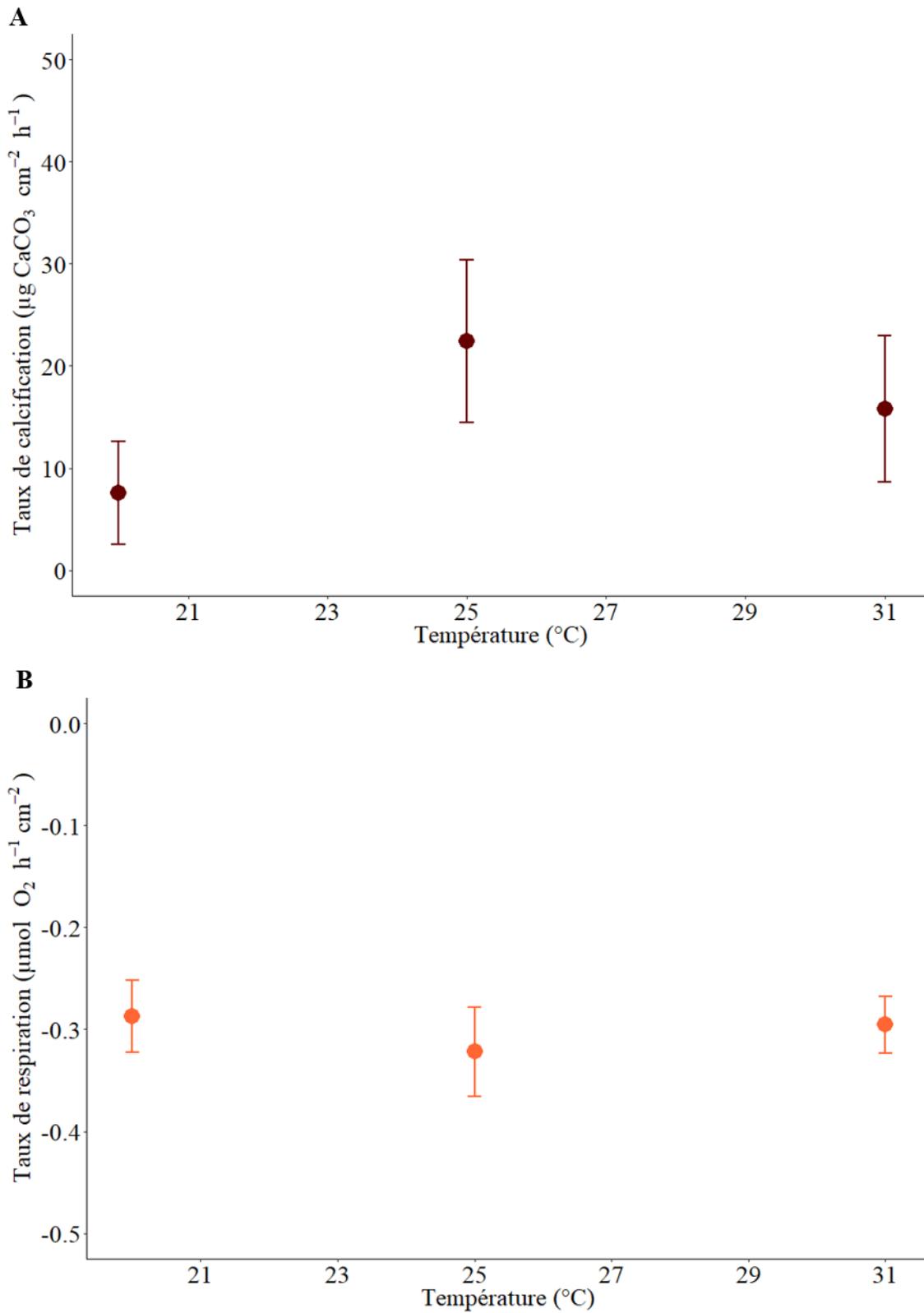
De nombreux tests ont été effectués pour déterminer la durée d'incubation adéquate afin d'obtenir une diminution d'alcalinité suffisante pour calculer le taux de calcification, sans observer de changement du pH. Ainsi, les microcolonies peuvent être incubées 30 min à 25°C, 45 min à 31°C et 1h à 20°C. A la fin des incubations, l'eau des chambres d'incubation est récupérée pour réaliser les titrations comme décrit dans (Tambutté, É. *et al.*, 2015). Comme pour les mesures d'alcalinité dans de plus grands volumes, le taux de calcification est ensuite calculé à partir de la différence d'alcalinité totale (AT) entre les échantillons et les blancs. Les données sont ensuite normalisées par la surface des échantillons. La surface des microcolonies à plat correspond à la circonférence de celles-ci et a été déterminée à partir de photographies capturées avec une caméra (Nikon) placée sur une loupe binoculaire (Nikon SMZ 745T) au grossissement  $\times 0,67$ , enregistrées sur le logiciel Archimed et analysées avec le logiciel Histolab.

De premières expériences ont été conduites de nuit et ont permis de calculer le taux de calcification à 20°C, 25°C et 31°C. Des mesures du taux de respiration ont également été réalisées grâce à des pastilles collées à l'intérieur des chambres d'incubation reliées à un oxymètre (Oxy4mini) tel que décrit dans l'article 1 (Bernardet *et al.*, 2019). Les résultats préliminaires de ces expériences sont présentés en Annexe 6.

**Annexe 5.** Conception de nouvelles chambres d'incubation pour mesurer l'alcalinité dans des petits volumes. A : Plan de conception des chambres d'incubation, B. et C. Photographie des chambres d'incubations.



**Annexe 6.** Résultats préliminaires des taux de calcification (A) et de respiration (B) de microcolonies à plat.



**Annexe 7.** Valeurs propres de l'analyse discriminante des gènes de jonctions septées.

	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
Valeurs propres	0,922	0,868	0,729	0,709	0,612
Proportion	<b>24,013</b>	<b>22,604</b>	<b>18,978</b>	18,461	15,944
Proportion cumulée	<b>24,013</b>	<b>46,617</b>	<b>65,595</b>	84,056	100

**Annexe 8.** Variables discriminantes de l'analyse discriminante des gènes de jonctions septées.

	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
StpClaud3	-12,5387	-80,864	-136,7624	-77,8208	147,334
StpClaud4	5,1034	43,472	-1,5606	8,1144	50,8434
StpClaud5	61,0795	-901,749	-692,6567	-103,4937	505,0142
StpClaud6	-19,6101	150,092	49,315	182,17	-220,677
StpClaud7	88,4068	-135,976	68,9265	-56,1058	94,9415
StpClaudAS1	-80,1926	-104,355	23,0187	-171,4665	33,8717
StpClaudAS2	34,4287	-24,118	-139,9376	-59,1042	111,9461
StpCONT	28,4317	-15,003	-95,9058	-30,5088	61,3507
StpCORA1	-1,3017	2,042	-0,6928	-2,4313	1,1519
StpCORA2	4,776	-23,766	25,6178	5,2672	-25,9115
StpCORA3	5,1599	-10,553	-9,0375	-5,9717	7,2949
StpNRG1	0,2255	-2,777	-1,9631	0,1003	-0,4458
StpNRG2	0,4101	3,07	2,5856	3,1525	-1,7241
StpNRX1	-8,3249	13,747	15,9079	3,41	-14,5798
StpNRX2	-366,1763	-625,103	-335,9557	-199,4479	666,2525
StpNRX3	59,5012	-80,289	-265,3444	-38,596	-337,3021
StpYURT	-45,2948	-39,436	109,1265	-2,4199	-64,491

**Annexe 9.** Résultats d'une ANOVA à un facteur sur l'effet des traitements (température et condition nuit/jour) sur chacun des axes de l'analyse discriminante des gènes de jonctions septées (DF1, DF2 et DF3) (Figure 45) suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

Variable	Effet	df	F	p	Post-hoc	
DF1	Traitement	5	296,2	< 0,0001	a	20°C Jour, 20°C Nuit, 25°C Jour
					b	25°Nuit
					c	31°C Jour
					d	31°C Nuit
					e	-
					f	-
DF2	Traitement	5	31,56	< 0,0001	a	31°C Jour
					b	20°C Nuit
					c	20°C Jour, 25°C Jour, 25°C Nuit
					d	31°C Nuit
					e	-
					f	-
DF3	Traitement	5	97,1	< 0,0001	a	20°C Jour
					b	25°C Nuit, 31°C Nuit
					c	31°C Nuit, 31°C Jour, 20°C Nuit
					d	25°C Jour
					e	-
					f	-



**Coralie BERNARDET**

**Physiologie des transports ioniques et moléculaires chez les coraux,  
implications environnementales**

**RÉSUMÉ**

Les coraux tropicaux constructeurs de récifs sont à l'origine d'écosystèmes extrêmement riches dont dépendent de nombreuses espèces, y compris l'Homme. Aujourd'hui, les changements climatiques représentent toutefois une menace pour la survie des coraux. Afin de comprendre la réponse de ces espèces aux modifications environnementales, il est essentiel d'avoir des informations sur la physiologie de ces espèces-clé. Les travaux conduits au cours de ma thèse ont ainsi permis de caractériser, au niveau mécanistique, les processus affectés par des changements de température chez l'espèce *Stylophora pistillata*. Pour cela, j'ai employé des approches multiples en partant de l'animal jusqu'au gène. Mes résultats ont montré : 1) que les taux de calcification, de photosynthèse et de respiration sont drastiquement réduits aux extrémités de la fenêtre thermique, 2) l'existence d'un phénomène de « *light-enhanced calcification* », excepté à basse température, 3) la sous-expression d'un groupe de gènes impliqué dans le transport du carbone inorganique lorsque les taux de calcification sont réduits (stress thermiques et la nuit), 4) la stabilité du pH dans le milieu extracellulaire calcifiant dans tous les traitements, et 5) l'augmentation de la perméabilité paracellulaire conjointement à l'augmentation de la calcification (25°C et le jour). En plus de leur intérêt en recherche fondamentale, ces informations peuvent constituer des outils utiles pour de futures recherches sur le terrain dans le but d'évaluer l'état de santé des coraux et prédire leur devenir dans un monde qui change.

**Mots-clé :** Corail, *Stylophora pistillata*, calcification, température, nuit/jour, expression génique, pH, perméabilité

**ABSTRACT**

Tropical reef-building corals are at the basis of extremely biodiverse ecosystems on which many species depend, including human beings. Today, climate change represents a threat for the future survival of corals, and it is becoming crucial to better understand the physiology of these key species and the mechanisms underlying their responses to environmental change. The work conducted during my PhD focused on the characterization of the processes affected by temperature changes in *Stylophora pistillata*. For this purpose, I used multiple approaches from the animal to the gene. My results showed that: 1) calcification, photosynthesis and respiration declined drastically at the extremes of the thermal performance window, 2) light-enhanced calcification occurs across the thermal performance window except at low temperature, 3) a group of genes involved in inorganic carbon transport is under-expressed when calcification is reduced (thermal stress and during night), 4) pH in the extracellular calcifying medium remains stable at low and high temperatures, 5) paracellular permeability is highest when calcification increases (25°C and during the day). Information gained from this lab-based study will be useful in guiding further research in the field in order to evaluate coral health and predict the future of coral reefs in a changing world.

**Keywords:** Coral, *Stylophora pistillata*, calcification, temperature, night/day, gene expression, pH, permeability