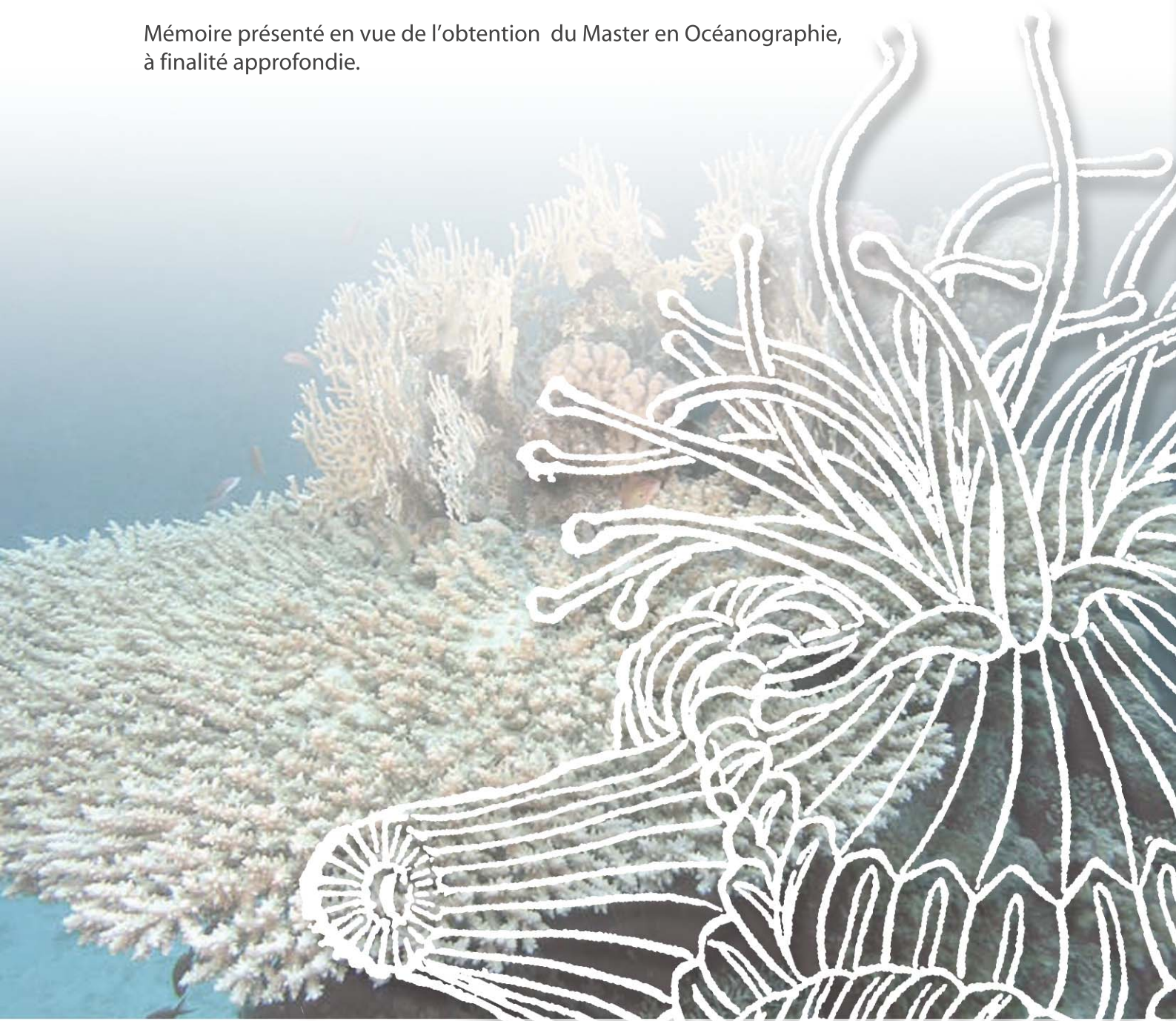


Le blanchiment **des coraux :** Implications microbiennes et nouvelle voie d'investigation

Ophélie Ladrière
Année académique 2005 - 2006

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Master en Océanographie,
à finalité approfondie.



Résumé

Le blanchiment des récifs coralliens fait partie des grandes problématiques environnementales qui pèsent sur notre planète depuis quelques dizaines d'années. En effet, les écosystèmes récifaux sont le siège de la plus grande biodiversité marine et le fléau qui les touche ne cesse d'augmenter en fréquence, en étendue et en intensité. Il est donc primordial d'étudier les mécanismes d'action de ce phénomène afin de pouvoir en posséder de meilleures connaissances et ainsi mieux protéger et prévoir l'avenir de ces écosystèmes, essentiels à bien des égards. Par ailleurs, de nouvelles techniques et de nouveaux moyens expérimentaux sont sans cesse réclamés afin de pousser les recherches dans ce domaine.

Dans cette optique, le présent travail s'est orienté sur deux axes. Tout d'abord, l'implication de microorganismes dans le phénomène de blanchiment a été étudiée (e.a. hypothèse bactérienne). La pertinence d'utiliser l'anémone de mer *Aiptasia* comme outil dans l'étude du blanchiment corallien a ensuite été testée.

Pour ce faire, l'observation en ultrastructure du mucus et de l'endoderme de coraux sains, d'une part, et blanchis, d'autre part, provenant de milieux naturels et d'aquariums a été réalisée afin de mettre en évidence des bactéries et/ou des virus au sein de ces structures coralliennes. Une étude de faisabilité des manipulations a été effectuée en vue de réaliser une comparaison de diversité génétique des communautés bactériennes présentes dans l'eau de mer, d'une part, et associées aux coraux sains et blanchis, associés ou non des poissons, d'autre part. À cette occasion, les protocoles expérimentaux nécessaires à ce genre d'étude ont pu être déterminés. Ensuite, selon le second axe de ce travail, des anémones de mer ont été observées en microscopie électronique tout comme les coraux et ont fait l'objet de comptages de densités en zooxanthelles. Par ailleurs, un blanchiment artificiel induit par un choc thermique a également été testé sur ces individus.

Les résultats obtenus ont montré la présence d'une densité en zooxanthelles plus élevée dans l'endoderme des organismes sains, anémones ou madrépores, par rapport à leurs homologues blanchis. L'observation de la structure fine des différents échantillons montre que les zooxanthelles des individus blanchis ont tendance à présenter un phénomène de rétraction/résorption par rapport à la vacuole des cellules hôtes les hébergeant. Ces algues se retrouvent d'ailleurs parfois libres et dissociées du tissu endodermique corallien en cours de blanchiment. Un autre critère de diagnostic qui a pu être établi est la proportion et la bonne distinction des organites constitutifs des algues symbiotiques. Au niveau de la présence de microorganismes dans les animaux échantillonnés, des bactéries ont pu être mises en évidence chez des coraux sains et blanchis. Des virus ont pu être montrés au niveau de l'endoderme d'anémones saines et blanchies également. Ces deux observations montrent que le premier stade nécessaire au phénomène de blanchiment pourrait bien être l'infection par un type de microorganisme induisant par la suite l'expulsion ou la dégradation des zooxanthelles. L'étude des anémones de mer a également mis en évidence une distribution hétérogène des zooxanthelles le long des tentacules et le fait que l'application d'un choc thermique, chaud ou froid, occasionne un stress (supplémentaire ?) induit l'expulsion des symbiotes. Les techniques d'étude de la diversité des bactéries associées aux coraux sont opérationnelles et peuvent être appliquées à une étude plus poussée de l'implication bactérienne dans le blanchiment corallien.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont, bien entendu, au Docteur Mathieu Poulicek, sans qui ce mémoire ne serait pas. Merci d'avoir cru en moi comme tu l'as fait et merci de m'avoir ouvert les yeux au domaine de l'écologie des récifs coralliens, écosystèmes riches et importants à bien des égards.

Je désirerais remercier ensuite le Professeur Jean-Pierre Thomé, qui m'a accueillie chaleureusement au sein du laboratoire d'écologie animale et d'écotoxicologie, le Professeur Pierre Vandewalle pour son soutien financier dans l'achat des souches bactériennes et de la « bible » en matière de maladies coralliennes, et à ce même titre les Fondations Camille Hela et Docquier pour l'octroi de leurs bourses d'études, précieuses à la prise en charge du coût de cette année d'étude.

Je tiens à remercier chaleureusement les Docteurs Annick Wilmotte et Philippe Compère qui m'ont enseigné de nombreuses choses, m'ont guidée, conseillée et épaulée dans les deux grands volets de ce travail. Merci pour votre gentillesse !

Qu'aurais-je fait sans Nicole Decloux ? 1000 fois merci pour la préparation des échantillons pour l'ultrastructure, tes dépannages, et surtout ta disponibilité et ta bonne humeur, toujours bien agréable.

Je remercie également les Drs. P. Motte, J. Piette et V. Demoulin pour leurs avis précieux et conseils avisés concernant les photos prises au TEM.

Ce mémoire n'aurait pas pu être réalisé sans échantillons à observer et à analyser. Merci à Eric Parmentier (de ULg) pour les échantillons de Madagascar, à Lucie Penin (de l'Université de Perpignan) pour les échantillons de Polynésie française, à Alexandre Sneessens (de l'UCL) pour les échantillons de Nausicaà, et à Leah Reshef (de l'Université de Tel-Aviv) pour les divers échantillons et coupes, pour sa gentillesse et ses nombreux conseils.

Merci à mes comparses du laboratoire de cyanobactéries (du Dr. Wilmotte) : Cédric, Rafa, Laetitia, et GG, et de l'unité de morphologie ultrastructurale (du Dr. Compère): Laure et Caro, pour leurs nombreux coups de main, leur bonne humeur et leur bonne humeur (si si, c'était bien chouette de vous côtoyer !).

Je souhaite dire merci à Christian Michel, conservateur de l'Aquarium-Museum de l'Université de Liège, pour m'avoir permis de le débarrasser de quelques anémones de mer, un peu trop envahissantes à son goût.

Je remercie aussi toute l'équipe du décanat et de l'apparitorat de la Faculté des Sciences pour le job, leurs encouragements hebdomadaires et leur grande sympathie. Monsieur le Doyen a bien de la chance de vous avoir à ses côtés !

Un merci du fond du cœur à ma famille et mes amis (qui se reconnaîtront) qui me soutiennent et croient en moi depuis le début et tout au long de ses longues années d'études. Merci à Damien, Marie et Maman pour les relectures. Merci à Tom pour la couverture. Merci Papa, pour le sponsoring (ordi, livres, ...) et pour être toujours là.

Et un merci particulier à Damien, sans qui la vie serait moins belle, tout simplement...

Table des matières

PARTIE 1 : Implications microbiennes du blanchiment corallien

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
<u>I. Les récifs coralliens</u>	1
I. 1. Biologie et morphologie des coraux hermatypiques	1
I. 2. Association coraux-zooxanthelles	3
I. 3. Rôle des bactéries	5
I. 4. Répartition et intérêts des récifs	6
<u>II. Le blanchiment des coraux</u>	9
II. 1. Le phénomène de blanchiment	9
II. 2. Historique	9
II. 3. Hypothèses à la base du blanchiment	10
A) <i>Facteurs environnementaux</i>	10
B) <i>Hypothèse adaptative</i>	10
C) <i>Hypothèse bactérienne</i>	11
D) <i>Hypothèse de « protection contre le blanchiment » par l'association avec des poissons</i>	16
E) <i>Cause virale ou fongique</i>	16
II. 4. Mécanismes d'adaptation	16
II. 5. Impacts du blanchiment	17
CHAPITRE II : OBJECTIFS	18
CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES	19
<u>I. Description des échantillons</u>	19
<u>II. Morphologie-Ultrastructure</u>	22
II.1. Microscope électronique à balayage	22
A) <i>Préparation des échantillons</i>	22
B) <i>Fonctionnement du microscope et conditions d'observation</i>	23
II.2. Microscope électronique à transmission	23
A) <i>Préparation des échantillons</i>	23
B) <i>Fonctionnement du microscope et conditions d'observation</i>	23
II.3. Microscope optique	24
<u>III. Diversité génétique des communautés bactériennes</u>	24
III.1. Préparation des échantillons	24
III.2. Extraction de l'ADN bactérien	25
A) <i>Extraction de filtres</i>	25
B) <i>Extraction de fragments de corail</i>	26
III.3. Amplification de l'ADN par PCR	27
A) <i>Principe</i>	27

B) Méthode	29
C) Programmes PCR	30
III.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	31
A) Principe	31
B) Mode opératoire	31
III.5. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	31
A) Principe	31
B) Mode opératoire	32
III.6. Séquençage et analyse des bandes DGGE	34

CHAPITRE IV : RÉSULTATS **36**

I. Observations en microscopie électronique **36**

I.1. Microscope électronique à balayage (SEM)	36
I.2. Microscope électronique à transmission (TEM)	49
I.3. Microscope optique à épifluorescence	57

II. Diversité génétique des communautés bactériennes associées

	59
II.1. Vérification des réactifs et des conditions PCR	59
II.2. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	61
II.3. Séquençage des bandes DGGE	62

CHAPITRE V : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

PRÉLIMINAIRES **64**

I. Discussion des observations morphologiques et ultrastructurales **64**

I.1. Observations au SEM	64
I.2. Observations au TEM	65
I.3. Observations en microscopie optique à épifluorescence	66
I.4. Conclusion préliminaire	67

II. Discussion de l'approche moléculaire **67**

II.1. Choix de la bibliographie et des amorces	67
II.2. Discussion des protocoles	67
II.3. Que peut-on tirer des résultats obtenus ?	68
II.4. Conseils et perspectives	68
II.5. Conclusion préliminaire	69

PARTIE 2 : Nouvelle voie d'investigation avec l'anémone de mer *Aiptasia pulchella*

CHAPITRE I : INTRODUCTION **70**

CHAPITRE II : OBJECTIFS ADDITIONNELS **72**

CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES **73**

I. Mesure de la densité en zooxanthelles **73**

II. Expérience de blanchiment artificiel **74**

<u>III. Observations en microscopie électronique à transmission (TEM)</u>	74
CHAPITRE IV : RÉSULTATS	75
<u>I. Mesure de la densité en zooxanthelles</u>	75
<u>II. Expérience de blanchiment artificiel</u>	77
<u>III. Observations en microscopie électronique à transmission (TEM)</u>	80
CHAPITRE V : DISCUSSION	82
<u>I. Discussion de la densité en zooxanthelles dans les anémones saines et blanchies</u>	82
<u>II. Discussion de l'expérience artificielle de blanchiment</u>	83
<u>III. Discussion des observations réalisées au TEM</u>	83
<u>IV. Conclusion de la partie 2</u>	84

<u>PARTIE 3 : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</u>
--

<u>I. Conclusion générale</u>	86
<u>II. Perspectives</u>	87

Références bibliographiques	88
------------------------------------	-----------

Annexes

- Annexe 1 : Produits et réactifs de biologie moléculaire
- Annexe 2 : Protocoles de biologie moléculaire
- Annexe 3 : Eléments du squelette corallien, utiles à la caractérisation systématique de la colonie
- Annexe 4 : Tableaux de calculs de densités en zooxanthelles dans l'endoderme des anémones de mer et calculs de l'expulsion des zooxanthelles lors du blanchiment artificiel

Partie I :

Implications microbiennes
du blanchiment corallien

Chapitre I :

INTRODUCTION

Depuis quelques décennies, la dégradation et la réduction, en nombre et en surface, des récifs¹ coralliens ont pu être constatées de par le monde. Le blanchiment des coraux est une des nombreuses manifestations des déséquilibres qui menacent notre planète. En effet, les écosystèmes récifaux abritent la plus grande biodiversité du monde marin et peuvent être comparés, sur terre, aux forêts tropicales humides. C'est pourquoi, l'étude et la compréhension des mécanismes de destruction de ces zones stratégiques à intérêts multiples pour l'homme font partie des principales préoccupations de ces dernières années, et doivent certainement le rester.

I. Les récifs coralliens

I. 1. Biologie et morphologie des coraux hermatypiques

Les seuls cnidaires capables d'édifier des constructions récifales sont des coraux de l'ordre des *Madreporaria* ou *Scleractinia*, de la classe des *Anthozoa*. L'ensemble des coraux durs que représentent les madrépores est caractérisé par la formation d'un exosquelette calcaire (aragonite), permise par la symbiose qu'ils établissent avec des algues symbiotiques unicellulaires appelées zooxanthelles. Les coraux impliqués dans ce type de symbiose sont appelés coraux hermatypiques et sont, pour la plupart, coloniaux.

Les polypes de madrépores sont, comme chez les autres cnidaires, à symétrie radiaire et diblastiques². Le tissu le plus externe, appelé ectoderme, est séparé du tissu plus interne, l'endoderme (ou gastroderme), par une substance gélatineuse quasiment anhyste³, appelée mésoglée (Fig.1). L'ectoderme possède les différents types de cellules suivants : cnidocytes, cellules piliers, cellules de remplacement, cellules de recouvrement et cellules nerveuses. L'endoderme est constitué de cellules glandulaires, de cellules ciliées et de cellules musculaires (Poulicek, 2006) (Fig.2).

Les coraux récifaux sont carnivores. Cependant, comme ils se trouvent dans des zones tropicales pauvres en substances nutritives, ils nécessitent des ressources alimentaires supplémentaires. L'alimentation et donc la survie des madréporaires reposent dès lors sur trois bases indépendantes : le plancton animal, les substances

¹ Un récif, au sens biologique du terme, est une construction édifée essentiellement par des êtres vivants, s'élevant du fond de la mer vers la surface, dont la structure est généralement en forme de banc, et suffisamment grande pour exercer une influence déterminante sur les conditions physiques et, de ce fait, écologiques du milieu ambiant. Sa consistance est assez ferme pour résister au ressac et permettre ainsi l'existence d'un édifice durable tout à fait caractéristique, habité par des organismes spécifiquement adaptés (Poulicek, 2006).

² 2 tissus différenciés (en 2 couches).

³ Anhyste : synonyme d'acellulaire.

dissoutes dans l'eau ou régénérées par les bactéries symbiontes du mucus (section I.3., p.5) et les produits du métabolisme des zooxanthelles (section I.2., p.3).

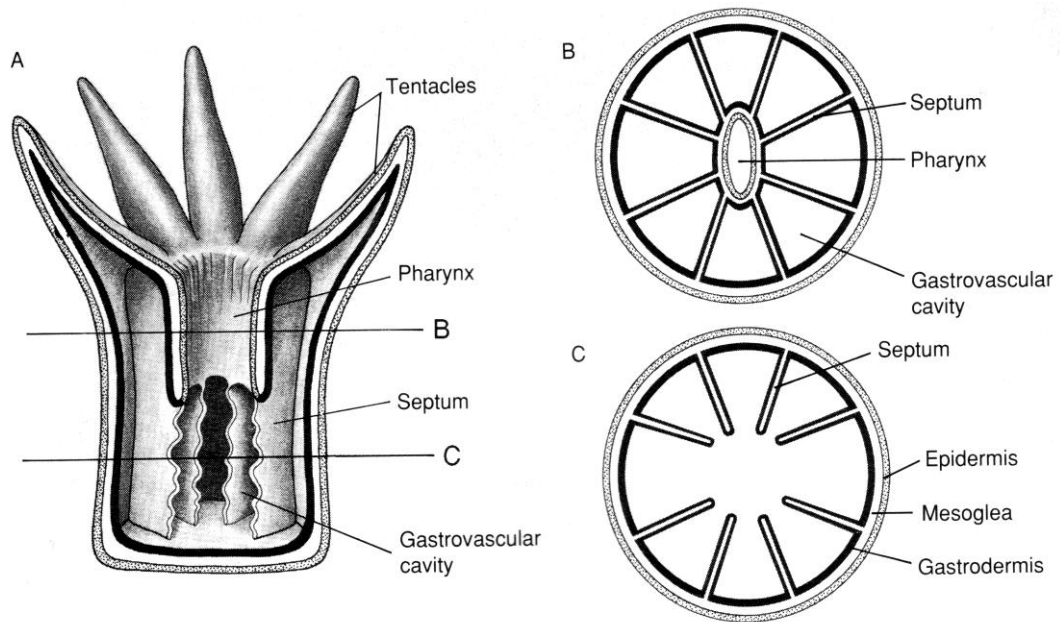


Figure 1 : Structure d'un polype d'Anthozoaire. A, Coupe longitudinale. B, coupe transversale au niveau du pharynx. C, coupe transversale sous le pharynx. (Ruppert & Barnes, 1996).

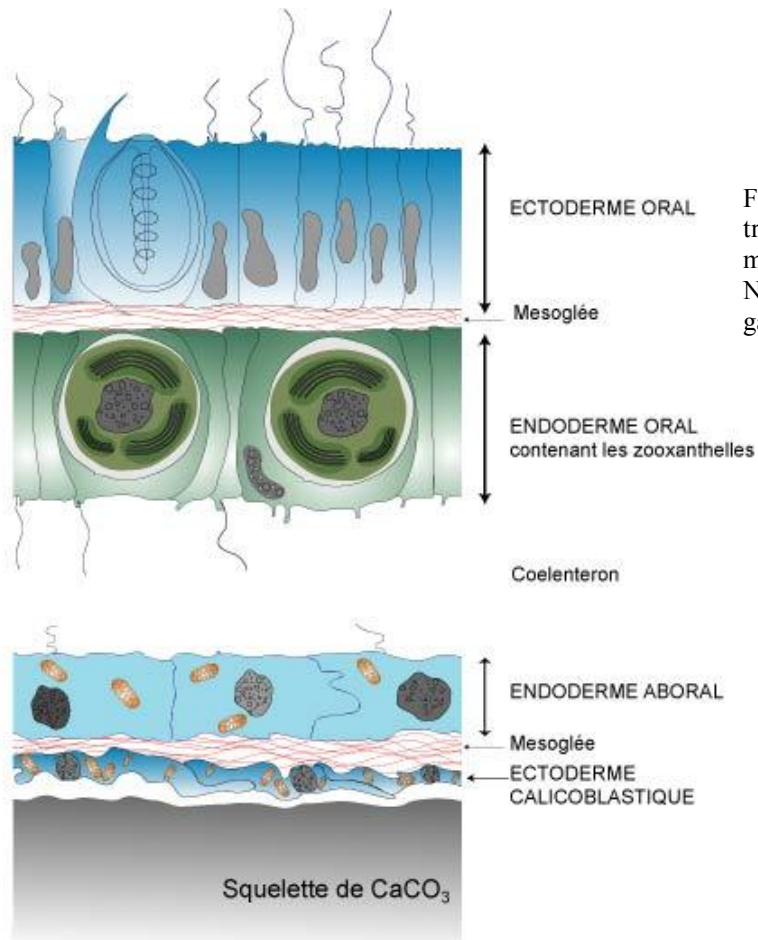


Figure 2 : Coupe schématique à travers les tissus d'un madreporite ()
N.B. : Coelenteron = cavité gastrique.

I. 2. Association coraux-zooxanthelles

Les madréporaires, ou scléractiniaires, ne sont pas les seuls organismes marins à héberger des algues symbiotiques dans leurs tissus. D'autres animaux, tels que les mollusques bécariens, certaines anémones de mer, des éponges et coraux mous, possèdent également des zooxanthelles. Ces dinoflagellés endosymbiontes, qui appartiennent principalement au genre *Symbiodinium*, semblent jouer le rôle principal dans le métabolisme alimentaire des coraux. En effet, leurs zones de répartition sont pauvres en nutriments et donc également pauvres en plancton.

Les zooxanthelles se trouvent dans les vacuoles des cellules de l'endoderme du corail et ne sont jamais digérées par les polypes. Le polype recueille certaines substances produites par l'activité métabolique des zooxanthelles telles que les sucres et les acides aminés tandis que les algues vivent dans une « serre » saturée en acide carbonique et profitent des produits du métabolisme de la cellule corallienne hôte tels que les phosphates et les substances azotées. L'absorption constante de CO_2 , nécessaire à la photosynthèse et provenant de l'organisme animal, par les algues symbiotiques, facilite considérablement la précipitation de calcaire cristallisé (Fig. 3). Celle-ci permet au récif de contrebalancer ou de dépasser les processus de dégradation qui l'affectent (ressac, prédateurs, ...).

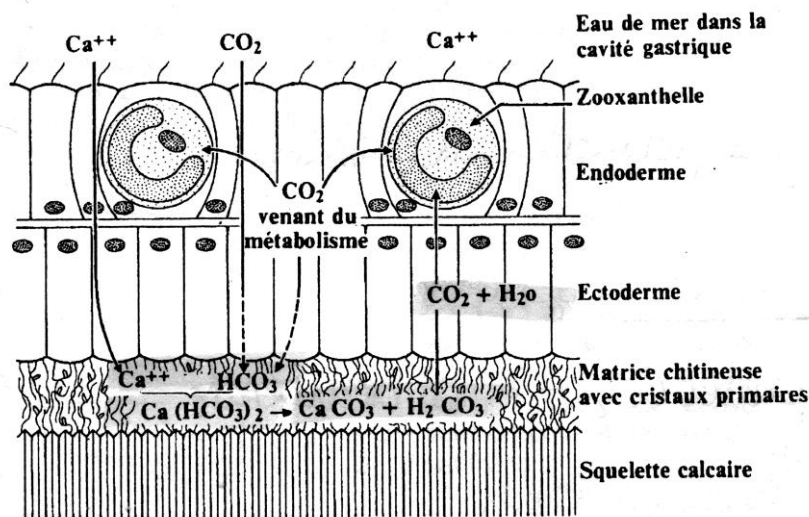


Figure 3 : Interactions entre les zooxanthelles et les tissus coralliens pour la synthèse du squelette (Poulicek, 2006).

Cette association semble très étroite. En effet, les pertes sont faibles voire nulles au niveau des échanges entre le végétal et l'animal. Cependant, des changements néfastes des paramètres environnementaux conduisent à la dégradation de la symbiose : les zooxanthelles affectées ne se trouvent alors plus dans des conditions de vie optimales. Ceci occasionne, par conséquent, un « mal-être » du corail puisque celui-ci ne dispose plus de son partenaire essentiel.

La mise en évidence des zooxanthelles fut réalisée par Brandt en 1883 mais ces algues ne furent mises en culture et décrites qu'à partir des années cinquante. À cette

époque, il était admis que tous les dinoflagellés symbiotiques appartenaient à une seule espèce pandémique⁴ *Symbiodinium microadriaticum* (Fig. 4).

Nous savons actuellement que le genre *Symbiodinium* est très diversifié. Des recherches menées durant les trois dernières décennies démontrent que différents symbiontes présentent des variations comportementales, morphologiques, biochimiques, physiologiques et génétiques considérables (Trench, 1992). Il existe cependant peu d'études effectuées sur la manière dont la diversité des symbiontes affecte la biologie de leurs hôtes. Encore récemment, les distributions de symbiontes étaient considérées comme hautement hôte-spécifiques, avec des espèces individuelles d'hôtes contenant un seul type d'algue.

Le genre *Symbiodinium* contient, par mise en évidence moléculaire, sept clades principaux (A-G), dont chacun contient de multiples « taxa » (Pawlowski *et al.*, 2001 ; Pochon *et al.*, 2001 ; Baker, 2003 ; LaJeunesse *et al.*, 2003). De plus, le genre est très clairement diversifié. En effet, il contient de nombreux membres qui sont indubitablement différents les uns des autres. Ceci est important pour notre compréhension des symbioses que ces algues forment avec des hôtes protistes et invertébrés (Rowan, 1998).

Les symbioses impliquant *Symbiodinium* montrent que, d'une part, certaines espèces hôtes sont hautement spécifiques et contiennent exclusivement un seul taxon symbionte (spécificité stricte) et que, d'autre part, d'autres espèces hôtes sont moins spécifiques et contiennent de multiples types de symbiontes. Les symbiontes présentent, par ailleurs, une gamme de spécificités plus restreinte que celle de leurs hôtes (Baker, 2003 ; LaJeunesse *et al.*, 2003).

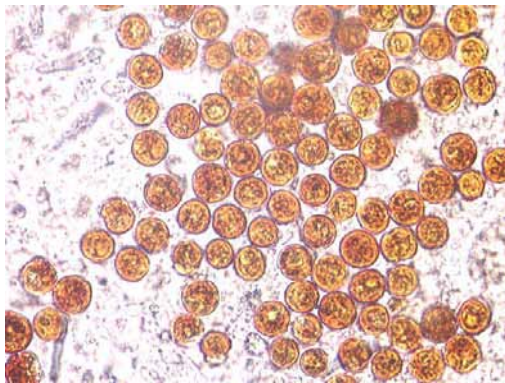


Figure 4 : Photo de zooxanthelles dans de l'endoderme d'anémone de mer *Aiptasia pulchella* prise au microscope optique (M. Poulicek).

Dans les coraux scléractiniens, de nombreux cas de diversité intraspécifique du symbionte montrent également des patrons de zonations photiques. Ces distributions suggèrent que les symbiontes varient dans leurs optima photiques. En effet, des habitats se partitionnent et se répartissent entre les différents symbiontes, en fonction de la luminosité. Des études expérimentales soutiennent cette interprétation et démontrent également que les coraux récifaux peuvent héberger des communautés dynamiques de symbiontes de plusieurs espèces, et que (dans certains cas) la colonie représente un

⁴ Répartie sur une zone géographique très étendue.

paysage sur lequel les symbiontes sont en compétition pour l'espace (Rowan *et al.*, 1997). Cependant, on connaît très mal l'impact d'autres gradients environnementaux (tels que la température) sur la distribution des algues symbiotiques.

Grâce à la grande diversité des symbiontes algaux des récifs coralliens et grâce à la relative flexibilité de cette association corail-algue, il est émis l'hypothèse que les effets causés par l'augmentation des températures de surface soient atténués par : (1) la persistance et la propagation d'hôtes coralliens contenant des symbiontes résistants au blanchiment ; et/ou (2) la possibilité que les coraux puissent changer leurs symbiontes en réponse à l'augmentation des températures et/ou à un blanchiment récurrent (Cfr. Hypothèse adaptative du blanchiment, section II.3. B, p.10).

I. 3. Rôle des bactéries

À la surface des polypes se trouve un film muqueux (couche de mucopolysaccharides) qui est sécrété par l'animal et représente une énorme dépense énergétique : jusqu'à 40% du poids frais du polype par jour. Ce mucus s'évacue régulièrement sous forme de flocs mais il n'est pas totalement perdu car la riche population de bactéries hétérotrophes qui vit en son sein est capable d'hydrolyser les composés polymériques en composés plus simples (acides gras, acides aminés, ...) (Fig. 5). Ces monomères sont en partie récupérés par les cellules sous-jacentes au mucus en décomposition ou biodégradés par la microflore bactérienne une fois le flocc émis en eau libre. Ce mécanisme est assimilé à une production paraprimaire du fait que ce symbiocosme court-circuite la chaîne des décomposeurs (Poulicek, 2006).

Au sein des communautés bactériennes associées aux coraux, peuvent se retrouver des bactéries de pathogénicités variables en fonction des conditions environnementales (cfr. Section II.3 C, p.11). En effet, durant les vingt dernières années, la plupart des recherches en microbiologie des coraux se sont limitées à l'étude des bactéries associées aux pathogénèses coralliennes (e.a. Mitchell & Chet, 1975 ; Edmunds, 1991 ; Ritchie *et al.*, 1994 ; Ritchie & Smith, 1995 ; Kushmaro *et al.*, 1996, 1997, 2001 ; Santavy & Peters, 1997 ; Patterson *et al.*, 2002 ; Frias-Lopez *et al.*, 2002 ; Ben-Haim & Rosenberg, 2002). Par ailleurs, la contribution générale des bactéries à la biomasse et au bilan énergétique du récif corallien a fait l'objet de quelques études (Ritchie & Smith, 1997 ; Kushmaro *et al.*, 1999 ; Rohwer *et al.*, 2001). Ces études ont montré une biocénose microbienne dynamique vivant à la surface et dans le tissu de beaucoup d'espèces de corail dont le rôle, au sein de l'écosystème récifal, reste en grande partie un mystère. D'autre part, environ 1 % seulement des bactéries trouvées dans l'environnement marin sont cultivables sur milieu agar standard. Des recherches récentes utilisant des outils moléculaires, e.a. PCR (Polymerase Chain Reaction) et DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), ont étudié des bactéries non cultivables (Rohwer *et al.*, 2001, 2002), mais les fonctions et associations de ces bactéries sont encore mal comprises.

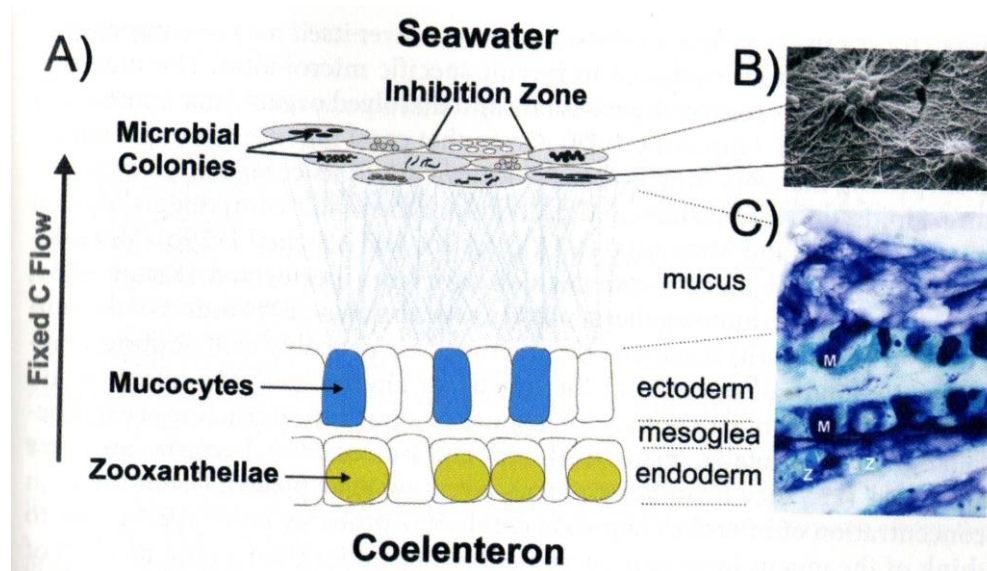


Figure 5 : A) Microbes associés aux coraux, comme inhibiteurs de colonisation par d'autres organismes. Dans ce modèle, les coraux encouragent la croissance d'une microbiocénose spécifique par la sécrétion de mucus. B) Photo au microscope électronique à balayage de colonies microbiennes à la surface de *Diploria strigosa*. Les colonies produisent les réseaux du mucus. C) Coupe d'un corail fixé et encaissé, coloré au Bleu Trypan. Les microbes sont rarement observés sous la couche de mucus (Bythell *et al.*, 2002 dans Rosenberg & Loya, 2004). M Mucocytes, Z zooxanthelles.

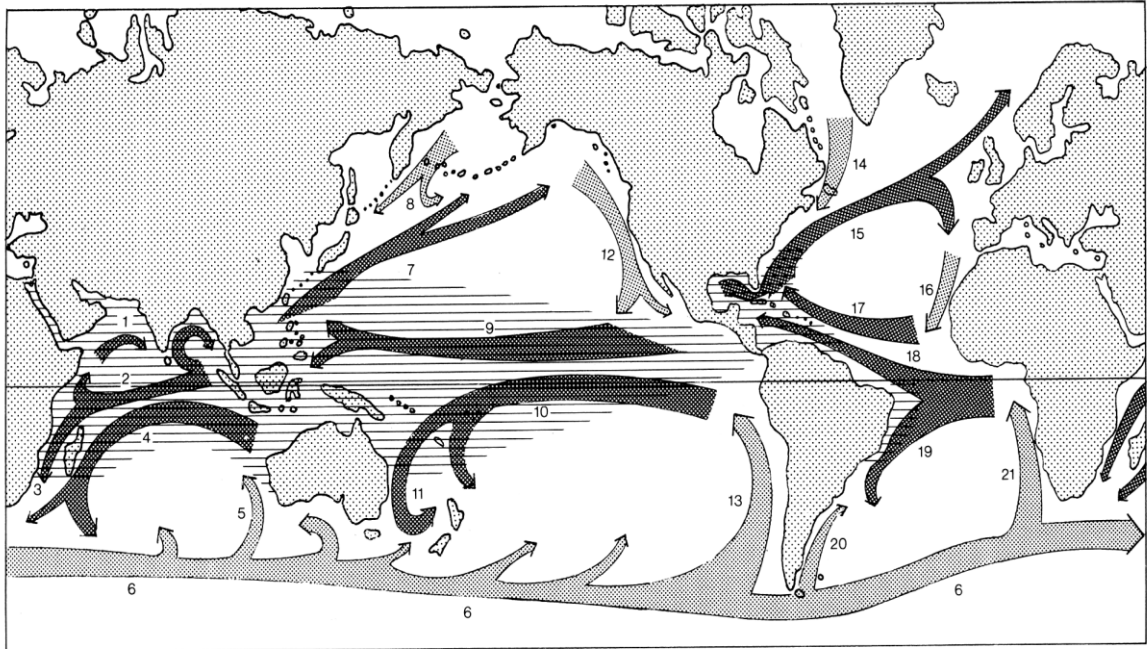
I. 4. Répartition et intérêt des récifs

Au sein de la symbiose, c'est le partenaire végétal qui va dicter les conditions de vie et, de ce fait, limiter la répartition géographique des récifs coralliens. L'hermatypisme des coraux récifaux s'établit dans des zones chaudes (20-31°C, optimum 25-29°C), pauvres en nutriments, peu profondes, où la luminosité est suffisamment importante et où les apports détritiques sont limités. La salinité doit se situer entre 32 et 42 ‰.

D'ailleurs, l'isochryme⁵ de 20°C (dans l'Hémisphère Nord et dans l'Hémisphère Sud) délimite presque parfaitement la présence des récifs coralliens sur le globe terrestre, désignant ainsi la température de l'eau comme facteur décisif de leur distribution générale (Fig. 6). Le besoin de lumière des coraux s'explique par l'activité photosynthétique des zooxanthelles, activité indispensable qui permet au corail d'avoir une croissance suffisamment rapide pour contrer les effets destructeurs du ressac et pour édifier d'imposantes structures sur, parfois, d'importantes étendues. Enfin, la sédimentation constitue le troisième facteur primordial dans la distribution régionale des coraux. Cette sédimentation doit être relativement faible. En effet, ces animaux sont sessiles ; ils ne peuvent donc pas bouger lorsqu'ils sont ensablés. Ainsi, la température de l'eau et la sédimentation sont les principaux facteurs de distribution horizontale des récifs coralliens, alors que la lumière détermine essentiellement leur distribution verticale (Poulicek, 2006).

⁵ Les isochrymes sont des lignes reliant les températures moyennes hivernales identiques (Poulicek, 2006).

Deux régions récifales principales sont à distinguer : la région indopacifique et la région atlantique. La région indopacifique contient toutefois une province récifale autonome : la Mer Rouge, qui accueille les récifs les plus proches de l'Europe et abrite de nombreuses espèces endémiques au niveau des faunes associées. La région indopacifique est la plus grande et la plus diversifiée des deux ; elle retiendra donc principalement notre attention.



3. Trajet des courants marins froids (clairs) et des courants marins chauds (sombres) pendant l'été septentrional et ceinture récifale qui dépend de ces courants (hachurés). Les différents courants sont : 1) mousson du sud-ouest ; 2) courant indien nord-équatorial ; 3) courant du Mozambique et courant des Aiguilles ; 4) courant indien sud-équatorial ; 5) courant ouest-australien ; 6) circulation globale par dérive de vents d'ouest ; 7) Kuroshio ; 8) Oya-shio ; 9) courant pacifique nord-équatorial (dérive de mousson) ; 10) courant pacifique sud-équatorial ; 11) courant est-australien ; 12) courant californien ; 13) courant de Humboldt ; 14) courant du Labrador ; 15) Gulf Stream ; 16) courant des Canaries ; 17) courant atlantique nord-équatorial ; 18) courant atlantique sud-équatorial ; 19) courant du Brésil ; 20) courant des Falklands ; 21) courant de Benguela.

Figure 6 : Trajet des courants marins chauds (ombrage sombre) et froids (ombrage clair) et délimitation des zones à récifs de madrépores (hachures horizontales) (Poulicek, 2006 ; chap.3).

Les récifs coralliens comptent parmi les écosystèmes les plus anciens de la Terre ; ils sont apparus il y a plus de 200 millions d'années et se sont développés sous leur forme actuelle dès le Tertiaire. Ils font également partie des écosystèmes les plus riches avec un nombre total d'espèces supposé entre 500 000 et 2 000 000 dont à peine 20% auraient été répertoriés.

Outre le fait que ces récifs constituent des habitats essentiels pour bon nombre d'espèces animales, ils sont une source importante de nourriture, de revenus et d'emplois pour de nombreux pays, pour la plupart, du Tiers Monde. En effet, les récifs remplissent des intérêts divers. Le premier intérêt, pour les populations et les pays concernés, est la pêche et l'exploitation des diverses ressources vivantes. En effet, il faut savoir qu'un Km² de récif corallien produit, chaque année, environ 15 tonnes de poissons et autres organismes comestibles. D'autres industries, telles que l'industrie perlière en Polynésie française, sont également dépendantes de cet écosystème.

Par ailleurs, un des intérêts économiques principaux est constitué par le tourisme. Celui-ci constitue dans certains cas la seule source de revenu et d'économie locale. Le tourisme comprend bien entendu la plongée sous-marine, principale activité touristique de ces régions, de par la beauté des fonds marins, mais également toutes les autres pratiques nautiques (jet-ski, bateaux, chasse sous-marine, ...).

Les intérêts ne sont évidemment pas qu'économiques. Les récifs protègent les littoraux vulnérables de l'action des vagues et des tempêtes en diminuant la force de la houle (le tsunami de décembre 2004 l'a clairement démontré), et la lagune se situant entre le récif et le littoral permet la navigation et diverses activités humaines.

Par ailleurs, les récifs coralliens fournissent également des composés utilisés dans la fabrication de produits cosmétiques et de produits pharmaceutiques tels que des anticancéreux, antimigraineux et régulateurs de tension artérielle. Les avancées potentielles dans la recherche pharmaceutique, ou médicale en général, permises par ces sources de molécules diverses, encore inconnues à ce jour, risquent d'être compromises par l'appauvrissement voire la disparition de ces écosystèmes.

Il faut également noter que les récifs coralliens sont à l'origine de la genèse des atolls. De nombreuses îles de l'Indopacifique sont constituées d'atolls ; en Polynésie française, 84 atolls sont recensés parmi les 118 îles.

II. Le blanchiment⁶ des coraux

II. 1. Le phénomène de blanchiment

Durant ces vingt dernières années, un nombre croissant de maladies de coraux, décrites comme « blanchiment corallien », ont été rapportées (Brown, 1997 ; Glynn, 1991 ; Hoegh-Guldberg & Salvant, 1995). Le blanchiment des coraux est la rupture de l'association symbiotique entre les hôtes coralliens et leurs endosymbiontes microalgues photosynthétiques (zooxanthelles) (Banin *et al.*, 2000). Le blanchiment, ou la perte de coloration, résulte de la réduction de densité des zooxanthelles dans le tissu gastrodermique du corail et/ou de concentrations décroissantes en pigments photosynthétiques dans les cellules algales (Gates *et al.*, 1991).

Le blanchiment corallien apparaît lorsque les conditions environnementales occasionnent un stress et rompent la symbiose, ce qui conduit à la dégénérescence et/ou l'expulsion des zooxanthelles du corail hôte. La perte des pigments photosynthétiques rend le squelette blanc, visible à travers le tissu corallien transparent, et donne à l'organisme une apparence « blanchie » (Fig. 7). Le blanchiment est fatal pour le corail si la relation symbiotique n'est pas rapidement rétablie (Jokiel, dans Rosenberg & Loya, 2004, chap.23).



Figure 7 : Photo d'une colonie corallienne de *Oculina patagonica* présentant des tissus sains et blanchis (www.calacademy.org ou Rosenberg & Loya, 2004, p.447).

Le facteur de stress le plus fréquemment rapporté est l'augmentation de la température de l'eau (Brown, 1997 ; D'Elia *et al.*, 1991 ; Glynn, 1991 ; Jokiel & Coles, 1990 ; Kushmaro *et al.*, 1998).

II. 2. Historique

Depuis les années quatre-vingts, de spectaculaires phénomènes régionaux de blanchiment sont apparus au niveau des zones de récifs coralliens, dans le monde entier, avec une fréquence et une étendue géographique croissantes. Ces événements massifs de blanchiment sont corrélés à des températures de surface élevées (SST, Sea Surface

⁶ Le terme de blanchiment a été choisi préférentiellement à celui de blanchissement. En effet, selon le dictionnaire, ils font tous deux référence au fait de devenir blanc. Cependant, le premier terme fait aisément ressortir l'aspect malsain du phénomène.

Temperature). Actuellement, la communauté scientifique pense que le phénomène de blanchiment massif est associé au réchauffement global dû à l'émission anthropique de dioxyde de carbone et autres gaz (Jokiel dans Rosenberg & Loya, 2004 ; chap.23).

C'est au niveau de l'Océan Indien que le blanchiment corallien et la mortalité des coraux à large échelle ont été le plus rapportés. Depuis les premiers rapports de blanchiment, il a été reconnu que la plupart des épisodes de blanchiment à grande échelle ont suivi les ENSO (El Niño Southern Oscillation). L'observation de blanchiment corallien a accompagné les phases chaudes, notamment au cours des années 1987/1988, 1990/1992, 1994/1995, 2002/2003 et le plus grand événement en 1997/1998 (Huppert & Stone, 1998). Selon certaines estimations, environ un sixième des récifs coralliens du monde a été détruit sur une seule période de 9 mois durant le phénomène de blanchiment de 1997/1998 (Wilkinson, 2000). Cependant, différentes zones de corail vivant se sont maintenues et la capacité de guérison fut plus importante que prévue à certains endroits. On peut dès lors s'interroger sur la résistance des récifs à ce genre d'évènement et sur la manière dont peut changer cette résistance ou récupération au cours du temps en réponse à des températures croissantes et des épisodes récurrents de blanchiment (Baker, chap.8 de Rosenberg & Loya, 2004).

II. 3. Hypothèses à la base du blanchiment

A) Facteurs environnementaux

Une réduction de la densité ou du contenu pigmentaire des algues symbiotiques peut être attribuée à une variété de facteurs environnementaux incluant une faible (Goreau, 1964) ou une forte (Nakano *et al.*, 1997) salinité, des niveaux d'éclairement bas et élevé dont spécialement la radiation d'ultraviolets (Banaszak & Trench, 1995 ; Lesser & Shick, 1989), les maladies (Kushmaro *et al.*, 1996 ; Rosenberg & Loya, 1999), et les hautes (Iglesias-Prieto *et al.*, 1992 ; Warner *et al.*, 1996) et basses (Steen & Muscatine, 1987 ; Kobluk & Lysenko, 1994) températures, tout autant que des combinaisons de ces facteurs. Le blanchiment de grande étendue a généralement été lié à des températures élevées de l'eau sur de larges échelles géographiques, surtout celles associées aux phénomènes El Niño (Glynn, 1984, 1991 ; Coffroth *et al.*, 1988).

À la suite de tels événements, la perte des zooxanthelles peut être partielle ou complète. Dans ce dernier cas, la guérison ne se produit généralement pas, et la mort subséquente d'un grand nombre d'invertébrés symbiotiques récifaux peut drastiquement altérer la composition de la communauté récifale (Goreau, 1992).

B) Hypothèse adaptative (ABH, *Adaptative Bleaching Hypothesis*)

La persistance des récifs au cours des temps géologiques (Kinzie & Buddemeier, 1996 ; Buddemeier *et al.*, 1997) et l'aspect multifacette de la relation symbiotique qui semble apparaître dans certains hôtes (Rowan & Powers, 1991a ; Baker & Rowan, 1997 ; Rowan, 1998) ont donné le jour à « l'hypothèse adaptative du blanchiment » (ABH) (Buddemeier & Fautin, 1993). Cette hypothèse suggère que différents partenaires algaux, à l'intérieur de leurs hôtes, se déplacent dans l'espace et dans le temps, donnant lieu à un complexe symbiotique aux nombreuses combinaisons

possibles, certaines étant plus fonctionnelles que d'autres sous certaines conditions environnementales (Kinzie *et al.*, 2001).

L'hypothèse adaptative du blanchiment (ABH) peut être brièvement définie comme suit : la perte de photosymbiontes permettrait à certains représentants de l'espèce hôte de rétablir une symbiose avec une algue dominante différente, résultant en un nouvel holobionte⁷ qui est mieux adapté aux conditions environnementales altérées (Buddemeier & Fautin, 1993 ; Ware *et al.*, 1996). Le mécanisme à la base de l'hypothèse ABH repose sur cinq principes fondamentaux : (1) de multiples types de zooxanthelles et d'espèces hôtes coexistent habituellement ; (2) une diversité de photosymbiontes peut vivre avec beaucoup d'hôtes (mais pas nécessairement tous), et *vice versa* ; (3) des combinaisons hôte-symbionte peuvent différer physiologiquement pour des aspects (particulièrement au niveau des réponses au stress) qui affectent la survie de l'holobionte, de l'hôte et peut-être du symbionte ; (4) le blanchiment donne une opportunité de repeuplement d'un hôte avec différents photosymbiontes dominants (allochtones ou autochtones) ; et (5) les holobiontes sensibles au stress ont des avantages compétitifs en l'absence de stress, ce qui implique un retour à des combinaisons de sujets sensibles au stress sous des conditions non stressantes (Buddemeier & Fautin, 1993 ; Ware *et al.*, 1996). En accord avec LaJeunesse *et al.* (2003), l'ABH suppose que les associations symbiotiques sont très flexibles et s'adaptent rapidement à un changement environnemental.

Par ailleurs, les coraux blanchiraient suite à une diminution de la diversité génétique des zooxanthelles hébergées. Le phénomène de « capture post-blanchiment » aurait comme résultat de restaurer un niveau élevé de diversité (et donc contribuerait à expliquer pourquoi les coraux ayant déjà blanchi ont moins de « risques » de blanchir à nouveau lors d'un épisode ultérieur) dans un délai relativement court (Glynn, communication personnelle à Poulicek, 2003).

C) Hypothèse bactérienne

Le blanchiment des coraux correspond bien à la définition de « maladie » dans le sens où l'on se trouve dans des conditions qui vont à l'encontre de la santé des organismes touchés. Le blanchiment corallien présente des symptômes et signes caractéristiques : en plus d'un taux de croissance réduit, le blanchiment occasionne une réduction de la reproduction sexuée (Szmant & Gassman, 1990 ; Fine *et al.*, 2001) et une augmentation de la mortalité des coraux (Brown & Suharsono, 1990 ; Glynn, 1990).

Comme beaucoup de maladies, le blanchiment peut avoir plus d'une cause. Cela a déjà été souligné plus haut ; des résultats démontrent que le blanchiment des coraux peut être induit par divers facteurs dont, dans le cas de la présente hypothèse, la combinaison d'une température élevée et d'une infection bactérienne (Kushmaro *et al.*, 1998). En effet, l'action seule de l'élévation de température ne semble pas conduire au blanchiment. Il s'agirait, selon Kushmaro *et al.* (1998) et Ben-Haim & Rosenberg (2002), d'une action simultanée de la température et d'un agent pathogène. Ce dernier deviendrait virulent en fonction de l'augmentation de la température.

⁷ Un holobionte est une écoespèce, c'est-à-dire une association hôte-symbionte(s).

Les déclencheurs environnementaux du blanchiment corallien ont été décrits comme étant des stress (Brown, 1997). L'infection bactérienne peut être considérée comme un stress biologique. Cependant, du point de vue d'un microbiologiste, un agent infectieux n'est pas un facteur de stress, mais un organisme vivant avec un répertoire complet de gènes codant pour des facteurs de virulence. Les facteurs de stress environnementaux, tels qu'une température croissante, peuvent rendre l'hôte corallien plus sensible à l'infection ou peuvent permettre à l'agent infectieux de devenir plus virulent. L'intérêt de distinguer un stress d'un agent infectieux n'a plus de raison d'être à partir du moment où l'on considère le mécanisme d'une maladie et les technologies potentielles pour prévenir ou soigner cette maladie (Rosenberg, chap.25 de Rosenberg & Loya, 2004).

Pour démontrer qu'un microorganisme particulier est l'agent causatif (responsable) d'une maladie, les postulats de Koch doivent être satisfaits : (1) l'organisme est régulièrement trouvé dans les lésions de la maladie, (2) il peut être isolé en culture pure sur milieu artificiel, (3) l'inoculation de cette culture pure dans des animaux sains produit une maladie similaire et (4) l'organisme peut être récupéré des lésions de ces animaux. En utilisant ces critères, il a été démontré que *Vibrio shiloi* (Fig. 8) est l'agent causatif du blanchiment d'*Oculina patagonica* (Fig.7, p.9) en Mer Méditerranée (Kushmaro *et al.*, 1996, 1997). Il a ensuite été démontré sur le terrain et en laboratoire qu'une haute température de l'eau était nécessaire pour que l'infection conduise à une maladie de blanchiment corallien (Kushmaro *et al.*, 1998).

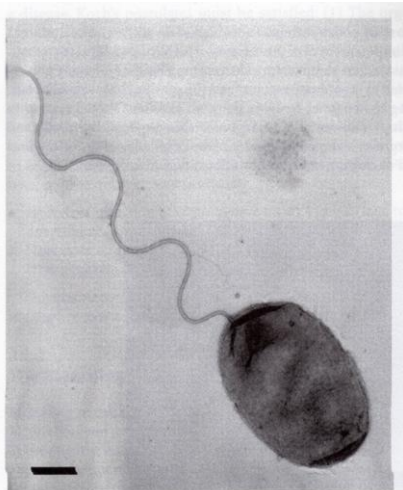


Figure 8 : Photo au microscope électronique à transmission de *Vibrio shiloi*, pendant une croissance exponentielle en culture pure. barre : 0,2 μm (Rosenberg & Loya, 2004).

Selon Kushmaro *et al.* (2001), l'agent causatif, référencé comme *Vibrio sp.* AK1 (*Vibrio shiloi*), était présent dans tous les coraux *O. patagonica* blanchis et absent des coraux sains (non blanchis) examinés. Des cultures pures de *V. shiloi* provoquaient le blanchiment lorsqu'elles étaient inoculées dans des coraux non blanchis lors d'expériences en aquarium contrôlé. La première étape du processus d'infection est l'adhésion de AK1 aux cellules du corail via un récepteur β -galactopyranoside (Toren *et al.*, 1998). De manière intéressante, la liaison se produit uniquement lorsque les bactéries sont cultivées à des températures élevées de l'eau de mer, ce qui expliquerait la manière dont des températures croissantes causent le blanchiment des coraux (Kushmaro *et al.*, 1998). Après l'adhésion, AK1 pénètre à l'intérieur du tissu corallien,

se multiplie intracellulairement (Banin *et al.*, 2000) et produit des toxines qui inhibent la photosynthèse et lysent les zooxanthelles intracellulaires (Ben-Haim *et al.*, 1999).

Même si les membres du genre *Vibrio* sont des pathogènes communs de l'environnement marin, *Vibrio shiloi* est le premier vibriion qui attaque les zooxanthelles et dont il a été prouvé qu'il est responsable de la maladie de blanchiment corallien.

En phase de croissance exponentielle, *Vibrio shiloi* AK1 est une bactérie Gram-négative, mobile, en forme de bâtonnet (2,4x1,6 µm), possédant un flagelle polaire gainé unique (Fig. 8). Cependant, lorsqu'elle se multiplie intracellulairement dans le tissu corallien, elle perd son flagelle et est plus petite (2,0x1,0 µm ; Fig. 9) (Kushmaro *et al.*, 2001). À ce stade, la bactérie est viable mais non cultivable (Israely *et al.*, 2001).

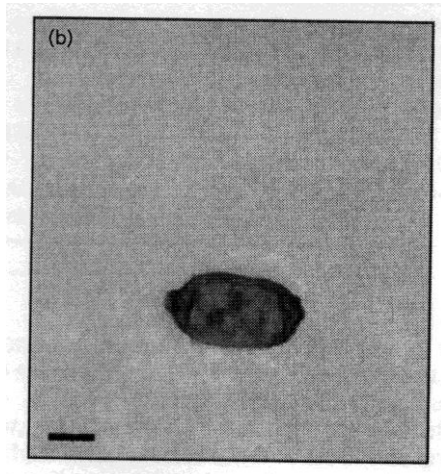


Figure 9 : *Vibrio shiloi* AK1 au microscope électronique à transmission, lors de sa croissance intracellulaire dans les tissus coralliens. Barre : 0,5 µm. (Kushmaro *et al.*, 2001).

La propriété qui conduit à l'isolation de *V. shiloi* AK1 est sa capacité à infecter et à blanchir son hôte corallien. Cette propriété de virulence n'est pas seulement d'une importance écologique considérable ; elle mène également à un style de vie unique. *V. shiloi* AK1 adhère de façon spécifique à son hôte corallien, pénètre dans le tissu du corail, se multiplie par voie intracellulaire et ensuite tue les zooxanthelles coralliennes, ce qui mène au blanchiment du corail (Banin *et al.*, 2000 ; Ben-Haim *et al.*, 1999). *Vibrio mediterranei*, souche à laquelle était associé AK1 au départ, n'est pas un pathogène du corail et n'a jamais été retrouvée en multiplication intracellulaire (Kushmaro *et al.*, 2001).

La température de croissance bactérienne est critique pour l'adhésion de *V. shiloi* à son hôte corallien *O. patagonica*. Lorsque la bactérie est cultivée à basse température (16-20°C), il n'y a pas d'adhésion au corail, et ce quelle que soit la température à laquelle le corail a été maintenu. En outre, des bactéries cultivées à hautes températures (25-30°C) adhèrent avidement aussi bien aux coraux maintenus à basse température qu'à ceux maintenus à haute température. L'importante ramification de ces découvertes est qu'une condition de stress écologique (haute température) est nécessaire au pathogène de blanchiment corallien pour initier l'infection et devenir virulent (Rosenberg, dans Rosenberg & Loya, 2004).

La présence de *Vibrio shiloi* au sein des tissus de *Oculina patagonica* a été révélée par microscopie en épifluorescence à plusieurs reprises (e.a. Kushmaro *et al.*, 2001 ;

Israely et al., 2001 ; Banin et al., 2000). En effet, le corail a d'abord été mis en présence d'anticorps anti-*V. shiloi* marqués. Les bactéries d'intérêt associées aux anticorps peuvent ensuite être visualisées en fluorescence.

Un second agent pathogène de corail permet d'appuyer cette hypothèse bactérienne du blanchiment corallien. Cet agent pathogène, la bactérie *Vibrio coralliilyticus* (Fig. 10), est le responsable du blanchiment de *Pocillopora damicornis*. Comme pour *V. shiloi*, le paramètre environnemental critique qui détermine la réussite de l'infection est la température de l'eau de mer (Ben-Haim et al., 2003).

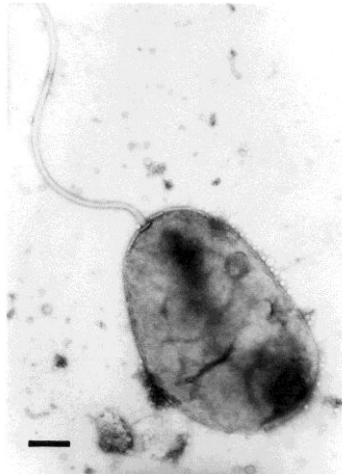


Figure 10 : Photo en microscopie électronique à transmission de *Vibrio coralliilyticus* YB1. Barre = 0,2 μm . (Ben-Haim et al., 2003)

La première souche de *V. coralliilyticus*, isolée de *P. damicornis* blanchis sur le récif de Mawi Island près de Zanzibar dans l'Océan Indien, a été présentée comme une nouvelle espèce du genre *Vibrio*, en se basant sur sa morphologie, ses caractéristiques biochimiques et sa séquence d'ADN ribosomal 16S (Ben-Haim & Rosenberg, 2002). *V. coralliilyticus* YB1 est une bactérie Gram-négative, mobile, en forme de bâtonnet, de 1,3 sur 0,9 μm , avec un flagelle polaire gainé unique (Fig. 10).

Durant l'été 2001, la température de l'eau autour du récif de Eilat (Mer Rouge) a atteint 26-27°C, ce qui est plus élevé que les températures maximales habituelles. Pendant cette période, un blanchiment et une lyse partielle des tissus de *P. damicornis* ont été observés. Afin de déterminer si ces effets sont associés à la présence d'une bactérie spécifique, des fragments de coraux ont été prélevés, rincés à l'eau de mer et écrasés, et une série de dilutions a été étalée sur agar TCBS (thiosulfate-citrate-bile-sucrose). *V. coralliilyticus* était présente dans les différents coraux blanchis et les coraux partiellement lysés mais était absente des coraux sains examinés (Ben-Haim et al., 2003).

L'inoculation de coraux à des températures oscillant entre 24,5 et 29,0°C avec *V. coralliilyticus* a causé le blanchiment ou la lyse du tissu corallien. La figure 11 montre des fragments de *P. damicornis* sain, blanchi par les bactéries et lysé par les bactéries. À 24,5 et 25°C, les coraux sont demeurés sains durant 10 jours. Le blanchiment a commencé 12 jours après l'inoculation et après 20 jours, la plupart des coraux avaient blanchi. Deux semaines plus tard, les coraux étaient toujours blancs et ne montraient aucun signe de lyse. Par contre, les coraux exposés à des températures de 27-29°C ont présenté des symptômes différents des coraux infectés à plus basse température. Après

10 jours, la plupart des coraux étaient lysés et après 15-20 jours, les coraux étaient lysés et mourraient. Il n'y avait pas de signe de blanchiment à ces températures. Les coraux infectés à 20 et 22°C ne montrent ni blanchiment ni lyse et ce durant 6 semaines.



Figure 11 : *Pocillopora damicornis* (a) sain, (b) blanchi par des bactéries, (c) lysé par des bactéries (Ben-Haim *et al.*, 2003).

La figure 12 présente une photo de microscopie électronique à transmission d'une section fine de *P. damicornis* infecté par *V. coralliilyticus*.

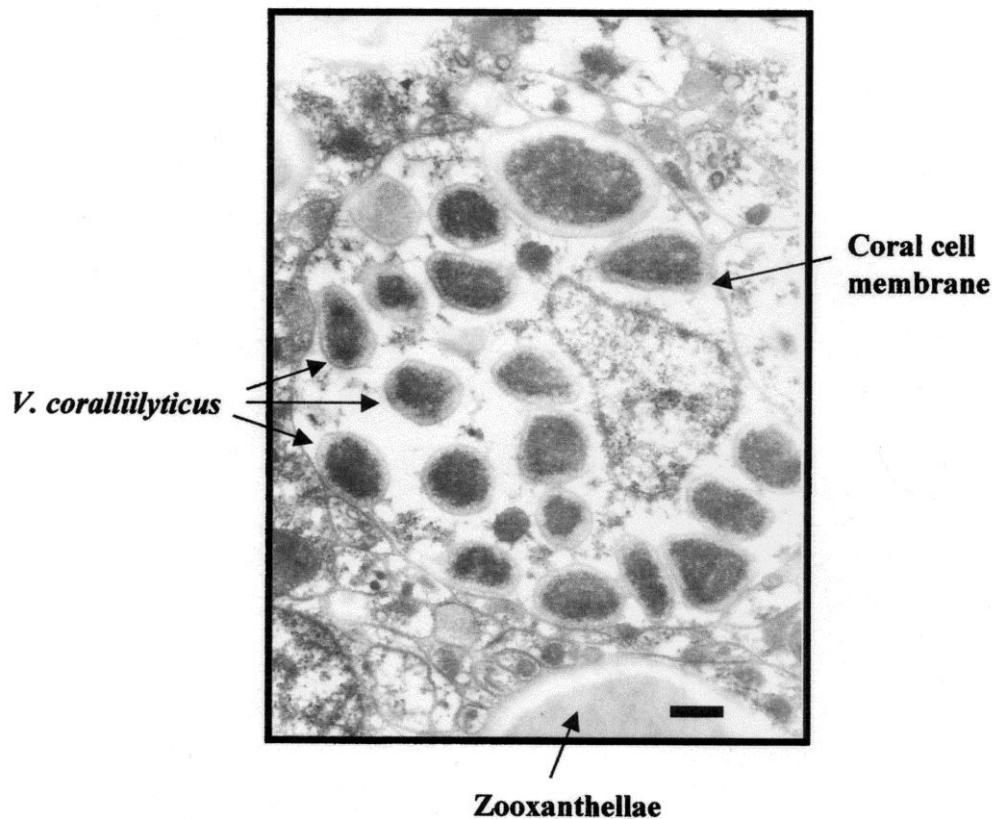


Figure 12 : Micrographie électronique d'une section fine de corail *Pocillopora damicornis*, 13 jours après une infection avec *Vibrio coralliilyticus* à 24,5°C. Barre = 0,5 μm (Ben-Haim *et al.*, 2003).

Dans chacun des deux cas de blanchiment bactérien, une espèce spécifique de *Vibrio* différente était le pathogène responsable et la virulence de celui-ci dépendait de la température de l'eau.

D) Hypothèse de « protection contre le blanchiment » par l'association avec des poissons

Une nouvelle hypothèse a, depuis peu, vu le jour. Elle exploite l'interaction tripartite potentielle « poissons Pomacentridae-bactéries-coraux » (communication orale au congrès international sur les récifs coralliens, Perpignan, 2000 ; Suefuji & Van Woesik, 2001). Certains Pomacentridae vivent en association avec des coraux branchus (principalement *Acropora* et *Pocillopora*). Ces coraux leur servent d'abri, de territoire et de lieu de nourrissage. Les coraux associés à des poissons auraient 30% de risques en moins de blanchir, par rapport à des colonies de la même espèce, dans des conditions identiques mais sans poissons associés (communication orale, Poulicek, 2005).

Différentes campagnes à Madagascar et Moorea (Polynésie française) ont révélé une augmentation significative de la densité et de la diversité fonctionnelle des microorganismes du mucus des coraux lorsqu'ils sont associés à des poissons demoiselles (Theunis, 2005 ; Theunis & Poulicek, 2006). Par ailleurs, ces microorganismes montrent des activités métabolique et respiratoire nettement plus élevées (Theunis, 2005 ; Theunis & Poulicek, 2006). Cette augmentation de la vitalité et de la diversité des communautés microbiennes pourrait rejoindre l'idée émise par Suefuji & Van Woesik (2001) selon laquelle les Pomacentridae auraient un effet protecteur vis-à-vis du blanchiment corallien. Il en découlerait une augmentation de la compétition des autres bactéries par rapport à *Vibrio shiloi* ou à d'autres pathogènes (Vandewalle & Poulicek, non publié ; Theunis, 2005 ; Theunis & Poulicek, 2006).

E) Cause virale ou fongique

Les microorganismes impliqués dans les maladies du blanchiment corallien ne sont pas forcément des bactéries. Les agents causatifs de ces maladies pourraient être également des virus ou des champignons.

II. 4. Mécanismes d'adaptation

Le premier mécanisme contrôlant l'adaptation à des températures plus élevées est la sélection naturelle (Darwin 1859). La variation de la réponse de blanchiment au sein d'espèces variées existe. Une adaptation génétique apparaît lorsque les membres les moins résistants d'une population sont éliminés par les conditions écologiques, laissant les organismes ayant une meilleure aptitude à se reproduire et à s'établir sur un habitat disponible.

Pour rappel, les événements de blanchiment n'ont jamais résulté en une mortalité complète d'une population entière de corail. Les génotypes qui ont survécu ont probablement une tolérance aux hautes températures. Le processus de sélection naturelle pour la tolérance au blanchiment aux hauts niveaux de température et d'irradiance est déjà souligné. Le temps requis pour une telle adaptation génétique au sein des récifs coralliens est inconnu, mais devrait cependant s'étendre sur de nombreuses générations coralliennes, durant des centaines voire des milliers d'années.

Le temps nécessaire à l'adaptation peut être diminué substantiellement si les coraux sont capables de substituer des zooxanthelles résistantes thermiquement contre leurs types moins résistants comme proposé par l'hypothèse adaptative du blanchiment (cfr. Point II.3.B). L'adaptation des coraux récifaux à des températures plus élevées par ce mécanisme doit encore être démontré. De nombreuses espèces et types de zooxanthelles sont actuellement reconnus, et leur réponse à la température et à l'irradiance varie certainement. De plus, certaines espèces de corail possèdent des colonies qui contiennent différents types de zooxanthelles, lesquelles peuvent induire une perte sélective du type le plus sensible durant un stress thermique (Rowan *et al.*, 1997). Des expériences de transplants réciproques sur une gamme de profondeurs ont rompu les symbioses coralliennes et ont montré que le blanchiment pourrait fournir une opportunité de remplacer les zooxanthelles expulsées par d'autres types de symbiotes (Baker, 2001). De nouvelles combinaisons de symbiotes et d'hôtes seront dès lors sujettes au même processus de sélection naturelle que les autres coraux du récif et pourront survivre ou être éliminées de la population (Jokiel, dans Rosenberg & Loya, 2004).

II. 5. Impacts du blanchiment

Si le processus de blanchiment n'est pas rendu réversible endéans quelques semaines voire quelques mois, le corail mourra, faute d'apports énergétiques suffisants (les zooxanthelles ayant été expulsées ou dégradées). Par contre, si le stress est de faible amplitude ou s'il est bref, les coraux peuvent phagocyter des zooxanthelles libres dans l'eau de mer environnante, qui se multiplieront dans les cellules de l'hôte, et la symbiose sera restaurée (cfr. Hypothèse adaptative du blanchiment). Ils peuvent également laisser se multiplier les zooxanthelles qui n'ont pas été expulsées. En effet, le blanchiment n'est jamais complet et il est possible que parmi les souches restantes, il y ait des souches beaucoup plus résistantes, qui étaient moins compétitives dans la situation antérieure.

En outre, le phénomène de blanchiment affecte fortement et négativement la croissance et les capacités reproductrices des coraux (Szmant & Gassman, 1990). Par ailleurs, une couverture importante d'algues colonisatrices des zones affectées par le blanchiment peut empêcher la recolonisation par de nouveaux coraux et donc altérer la diversité des espèces coralliennes et provoquer une restructuration considérable de la communauté.

La disparition des coraux suite au phénomène de blanchiment détruira les peuplements de poissons associés à ces madrépores au profit des poissons herbivores. Il en résultera un appauvrissement de la biodiversité ichthyologique. Ceci aura un impact sans précédent sur la pêche locale et sur le tourisme (lié à la plongée sous-marine). L'économie de toute la région concernée sera dès lors fortement affectée. De plus, les surfaces nécrosées pourraient être le siège d'apparitions de nouvelles maladies. Les structures édifiées par les coraux pourraient également se voir fragilisées et érodées. La côte ne bénéficierait alors plus du rôle protecteur des récifs face à la houle et des catastrophes de type tsunami pourraient voir leurs impacts amplifiés.

Chapitre II :

OBJECTIFS DU MÉMOIRE

Le blanchiment corallien est un des problèmes environnementaux majeurs de ce siècle. Afin d'en étudier et d'en comprendre les mécanismes, il est donc primordial de développer les recherches dans ce domaine. Une meilleure connaissance de ce phénomène nous permettrait de mieux prévoir l'avenir de ces écosystèmes riches et essentiels à bien des égards, et de mieux les protéger.

Il existe, cependant, différentes manières d'aborder l'étude du blanchiment corallien. Le présent travail se base sur deux hypothèses. D'une part, l'hypothèse bactérienne du blanchiment, une théorie selon laquelle l'expulsion et/ou la dégradation des zooxanthelles symbiotiques seraient provoquées par des agents pathogènes dont la virulence serait favorisée par des facteurs environnementaux tels que l'augmentation de la température de l'eau ; et d'autre part, l'hypothèse « protectrice » selon laquelle les coraux présenteraient moins de risques de blanchir s'ils vivent en association avec des poissons.

Selon cette approche, nous avons essayé de mettre en évidence la présence de bactéries et de VLP (Virus-like Particles) en terme de morphologie ultrastructurale : (1) à la surface du mucus de madrépores sains et blanchis, provenant de milieux naturels et d'aquariums, à l'aide de la microscopie électronique à balayage et (2) dans les tissus de ces coraux à l'aide de la microscopie électronique à transmission. En outre, la diversité génétique des communautés microbiennes associées au mucus des coraux a été testée afin d'établir quelles étaient les différences de ces communautés (1) au sein de colonies saines, (2) de colonies blanchies, (3) de colonies associées à des poissons et (4) dans différents échantillons d'eau, et le lien éventuel de ces communautés avec trois souches de bactéries connues comme étant pathogènes de certaines espèces coralliennes.

Chapitre III :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Afin d'atteindre les différents objectifs de ce mémoire, une série de techniques a été utilisée. La plupart des protocoles ont été mis au point et adaptés, en fonction du type d'échantillon analysé, pour être, de cette manière, dans des conditions d'étude optimales.

I. Description des échantillons

Différents échantillons en provenance de Polynésie française, de Madagascar, de Mer Méditerranée (Israël) ou encore de l'aquarium Nausicaà de Boulogne-sur-mer (France) ont été prélevés et ramenés par des collaborateurs, dans les conditions que nous leur avons prescrites. Ces prélèvements ont été traités et préparés selon les règles suggérées pour les diverses expériences ou observations à réaliser ; en voici leur présentation.

- Mucus de madrépore, eau interstitielle, de fond et de surface (Moorea, mars 2005).

Ces échantillons ont été collectés en plongée autonome lors d'une mission à Moorea, Polynésie française, en mars 2005, par Laetitia Theunis. Le site d'échantillonnage se situe sur le récif frangeant, face à Papetoia et près de la passe de Tareu. Le matériel a été prélevé à l'aide de seringues stériles de 10 ml et filtré sur filtres stériles de 25 mm de diamètre et 0,2 µm de porosité. Chaque filtre a ensuite été placé dans un tube Falcon® stérile de 15 ml avec ~7 ml d'éthanol 100%, au réfrigérateur (pour la biologie moléculaire). De retour en Belgique, ces tubes ont été placés au congélateur à -20°C. Il faut noter que ce mode de conservation n'est pas idéal. Il aurait été préférable de travailler sur du matériel frais congelé mais la chaîne du froid est difficile à maintenir de la Polynésie française à la Belgique.

Voici la liste des échantillons utilisés :

- **CPMO 8** : Eau « interstitielle » d'une colonie de *Pocillopora sp.* d'1,5 m de diamètre, en étroite association avec 8 poissons *Chromis* bleus, à 4 m de profondeur.
- **CMO 10** : Eau « interstitielle » d'une colonie de *Pocillopora* d'1,5 m de diamètre, à 4 m de profondeur, située à 3-4 m de la colonie PO1 mais dépourvue de poissons associés.
- **ELS 12** : Eau de « surface » (prélevée à 0,5 m de profondeur) au-dessus de la colonie ci-dessus.
- **ELF 13** : Eau de « fond » prélevée à 0,5 m (3,5 m de profondeur) au-dessus du sédiment entre les colonies CMO 10 et CPMO 8.
- **FUN 14** : Mucus de *Fungia concinna* de 15 cm de long, prélevé au niveau du sédiment, proche des colonies CPMO8 et CMO10.

➤ Coraux prélevés à Tuléar (Madagascar, novembre 2005)

10 échantillons ont été rapportés de Madagascar par Eric Parmentier. Ces échantillons ont été prélevés sur la pente externe du récif barrière du « Grand Récif » de Tuléar. Ils regroupent 5 espèces coralliennes ; à chacune correspondent 1 échantillon d'organisme sain et 1 échantillon d'organisme blanchi (Fig. 13). Ces prélèvements ont été fixés dans du glutaraldéhyde pour l'observation en microscopie électronique. Les échantillons ont été codifiés comme suit (détermination par M. Poulicek) :

- **1S** : *Acropora digitifera* (Acroporidae) (Dana, 1846), sain (?)
- **1B** : *A. digitifera*, blanchi
- **2S** : *Acropora danai* (Acroporidae) (Edwards & Haine, 1860), sain
- **2B** : *A. danai*, blanchi
- **3S** : *Echinopora prob. hirsutissima* (Favidae) (Edwards & Haine, 1860), sain
- **3B** : *E. hirsutissima*, blanchi
- **4S** : *Porites (Synarea) rus* (Poritidae) (Forskal, 1775), sain
- **4B** : *P. rus*, blanchi
- **5S** : *Acropora humilis* (Acroporidae) (Dana, 1846), sain (pas de photo)
- **5B** : *A. humilis*, blanchi

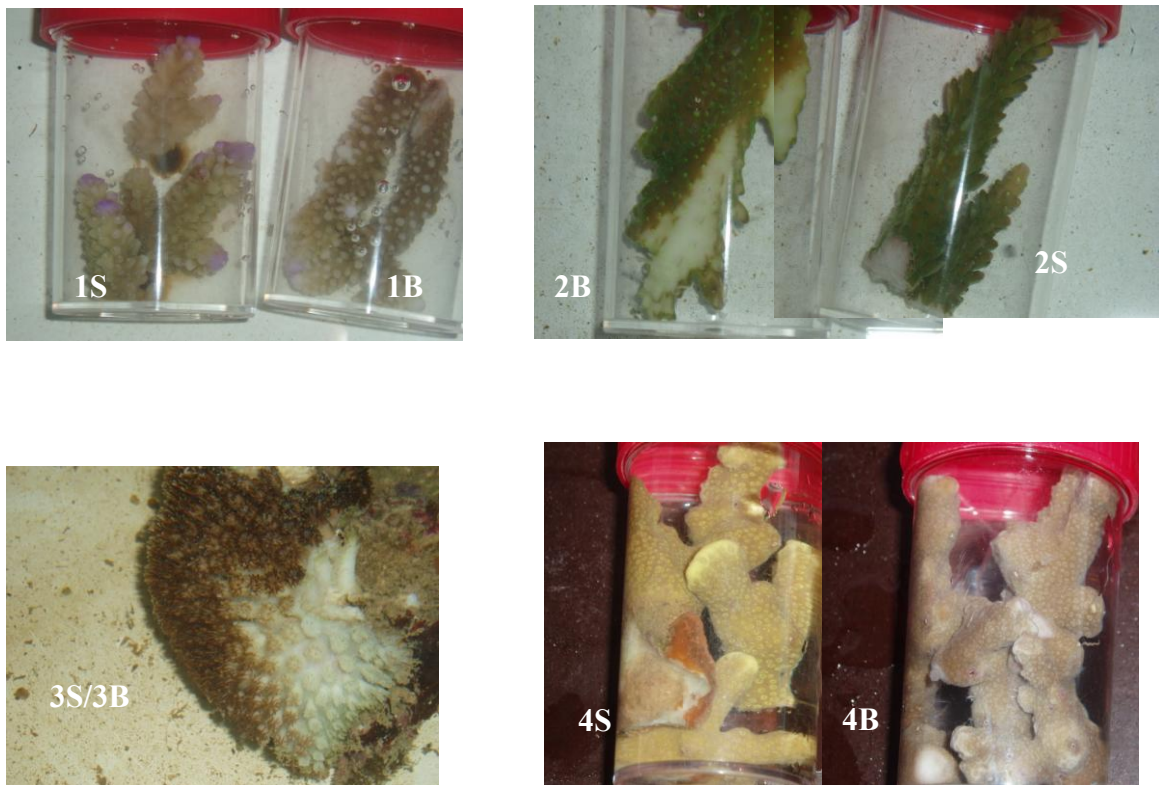


Figure 13 : Photos des échantillons prélevés à Madagascar (sauf l'espèce 5).

➤ Coraux prélevés à Moorea (Polynésie française, avril 2006)

Lucie Penin de l'Université de Perpignan a récolté 8 échantillons de coraux, stockés ensuite dans de l'éthanol 100%, pour la détermination de la diversité génétique des communautés microbiennes vivant au sein du mucus de ces coraux. Les échantillons ont été prélevés sur la pente externe du récif, au niveau du « Transect de Tiahura ». Deux espèces ont fait l'objet de cet échantillonnage : *Acropora latistella* (espèce branchue) et *Leptoseris mycetoseroides* (espèce encroûtante à foliacée); pour lesquelles deux fragments d'environ 1cm³ d'un organisme sain et deux d'un organisme blanchi ont été prélevés et placés dans des tubes stériles (8 au total). Un seul échantillon de *Leptoseris mycetoseroides* non blanchi, **Lnb1**, a été utilisé dans le présent travail mais les autres échantillons seront utilisés ultérieurement.

- **Ab1** et **Ab2** : *Acropora latistella* blanchis 1 et 2
- **Anb1** et **Anb2** : *Acropora latistella* non blanchis 1 et 2
- **Lb1** et **Lb2** : *Leptoseris mycetoseroides* blanchis 1 et 2
- **Lnb1** et **Lnb2** : *Leptoseris mycetoseroides* non blanchis 1 et 2

➤ Coraux de Nausicaà (mars 2006)

Des échantillons de corail ont été prélevés en mars 2006 par Alexandre Sneessens à l'aquarium Nausicaà de Boulogne-sur-mer. L'espèce prélevée est *Pocillopora damicornis*. 4 échantillons sains et 4 blanchis ont été fixés au glutaraldéhyde pour l'observation en microscopie électronique et 2 échantillons de chaque « état » ont été conservés dans l'éthanol 100% pour d'éventuelles expériences moléculaires. Uniquement les huit premiers échantillons ont fait l'objet d'observations morphologiques. Ils ont été codifiés comme suit : **Nau nb1** (pour Nausicaà, non-blanchi n°1), **Nau b1** (blanchi), **Nau nb2**, **Nau b2**, **Nau nb3**, **Nau b3**, **Nau nb4** et **Nau b4**.

➤ Souches bactériennes (Université de Gand, Mai 2006)

3 cultures de souches bactériennes d'intérêt ont été achetées à l'unité BCCM/LMG de l'Université de Gand :

- **1** : *Vibrio shilonii* (*V. shiloi*) (Rosenberg AK-1) LMG 19703
- **2** : *Vibrio corallilyticus* (Rosenberg YB-1) LMG 20984
- **3** : *Vibrio corallilyticus* (Rosenberg YB-2) LMG 21348

Ces souches ont fait l'objet d'extractions et d'observations en microscopie électronique. Notons que les cultures de ces trois souches ont été repiquées de façon hebdomadaire sur milieu solide.

➤ Coraux prélevés en Mer Méditerranée (Université de Tel-Aviv, Israël, été 2005-hiver 2006)

Grâce à une collaboration avec l'Université de Tel-Aviv, nous avons pu observer en microscopie à épifluorescence des coupes réalisées sur du corail *Oculina patagonica*

infecté en laboratoire par la bactérie *Vibrio shiloi* et marqué par des anticorps anti-*V. shiloi* (échantillon L22, fixé 22 h après infection). Quelques coupes de corail sain (échantillon H2, prélevé en hiver 2006), partiellement blanchi (échantillon L1, prélevé en juillet 2005) et très blanchi (échantillon L3, prélevé en juillet 2005) ont également été observées au microscope électronique à transmission (TEM). Tous les échantillons ont été fixés dans du glutaraldéhyde 2,5 % durant 2 h, puis conservés dans du NaN₃ 20 mM dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline).

II. Morphologie-Ultrastructure

Afin d'établir un état des lieux et de mettre en évidence l'éventuelle présence de microorganismes au sein des tissus coralliens, les échantillons de coraux et les souches bactériennes ont pu être observés à l'aide de la microscopie électronique, d'une part, et de la microscopie optique, d'autre part. Ces modes d'observations sont différents de par leur résolution et leur niveau d'observation, mais ils sont, cependant, tout à fait complémentaires. Chaque prélèvement a été divisé en deux parties pour les deux techniques de microscopies électroniques utilisées (SEM et TEM). Ensuite, après préparations des échantillons, des coupes semi-fines et fines sont réalisées (voir ci-après). Les coupes semi-fines sont d'abord observées en microscopie optique pour acquérir une vue générale de la partie de l'organisme observée. Les coupes fines font ensuite l'objet d'une observation au microscope électronique à transmission (TEM)

II.1. Microscope électronique à balayage (SEM, Scanning Electron Microscope)

Le microscope électronique à balayage utilisé (JSM 840A, JEOL) a permis l'observation de la surface des échantillons (massifs) de coraux et des souches bactériennes issues de cultures pures. Le mucus des madrépores a ainsi pu être observé afin d'en connaître l'aspect mais également afin de détecter des éléments à sa surface, tels que des bactéries. Cette technique a également permis de confirmer la détermination des espèces coralliennes échantillonnées.

A) Préparation des échantillons

Les échantillons, placés dans du glutaraldéhyde (2,5%, Agar Scientific[®] EM Grade), sont ensuite conservés dans de l'eau de mer filtrée (ou du tampon cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,3 pour les bactéries) avec du NaN₃ 20mM. Un fragment de chaque échantillon est prélevé. Le reste des échantillons est conservé au réfrigérateur. Les fragments sont rincés trois fois à l'eau de mer filtrée (ou du tampon cacodylate de sodium pour les bactéries). Puis, sous hotte, les morceaux prélevés sont baignés pendant 1h dans du tetroxyde d'osmium 1% (Agar Scientific[®]). Après ce bain, trois rinçages à l'eau distillée sont effectués et un quatrième bain est maintenu pour la nuit au congélateur à -23°C. Les échantillons sont ensuite lyophilisés.

Après lyophilisation, les échantillons sont collés sur des supports en aluminium à l'aide de colle à l'argent (Agar Scientific[®], ou de papier carbone collant double face pour les bactéries). Le lendemain, les échantillons sont métallisés au platine sous argon dans un évaporateur à plasma (Balzers[®] SCD 030).

B) Fonctionnement du microscope et conditions d'observation

Les observations sont d'abord réalisées à faible grossissement, afin de réaliser les vues plus générales, puis avec des grossissements progressifs. La tension utilisée pour les observations est de 19 kV et le logiciel Orion a servi à la capture des images.

II.2. Microscopie électronique à transmission (TEM, Transmission Electron Microscope)

La microscopie électronique à transmission, technique de microscopie basée sur le principe de la transmission des électrons, a été utilisée afin de mettre en évidence des structures microbiennes au sein des tissus coralliens. L'observation ultrastructurale de coupes fines (~70 nm) réalisées sur les échantillons de coraux et sur les trois souches de bactéries permet d'obtenir une meilleure image de la structuration des tissus et de l'organisation cellulaire interne.

A) Préparation des échantillons

Les échantillons (conservés dans du glutaraldéhyde 2,5%) sont placés dans de l'EDTA 0,2 M (NaCl, sucrose et Tris-HCl) pendant plusieurs semaines afin de les décalcifier. Par la suite, ils doivent être fixés, rincés et enchâssés dans la résine avant de pouvoir réaliser des coupes. Il y a d'abord une fixation au glutaraldéhyde 2,5 % dans de l'eau de mer durant 2h. Puis, on effectue trois rinçages de 5 minutes à l'eau de mer. Après cela, une post-fixation au tetroxyde d'osmium OsO₄ 1% dans de l'eau de mer d'1 h est réalisée. Ensuite, 5 rinçages de 5 minutes sont effectués à l'aide d'eau distillée. Les échantillons sont déshydratés dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante: Alcool 30 % (5 min)-50 % (5 min)-70 % (au moins une nuit)-90 % (5 min) et alcool absolu (3 x 20 min), et passent ensuite 2 fois 30 minutes dans des bains d'époxy-propane. Les échantillons sont imprégnés 3 heures dans un bain époxy-propane/epon 1 :1 et restent ensuite toute la nuit dans de la résine époxy de type epon (SPI-PON 812 de SPI-CHEM™). Le lendemain, nous pouvons procéder à l'enchâssement et les échantillons polymérisent durant 3 jours dans une étuve à 60°C.

Après cette série de préparatifs, les coupes semi-fines (0,5 µm) et fines (~70 nm) peuvent être réalisées à l'aide d'un microtome (Ultracut E, Reichert-Jung). Les coupes fines sont ensuite adsorbées sur une grille métallique (2 mm de diamètre environ) recouverte d'un film de carbone ou de résine Formvar®. Les grilles peuvent être alors colorées à l'aide d'acétate d'uranyle (Electron Microscopy Science) et de citrate de plomb (SPI-CHEM™).

B) Fonctionnement du microscope et conditions d'observation

L'approche de grossissement progressif est identique à celle appliquée pour le SEM. La tension est de 80 kV et les photos sont réalisées selon le principe d'impression sur négatif. Les négatifs, une fois développés, doivent être scannés à l'aide d'un scanner muni d'un adaptateur pour négatifs.

II.3. Microscope optique

Le microscope optique (Olympus BX 50) a principalement servi d'outil pour la détermination de zones d'intérêt, sur la base de coupes semi-fines (0,5 μm , colorées au Bleu de Toluidine 0,5 % dans du tétraborate de sodium 1 %), afin de réaliser une observation plus ciblée des coupes fines au microscope électronique à transmission. Ce que nous appelons ici « zone d'intérêt » est une région de l'échantillon où les tissus sont bien identifiables et où « l'état de santé » du madrépore peut être observé. Cette zone se situe au niveau de l'endoderme ; celui-ci abritant les zooxanthelles endosymbiotiques. Les grossissements réalisés sont de 10 et 40 X.

Par ailleurs, la microscopie électronique à épifluorescence a également été utilisée afin de mettre en évidence des bactéries *Vibrio shiloi* présentes dans les tissus du corail *Oculina patagonica*, provenant de la partie Sud-Est de la Mer Méditerranée et infecté en laboratoire (par Leah Reshef à l'Université de Tel Aviv, Israël). Cette mise en évidence consiste en un marquage d'anticorps anti-*V. shiloi* (à l'aide d'un fluorochrome) qui vont aller se greffer sur les bactéries cibles. Ces bactéries d'intérêt sont dès lors visibles en fluorescence. Cette technique a également servi à la mise en évidence des bactéries *Vibrio shiloi* et *V. coralliilyticus* dans les tissus d'*Acropora* sp. (Moorea 2005).

III. Diversité génétique des communautés bactériennes

Avant de manipuler et de tester la diversité génétique des communautés bactériennes associées aux coraux ou trouvées dans l'eau de mer, un test des conditions expérimentales a été effectué. En effet, des contaminations peuvent survenir, particulièrement lors de l'évaporation de l'éthanol dans lequel l'échantillon a dû être conservé étant donné qu'il n'est pas possible de travailler sur des échantillons frais. Il a donc été préférable de vérifier préalablement les hottes, kits d'extraction et d'amplification, à l'aide de « blancs » ou contrôles négatifs (préparations sans ADN). De plus, afin d'éviter toute contamination, des conditions drastiques de stérilité ont été adoptées : lampe UV sous hotte stérile à flux laminaire, utilisation de matériels stériles ou nettoyés à l'aide de produits désinfectants (javel et alcoool), changement régulier de gants, tips stériles avec filtres, fractions aliquotes de réactifs préparées sous hotte, majeure partie des manipulations réalisées sous hotte dans des locaux séparés (CIP, Biochimie, Cyano), ... Les produits et protocoles utilisés sont plus amplement détaillés en annexes (Annexes 1 et 2).

III.1. Préparation des échantillons

Les premiers échantillons à notre disposition étaient les prélèvements effectués sur filtres provenant de Polynésie française (mars 2005). Ceux-ci sont conservés dans de l'éthanol 100%. Cependant, pour l'extraction de filtres, les échantillons doivent être congelés en présence de tampon de lyse.

La première étape consistait donc à enlever entièrement l'éthanol des filtres et ensuite, de les mettre en présence de tampon de lyse. L'éthanol, qui contient de la

matière en suspension, est précautionneusement prélevé et réparti dans plusieurs tubes Eppendorf® d'1,5 ml. Le filtre est laissé dans son tube pour évaporation des restes d'éthanol (toujours sous hotte stérile à flux laminaire, après avoir mis les UV toute une nuit). Les tubes sont ensuite centrifugés et l'éthanol est par la suite pipeté au maximum. Les culots sont laissés à sécher pour que l'éthanol résiduel puisse s'évaporer. Le tampon de lyse est rajouté et le filtre ainsi baigné dans ce tampon est mis au congélateur.

Pour ce qui concerne les fragments de coraux, un morceau est prélevé à l'aide d'une pince stérile, laissé à évaporer 2-3 min sous hotte et ensuite placé dans un tube contenant du tampon de lyse (du kit d'extraction, voir plus bas).

III.2. Extraction de l'ADN bactérien

A) Extraction de filtres

L'ADN bactérien est extrait des prélèvements sur filtre selon le protocole de Giovannoni *et al.*, 1990, modifié par Wilmotte *et al.*, 2002. Les filtres sont conservés dans du tampon de lyse. Ce protocole prévoit 3 étapes : (1) la lyse enzymatique qui nécessite le lysozyme, le SDS et la protéinase K, (2) l'extraction, rendue possible grâce au phénol/chloroforme/alcool isoamylique ainsi qu'au chloroforme/alcool isoamylique, et enfin, (3) la précipitation via l'ajout de NaAc et d'éthanol pur.

➤ Lyse enzymatique

Après décongélation de l'échantillon baignant dans le tampon de lyse, le lysozyme est ajouté et l'échantillon est mis à incuber dans un bain-marie à 37°C. Cette étape hydrolyse le peptidoglycane de la couche rigide de la paroi des bactéries et va provoquer une lyse cellulaire.

À la suite de cette incubation, le SDS et la protéinase K sont incorporés aux échantillons. L'agent dénaturant (SDS) désorganise la double couche phospholipidique des membranes. La dissociation des protéines est réalisée en faisant agir une protéase, la protéinase K. Le SDS facilite son action en déployant la chaîne peptidique.

Toujours sous hotte, du phénol/chloroforme/ alcool isoamylique à 56°C est ajouté. Le tube est ensuite incubé à 56°C. Cette étape permet la dénaturation des protéines, l'élimination des lipides et la dissolution du filtre. Les solvants organiques sont non miscibles à l'eau et aux lipides, de densité supérieure. Les acides nucléiques n'y sont pas solubles.

➤ Extraction

Les échantillons sont centrifugés, le surnageant est transféré dans un nouveau tube Falcon® de 15 ml. L'ADN se trouve exclusivement dans la phase supérieure (aqueuse) tandis que les protéines se trouvent à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Dans la phase organique se trouvent les débris.

Du chloroforme/ alcool isoamylique incubé préalablement à 56°C est ajouté et le tube est incubé à 56°C. L'ajout d'alcool isoamylique au mélange phénol/chloroforme

améliore la séparation et empêche la formation de mousse lors de l'extraction. Cette deuxième extraction élimine le reste de phénol.

➤ Précipitation

Une centrifugation des échantillons est à nouveau réalisée. Ensuite, le surnageant est réparti dans plusieurs eppendorfs[®] et du NaAc 3M (acétate de sodium) et de l'éthanol pur sont ajoutés à chacun des tubes afin de favoriser la précipitation de l'ADN, soit 1/10 V NaAc 3M et 2 V d'éthanol. L'éthanol pur permet la précipitation de l'ADN sans le dénaturer. L'ADN précipite ainsi durant une nuit à -20°C .

Le lendemain, les échantillons sont centrifugés, le surnageant est éliminé et de l'éthanol 70% est ajouté aux culots. L'ADN se trouve dans le précipité. Le rinçage à l'éthanol 70% permet l'élimination des sels et des impuretés.

Les échantillons sont à nouveau centrifugés, le surnageant éliminé et le culot laissé à sécher. Du TE^{-4} est ensuite ajouté au culot.

➤ Purification

La purification se réalise à l'aide du kit Wizard[®] DNA Clean Up System de Promega. Ce kit contient une seringue que l'on remplira de résine (thiocyanate de guanidium) fournie avec le kit et qui sera fixée sur une mini-colonne (matrice de silice qui lie l'ADN). Le tout est placé sur un système de pompe à vide permettant d'éliminer les solvants organiques, les dernières impuretés présentes après l'extraction de l'ADN et, in fine, de récupérer l'ADN.

Les tubes sont incubés à 55°C pour permettre de dissoudre les culots. La résine préalablement chauffée est ajoutée à l'échantillon contenant l'ADN. Ce mélange résine/ADN est déposé dans la mini-colonne. Le vide est réalisé afin de faire passer le mélange sur le filtre de la mini-colonne qui est rincée avec de l'isopropanol 80%.

Les mini-colonnes sont ensuite placées sur des nouveaux Eppendorf[®] et mis à centrifuger. Le possible isopropanol résiduel se voit ainsi éliminé. De nouveaux Eppendorf[®] sont utilisés pour récupérer les mini-colonnes. Du TE^{-4} à 80°C est ajouté et les tubes avec mini-colonnes sont centrifugés pour récupérer l'ADN.

B) Extraction de fragment de corail

La présence de nombreux polysaccharides dans le mucus de corail peut rendre l'extraction d'ADN difficile. C'est pourquoi, un autre protocole d'extraction a été testé sur ce nouveau type d'échantillon que représente le fragment de corail. Le kit Wizard[®] Magnetic DNA Purification System For Food de Promega a été utilisé pour extraire l'ADN bactérien associé au mucus de cet échantillon. Ce kit sert à extraire l'ADN de matrices complexes comme le chocolat, les huiles, etc. Cependant, une étape a été ajoutée au protocole pour « arracher » le mucus du reste du fragment. Cette étape intervient après avoir placé le fragment de corail dans du tampon de lyse (du kit utilisé). Elle consiste en l'ajout de billes de verre qui vont arracher le mucus lors de l'agitation du tube sur vortex.

Ensuite, selon le protocole Promega, de la RNase et du tampon de lyse sont ajoutés. Les échantillons incubent alors à température ambiante. De la solution de précipitation est ajoutée et l'échantillon est passé sur vortex. Le morceau de corail détaché de son mucus est enlevé et une centrifugation est effectuée sur les tubes. Le liquide est par la suite récupéré et mis dans un nouveau tube ; les billes de verre sont jetées.

Les microbilles MagneSil[®] PMPs du kit sont ensuite ajoutées à l'échantillon qui est alors vortexé et un volume d'isopropanol équivalent à 8/10ième du volume de l'échantillon est ajouté. Le tube est mélangé et incubé à température ambiante.

Les tubes sont ensuite insérés sur le support MagneSphere[®] Technology Magnetic Separation Stand. Le liquide est alors pipeté tout en laissant les tubes sur le support. Les tubes sont retirés du support et on y ajoute du tampon de lyse (du kit). Ils sont mélangés puis placés sur le support et le liquide est enlevé. Cette opération est réalisée 3-4 fois.

Les échantillons sont resuspendus dans de l'éthanol 70% (solution de lavage). Les tubes sont remis sur le support et le liquide est jeté. Cette étape est également répétée 3-4 fois. Les tubes sèchent alors sous la hotte à température ambiante.

La dernière étape consiste à rajouter de l'eau DEPC (autoclavée et filtrée sur filtre de 0,2 µm de maille ; sans nucléases) et à vortexer les échantillons puis les incuber à 65°C. Le liquide contenant l'ADN est alors récupéré sur le support de séparation et mis au congélateur.

III.3. Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

A) Principe

Cette technique permet d'amplifier de façon exponentielle une séquence cible d'ADN. On utilise deux amorces qui vont s'hybrider sur les régions encadrant la séquence que l'on désire amplifier. Une enzyme, la *Taq* Polymérase procède à la réplication du brin d'ADN au départ de ces amorces. En polymérisant les dNTPs, l'ADN polymérase va prolonger les amorces de façon complémentaire au brin matrice (Fig. 14).

Chaque cycle de la PCR (sauf le premier et le dernier) se caractérise par trois phases :

- **(1) La phase de dénaturation :**
La température est d'environ 94°C et provoque la séparation des doubles brins d'ADN en simples brins où viendront se fixer les amorces spécifiques.

- (2) La phase d'hybridation :
La température est abaissée. Cette phase permet l'hybridation des amorces et la température est choisie en fonction de leur température de dénaturation.
- (3) La phase d'élongation :
L'élongation des amorces est réalisée par la *Taq* Polymérase. Cette étape se déroule à 68°C, la température optimale pour le mélange d'enzymes (Super *Taq* Plus) que nous utilisons.

Les *Taq* Polymérases usuelles synthétisent l'ADN dans le sens 5' → 3' et ne possèdent pas d'activité exonucléasique « proof reading ». Elles introduisent une erreur toutes les 2500 pb environ. La Super *Taq* Plus Polymérase est un mélange de la *Taq* Polymérase et d'une polymérase corrigeant les erreurs grâce à son activité exonucléasique 3' → 5'. La synthèse est donc plus fiable.

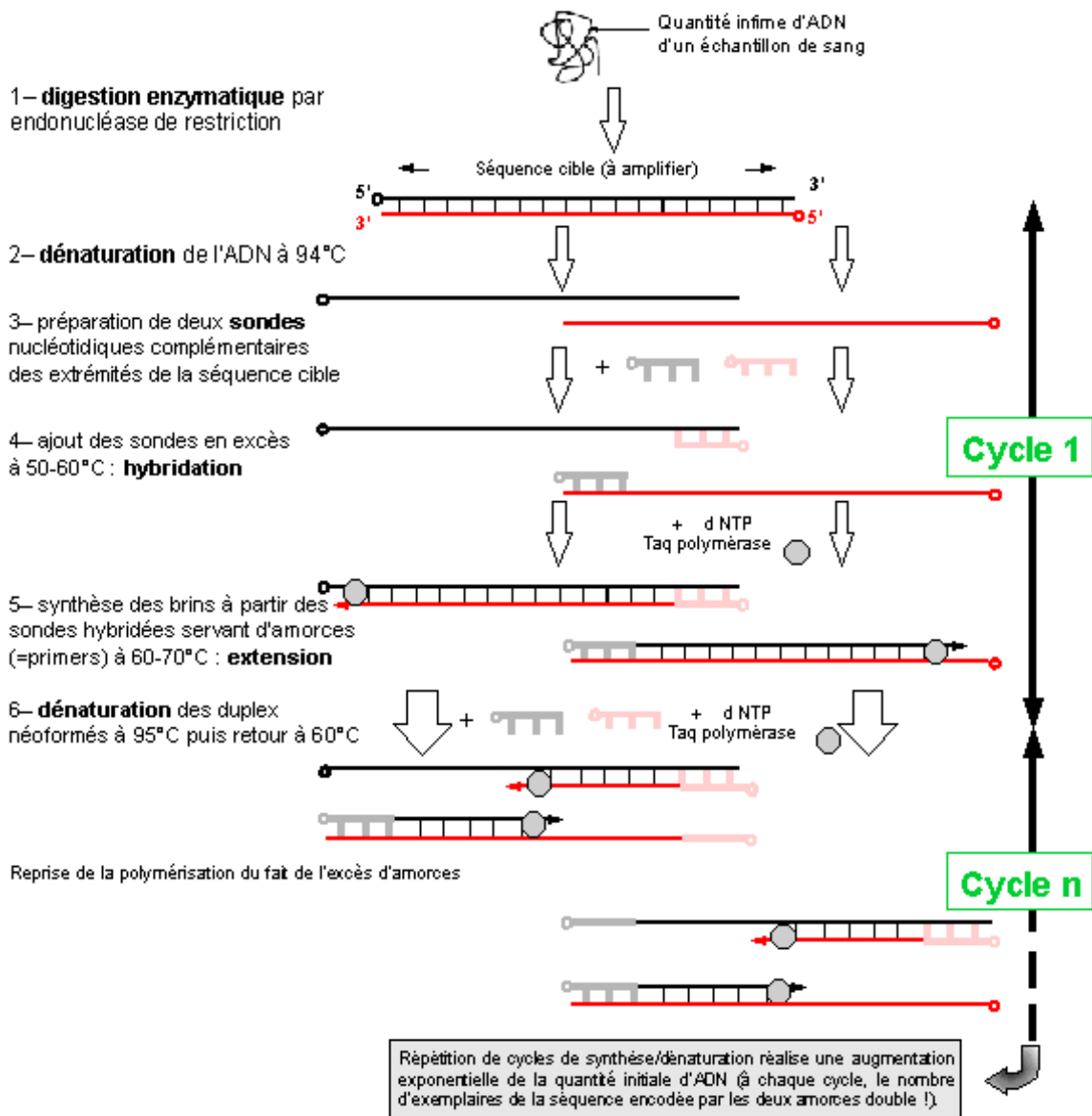


Figure 14 : Schéma explicatif de la PCR (www.inrp.fr)

B) Méthode

Un « master mix » est préparé, reprenant tous les réactifs pour la PCR sauf l'ADN. Il ne faut pas oublier de prévoir suffisamment de mix pour avoir un blanc PCR (témoin négatif) et une part supplémentaire donnant une marge de sécurité. Le blanc d'extraction est considéré comme un échantillon à part entière. C'est lui qui sera le témoin d'une contamination éventuelle lors de l'extraction des échantillons.

Pour une réaction de 50 μ l, on utilise les réactifs dans les proportions et l'ordre suivants :

Réactifs	Concentration stock	Volume/réaction (μ l)	Concentration finale
H₂O		35,8 (adaptable)	
Tampon Super Taq Plus	10X	5	1X
BSA	10 mg/ml	5	1 mg/ml
dNTPs	10 mM	1	200 μ M
1^{ère} amorce	Aliquot de 20 mM	1,25	0,5 μ M
2^{ème} amorce	Aliquot de 20 mM	1,25	0,5 μ M
Super Taq Plus Polymerase	5 U/ μ l	0,2	1 U/ μ l
ADN		0,5 (adaptable)	
Volume total		50	

A ce stade, les précautions prises pour éviter les contaminations sont drastiques. Un local est spécialement consacré à la préparation du « master mix ». Et, en plus des précautions générales citées précédemment, il est impératif de changer de tablier et de gants.

Le master mix (sans l'ADN) est préparé pour le nombre de réactions voulues. Il est ensuite incorporé à raison de 49,5 μ l dans des tubes PCR de 200 μ l. Ce n'est qu'ensuite que l'ADN est ajouté (0,5 μ l). Le contrôle négatif que représente le blanc PCR ne contient pas d'ADN et est donc constitué de 50 μ l de master mix. Il est l'assurance qu'il n'y a pas eu de contamination lors de cette manipulation.

Par la suite, un kit «pour PCR difficile» a été utilisé à la place de ce protocole. L'AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System d'Invitrogen™ fournit des réactifs de qualité pour l'amplification de fragments d'acide nucléique par PCR. Il contient des anticorps anti-Taq ADN Polymérase qui vont inhiber l'activité polymérase, fournissant un « hot start » automatique et permettant une manipulation plus aisée à température ambiante. La protéine AccuPrime™ thermostable favorise l'hybridation spécifique amorce-séquence cible durant chaque cycle de la PCR. Certains réactifs sont inclus dans le tampon (protéine AccuPrime™ thermostable, Mg⁺⁺, dNTPs). Les anticorps et la protéine AccuPrime™ améliorent la spécificité de la PCR lors de l'amplification et améliorent la fidélité de la Taq par 2 fois.

Pour de l'ADN génomique allant de 200 pb à 4 kb (pour le deuxième couple d'amorces testé, voir plus bas), les réactifs sont ajoutés dans les proportions suivantes :

Réactif	Pour une réaction de 50 μ l
Tampon PCR AccuPrime™ 10X	5 μ l
Primer Mix (10 μ l de chaque amorce)	1 μ l
ADN extrait	1-200 ng (2 à 4 μ l environ selon dosage)
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase	1 μ l
Eau distillée autoclavée (DEPC)	Jusque 50 μ l

C) Programmes PCR

Le premier couple d'amorces qui a été testé, 357F-518r, génère un fragment d'ADN de 194 paires de bases (pb). Ces amorces sont relativement universelles pour toutes les bactéries.

Le programme utilisé (Tannock *et al.*, 2000) est composé de cycles répétés ou non, composés, pour la plupart, des phases explicitées précédemment (Fig.14). Il se présente comme suit :

Tannock et al., 2000			357F-518r
Cycle 1	1X	Etape 1	94°C – 3 min
Cycle 2	30X	Etape 1	94°C – 30 sec
		Etape 2	56°C – 30 sec
		Etape 3	68°C – 1 min
Cycle 3	1X	Etape 1	68°C – 7 min
Cycle 4	1X	Etape 1	4°C - ∞

Le deuxième couple d'amorces, 357F-907r, génère un fragment d'ADN de 585 pb et fait appel à un protocole de type « touchdown » (Muyzer *et al.*, 1993) où la température d'hybridation est progressivement diminuée jusqu'à arriver à la température caractéristique de l'amorce en question. Ce type de protocole semble plus fiable car il réduit le risque de mésappariement. Il a également été utilisé pour la PCR préparant les échantillons à la DGGE (cfr. Plus bas).

Muyzer et al., 1993 (modifié au cycle n°3)			357F-907r
Cycle 1	1X	Etape 1	94°C – 3 min
Cycle 2	20X	Etape 1	94°C – 1 min
	↓ de 1°C/2 cycles	Etape 2	65°C* – 1 min
		Etape 3	68°C** – 3 min
Cycle 3	15X (au lieu de 5)	Etape 1	94°C – 1 min
		Etape 2	55°C – 1 min
		Etape 3	68°C – 3 min
Cycle 4	1X	Etape 1	68°C – 7 min
Cycle 5	1X	Etape 1	4°C - ∞

* Cette température est 10°C supérieure à celle attendue pour l'hybridation (basée sur le calcul du T_m , melting temperature), puis on la rabaisse progressivement jusque 55°C (1°C/2 cycles)

** Cette température est nécessaire au bon fonctionnement de la *Taq* Polymerase.

III.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

A) Principe

L'électrophorèse permet de vérifier que la PCR a bien amplifié le fragment d'intérêt et de visualiser d'éventuelles contaminations. Cette méthode implique un champ électrique qui va induire la migration de molécules chargées à travers un gel d'agarose. La vitesse de migration de la molécule dépend de sa taille et de la concentration du gel. En effet, plus le gel est concentré, plus ses mailles sont serrées ; la molécule migre, par conséquent, plus difficilement. Cette technique permet donc de séparer des molécules en fonction de leur taille, forme et charge. L'ADN, molécule chargée négativement (ionisation des groupements phosphates) migre vers le pôle positif. La visualisation s'effectue par une coloration au bromure d'éthidium, visible aux UV.

B) Mode opératoire

Le gel (1,5 % agarose) est réalisé en faisant dissoudre de l'agarose dans du tampon TAE 1X et est ensuite coulé dans un petit bac muni d'un peigne (pour faire les puits). Une fois polymérisé, il est placé dans une cuve à électrophorèse contenant du TAE 1X. Par puits, 12 µl d'ADN mélangés à 3 µl de bleu de charge sont injectés et mis à migrer 45 min à 90 Volts. Pour pouvoir être visualisé, le gel est baigné dans du bromure d'éthidium puis rincé à l'eau. La visualisation s'opère sous lampe UV.

III.5. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou DGGE

A) Principe

Cette technique d'électrophorèse en gradient de gel dénaturant permet de séparer des fragments d'ADN de même taille différant par un ou plusieurs nucléotides. Pour des séquences nucléotidiques de même longueur, la stabilité de chacune d'elle est différente selon sa composition en bases. Plus les séquences seront riches en bases G et C (liées par 3 liaisons hydrogène), plus elles seront stables. La DGGE, méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, repose sur ce principe. Le gel est coulé de façon à créer un gradient de solutions dénaturantes (urée et formamide). En principe, pour déterminer le gradient de dénaturant à utiliser, les échantillons sont d'abord soumis à une migration sur gel à gradient dénaturant de 0 à 100%, perpendiculaire au champ électrique (Fig. 15). La concentration choisie est celle pour laquelle les fragments se dénaturent et stoppent leur migration à une hauteur raisonnable dans le gel (s'il y a trop de dénaturant, les fragments stoppent la migration directement, dans le cas contraire, ils migrent sans s'arrêter) (Léonard, 2006).

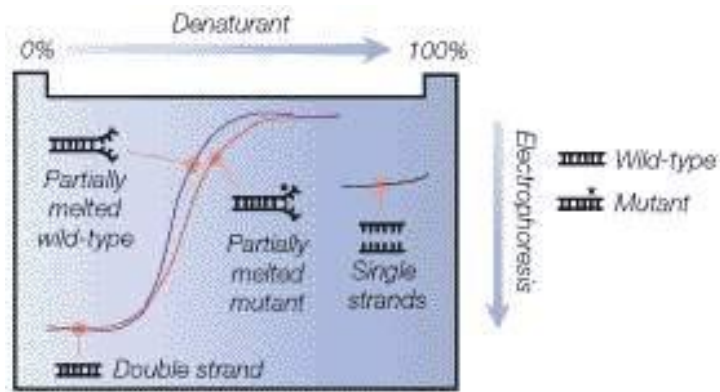


Figure 15 : Gradient de dénaturant
(www.molbiol.edu.ru)

L'ADN migre dans un gel d'acrylamide où la concentration en dénaturants affecte la mobilité des fragments : une molécule partiellement dénaturée (les liaisons hydrogène entre les deux brins d'ADN sont rompues) présente un encombrement stérique plus important et est fortement ralentie dans le gel par rapport à une molécule appariée ou complètement dénaturée. Bien que le gradient augmente de façon linéaire, la dénaturation de l'ADN s'effectue par domaine de dénaturation, chacun ayant sa température de fusion déterminée par la composition en bases AT et GC. Deux molécules dont les séquences diffèrent par une ou plusieurs paires de bases pourront donc s'ouvrir à des moments différents et migreront différemment à travers un gradient précis.

Pour cette application, est ajouté un domaine à haut point de fusion : une pince GC (GC clamp). Cette pince est constituée d'environ 40 bases G ou C. Elle est créée artificiellement lors d'une étape de la PCR en utilisant une amorce présentant cette pince de 40 pb à l'extrémité 5'. Lorsque les séquences sont complètement dénaturées, cette pince maintient les deux brins attachés à l'extrémité et ils sont pratiquement arrêtés dans leur migration à cause de leur configuration spatiale.

B) Mode opératoire

Avant de pouvoir couler les gels, il convient de monter le dispositif (Fig. 16) et de préparer les solutions dénaturantes.

Deux solutions d'acrylamide sont réalisées : une sans produit dénaturant (0 %) et une totalement dénaturante (100 %, avec urée et formamide). Le gradient de dénaturant est formé par un mélange de ces deux solutions à des concentrations déterminées.

	Solution dénaturante 0 %		Solution dénaturante 100 %	
	Gel à 8 %	Gel à 6,5 %	Gel à 8 %	Gel à 6,5 %
Acrylamide/Bis 30 %	26,7 ml	21,7 ml	26,7 ml	21,7 ml
Urée	-	-	42 g	42 g
Formamide	-	-	40 ml	40 ml
TAE 50X	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

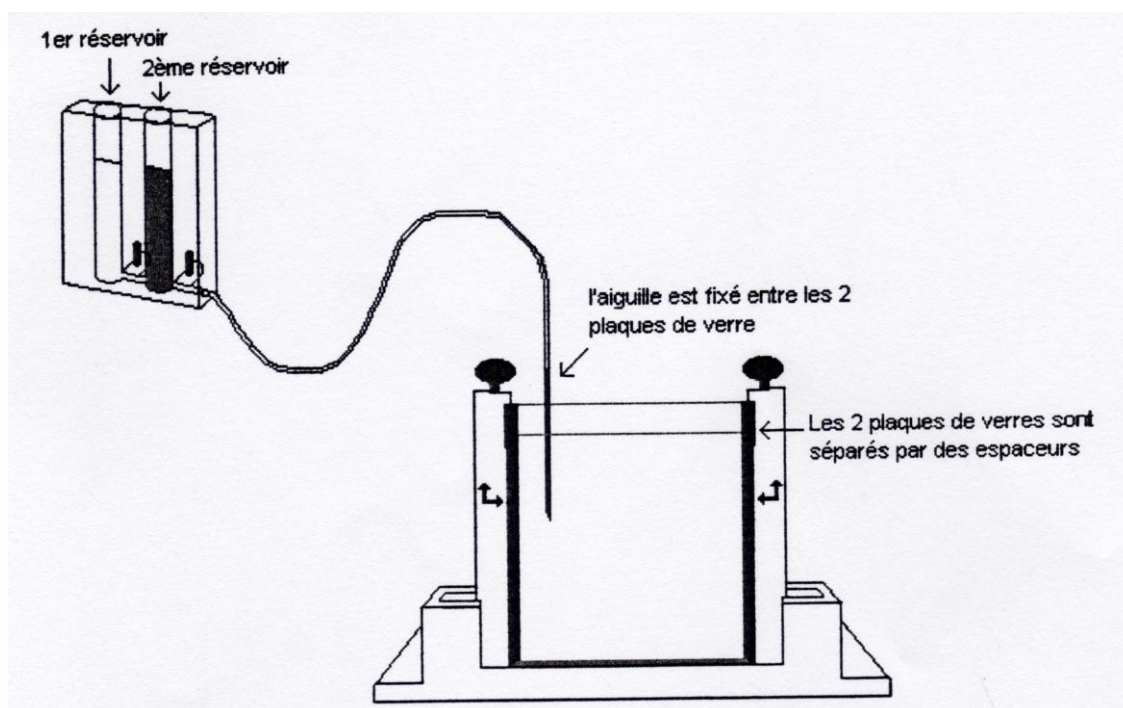


Figure 16 : Schéma du dispositif et du montage réalisé pour couler le gel (Davin, 2002).

Les solutions sont amenées à un volume de 100 ml à l'aide d'eau désionisée et filtrées avec des unités de filtration Nalgène® de maille 0,22 μm . Elles sont alors conservées à 4°C. Avant utilisation, les cristaux d'urée qui se sont formés dans la solution dénaturante à 100 % sont dissous durant quelques minutes au bain-marie à 55°C, en agitant légèrement.

Le premier gel, le gel dénaturant, est ensuite préparé. Quel que soit le gradient de dénaturation désiré (40-65 %, 30-60 %), le gel est préparé à partir des solutions dénaturantes à 0 et 100 % :

Pour 12 ml de solution	À 40 %	À 65 %	À 30 %	À 60 %
Solution à 0 %	7,2 ml	4,2 ml	8,4 ml	4,8 ml
Solution à 100 %	4,8 ml	7,8 ml	3,6 ml	7,2 ml
APS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Temed	8 μl	8 μl	8 μl	8 μl

La solution la moins dénaturante est versée dans le premier réservoir et la solution la plus dénaturante dans le second (cfr. Fig. 16). L'homogénéisation des solutions se fait à l'aide d'une puce magnétique et d'un agitateur sous le deuxième compartiment. Les deux robinets sont alors ouverts en même temps pour couler le gel. Le principe des vases communicants permet la formation du gradient. Par la suite, une couche d'eau désionisée est directement ajoutée pour que le niveau du gel soit bien horizontal et éviter le contact entre le gel et l'air (qui perturberait la polymérisation). La polymérisation s'effectue durant une heure et demi à température ambiante (toujours sous la hotte).

Afin de couler le second gel (stacking gel), il convient de d'abord évacuer la couche d'eau se trouvant au-dessus du premier gel et de placer le peigne entre les vitres mais sans l'y enfoncer. Le stacking gel est coulé selon la composition suivante et laissé à polymériser une heure en présence du peigne enfoncé à fond.

Solution dénaturante à 0 %	5 ml
APS	100 μ l
Temed	8 μ l

Après la polymérisation de ce second gel, la cuve d'électrophorèse est remplie avec du TAE 1X et préchauffée à 65°C. Les produits PCR sont mélangés à une solution de charge dans les proportions 5/1 et chargés sur le gel (de même que le marqueur). Le gel est ensuite inséré dans la cuve. La migration s'opère à 1230 V.h à 60°C pour un gel à 6,5 % (200V pendant un peu plus de 6h) ou à du 1200 V.h pour un gel à 8 % (75V pendant 16h).

Après l'électrophorèse, le gel est refroidi en plaçant les vitres sous l'eau. La plaque supérieure est retirée et la seconde, sur laquelle repose le gel, est déposée dans du tampon TAE 1X. Le Gelstar[®] (2 μ l dilué dans 15 ml d'eau distillée) est étalé sur toute la surface du gel et laissé durant 30 minutes à l'abri de la lumière, sous papier aluminium. Le Gelstar[®] est ensuite éliminé et le gel est trempé à nouveau dans du TAE 1X. Le gel est alors scanné et visualisé grâce à un appareil Fluo Imager (BioRad, USA) à 530 nm.

Pour un séquençage ultérieur, les bandes sont excisées sous UV, à l'aide d'un scalpel lavé à l'éthanol avant chaque excision, en commençant par les bandes moins visibles. Chaque bande est placée dans un tube Eppendorf[®] avec du TE⁻⁴. Ces tubes sont alors conservés à -20°C.

III.6. Séquençage et analyse des bandes DGGE

Les douze bandes excisées du gel DGGE ont été (ré)amplifiées par PCR (protocole de Muyzer *et al.*, 1993 adapté, cfr. Plus haut) et envoyées à GENOME Express pour être séquencées. Les séquences obtenues ont fait l'objet d'une analyse par le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui vise à trouver les séquences les plus similaires existant dans l'ensemble des séquences disponibles dans le monde. Le seuil de fiabilité de ce test est placé à 97,5 % de similitudes entre séquences.

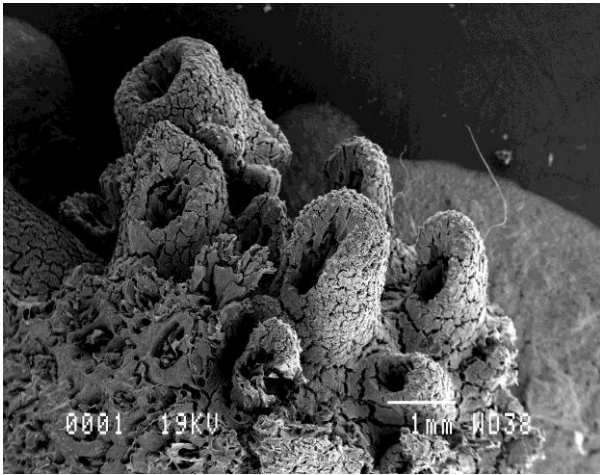


Figure 17 : Vue d'ensemble de l'échantillon n°1 (sain), *Acropora digitifera*.

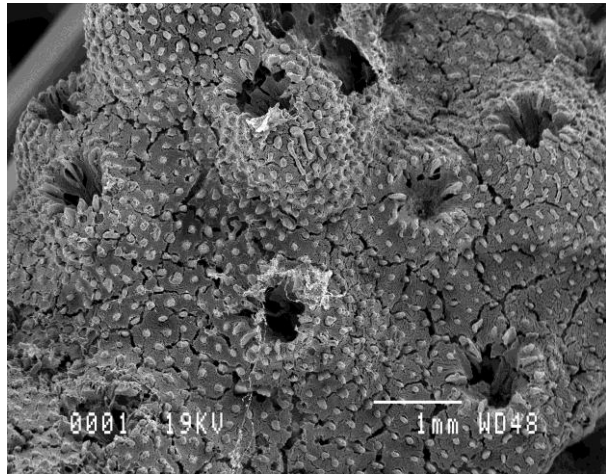


Figure 18 : Vue d'ensemble de l'échantillon n°2 (blanchi), *Acropora danai*.

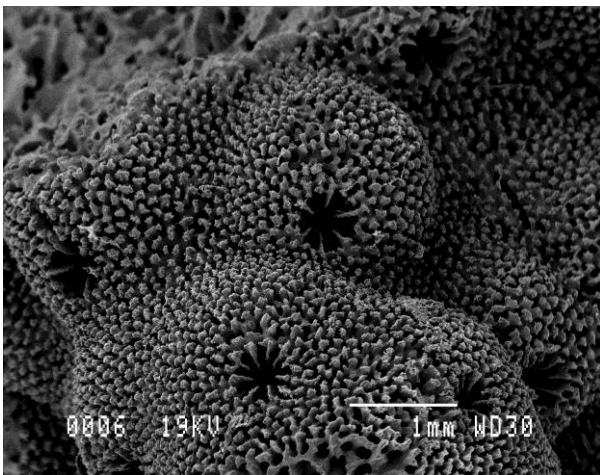


Figure 19 : Vue d'ensemble de l'échantillon n°5 (blanchi), *Acropora humilis*.

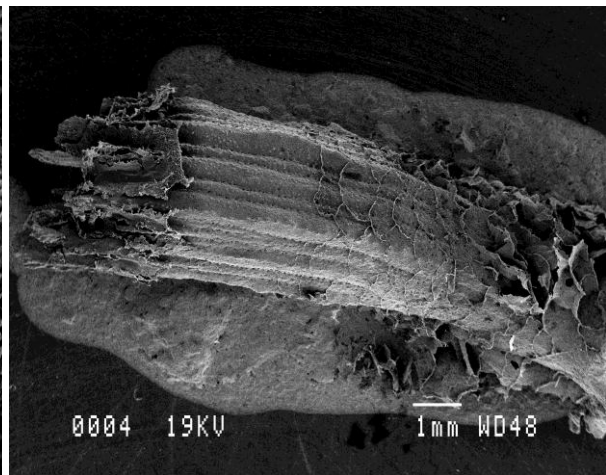


Figure 20 : Vue d'ensemble de l'échantillon n°3 (blanchi), *Echinopora prob. hirsutissima*.

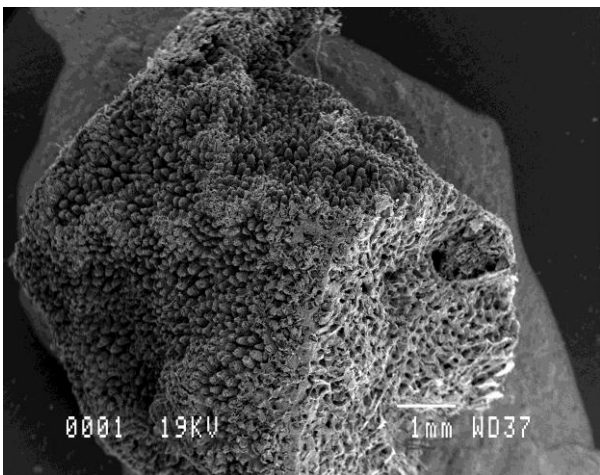


Figure 21: Vue d'ensemble de l'échantillon n°4 (blanchi), *Porites (Synarea) rus*.

Chapitre IV : RÉSULTATS

I. Observations en microscopie électronique

I.1. Microscope électronique à balayage (SEM)

➤ Coraux sains/blanchis prélevés à Madagascar (novembre 2005).

Pour chaque échantillon, une vue d'ensemble a été réalisée. Ces photos ont permis de confirmer, grâce à la morphologie du squelette, l'identification des espèces qui avait été réalisée à l'œil nu et au binoculaire précédemment. L'espèce n°1, *Acropora digitifera* (Fig. 17), est représentée par des colonies de type massif à branchu, de même que l'espèce n°2, *Acropora danai* (Fig. 18) et l'espèce n°5, *Acropora humilis* (Fig. 19).

Acropora digitifera (sp. 1) est caractérisé par des colonies branchues ou cespiteuses avec un attachement central ou latéral. Les colonies branchues ont habituellement une base fusionnée avec des branches courtes. Les corallites¹ radiaux sont tubulaires, de 1,3 à 2,4 mm de diamètre, avec des ouvertures arrondies ou divisées en 2, s'ouvrant parfois comme des lèvres. Ils sont similaires ou variés en taille et sont généralement arrangés en lignes. Le coenosteum², sur et entre les corallites, consiste en des spinules denses avec une structure réticulée bien visible (Veron *et al.*, 1977).

Chez *Acropora danai* (sp. 2), les colonies possèdent des branches épaisses qui s'étalent horizontalement, proliférant de façon distale en petites branches courtes et obliques. Les corallites sont de formes et de tailles variées, dans la masse ou tubulaires, jusque 3 mm de haut, avec des ouvertures circulaires ou en forme de narine. Ils sont fortement dentés et les septa³ sont généralement proéminents. Les corallites axiaux sont tubulaires, arrondis, de 2 à 2,5 mm de diamètre, avec des calices⁴ de 0,7 à 1,2 mm de diamètre, à deux cycles de septa. Tous les corallites possèdent des costae⁵ qui portent des épines émoussées (Veron *et al.*, 1977).

Acropora humilis (sp. 5) est constitué de colonies branchues ou cespiteuses. Les branches sont digitées, en fuseau, et varient beaucoup en épaisseur. Les corallites radiaux sont généralement de deux tailles, avec les plus grands devenant plus longs et plus étendus à travers la base des branches. Les corallites de petite taille sont intercalés entre les plus gros. Les corallites axiaux font 3 à 8 mm de diamètre avec des calices de

¹ Les corallites sont les parties du squelette qui soutiennent individuellement les différents membres de la colonie (cf. Fig.1 de l'annexe 2).

² Le coenosteum est le squelette situé entre les corallites (polypes).

³ Septum : fine séparation entre 2 cavités ou masses tissulaires au sein d'un organisme ; les septa divisent l'intérieur du calice.

⁴ Le calice correspond à l'ouverture du corallite ; cavité dans laquelle est abrité le polype.

⁵ Les costae sont les rides formées par les prolongements des septa le long du coenosteum. (Poulicek, 2006)

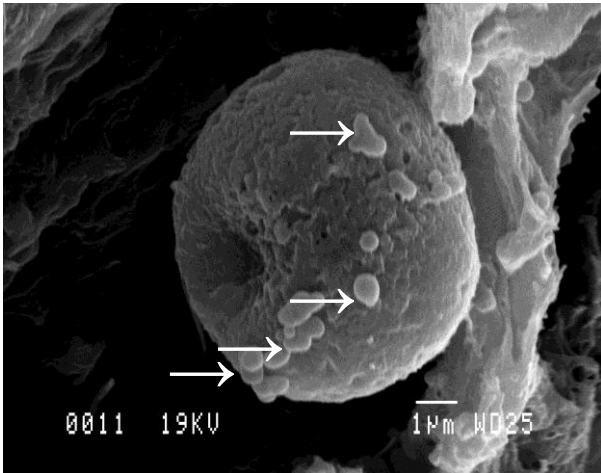


Figure 22 : Zooxanthelle avec quelques bactéries (flèches) à sa surface.

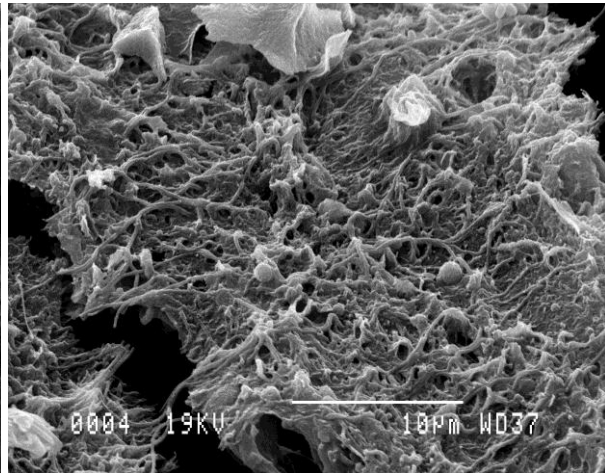


Figure 23 : Structure fibreuse du mucus formant de véritables réseaux. La présence de bactéries filamenteuses peut être envisagée.

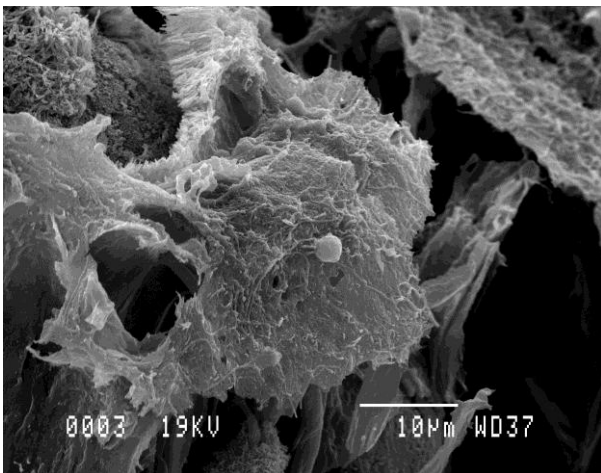


Figure 24 : Zone de mucus se détachant du corail (floc), avec une bactérie sphérique au centre de la photo.

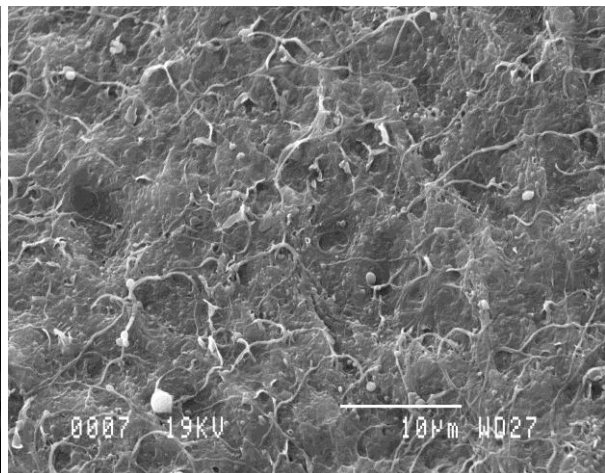


Figure 25 : Allure générale du mucus sur *Acropora digitifera* sain ; présence de quelques bactéries.

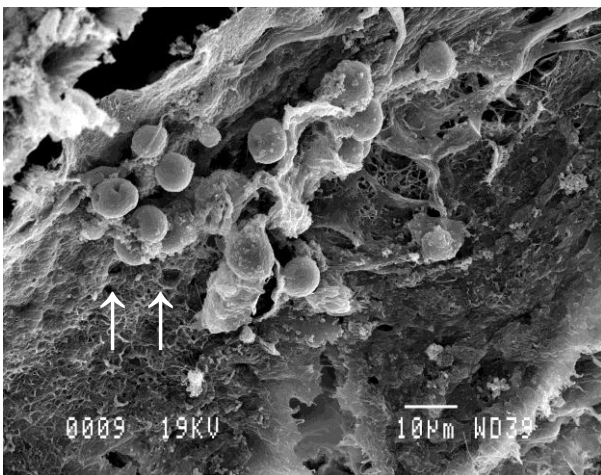


Figure 26 : zooxanthelles au niveau du mucus de *A. digitifera* sain. Les flèches indiquent des trous de taille similaire au diamètre des zooxanthelles.

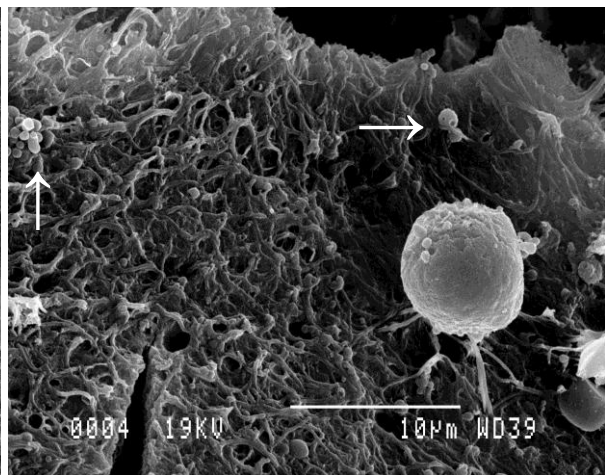


Figure 27 : Zooxanthelles (à droite de l'image) et structure plus fibreuse du mucus (sur la gauche) chez *A. digitifera* blanchi, avec un certain nombre de bactéries (flèches).

1,1 à 1,6 mm de diamètre. Le coenosteum, sur et entre les corallites radiaux, est réticulé et/ou constitué de costae, avec des spinules élaborés et aplatis latéralement (Veron *et al.*, 1977).

L'espèce n°3, *Echinopora hirsutissima* (Fig. 20), de la famille des Faviidae, présente une forme beaucoup plus particulière. Les colonies sont branchues, dendroïdes⁶, avec des dimensions allant jusque 20 x 15 cm. Les branches mesurent jusque 40 mm de diamètre, diminuant jusqu'à la pointe qui est une expansion pointue ou aplatie des costae exothécaux. Les corallites sont circulaires, jusque 4 mm de diamètre, cylindriques ou en forme de cônes tronqués dépassant plus ou moins des branches. Les septa sont généralement en trois cycles, les deux premiers rejoignant la columelle⁷ (Veron *et al.*, 1977).

Enfin, *Porites rus*, l'espèce n°4 (Fig. 21) est d'une forme coloniale plus massive. Les coralla⁸ peuvent être plats, étendus horizontalement de façon laminaire, ou submassifs, composés de lobes en forme de colonne épaisse avec une jupe laminaire étendue à la base, ou branchus, ou irrégulièrement massifs. Les branches ont des formes irrégulières et s'anastomosent⁹ généralement, formant parfois un plateau continu. Les calices sont petits (<0,7 mm de diamètre). Les corallites sont concentrés dans certaines zones du corallum, comme les bords, les parties concaves entre les branches et dans les creux entre les rides ou crêtes. Ils sont séparés les uns des autres par le développement d'un coenosteum important et réticulé (Veron *et al.*, 1977).

Des observations à grossissement plus élevé ont permis d'analyser le mucus et de révéler la présence de bactéries (de 0,5 à 1 ou 2 µm de diamètre) et de cellules de taille plus importante, vraisemblablement des zooxanthelles, algues symbiotiques sphériques d'environ 8 µm de diamètre (Fig. 22). À la surface du mucus sont observés de véritables réseaux (Fig. 23). Ces réseaux pourraient être un ensemble de bactéries filamenteuses. Cependant, il semblerait plus vraisemblable qu'un artéfact de préparation des échantillons ait rendu le mucus d'une texture fibreuse. Certains échantillons, tels que l'échantillon 4 sain, ne possédaient plus beaucoup de mucus en surface à la suite des diverses étapes de préparation à l'observation. D'autres échantillons, par contre, sont encore tout à fait munis de leur couche muqueuse qui présente un aspect fibreux bien conservé (Fig. 24).

Les photos les plus représentatives de l'ensemble des observations réalisées sont reprises dans le présent travail. Il faut au préalable signaler que l'échantillon appelé 1S (sain) semble être au début d'une phase de blanchiment. En effet, sur la photo de l'échantillon « frais » (Fig. 13, pg. 20), un aspect rosé et blanchi peut être observé à certains endroits. Cet échantillon présente, comme sur l'image 25, quelques bactéries. On retrouve également toute une série de zooxanthelles à la figure 26. Notons, sur cette dernière, la présence de « trous ou perforations » de taille similaire à celle des algues présumées. L'homologue blanchi de cet échantillon héberge de nombreuses bactéries (Fig. 27) et des zooxanthelles sont repérables à la surface du mucus ou au niveau de

⁶ Dendroïde : qui a la forme d'un arbre (www.le-dictionnaire.org).

⁷ La columelle est la colonne calcaire créée par le polype, sous lui, lors de la croissance de la colonie.

⁸ Le corallum est le nom utilisé pour le squelette de la colonie en général.

(Poulicek, 2006)

⁹ Anastomose : réunion bout à bout ou par segment intermédiaire de deux conduits (Le Petit Larousse Illustré, 2002).

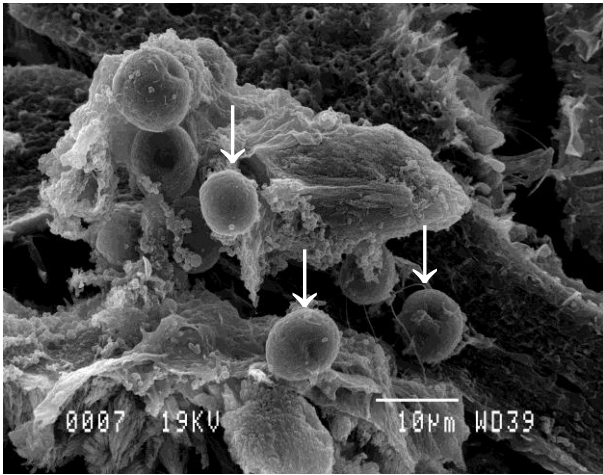


Figure 28 : Zooxanthelles au niveau du mucus de *A. digitifera* blanchi.

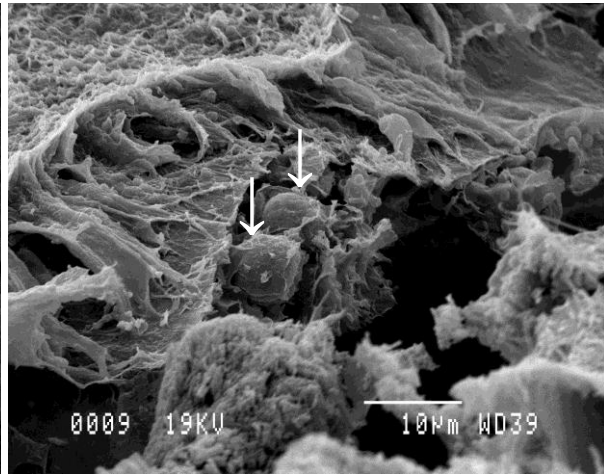


Figure 29 : Zooxanthelles visibles dans une zone de déchirure du mucus chez l'individu blanchi de *A. digitifera*.

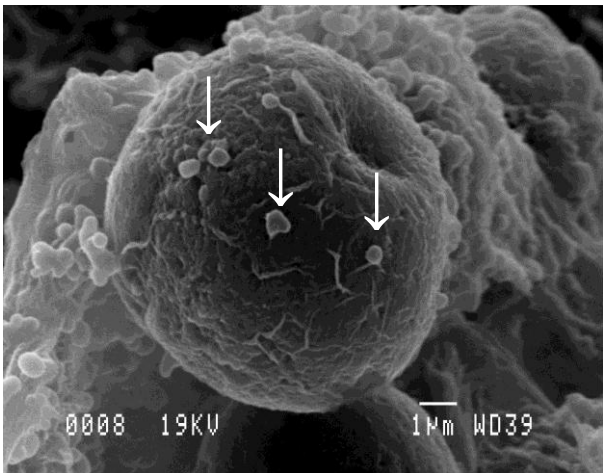


Figure 30 : Gros plan d'une zooxanthelle chez *A. digitifera* blanchi. L'algue héberge quelques bactéries à sa surface (flèches).

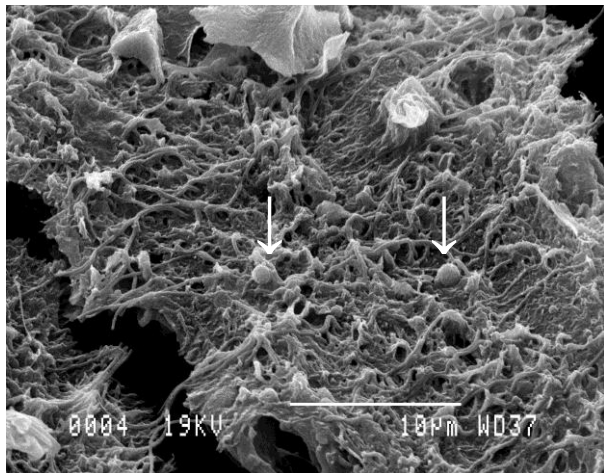


Figure 31 : Bactéries (flèches) dans la structure fibreuse du mucus de *Acropora danai* blanchi.

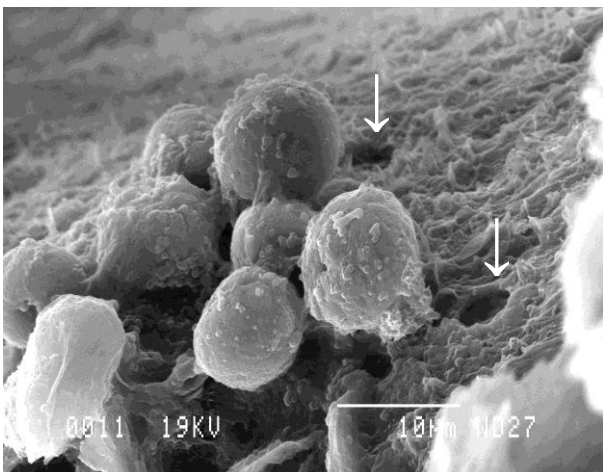


Figure 32 : Zooxanthelles sur le mucus de *Acropora danai* blanchi. Les flèches indiquent les trous supposés être créés à la suite de la sortie de zooxanthelles.

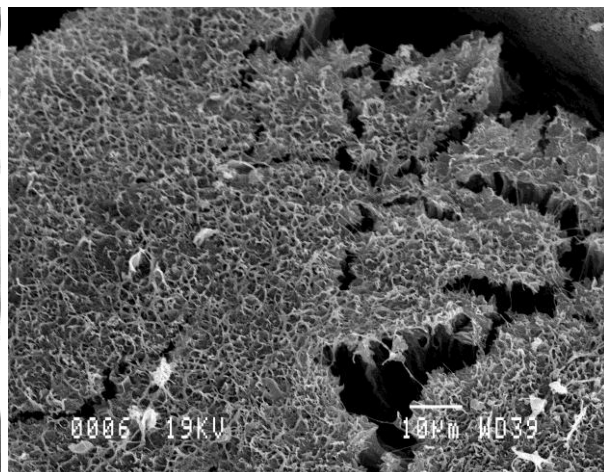


Figure 33 : Allure générale du mucus de *Acropora danai* sain.

fractures -ou plutôt de zones déchirées- de cette couche de mucopolysaccharides (Fig. 27, 28 et 29). Notons également que des bactéries sont observées à la surface des zooxanthelles (Fig. 30).

L'individu blanchi du couple n°2 (*Acropora danai*) présente de nombreuses bactéries (Fig. 31) et un certain nombre de zooxanthelles (Fig. 32). Notons ici également des trous suggérant des zones de sortie de zooxanthelles. L'échantillon sain héberge aussi des bactéries (Fig. 33), mais aucune zooxanthelle n'a pu être mise en évidence.

Beaucoup de bactéries ont été remarquées sur l'échantillon blanchi du prélèvement 3 (*Echinopora prob. hirsutissima*), la plupart étant des bactéries sphériques (Fig. 34). À nouveau, des espaces creux (trous) de l'ordre de 8-10 µm de diamètre sont apparents (Fig. 35). Cet échantillon a aussi la particularité de présenter à sa surface, les flocs de mucus caractéristiques qui se détachent et sont libérés dans la colonne d'eau (comme cela a été évoqué dans l'introduction, pg. 5) (Fig. 36). Par ailleurs, des zooxanthelles ont été retrouvées dans l'individu blanchi mais également dans l'individu sain (Fig. 37).

Les coraux du prélèvement n°4 (*Porites rus*) possèdent un mucus très fibreux (Fig. 38). Des zooxanthelles sont retrouvées à la surface des 2 échantillons (sain et blanchi) (Fig. 39 et 40). Par ailleurs, la figure 41 montre que le mucus est chargé de bactéries et de quelques zooxanthelles. Cette photo montre aussi que le mucus peut facilement se détacher du polype.

Le cinquième groupe d'échantillons présente, aussi bien pour l'individu blanchi que pour l'individu sain, un certain nombre de bactéries et quelques rares zooxanthelles (Fig. 42 et 43). Il faut toutefois noter que le nombre de bactéries et de zooxanthelles observé semble nettement inférieur à celui des autres échantillons.

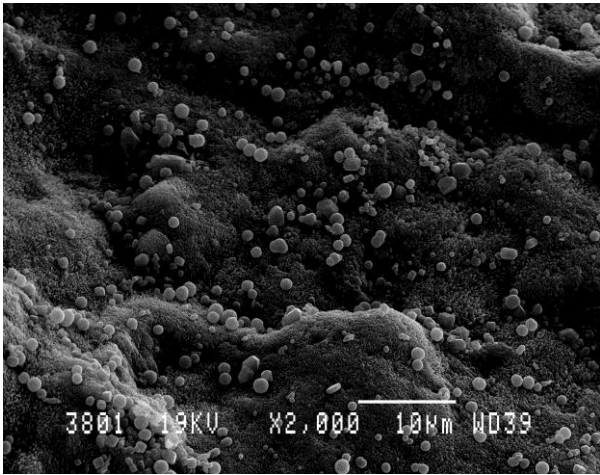


Figure 34 : Nombreuses bactéries sphériques à la surface du mucus de *Echinopora blanchi*.

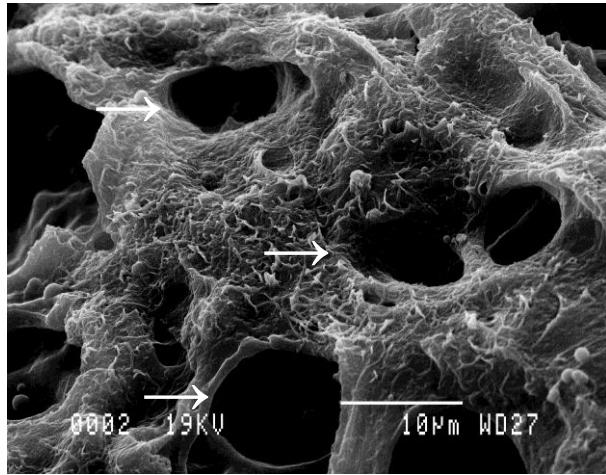


Figure 35 : Trous d'environ 8-10 µm de diamètre dans le mucus de *Echinopora blanchi* (flèches), suggérant des zones de sortie de zooxanthelles.

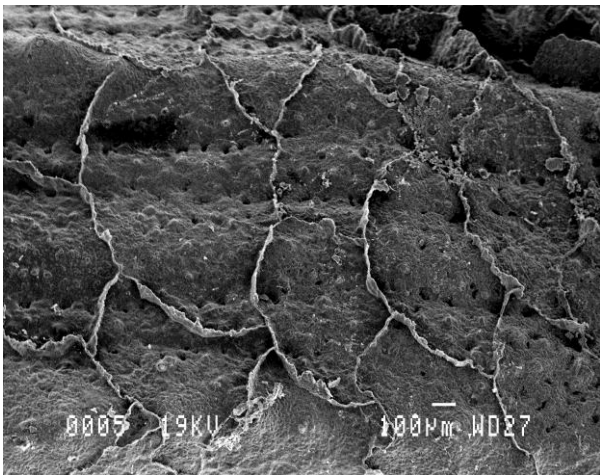


Figure 36 : Structure particulière du mucus, en floccs, chez *Echinopora blanchi*.

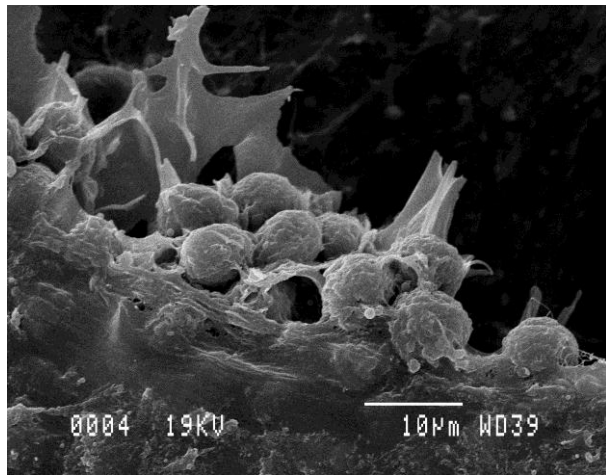


Figure 37 : Zooxanthelles dans une zone de fracture du mucus de *Echinopora* sain.

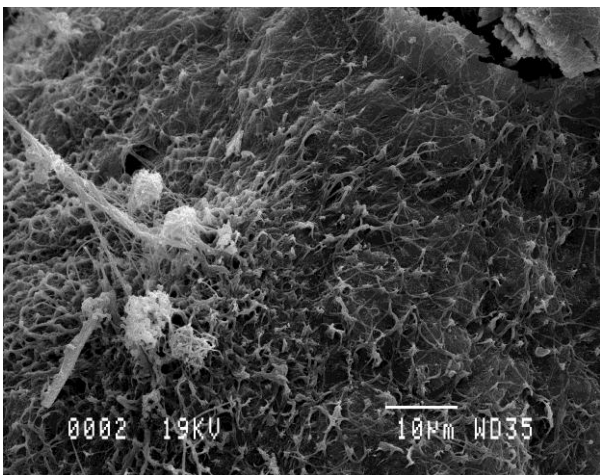


Figure 38 : Allure du mucus de *Porites rus* sain.

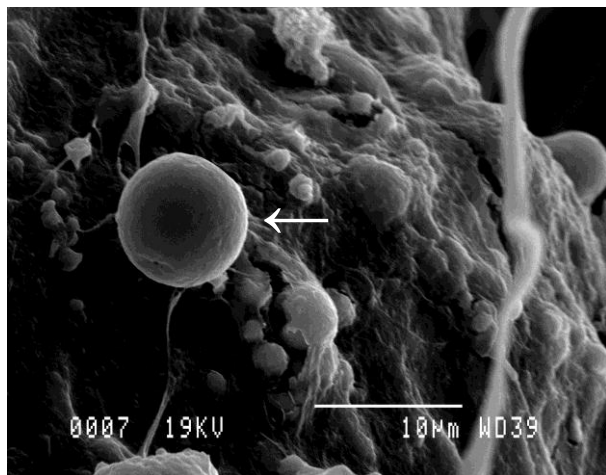


Figure 39 : Zooxanthelle (flèche) et bactéries sphériques (plus petites) chez *Porites rus blanchi*.

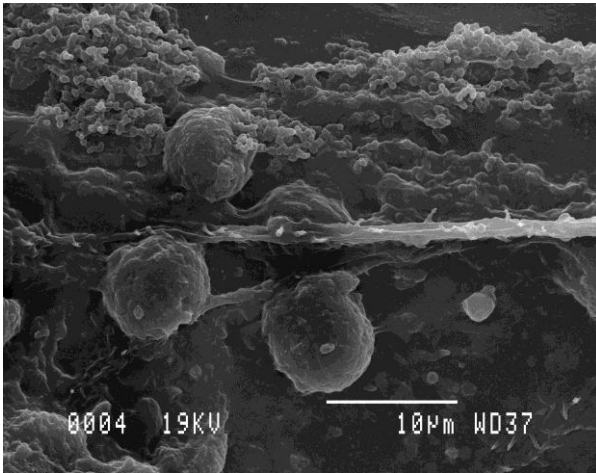


Figure 40 : Zooxanthelles au niveau du mucus de *Porites rus* sain, et nombreuses bactéries.

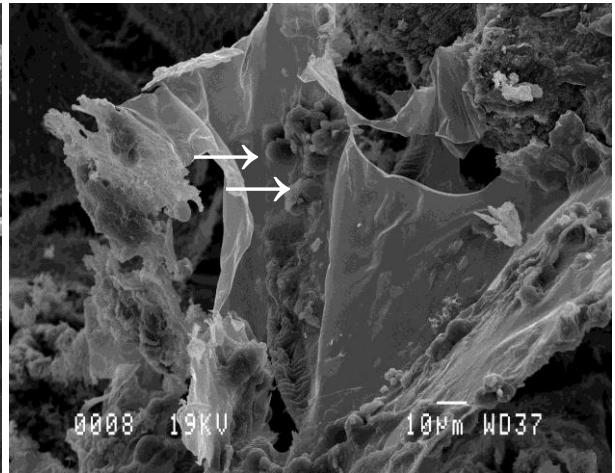


Figure 41 : Floccule de mucus de *Porites rus* sain en phase de détachement, avec des zooxanthelles (flèches) et des bactéries à sa surface.

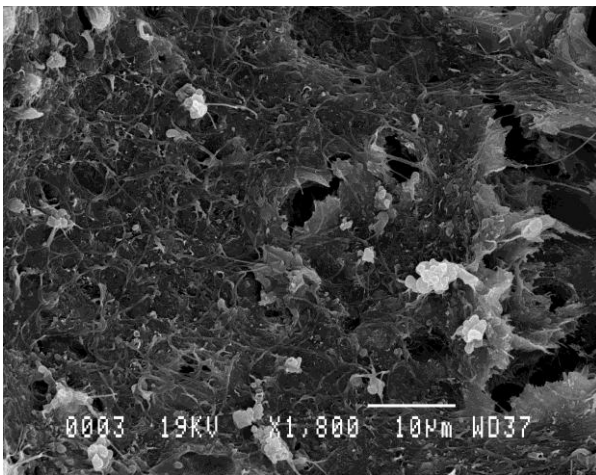


Figure 42 : Mucus de *Acropora humilis*.

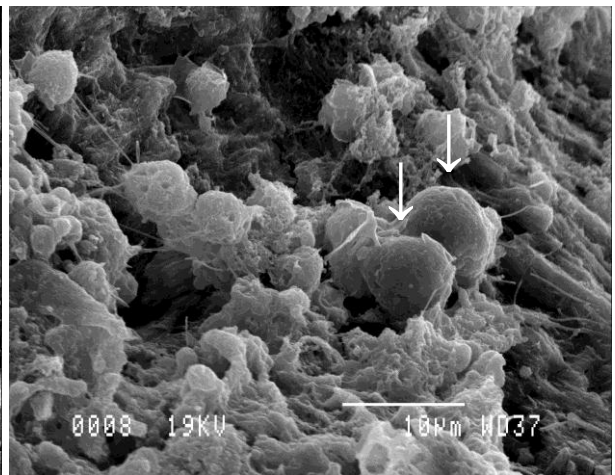


Figure 43 : Zooxanthelles (flèches) et bactéries au sein du mucus de *Acropora humilis*.

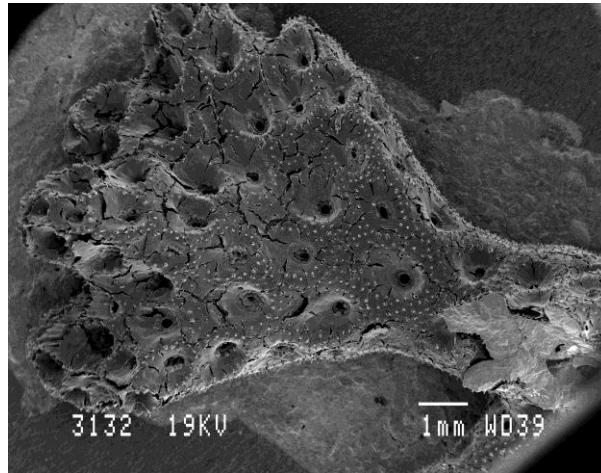


Figure 44 : Vue générale d'un échantillon de *Pocillopora damicornis* (sain).

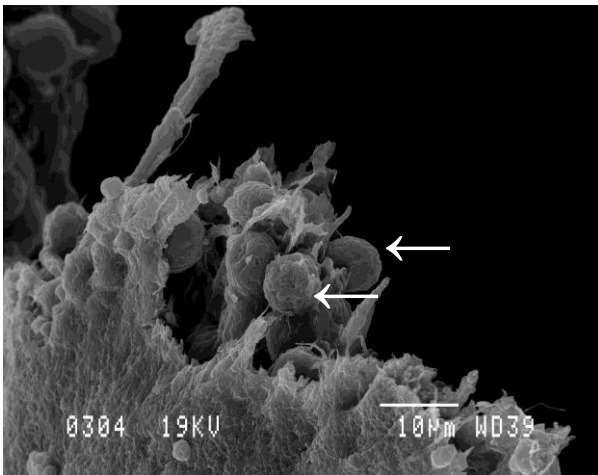


Figure 45 : Zooxanthelles (flèches) présentes dans une zone de fracture du mucus chez *P. damicornis* blanchi.

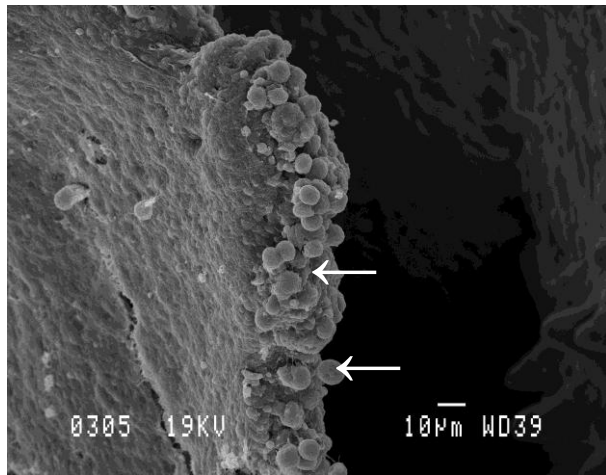


Figure 46 : Zooxanthelles (flèches) présentes dans une zone de fracture du mucus chez *P. damicornis* blanchi.

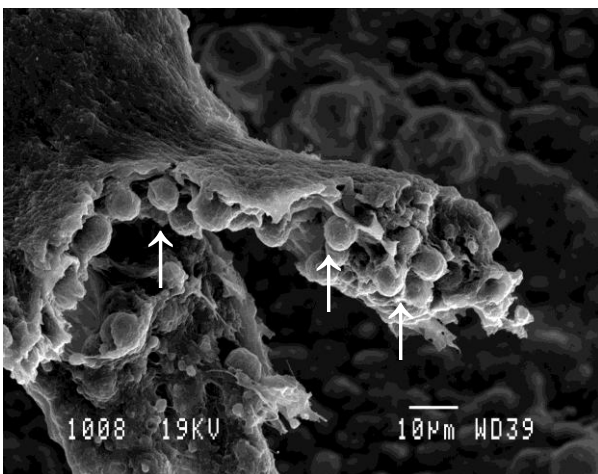


Figure 47 : Zooxanthelles (flèches) présentes dans une zone de fracture du mucus chez *P. damicornis* blanchi.

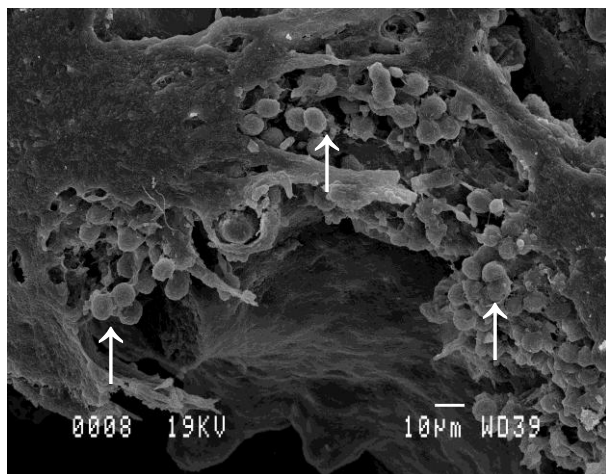


Figure 48 : Zooxanthelles (flèches) présentes dans une zone de fracture du mucus chez *P. damicornis* blanchi.

➤ Échantillons de coraux de Nausicaà

Tous ces échantillons d'aquarium sont issus de la même espèce de corail (*Pocillopora damicornis*, Fig. 44). L'ensemble des photos vont, dès lors, être traitées par « état ».

Le mucus des organismes blanchis héberge de nombreuses zooxanthelles, surtout au niveau de zones de fracture/déchirure du mucus (Fig. 45, 46, 47, 48 et 49). La surface du mucus paraît relativement « propre », par rapport aux échantillons du milieu naturel, avec très peu de bactéries et une structure du mucus beaucoup moins fibreuse (Fig. 50). Cependant, certains échantillons blanchis présentent des particules d'allure minérale à leur surface (Fig. 51) ou des trous de diamètre similaire à celui des zooxanthelles (Fig. 52).

Les individus sains sont différents les uns des autres en fonction des caractéristiques observées. Deux d'entre eux possèdent un mucus relativement « lisse » et régulier (Fig. 53 et 54) contenant de nombreuses zooxanthelles (Fig. 55 et 56). Certaines zones présentent également des perforations particulières (Fig. 54). Les deux derniers échantillons observés renferment quelques bactéries et des organismes ressemblant à des flagellés (Fig. 57). Par ailleurs, le nombre d'algues dans le mucus semble plus restreint (Fig. 58 et 59).

➤ Souches bactériennes (BCCM/LMG, Université de Gand)

À la suite des fortes chaleurs des dernières semaines du mois de juillet, en particulier au niveau de la salle de microscopie électronique, et à des dérèglements intempestifs du microscope, la mise au point des photos de bactéries a été rendue très difficile. La qualité de ces photos est, par conséquent, relative.

La première des trois souches de bactéries, *Vibrio shiloi* AK-1, présente une forme cylindrique incurvée (Fig. 60). La souche n°3, *Vibrio coralliilyticus* YB-2, possède le même genre de forme et de taille que la précédente (Fig. 61 et 62). La seconde souche de *Vibrio coralliilyticus*, YB-1, semble, quant à elle, plus petite que les deux précédentes (Fig. 63 et 64).

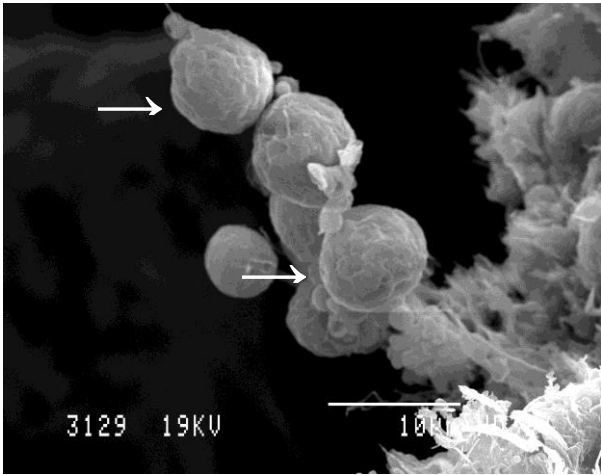


Figure 49 : Zooxanthelles (flèches) présentes dans une zone de fracture du mucus chez *P. damicornis* blanchi.

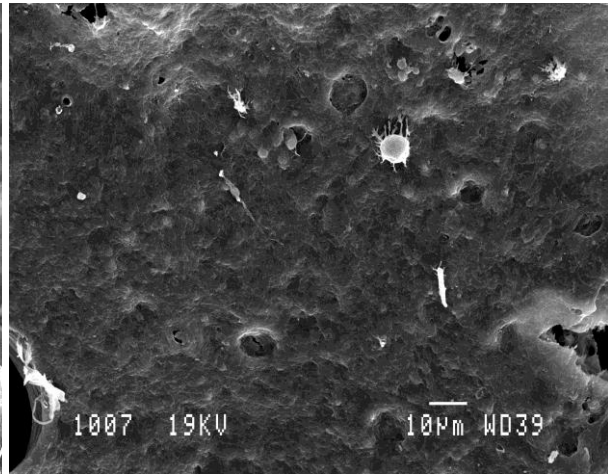


Figure 50 : Allure du mucus d'un individu de *P. damicornis* blanchi. Présence d'une zooxanthelle (plus claire, ~ 8 µm) sur la surface.

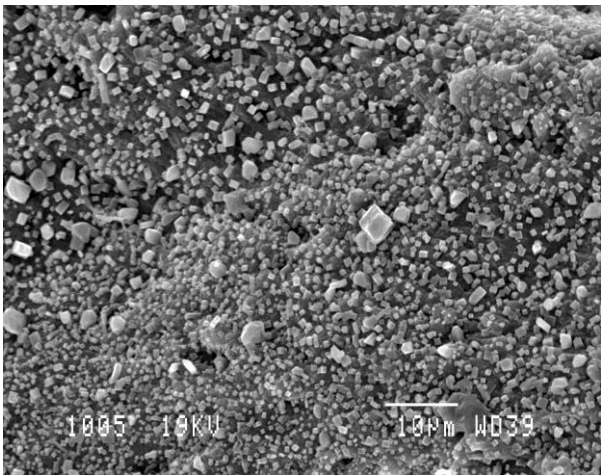


Figure 51 : Particules de type minéral à la surface d'un échantillon de *P. damicornis* blanchi.

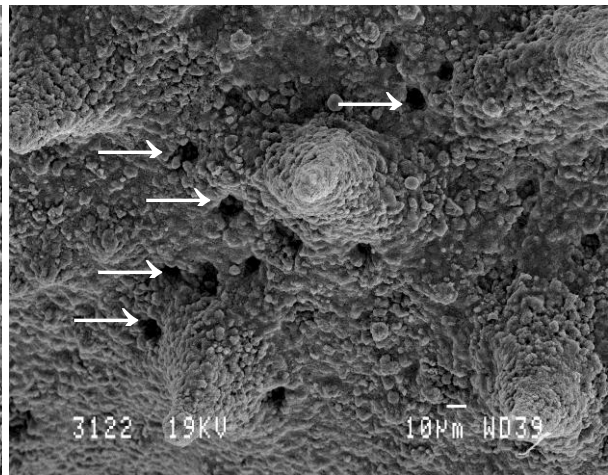


Figure 52 : Echantillon de *P. damicornis* blanchi, présentant des trous à la surface de son mucus (flèches), d'un diamètre similaire à celui des algues symbiotiques (8-10 µm) .

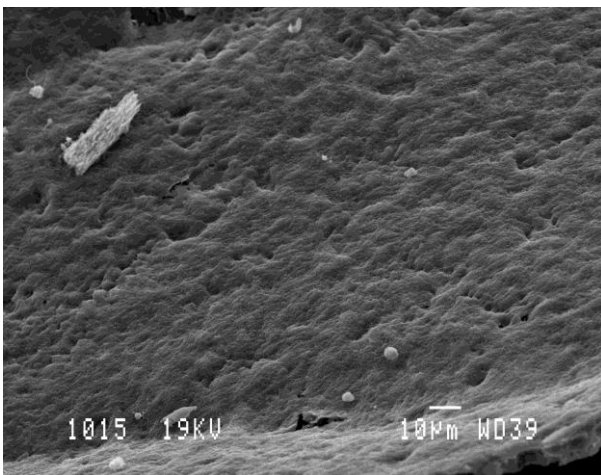


Figure 53 : Allure lisse du mucus d'un organisme sain de *P. damicornis*.

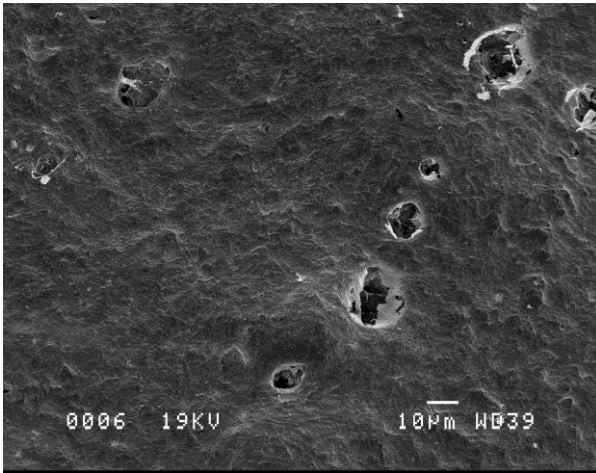


Figure 54 : Allure lisse du mucus d'un organisme sain de *P. damicornis*. Présence de trous.

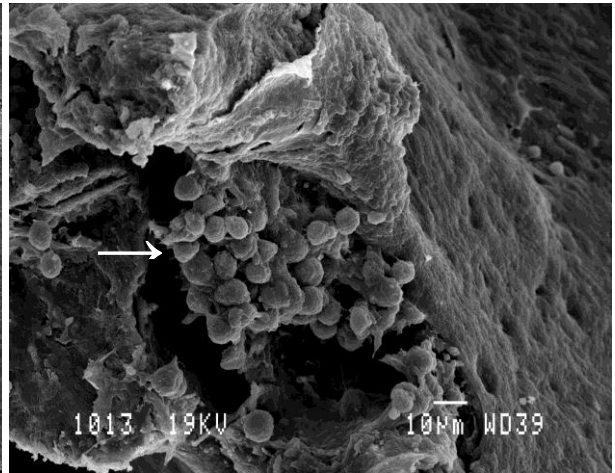


Figure 55 : Nombreuses zooxanthelles (flèche) dans le mucus de *P. damicornis* sain.

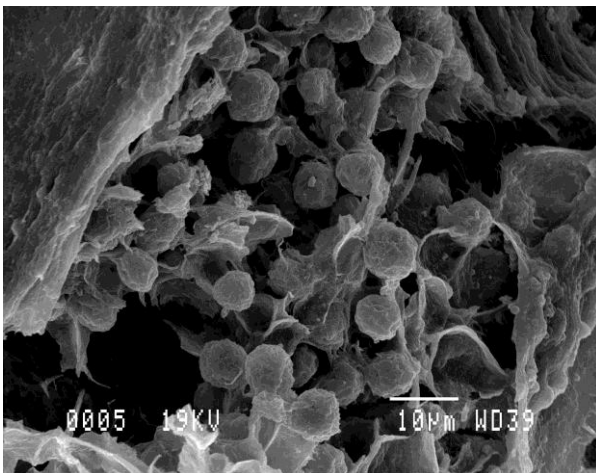


Figure 56 : Zooxanthelles dans le mucus de *P. damicornis* sain.

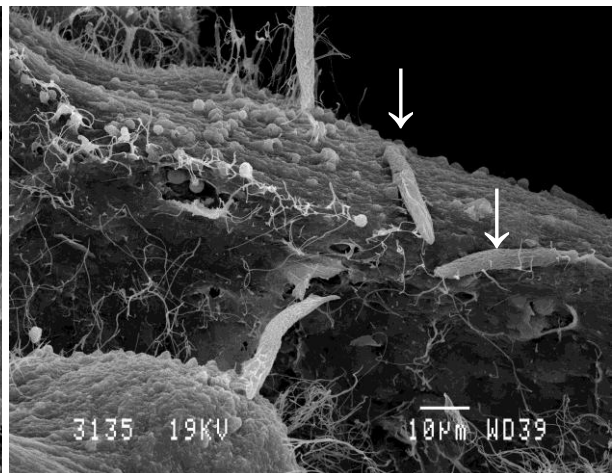


Figure 57 : Bactéries et flagellés (flèches) sur le mucus de *P. damicornis* sain.

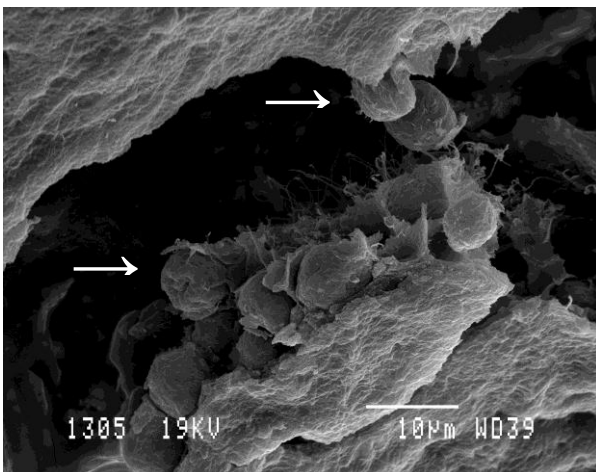


Figure 58 : Zooxanthelles (flèches) dans le mucus de *P. damicornis* sain.

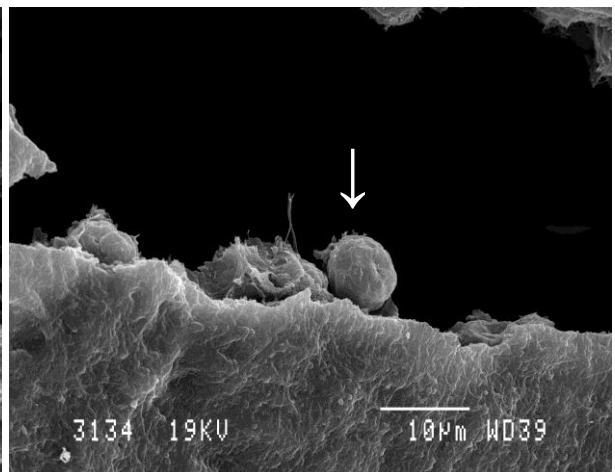


Figure 59 : Zooxanthelles (flèches) dans le mucus de *P. damicornis* sain.

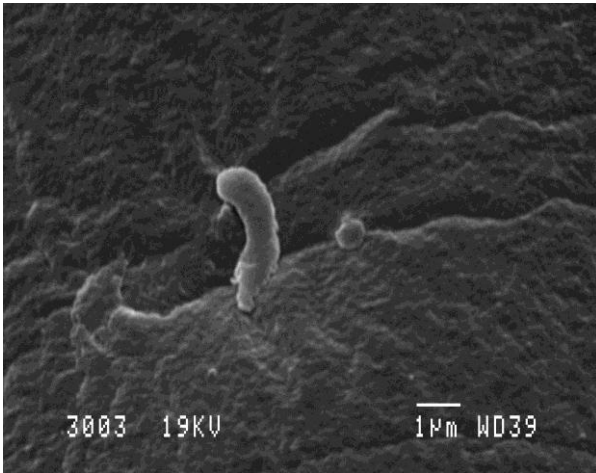


Figure 60 : Bactérie *Vibrio shilonii* AK-1 de culture pure, en microscopie électronique à balayage.

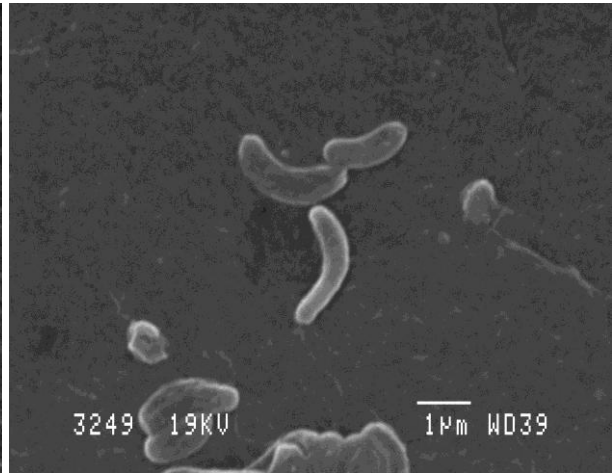


Figure 61 : Bactérie *Vibrio coralliilyticus* YB-2 de culture pure, en microscopie électronique à balayage.

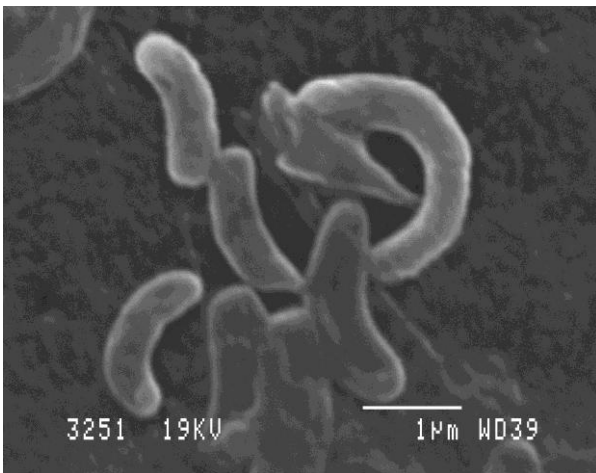


Figure 62 : Bactérie *Vibrio coralliilyticus* YB-2 de culture pure, en microscopie électronique à balayage.

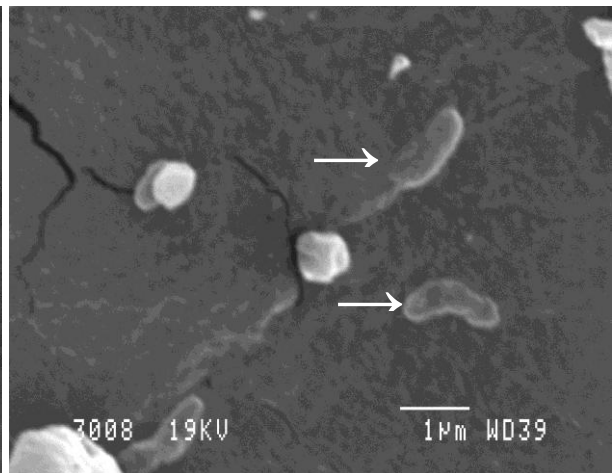


Figure 63 : Bactérie *Vibrio coralliilyticus* YB-1 de culture pure (flèches), en microscopie électronique à balayage. Cette souche semble être de plus petite taille que les deux précédentes.

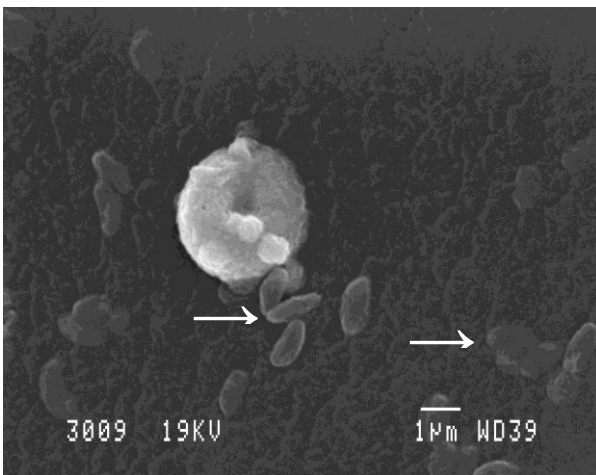


Figure 64 : Bactérie *Vibrio coralliilyticus* YB-1 de culture pure (flèches), en microscopie électronique à balayage.

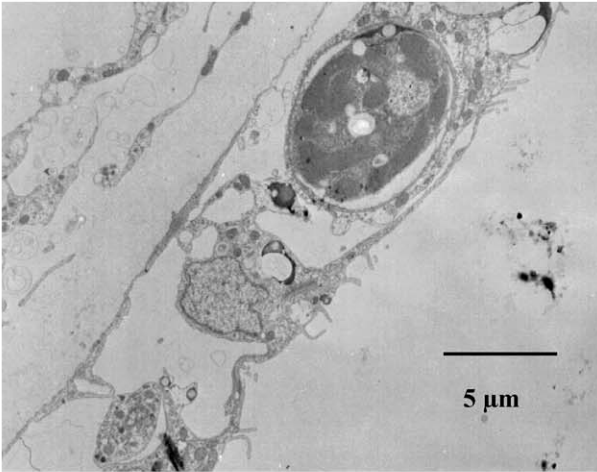


Figure 65 : Aspect général de l'endoderme d'*Acropora digitifera blanchi*.

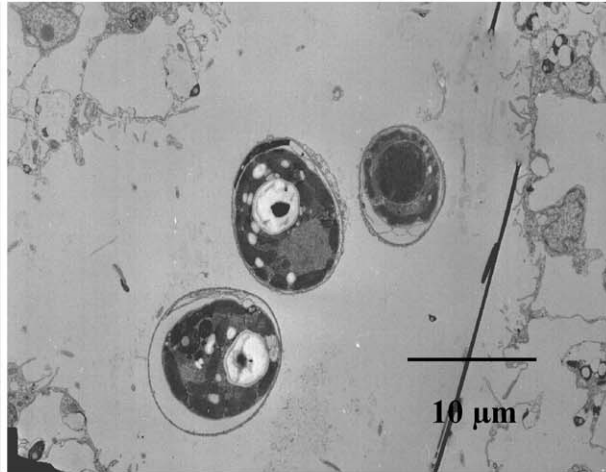


Figure 66 : Zooxanthelles libres, détachées de l'endoderme d'*Acropora digitifera blanchi*.

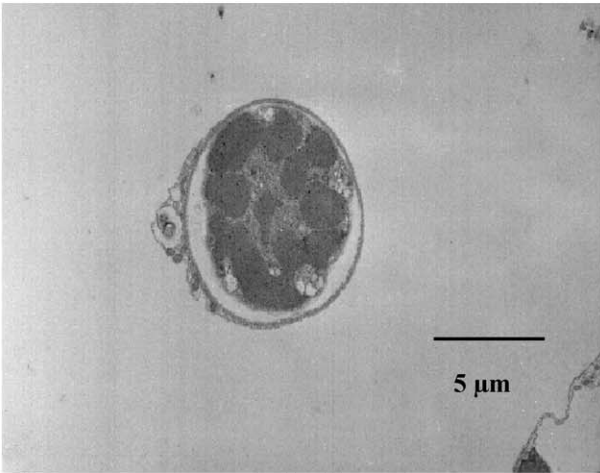


Figure 67 : Zooxanthelle libre, détachée de l'endoderme d'*Acropora digitifera blanchi*. L'algue semble emporter une partie de la cellule hôte qui l'hébergeait.

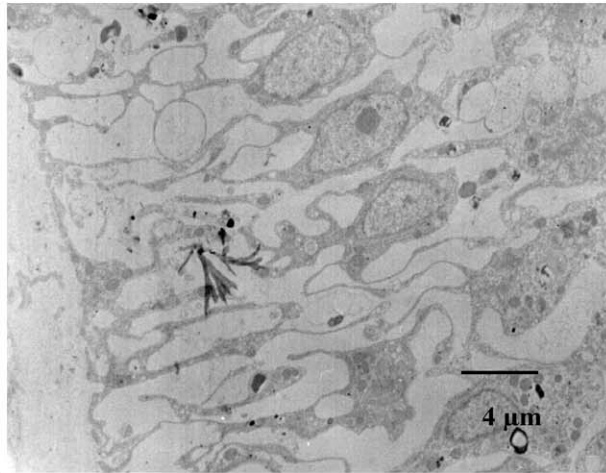


Figure 68 : Tissu ectodermique d'*Acropora digitifera* sain.

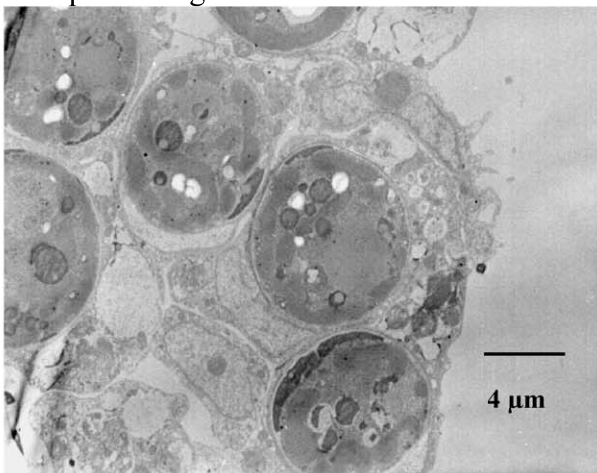


Figure 69 : Endoderme d'*Acropora digitifera* sain, muni de ses zooxanthelles.

I.2. Microscope électronique à transmission (TEM)

➤ Coraux sains/blanchis prélevés à Madagascar (novembre 2005).

Les photos réalisées en microscopie électronique à transmission sur les 5 espèces de coraux sont, comme pour celles du microscope électronique à balayage, présentées ci-après, par couple (espèce) sain/blanchi. Des interprétations sont suggérées mais les coupes font 70 nm d'épaisseur, elles ne sont, par conséquent, pas forcément représentatives de l'ensemble de l'organisme. En effet, celui-ci peut avoir une répartition relativement hétérogène de ses algues symbiotiques et les infections bactériennes ou virales potentielles peuvent se situer dans des zones préférentielles de l'individu. Autrement dit, le volume observé est inférieur à 1.10^{-4} mm³ (70 nm d'épaisseur x surface d'une grille de 2 mm de diamètre) pour chaque échantillon de corail soit moins de 1/1.000.000ième du volume total de l'animal (si on considère un polype de 0,3 cm de rayon de base et 1 cm de haut) ou moins de 1/4000ième du volume d'un tentacule (pour un tentacule de 0,5 mm de rayon de section et de 2 mm de long, par exemple). La portion de l'individu observé est donc infime par rapport au volume total de l'organisme considéré.

L'échantillon n°1 (*Acropora digitifera*) blanchi présente des tissus relativement endommagés (Fig. 65 et 66). Certaines zooxanthelles se retrouvent d'ailleurs libres, détachées de l'endoderme corallien (Fig. 66 et 67). L'algue semble emporter une partie de la cellule hôte qui l'hébergeait. L'individu sain de la même espèce paraît présenter également des tissus en régression (Fig. 68) mais il possède cependant plus de zooxanthelles au sein de son endoderme (Fig. 69). Aucune bactérie et aucun virus n'a pu être observé.

La coupe fine de l'échantillon n°2 (*Acropora danai*) sain était très abîmée, ce qui rendait les observations difficiles. Aucune photo n'a donc été prise pour cet individu. Son homologue blanchi présente, comme pour l'espèce 1, des tissus en cours de dégradation (Fig. 70) avec des zooxanthelles à différents stades de régression et de détachement par rapport aux cellules hôtes (Fig. 71 et 72). On peut y observer une structure membranaire qui n'est plus bien conservée.

Les détachements cellulaires observés ci-dessus pourraient provenir d'un problème de fixation. Les coupes ne sont cependant pas déchirées à ces endroits.

Chez *Echinopora hirsutissima* (échantillon n°3), l'organisme sain présente beaucoup plus de zooxanthelles et en « meilleure santé » (Fig. 73) que l'individu blanchi correspondant (Fig. 74 et 75). Chez ce dernier, l'endoderme semble parcouru de trous (Fig. 74). Ces trous pourraient représenter la place laissée par des zooxanthelles expulsées ou dégradées. De plus, la membrane vacuolaire de la cellule hôte et la paroi de l'algue endosymbiotique ne sont plus contiguës (Fig. 75). Par ailleurs, on peut également observer que la structure interne de l'algue s'avère affectée et que des composés de type minéral et des petites vésicules en bordure de zooxanthelle apparaissent (Fig. 75). Cette manifestation pourrait être le signe d'une dégénérescence de la cellule.

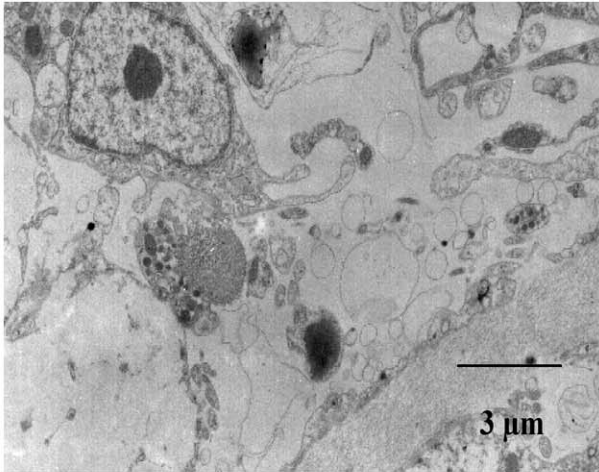


Figure 70 : Ectoderme d'*Acropora danai* blanchi, manque de cohésion entre les structures cellulaires.

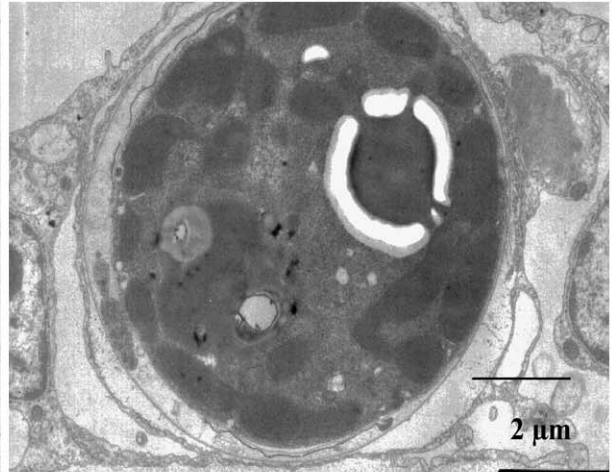


Figure 71 : Zooxanthelle dans l'endoderme d'*Acropora danai* blanchi.

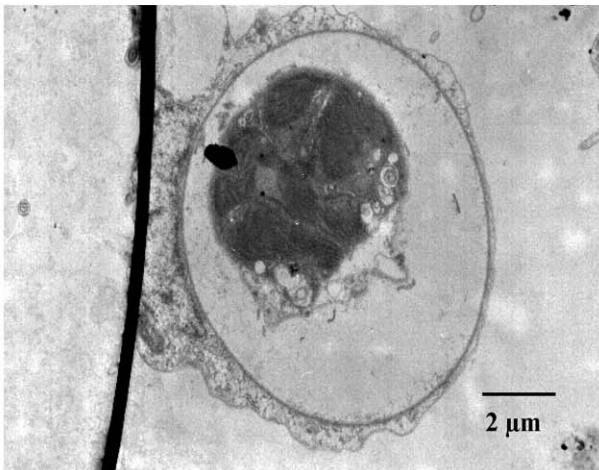


Figure 72 : Zooxanthelle très dégradée dans l'endoderme d'*Acropora danai* blanchi, grand espace de rétraction de l'algue.

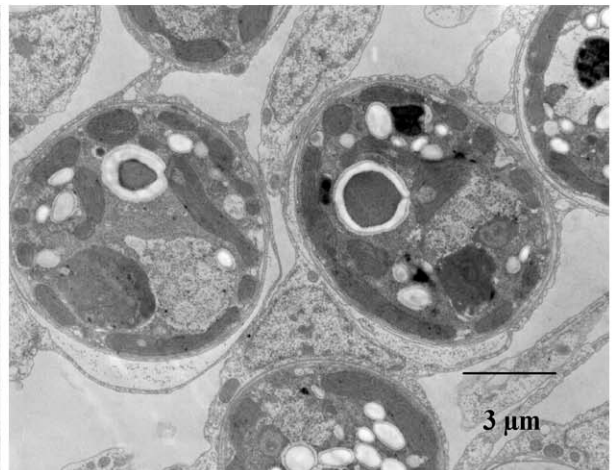


Figure 73 : Zooxanthelles dans l'endoderme d'*Echinopora hirsutissima* sain. Ces algues paraissent être en bonne santé et leurs organites sont aisément distingués.

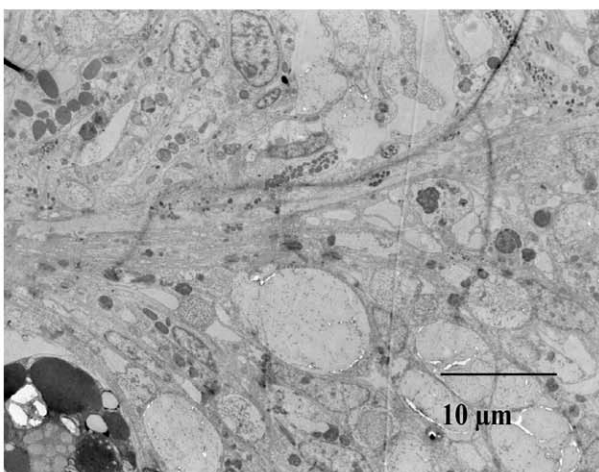


Figure 74 : Endoderme d'*Echinopora hirsutissima* blanchi; trous supposant la place laissée par les zooxanthelles expulsées.

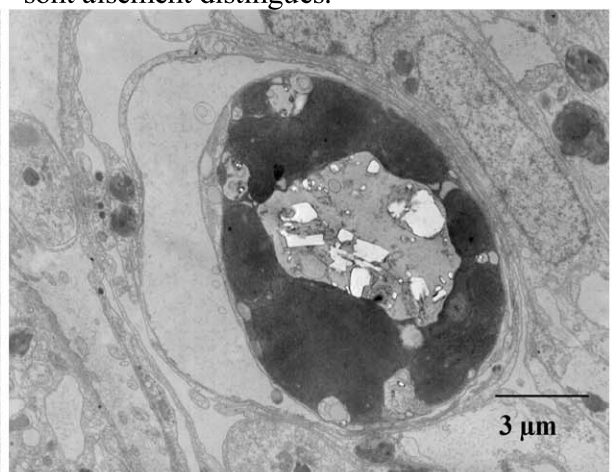


Figure 75 : Zooxanthelle dans l'endoderme d'*Echinopora hirsutissima* blanchi. Rétraction de l'algue et présence de petites vésicules sur son pourtour.

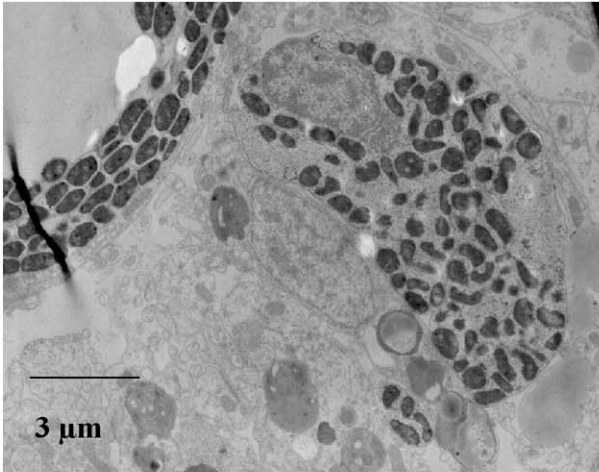


Figure 76 : Bactéries dans l'endoderme de *Porites rus* sain.

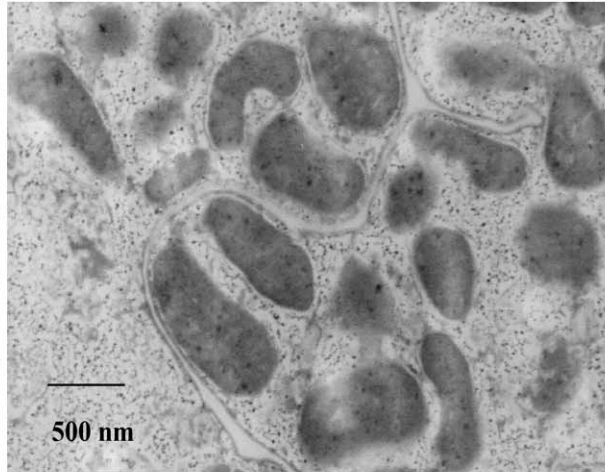


Figure 77 : Bactéries dans l'endoderme de *Porites rus* sain. Leur paroi peut être observée à certains endroits.

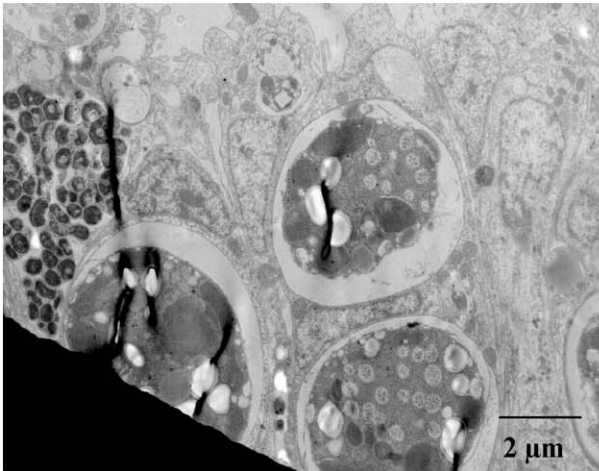


Figure 78 : Zooxanthelles et bactéries (sur la gauche) dans l'endoderme de *Porites rus* sain. Les algues semblent se rétracter.

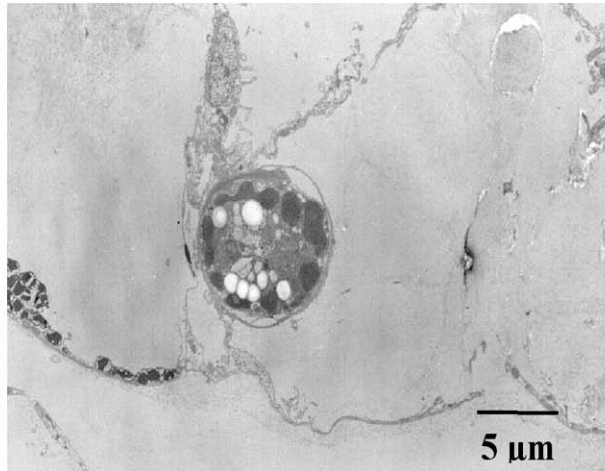


Figure 79 : Zooxanthelle (au centre) et bactéries (sur la gauche) dans l'endoderme de *Porites rus* blanchi.

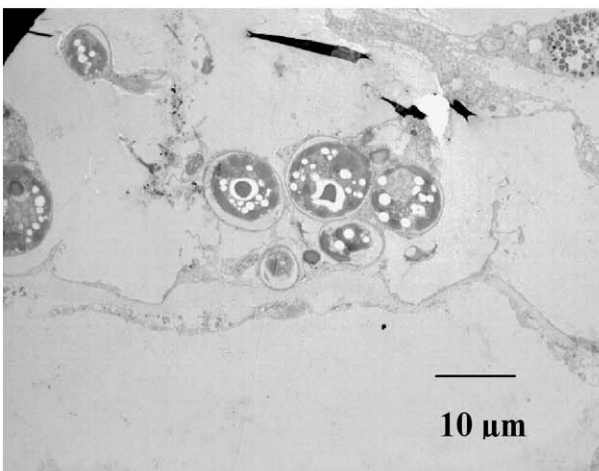


Figure 80 : Zooxanthelles (au centre) et bactéries (en haut à droite) dans l'endoderme de *Porites rus* blanchi.

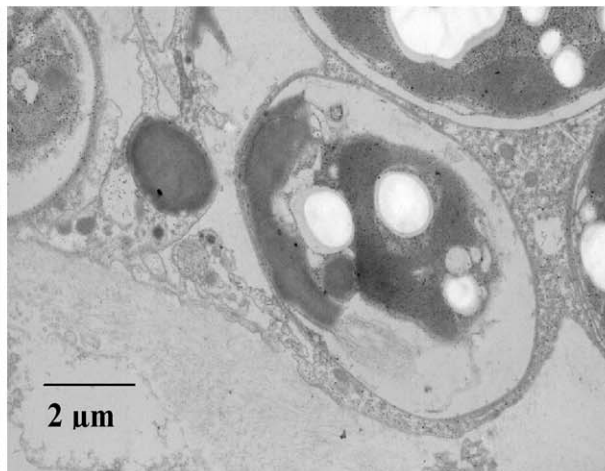


Figure 81 : Zooxanthelle en cours de dégradation dans l'endoderme de *Porites rus* blanchi, désorganisation au sein de l'algue

Des bactéries pourraient avoir été observées dans les tissus de l'individu sain de l'espèce n°4, *Porites rus* (Fig. 76). En effet, ces cellules présentent un diamètre de l'ordre de 800 nm à 1µm environ et possèdent une paroi (Fig. 77). Elles sont isolées dans des poches de type vésiculaire au sein de la cellule hôte. Par ailleurs, les zooxanthelles de cet organisme semblent se dégrader (Fig. 78) ; cet individu serait donc peut-être dans un premier stade de blanchiment à la suite d'une infection bactérienne. L'échantillon blanchi subit une régression tissulaire comme l'illustrent les figures 79 et 80. L'état des algues paraît d'ailleurs affecté (Fig. 81) avec une réduction des organites et une résorption de l'algue qui se détache de l'enveloppe vacuolaire qui l'entoure. Il semblerait que cet échantillon abrite également quelques bactéries (Fig. 79 et 80) Par ailleurs, une forme a été repérée en périphérie d'une zooxanthelle (Fig. 82 et 83). Elle pourrait être associée à un virus de par sa gamme de taille (entre 80 et 120 nm). Ce bourgeonnement serait alors un virus enveloppé et s'il est seul ou en peu d'exemplaires, il n'induirait pas forcément la mort de la cellule (selon le Dr. Piette du laboratoire de virologie de l'ULg).

L'espèce n°5, *Acropora humilis*, ne possédait presque plus de tissus après décalcification et préparation des échantillons à la microscopie (Fig. 84, individu blanchi) ; aucune observation n'a donc pu être réalisée de façon concluante sur cette espèce.



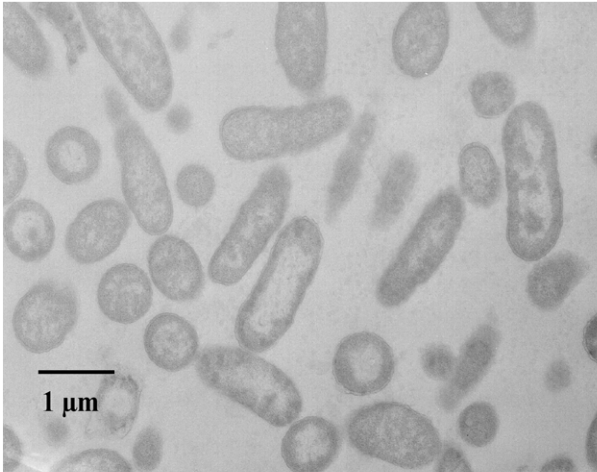


Figure 85 : Vue générale de bactéries *Vibrio shiloi* AK-1.

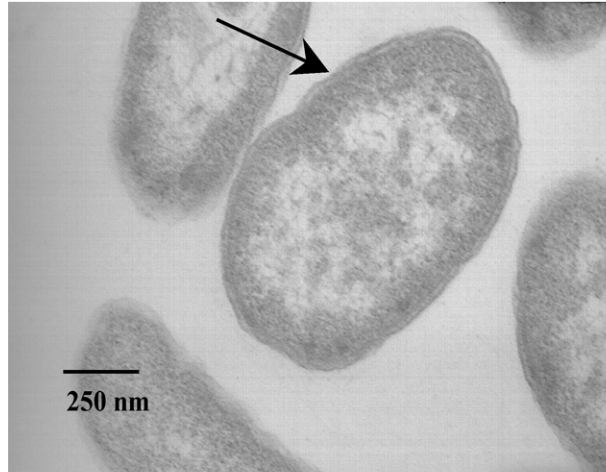


Figure 86 : *Vibrio shiloi* AK-1. La flèche indique la paroi de la bactérie.

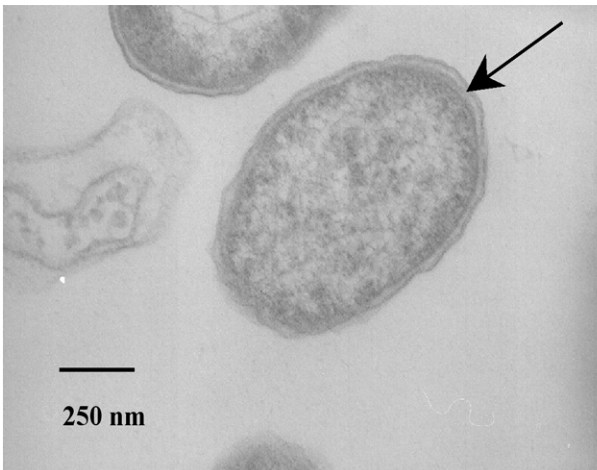


Figure 87 : *Vibrio shiloi* AK-1. La flèche indique la paroi de la bactérie. Bactérie morte sur la gauche de la photo.

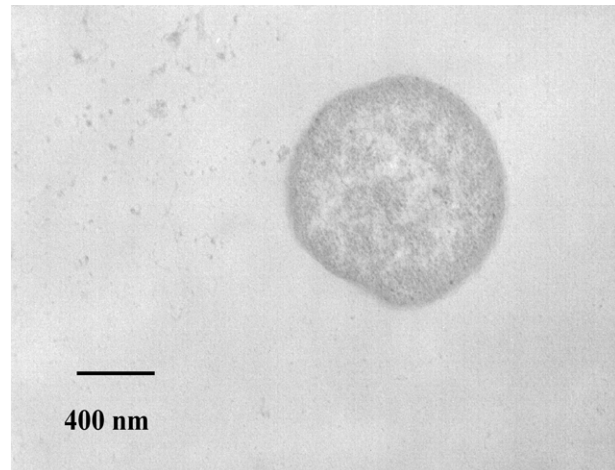


Figure 88 : *Vibrio coralliilyticus* YB-1, plus petite que *Vibrio shiloi* et *Vibrio coralliilyticus* YB-2.

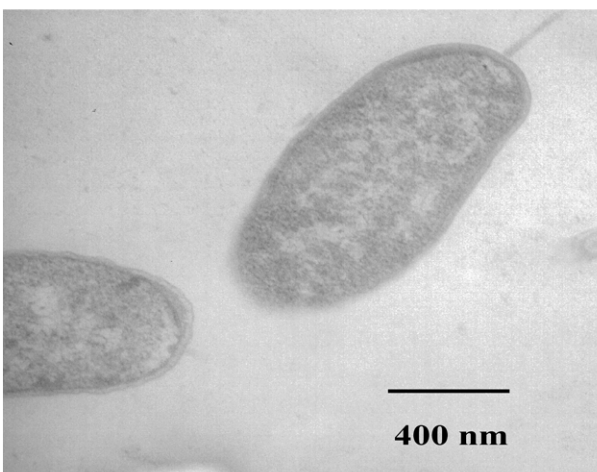


Figure 89 : *Vibrio coralliilyticus* YB-1, avec flagelle (?), en haut à droite de la photo.

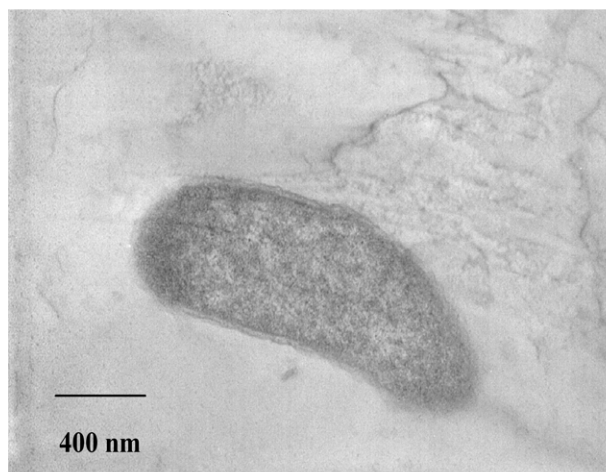


Figure 90 : *Vibrio coralliilyticus* YB-2.

Souches bactériennes

Vibrio shiloi AK-1 a pu être observé à partir de culture pure en coupes fines (Fig. 85). Cette bactérie présente une forme cylindrique à section circulaire. La membrane et la paroi sont bien distinguées (Fig. 86 et 87). La figure 87 présente une forme, sur la gauche de la photo, qui peut être assimilée à une bactérie morte. La zone centrale, plus claire, dans les bactéries paraît être la région où se situe le matériel génétique. La souche YB-1 de la bactérie *Vibrio coralliilyticus* semble plus petite que *V. shiloi* avec une forme un peu plus ramassée (Fig. 88). Le flagelle est visible sur la figure 89. La souche *Vibrio coralliilyticus* YB-2 (Fig. 90) montre une forme quasi similaire à celle de *V. shiloi*.

➤ Échantillons prélevés dans le Sud-Est de la Mer Méditerranée (par l'Université de Tel-Aviv)

L'échantillon de corail sain, H2, présente de nombreuses zooxanthelles, bien organisées et possédant beaucoup d'organites relativement bien distingués (Fig. 91 et 92). Sur la figure 92, les thylakoïdes des chloroplastes sont observés, de même que la structure condensée caractéristique des chromosomes de dinoflagellés (1 boule = 1 chromosome, avec les arceaux d'ADN à l'intérieur). Cependant, les zooxanthelles de cet individu (sain) semblent se décoller de la membrane vacuolaire de la cellule hôte, ce qui suggérerait un artefact de préparation de l'échantillon.

La coupe d'*Oculina patagonica* partiellement blanchi, L1, était très abîmée. Elle n'a dès lors pas fait l'objet d'observations concluantes. Son homologue très blanchi (L3), par contre, a pu permettre l'observation d'un tissu très endommagé (Fig. 93). En effet, plus aucune structure n'est distinguée et aucune zooxanthelle n'a été mise en évidence sur cette coupe.

Enfin, le dernier échantillon observé, L22, est un corail infecté artificiellement par *Vibrio shiloi*, en laboratoire. La zooxanthelle présente sur la figure 94 révèle une organisation moins claire que chez l'individu sain (H2). Un décollement ou une rétraction de la zooxanthelle par rapport à la vacuole l'hébergeant est également notée. Cependant, le matériel de réserve (zones plus claires dans l'algue) paraît plus abondant que chez l'individu sain. Par ailleurs, des entités (de l'ordre de 0,5 à 1 μm) pouvant vraisemblablement appartenir aux bactéries, sont visibles sur la partie droite de cette photo (Fig. 94, flèche) de même que sur la figure 95.

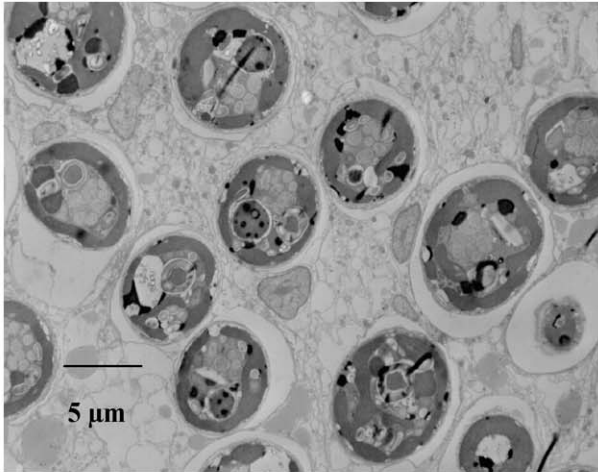


Figure 91 : Endoderme d'*Oculina patagonica* sain (H2) avec zooxanthelles.

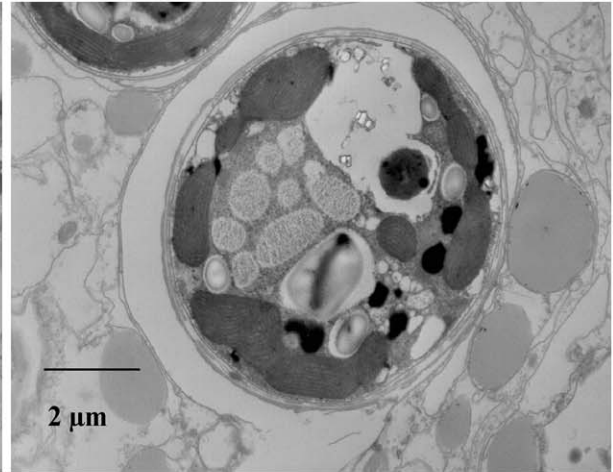


Figure 92 : Zooxanthelle dans l'endoderme d'*Oculina patagonica* sain (H2). Les différents organites y sont bien distingués, l'algue se détache également de sa cellule hôte.

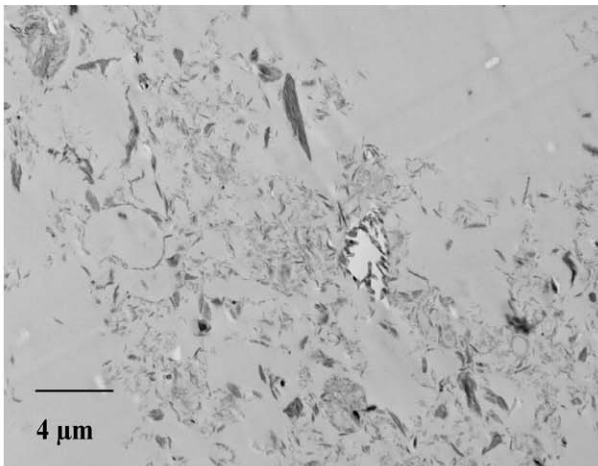


Figure 93 : Endoderme d'*Oculina patagonica* très blanchi (L3). Aucune zooxanthelle n'est observée au sein de ce tissu très endommagé.

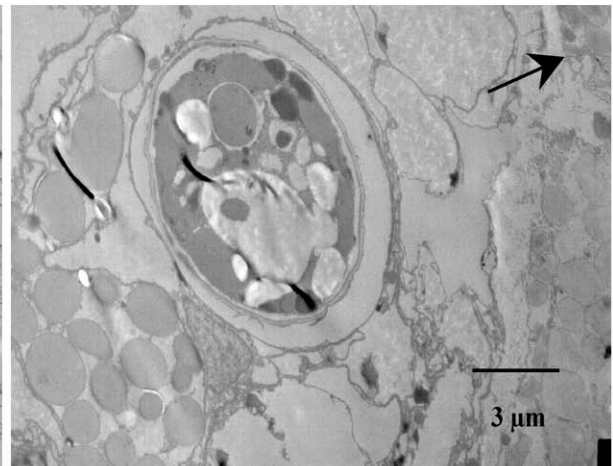


Figure 94 : Zooxanthelle dans l'endoderme d'*Oculina patagonica* infecté par *Vibrio shiloi* en laboratoire (L22). La flèche indique des bactéries. L'algue semble se rétracter et avoir du matériel de réserve plus abondant (zones plus claires).

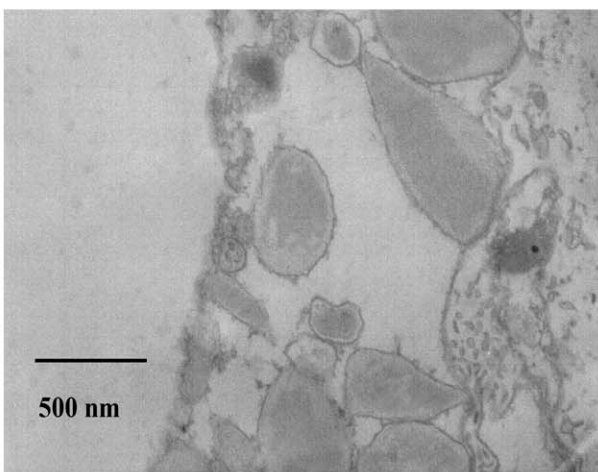


Figure 95 : Bactéries dans l'endoderme d'*Oculina patagonica* infecté par *Vibrio shiloi* en laboratoire (L22).

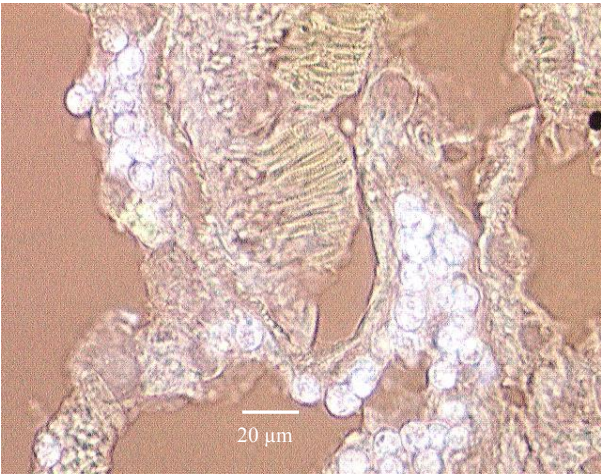


Figure 96 : Tissus d'*Oculina patagonica*, infecté par *Vibrio shiloi*, visualisés en lumière composite (zone n°1).



Figure 97 : Tissus d'*Oculina patagonica*, infecté par *Vibrio shiloi*, visualisés en lumière composite (zone n°2).

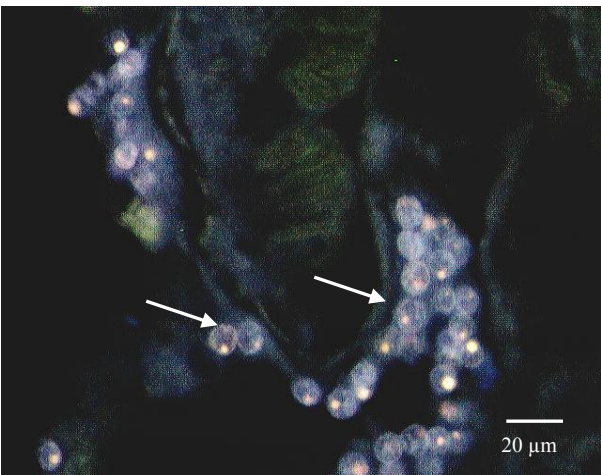


Figure 98 : Tissus d'*Oculina patagonica* infecté par *Vibrio shiloi* visualisés sous UV (zone n°1). Les flèches indiquent les zooxanthelles.

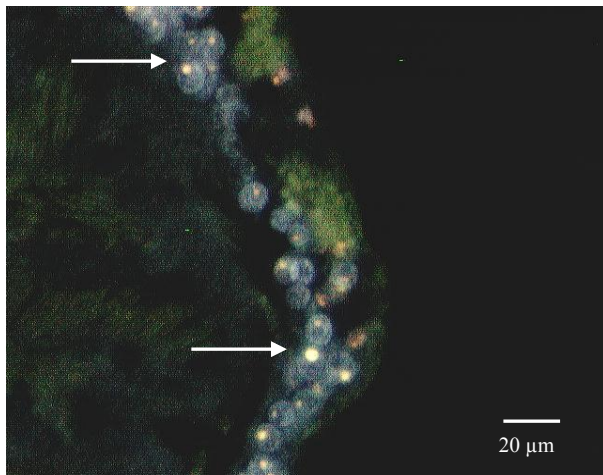


Figure 99 : Tissus d'*Oculina patagonica* infecté par *Vibrio shiloi* visualisés sous UV (zone n°2). Les flèches indiquent les zooxanthelles.

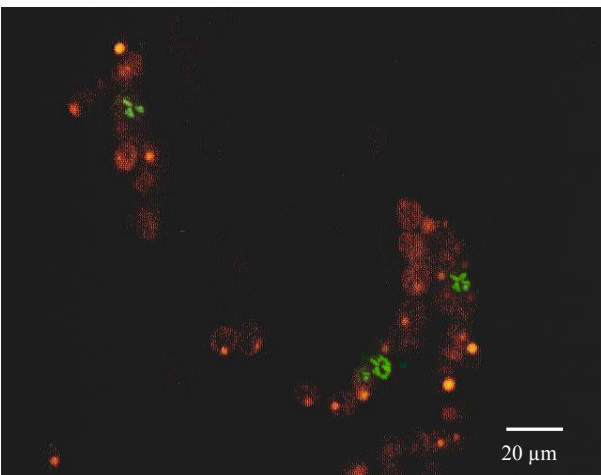


Figure 100 : Tissus d'*Oculina patagonica* infecté par *Vibrio shiloi* visualisés sous lumière bleue (zone n°1). Les zooxanthelles sont visibles en rouge et les bactéries *Vibrio shiloi* en vert.

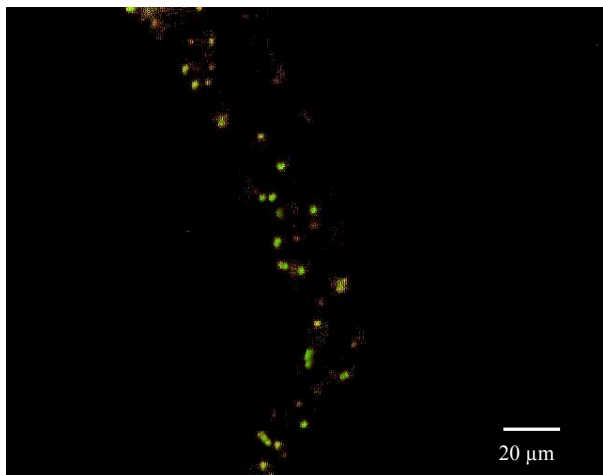


Figure 101 : Tissus d'*Oculina patagonica* infecté par *Vibrio shiloi* visualisés sous lumière bleue (zone n°2). Les zooxanthelles sont visibles en rouge et les bactéries *Vibrio shiloi* en vert.

I.3. Microscopie optique à épifluorescence

L'observation en épifluorescence d'un morceau de corail *Oculina patagonica* infecté en laboratoire par *Vibrio shiloi* a été réalisée sur différentes zones, et sous différentes lumières pour chaque zone. Pour rappel, l'organisme a été fixé 22 h après l'infection et n'a donc pas encore perdu ses zooxanthelles. Deux des zones observées sont présentées dans ce travail.

Le premier type de lumière utilisée est une lumière composite, qui permet de visualiser les différentes entités constitutives de l'organisme (Fig. 96 et 97). Sur ces deux photos, les zooxanthelles sont bien visibles, en bleu clair. Elles le sont d'autant plus, une fois les coupes observées sous ultraviolets (Fig. 98 et 99).

La lumière bleue permet enfin de révéler les bactéries d'intérêt (*V. shiloi*, dans le cas présent), mises en évidence par la fixation des anticorps marqués (anti-*V.shiloi*) à ces bactéries. Les anticorps marqués émettent dans le vert et sont observés sur les figures 100 et 101, soit sous forme de petits regroupements, soit de manière relativement éparse. Par ces observations, l'internalisation de *Vibrio shiloi* dans les tissus d'*Oculina patagonica* est confirmée et visualisée.

Par ailleurs et en parallèle à ceci, le Dr. M. Poulícek a mis en évidence les bactéries *Vibrio shilonii* et *V. coralliilyticus* dans les tissus d'un fragment de corail du genre *Acropora* (prélevé à Moorea en 2005) et ce, grâce aux souches bactériennes en provenance de l'Université de Gand, avec lesquelles des anticorps marqués ont pu être constitués. La coupe observée en épifluorescence à la figure 102, révèle toutes les bactéries présentes dans le tissu corallien grâce à une coloration à l'Acridine Orange. La même coupe (Fig. 103) montre les bactéries ciblées par des anticorps anti-*Vibrio shilonii* marqués au DAPI, à l'aide de la technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). *V. shilonii* est représenté par les petits points vert clair à jaune. Une autre préparation a permis de mettre en évidence les bactéries *Vibrio coralliilyticus*. L'ensemble des bactéries présentes dans le corail sont d'abord observées à l'aide d'Acridine Orange sous lumière interférentielle et UV (Fig. 104). Et ensuite les bactéries *V. coralliilyticus* ciblées par des anticorps marqués au DAPI sont visualisées en épifluorescence (Fig. 105). Ces observations additionnelles montrent que le corail *Acropora sp.* est occupé par différentes souches de *Vibrio*, dont au moins *Vibrio shilonii* et *V. coralliilyticus*.

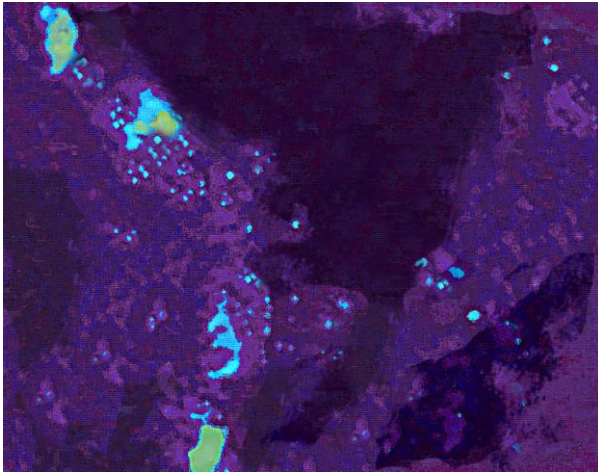


Figure 102 : Tissu d'*Acropora sp.* coloré à l'Acridine Orange. Les petits points bleus clairs représentent toutes les bactéries ainsi marquées.

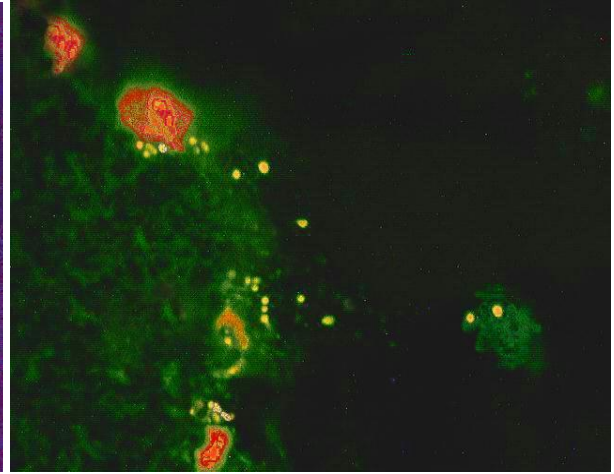


Figure 103 : Tissu d'*Acropora sp.* observé selon la technique FISH et mis en présence d'anticorps anti-*V. shilonii* marqués au DAPI. Les bactéries ciblées émettent de la lumière verte claire à jaune en épifluorescence.

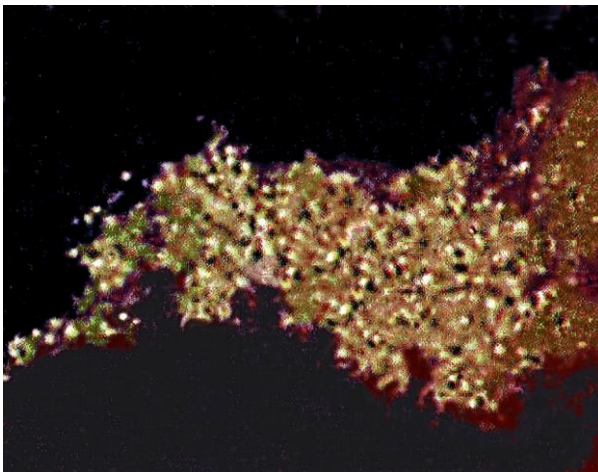


Figure 104 : Tissu d'*Acropora sp.* coloré à l'Acridine Orange et observé en lumière interférentielle et UV. Les points blancs représentent toutes les bactéries présentes dans le tissu.

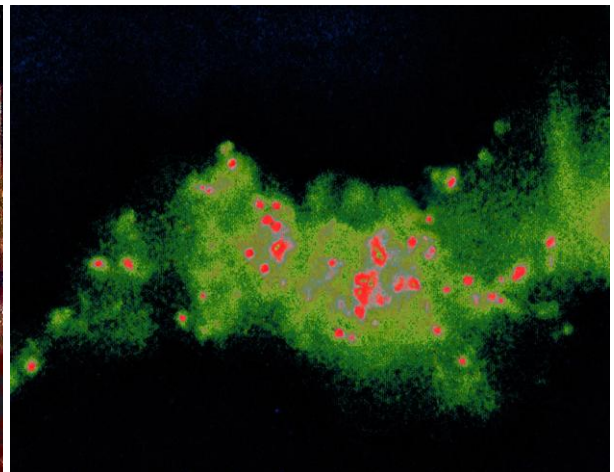


Figure 105 : Tissu d'*Acropora sp.* observé selon la technique FISH et mis en présence d'anticorps anti-*V. coralliilyticus* marqués au DAPI. Les bactéries ciblées sont observées en épifluorescence.

II. Diversité génétique des communautés bactériennes associées

Cette partie du travail relevant de la biologie moléculaire, a présenté quelques difficultés de mise en oeuvre. En outre, comme cela a déjà été évoqué dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (p. 24), le premier stade du cheminement des échantillons n'était pas idéal. Il a fallu tout d'abord retirer entièrement l'éthanol 100% des échantillons pour les mettre en présence du tampon de lyse. Il aurait été préférable et plus simple de mettre les échantillons directement dans le tampon de lyse et de les congeler mais les conditions de prélèvements sur les sites et de rapatriement par avion ne permettaient pas ce traitement.

Une partie importante des manipulations a été consacrée à la mise au point des conditions et des protocoles de traitement des échantillons. À la suite des résultats négatifs obtenus par L. Theunis en 2005, nous avons décidé de tester toutes les étapes de mise en place de la manipulation avant de réaliser les extractions sur nos échantillons.

II.1. Vérification des réactifs et des conditions PCR

Etant donné que les échantillons contenaient peu de matériel et afin d'éviter d'en perdre, des essais sans ADN ou « blancs » (contrôles négatifs) ont été réalisés en premier lieu pour vérifier les conditions de stérilité des expériences d'extraction et d'amplification de l'ADN. Ces essais ont révélé des contaminations au niveau de la PCR. À la suite de cet échec, tous les réactifs ont été remplacés et tout le matériel (y compris l'appareillage) a été nettoyé minutieusement. Une fois le problème de contamination résolu, un essai d'extraction de l'ADN bactérien a été réalisé.

Il convient par ailleurs de préciser que, sur la base de l'article de Zhongtang & Morrison (2004) dans lequel sont comparées différentes régions hypervariables des gènes rrs de l'ARN 16S dans la mise en évidence des communautés microbiennes par PCR-DGGE, deux couples d'amorces ont été choisis ; ceci afin de cibler deux régions de bon pouvoir discriminant mais de longueurs différentes. La première région ciblée est longue de 194 paires de bases (pb) et la seconde de 585 pb.

- A) Extraction d'ADN (sur filtre) selon Wilmotte *et al.*, 2002 et protocole PCR de Tannock *et al.*, 2000 avec les amorces 357f-518R (domaine V3, 194 pb).

Le premier essai d'extraction de l'ADN bactérien a été réalisé sur l'échantillon de mucus sur filtre FUN14 (*Fungia concinna*) selon le protocole de Wilmotte *et al.*, 2002. Ensuite l'extrait bactérien a été amplifié par PCR (protocole de Tannock *et al.*, 2000 et amorces 357f-518R) afin de vérifier la présence d'ADN. Cette expérience n'eut aucun résultat probant. La cause en est incertaine : problème lors de l'extraction ou protocole PCR inadéquat. Le mucus de corail est constitué à 90% de polysaccharides. Ceux-ci peuvent empêcher l'extraction d'ADN ou inhiber les réactions d'amplification de ce dernier.

L'extraction d'un échantillon d'eau passé sur filtre a été réalisée par ailleurs. Ce prélèvement est constitué d'eau interstitielle des branches d'une colonie de *Pocillopora* associée à des poissons (CPMO8). L'eau ne possédant pas ou peu de polysaccharides, l'inhibition de la PCR ne devait donc pas avoir lieu. Les conditions d'extraction et d'amplification de l'ADN par PCR sont les mêmes que pour FUN14. Le signal obtenu est extrêmement faible mais il est important de rappeler qu'il y avait déjà peu de matériel au départ.

Étant donné que l'échantillon précédent (CPMO8) ne présente pas de contamination et montre un léger signal, la manipulation a été étendue à trois autres échantillons d'eau : CMO10, eau interstitielle des branches d'une colonie de *Pocillopora* sans poissons associés ; ELS12, eau de surface et ELF13, eau de fond. Des contaminations se sont à nouveau manifestées. L'eau qui sert de réactif à la PCR a été changée et le nombre de cycles dans le protocole PCR a été diminué de 5. L'amplification suivante n'a rien donné.

À la suite de cela, les échantillons FUN14, CMO10, ELS12 et ELF13 ont été dosés au Nanodrop[®] (faculté de médecine vétérinaire, ULg) afin de voir, si malgré la contamination, de l'ADN avait pu être extrait. Les dosages ont révélé une quantité d'ADN allant de 16,2 ng/μl pour FUN14 à 51,5 ng/μl pour ELS12. De l'ADN a donc bien été extrait. Il paraît cependant étonnant d'obtenir trois fois moins d'ADN chez FUN14 par rapport à ELS12 alors que l'on retrouve environ 100 à 200 10⁵ bactéries par ml de mucus chez *Fungia* et 10 à 12 10⁵ bact/ml mucus dans l'eau de surface (Bussers & Vandewalle, 2000). Il y a donc normalement 10 à 15X plus de bactéries dans le mucus de *Fungia* par rapport à de l'eau de surface, alors qu'ici on en retrouve 3X plus dans l'eau. Ce résultat prouve qu'il y a une déficience dans la technique d'extraction de l'ADN pour les échantillons de coraux. En effet, le mucus est principalement constitué de polysaccharides, ce qui peut rendre l'extraction difficile. Par ailleurs, le témoin négatif de la PCR (positif dans ce cas) a été séquencé afin de déterminer quelle pouvait être l'origine de la contamination. Le résultat obtenu en utilisant le logiciel BLAST montre la présence d'*Acinetobacter*, une bactérie opportuniste. La question à savoir de quelle manière une telle bactérie peut arriver au sein de la réaction peut dès lors être posée.

- B) Extraction d'ADN (sur morceau de corail) avec le kit Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food de PROMEGA et protocole PCR de Muyzer *et al.*, 1993 avec les amorces 357f-907R (domaine V3-V5, 585 pb).

Le kit d'extraction Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food de PROMEGA a ensuite été testé sur un fragment de corail sain récolté en Polynésie française en mars 2006, Lnb1 (*Leptoseria mycetoseroides*, non blanchi). Les amorces utilisées pour la PCR sont 357f-907R et ciblent une séquence d'ADN plus longue que le couple d'amorces précédent.

Comme les amorces utilisées ont changé, un autre protocole PCR a donc du être testé. Il s'est révélé, par la suite, être mieux adapté pour ce type d'échantillons. La préparation des échantillons pour l'amplification a été réalisée à l'aide du kit AccuPrime[™] Taq DNA Polymerase System. Avec les amorces 357f-907R, le protocole de Muyzer *et al.*, 1993 (adapté pour la polymérase et les amorces employées) a été testé.

Ce protocole procède à une diminution progressive de la température d'hybridation (touchdown). Cette manipulation s'est opérée sur les échantillons suivants : CMO10, ELS12, ELF13, Lnb1, FUN14 et CPMO8 (plus un échantillon d'ADN connu comme contrôle positif). Ce protocole semble être adéquat. Le gel d'électrophorèse révèle une bande à 585 pb pour les échantillons CMO10, ELF13 et CPMO8.

II.2. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Afin de préparer la DGGE, une PCR est réalisée avec les amorces 357f munie de la queue GC et 907R. Le nombre de cycles de l'étape 3 du protocole PCR de Muyzer *et al.* (1993) est augmenté de 10 cycles à l'étape 3, soit 15 cycles avec une température d'hybridation de 55°C, afin d'obtenir une quantité d'ADN plus importante. Le gel (Fig. 106) révèle une bande pour les échantillons ELS12, Lnb1 et CPMO8. Cependant, une légère bande est également présente au niveau des blancs. Une PCR a donc du être refaite avec un nombre de cycles à l'étape 3 égal à 10 (5 cycles en moins). Une bande est présente pour les échantillons CMO10, ELF13 et Lnb1 (Fig. 107) et aucune contamination n'apparaît. Par ailleurs, les échantillons FUN14 et CPMO8 ont un signal très faible.

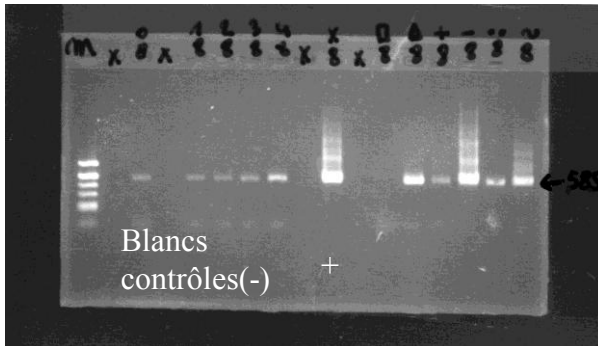


Figure 106 : Gel PCR pour la DGGE. Bande significative présente pour, de gauche à droite, ELS12 (Δ 8), Lnb1 (-8) et CPMO8 (~8). Pas de signal pour CMO10 (\square 8) et signal très faible pour ELF13 (+8) et FUN14 (·8). Protocole de Muyzer *et al.*, 1993 adapté, 15 cycles à l'étape 3.

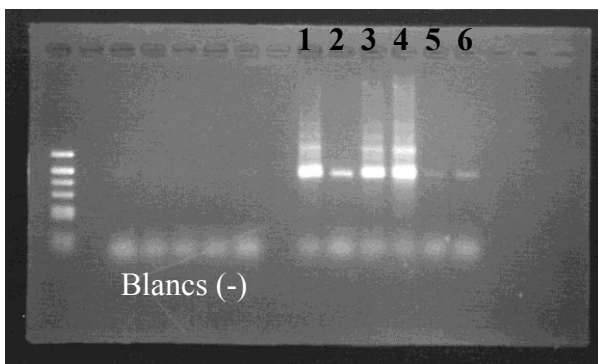


Figure 107 : Gel PCR pour la DGGE. Bande présente pour, de gauche à droite, CMO10 (1), ELS12 (2), ELF13 (3) et Lnb1 (4). Les échantillons FUN14 (5) et CPMO8 (6) ont un signal très faible. Protocole de Muyzer *et al.*, 1993 adapté, 10 cycles à l'étape 3.

Étant donné que les signaux étaient quelque peu différents entre les gels précédents, les 6 échantillons ont tous été placés dans le gel de gradient de dénaturant DGGE (soit CMO10, ELS12, ELF13, Lnb1, FUN14 et CPMO8).

Après quelques essais, au cours desquels nous avons fait varier le pourcentage du gel en polyacrylamide, le gradient de dénaturant, le temps de migration et le voltage

de migration, les conditions les plus adéquates ont été déterminées comme étant : un gel de 6,5% en polyacrylamide, une migration de 6h à 200V, avec un gradient de dénaturant de 30-60%, et un ajout régulier de tampon (TAE 1X) dans la cuve au cours de la migration. Cette dernière expérience révèle, enfin, un patron de bandes pour les échantillons CMO10 (1), ELF13 (3) et Lnb1 (4) et plus faiblement pour ELS12 (2) (Fig. 108).

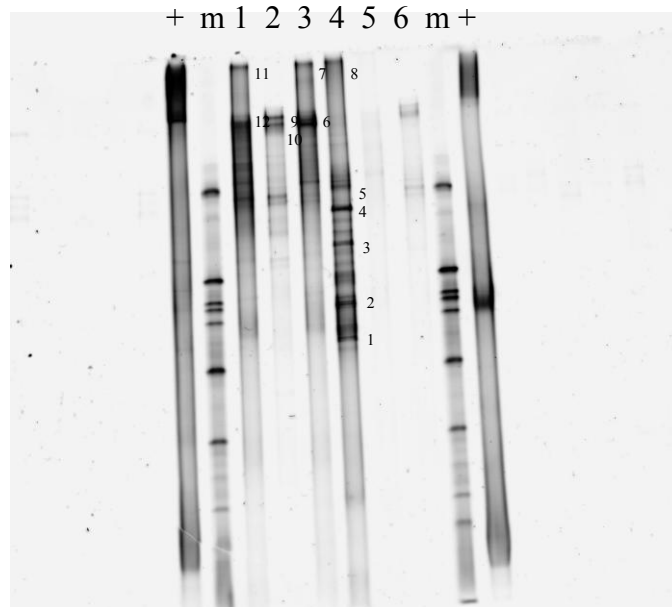


Figure 108 : Gel DGGE avec en (1) CMO10, (2) ELS12, (3) ELF13, (4) Lnb1, (5) CPMO8 et (6) FUN14 (m, marqueur ; +, contrôle positif).

Nous pouvons donc affirmer, en fin de compte, que la série de manipulations réalisées est opérationnelle et fournit des patrons de bandes. Les douze bandes bien visibles des quatre premiers échantillons ont été excisées (et numérotées, Fig. 108) pour être séquencées afin de déterminer les différentes espèces bactériennes présentes dans les échantillons.

II.3. Séquençage des bandes DGGE

Seule la bande 9 d'ELS12 est d'excellente qualité et permet une analyse BLAST vraiment fiable. Cette séquence provient d'un plaste. Il paraît logique que l'échantillon d'eau de surface duquel provient cette bande contienne donc des algues dont les plastes se situent dans la radiation des cyanobactéries et peuvent donc être ciblés par les amorces PCR bactériennes. Les bandes 1, 2 et 6 sont de moins bonne qualité et présentent un mélange de plusieurs séquences (bandes recouvrant plusieurs séquences ou bandes très proches dans le gel). La bande 6 de l'échantillon ELF13 (eau de fond) semble toutefois être associée à un plaste, tout comme la bande 9 de ELS12. L'échantillon de corail Lnb1 présente une bande 2 qui paraît être une acidobactérie et une bande 1 qui possède des affinités pour les *Chloroflexi*, bactéries vertes (Analyse BLAST réalisée par le Dr. Annick Wilmotte du laboratoire de cyanobactéries, ULg).

Les résultats de BLAST pour ces différentes séquences sont repris dans le tableau suivant :

échantillon	n° bande DGGE	nom	Nombre de paires de bases identiques	Pourcentage de similitude	n° d'accèsion
ELS12	9	Plaste	515/524	98 %	AF454328
ELF13	6	Plaste	466/481	96 %	AF454328
Lnb1	2	Acidobactérie	433/467	92 %	AY921976 AY921691
Lnb1	1	<i>Chloroflexi</i> (bact. verte)	293/330 306/347	88 % 88 %	AJ880443 DQ810477 DQ810456

Les autres séquences sont des mélanges de plusieurs séquences d'intensités proches, ce qui rend une analyse impossible. Il faudrait donc sans doute optimiser les conditions DGGE pour mieux séparer les bandes. De plus, nous avons peut-être excisé de trop gros fragments de gel.

Chapitre V :

DISCUSSION et Conclusions préliminaires

I. Discussion des observations morphologiques et ultrastructurales

I.1. Observations au SEM

Les objets observés, en microscopie électronique à balayage, sur les échantillons de coraux prélevés à Madagascar et à Nausicaà, semblent tout à fait se référer à des zooxanthelles et à des bactéries de par leur forme et leur gamme de taille (environ 8 μm pour les algues et environ 1 μm pour les bactéries). Tous les échantillons prélevés en milieu naturel présentent une structure assez fibreuse de leur mucus. Ceci serait vraisemblablement la conséquence d'un artéfact de la préparation des échantillons.

Cependant, les coraux prélevés en aquarium, qui ont été préparés de la même manière que les autres coraux pour l'observation microscopique, n'offrent pas une telle fibrose de leur mucus. L'hypothèse selon laquelle d'autres organismes, tels que des champignons ou des bactéries filamenteuses, seraient présents sur le mucus des madrépores issus de milieux naturels peut donc être envisagée. D'ailleurs, des éléments pouvant être associés à des flagellés ont été observés sur un échantillon prélevé en aquarium. Par contre, les sections des filaments observés semblent être, pour la plupart, de trop petite taille pour pouvoir être mises en relation avec des bactéries filamenteuses. De plus, aucune structure fongique caractéristique (septa ou sporange) n'a pu être mise en évidence. L'hypothèse de l'artéfact de préparation peut être maintenue d'autant plus que les espèces échantillonnées en milieu naturel et en aquarium sont différentes et pourraient donc présenter un aspect différent de leur mucus.

Des zooxanthelles ont été observées en surface ou dans les zones de déchirures du mucus au sein de pratiquement tous les individus, tant blanchis que sains. Cela pourrait témoigner d'un phénomène d'expulsion ou d'échange naturels des zooxanthelles. En effet, selon Muscatine & Pool (1979) la densité des symbiontes serait régulée au sein des tissus hôtes. Il semblerait, toutefois, que les organismes blanchis présentent le plus grand nombre de zooxanthelles observables au niveau du mucus. Ces individus possèderaient également un plus grand nombre de bactéries sur leur couche mucopolysaccharidique de même que des trous, plus nombreux chez les individus blanchis, pouvant attester de la sortie d'algues symbiotiques.

La majeure partie des zooxanthelles observées se situent dans le mucus, identifiées dans des déchirures de ce dernier. Il est donc permis de penser que les algues expulsées seraient maintenues dans le mucus, dans un premier temps, et seraient ensuite libérées dans le milieu environnant lors du détachement des flocs muqueux. Il peut être également suggéré que les algues, conservées dans les flocs après leur mort, consécutive à la dégradation des organites cellulaires, soient dégradées par les communautés bactériennes en charge de la décomposition du mucus. D'ailleurs, des bactéries ont été

observées à la surface de zooxanthelles à diverses reprises. Cette interprétation peut, en quelque sorte, aller à l'encontre de l'hypothèse adaptative du blanchiment. En effet, selon cette théorie (Buddemeier & Fautin, 1993), les différentes espèces de zooxanthelles présentes dans un individu sont susceptibles d'être échangées avec d'autres espèces d'algues symbiotiques présentes librement dans l'eau de mer ou dans d'autres colonies de madrépores.

Par ailleurs, d'après Baker (2003) et LaJeunesse *et al.* (2003), différentes souches de zooxanthelles peuvent être présentes au sein d'un même individu corallien et différentes gammes de spécificités existent pour le symbionte, d'une part, et pour l'hôte, d'autre part. Ces diverses souches de symbiontes peuvent se trouver distribuées de façon hétérogène dans les tissus de l'hôte les hébergeant. Ceci pourrait nous pousser à suggérer que lors d'échanges naturels de symbiontes ou suite à un stress, des souches soient préférentiellement expulsées ou maintenues dans les tissus hôtes.

Les bactéries observées sur les coraux et celles qui proviennent de cultures pures (vibrions) ne présentent pas la même morphologie. Les premières possèdent principalement une forme sphérique tandis que les secondes sont plutôt de forme cylindrique incurvée. Cela semble relativement cohérent car lorsque *Vibrio shiloi* et *V. coralliilyticus* adhèrent à des coraux, elles s'internalisent dans les tissus du corail ciblé ou sensibilisé et ne sont plus observées en surface.

1.2. Observations au TEM

Lors des observations au microscope électronique à transmission, une régression tissulaire plus importante au niveau des zooxanthelles a été remarquée chez les individus blanchis. En effet, l'espace périplasmique est plus important chez les zooxanthelles de coraux blanchis. Cette rétraction des zooxanthelles a également été observée dans les organismes sains mais dans une moindre mesure. Le détachement de la zooxanthelle par rapport à la vacuole de la cellule hôte pourrait provenir, d'une part, d'un artefact de la préparation des échantillons à l'EDTA (pour la décalcification). Cependant, toutes les algues endosymbiotiques observées ne présentent pas ce détachement, alors que tous les échantillons ont été préparés de la même façon. D'autre part, il peut être envisagé qu'une telle manifestation soit représentative d'une réaction post-stress, mais avant que la dégradation ou l'expulsion des zooxanthelles ne survienne. En effet, différents stades de dégradation et de résorption peuvent être observés à différents moments d'une phase de blanchiment et ce différemment selon les zones de l'individu étudiées.

Les échantillons de coraux sains présentent un endoderme beaucoup plus fourni en zooxanthelles que leurs équivalents blanchis. Les symbiontes paraissent être en « meilleure santé ». En effet, les différents organites constitutifs de l'algue sont plus facilement discriminés et l'organisation interne générale semble plus structurée. Ainsi, chez les individus sains, les chromosomes sont bien distingués au sein du noyau de même que les thylakoïdes au sein du chloroplaste (témoins d'une photosynthèse active réalisée par l'algue). Ce n'est pas le cas chez les zooxanthelles d'organismes blanchis. Un autre critère d'évaluation de la santé du corail peut être déterminé par la proportion relative des différents éléments constitutifs de ces dinoflagellés symbiotiques.

Par ailleurs, la formation de vésicules est observée sur les bords de certaines algues dans du corail blanchi. Ces vésicules semblent contenir des cristaux et pourraient être le signe précurseur d'une dégénérescence des cellules. Des trous, ou des espaces vides de forme circulaire, sont remarqués dans l'endoderme d'organismes qui ont subi un blanchiment. Ces espaces pourraient constituer la place laissée vide par des symbiotes expulsés ou dégradés. De plus, des zooxanthelles détachées de l'endoderme sont retrouvées libres chez les individus blanchis. Cette observation n'est pas constatée chez les échantillons sains.

Des structures, qui peuvent s'apparenter à des bactéries, ont été observées dans les échantillons de *Porites rus*. Le corail sain de cette espèce pourrait présenter les signes d'un premier stade de blanchiment provoqué par une infection bactérienne. À ce stade, il n'y a pas encore de tissu endommagé, ni de perte de zooxanthelles. Il peut paraître étonnant de trouver des bactéries dans un individu sain et pas chez les autres coraux blanchis. Il faut cependant garder à l'esprit que les coupes réalisées dans les échantillons ne font que 70 nm d'épaisseur. De plus, contrairement à une infection virale qui se répand partout, une infection bactérienne peut se manifester de façon plus ponctuelle ou locale. Par conséquent, nous n'avons pas pu mettre en évidence de bactéries au sein des autres espèces alors qu'elles en possédaient peut-être.

L'individu infecté artificiellement par *V. shiloi* en laboratoire présente, outre des bactéries, des zooxanthelles avec du matériel de réserve (e.a. amidon) apparemment plus abondant. Une réponse de l'algue face au stress pourrait être concrétisée par l'accumulation de réserves afin que celle-ci puisse survivre à une éventuelle expulsion (sorte de bagages faits avant le départ en vacances ou de provisions réalisées avant l'hiver...).

Enfin, la paroi des bactéries, provenant des cultures pures, est bien distinguée de leur membrane, et ce chez les 3 souches observées. Cette double « paroi » est caractéristique des bactéries Gram négatives. Leur section est circulaire à ovale et l'ADN semble rassemblé au centre des cellules (zone plus claire). Le flagelle d'une bactérie a été observé. Cela peut paraître étonnant car aucun flagelle n'a pu être observé en microscopie électronique à balayage. Cependant, le flagelle semblerait trop petit que pour être révélé avec la métallisation au platine, pour l'observation en SEM.

1.3. Observations en microscopie optique à épifluorescence

Les bactéries de la souche *Vibrio shiloi* AK-1 ont pu être mises en évidence sous lumière bleue au microscope optique grâce au marquage d'anticorps anti-*V. shiloi* dans l'endoderme de *Oculina patagonica*, infecté artificiellement en laboratoire. Ces bactéries sont observées à proximité des zooxanthelles. Cela prouve bien que les bactéries virulentes, une fois en contact avec leur « corail-cible », sont internalisées et se développent au sein de l'endoderme de l'hôte. Beaucoup de zooxanthelles ont pu être observées dans l'endoderme de cet individu. Cela semble normal puisque l'échantillon a été fixé 22h après l'infection. Durant cette période, les zooxanthelles n'ont pas encore pu être expulsées ou dégradées.

Ces bactéries sont facilement observées en microscopie optique mais pas en microscopie électronique à transmission. La raison de cette différence s'exprime par

rapport aux volumes observés. Une coupe en microscopie optique a une épaisseur de l'ordre de 500 nm alors qu'une coupe pour le TEM ne fait que 70 nm environ, soit une coupe plus de sept fois plus fine qu'en microscopie optique. Il y a donc moins d'éventualités de retrouver ces bactéries.

I.4. Conclusion préliminaire

À la suite des diverses observations que nous avons réalisées, nous pouvons affirmer que, parmi les outils permettant de diagnostiquer l'état de santé ou le niveau de blanchiment d'un corail, outre l'estimation de la densité en algues symbiotiques dans l'endoderme, le calcul de la proportion relative des différents organites des zooxanthelles semble être un bon critère. La présence de zooxanthelles « libres », détachées du tissu, ou une diminution de la structuration interne de l'algue peut être un bon indicateur de stress associé au blanchiment.

Aucune corrélation n'a pu être établie entre les bactéries observées, au niveau du mucus ou dans les tissus, et les trois souches de vibrions cultivées. Par ailleurs, le volume d'échantillons observés était peut-être trop petit que pour permettre la mise en évidence d'infections bactériennes dans les différents individus atteints par le blanchiment. Aucune infection virale ne semble néanmoins être présente dans ces échantillons.

II. Discussion de l'approche moléculaire

II.1. Choix de la bibliographie et des amorces

Nous nous sommes basée sur un article assez général de Zhongtang & Morrison (2004). Dans cet article, les auteurs ont comparé différentes paires d'amorces PCR (et donc différentes régions de l'ARN 16S) pour leur efficacité à produire les meilleures analyses de DGGE.

La conclusion de cette publication précise que les domaines qui présentent les meilleurs patrons de bandes, et qui sont les plus représentatifs de toutes les bactéries, sont les domaines variables V3 ou V1. Cependant, si l'on désire des séquences plus longues pour permettre une analyse phylogénétique convenable, les régions V3 à V5 ou V6 à V8 doivent être ciblées. Nous avons donc choisi les domaines V3 et V3-V5 pour avoir deux tailles de fragments d'ADN. Le domaine V3 consiste en une région de 194 pb alors que V3-V5 cible une séquence de 585 pb. Ces domaines nécessitent les amorces 357f et 518R pour le premier et 357f et 907r pour le second, afin de pouvoir être amplifiés.

II.2. Discussion des protocoles

Comme cela a déjà été spécifié dans le chapitre relatif aux résultats, nous disposons de très peu de matériel. Il aurait été en outre préférable de placer les échantillons frais directement dans le tampon de lyse et au congélateur. Le fait de devoir

faire évaporer tout l'éthanol, nous oblige à laisser le tube ouvert pendant un certain temps et à l'exposer à d'éventuelles contaminations.

Les amorces qui ont généré le plus petit fragment d'ADN ont d'abord été testées avec le protocole de Tannock *et al.* (2000) référencé dans l'article de Zhongtang & Morrison (2004), sur de l'ADN extrait de filtre, par la méthode de Wilmotte *et al.*, 2002. Des séquences plus courtes d'ADN permettent généralement d'avoir des bandes plus nettes dans le gel.

L'obtention de résultats peu concluants nous ont poussée à tester la seconde paire d'amorces avec un protocole (Muyzer *et al.*, 1993), également référencé par Zhongtang & Morrison (2004), qui procède à une diminution progressive de la température d'hybridation (touchdown) pour ce couple d'amorces. L'utilisation de ce type de protocole empêcherait ou, en tous cas, limiterait les mésappariements de séquence lors de l'amplification de l'ADN par PCR. Le produit PCR le plus long (et les protocoles l'accompagnant) s'est donc montré le plus adéquat pour ce type d'expérience.

Malgré les nombreux essais (ou plutôt échecs), les conditions nécessaires au bon déroulement des manipulations et aux résultats souhaités, pour cette série d'expériences, ont pu être définies. Ce travail a donc permis de conclure positivement une étude de faisabilité des expériences.

II.3. Que peut-on tirer des résultats obtenus ?

Le nombre d'échantillons qui ont été testés et qui présentent des bandes en DGGE est restreint (3 échantillons d'eaux et 1 échantillon de corail sain). Dans de telles conditions, aucune conclusion ne peut être tirée au niveau de la comparaison des communautés bactériennes associées aux coraux sains, blanchis et présentes dans l'eau. Cependant, des séquences de plastes d'algues eucaryotiques (phototrophes) ont été retrouvées dans les échantillons d'eau de surface et d'eau de fond à proximité de la colonie de *Pocillopora sp.* étudiée. Des séquences affiliées aux acidobactéries et aux *Chloroflexi* (bactéries vertes) ont été trouvées dans l'échantillon de corail Lnb1.

II.4. Conseils et perspectives

La méthode d'extraction d'ADN sur filtre ne semble pas correctement adaptée aux échantillons coralliens. Il conviendrait donc d'envisager de prélever à l'avenir du matériel sous forme de fragments de coraux, placés directement dans du tampon de lyse au congélateur (ou dans la glace). L'extraction d'ADN bactérien à partir d'un fragment de madrépore (et non sur filtre) a été réalisée avec succès pour l'échantillon de corail *Leptoseria mycetoseroides* non blanchi, Lnb1. Ce type d'échantillonnage est sans doute préférable dans le cadre d'une étude des communautés microbiennes associées aux coraux.

Par ailleurs, afin de rendre cette étude plus complète par rapport à l'hypothèse d'action protectrice des poissons contre le blanchiment, il serait intéressant d'extraire et de séquencer l'ADN des communautés bactériennes présentes dans le contenu intestinal

des poissons associés aux patates coralliennes étudiées. Une comparaison avec celles présentes dans le mucus et l'environnement des coraux serait alors réalisée. Un dosage systématique des ADN extraits pourrait, en outre, être envisagé afin de contrôler l'étape d'extraction de l'ADN pour les différents échantillons.

II.5. Conclusion préliminaire

Le nombre d'échantillons qui ont pu être testés dans ce travail est réduit. Par conséquent, la diversité génétique des communautés bactériennes associées aux coraux et présentes dans l'eau de mer environnante n'a pu être révélée.

Cependant, les conditions d'extraction et d'amplification de l'ADN, de même que celles nécessaires à la migration des séquences ciblées sur gel de gradient de dénaturant ont pu être définies pour les échantillons utilisés. Cette série d'expériences peut donc, à présent, être étendue à une étude de plus grande envergure.

Partie II :
Nouvelle voie
d'investigation avec
l'anémone de mer *Aiptasia*
pulchella

Chapitre I :

INTRODUCTION

Au cours de l'année et de l'avancement du présent mémoire, nous nous sommes aperçus que des anémones de mer se trouvant dans les aquariums de l'Université blanchissaient, tout comme les coraux étudiés dans ce travail. L'envie d'aller voir un peu plus loin est alors apparue. De plus, l'idée qu'une anémone hermatypique puisse blanchir selon les mêmes mécanismes que les madrépores soulevait la question de savoir si un tel matériel pouvait être utile dans l'étude du blanchiment corallien. C'est pourquoi une approche tout à fait préalable a été réalisée sur quelques anémones. Cette approche est présentée dans cette deuxième partie de mémoire.

Comme cela a déjà été établi dans la première partie de ce travail, certains cnidaires, tels que les coraux et les anémones de mer, hébergent des dinoflagellés photosynthétiques au sein de leur gastroderme, leur accordant une meilleure croissance.

L'étude du blanchiment corallien en laboratoire n'est pas une chose aisée. En effet, il est réellement difficile de maintenir des coraux durs dans des aquariums en système fermé, contrairement à l'anémone de mer *Aiptasia sp.* (principalement *A. pallida* Verrill, 1864 et *A. pulchella* Carlgren, 1943, Fig. 109), organismes communs des aquariums marins tropicaux de toutes tailles, du petit aquarium privé au grand aquarium public (Poulicek *et al.*, 2006 ; Ladrière *et al.*, 2006). Le genre *Aiptasia* est bien adapté à la vie en aquarium, d'une part car ces organismes apprécient une luminosité élevée du fait que l'essentiel de leur nutrition provient de leurs symbiotes photosynthétiques, et d'autre part parce que leur mode de reproduction via lacération pédale leur permet de proliférer rapidement lorsque les conditions sont favorables. Des petits morceaux de tissus se détachent lorsque l'anémone se déplace dans l'aquarium et chacun de ces fragments est capable de se développer en une nouvelle anémone. Ces anémones sont involontairement importées dans les aquariums via les pierres « vivantes » que l'on utilise comme décoration et constituent rapidement une « peste » envahissant la totalité du décor (Poulicek *et al.*, 2006).



Figure 109 : *Aiptasia pulchella* poussant sur le décor d'un aquarium (O. Ladrière).

Par ailleurs, bien que la signification écologique des symbioses cnidaires-zooxanthelles ait été reconnue depuis plus de septante ans (Yonge & Nichols, 1931), les efforts pour comprendre de quelle manière ces associations fonctionnaient ont été sporadiques. La plupart des symbioses algales sont caractérisées par des densités de symbiontes relativement constantes (Reimer, 1971 ; Muscatine & Pool, 1979 ; McAuley, 1994). Des théories selon lesquelles les algues symbiotiques seraient « régulées » par leurs hôtes ont vu le jour. Les trois modes de maintien des densités de symbiontes mis en lumière par ces théories sont (1) l'expulsion ou l'exocytose des extra symbiontes (surnuméraires), (2) la digestion des extra symbiontes, et (3) le contrôle de la croissance des endosymbiontes par surimposition d'un contrôle externe, ou par limitation de l'apport en nutriments (Muscatine & Pool, 1979). Les deux premières méthodes supposent que les algues surnuméraires sont produites par division algale, et que l'hôte possède un mécanisme de détection et de réponse aux augmentations de densité de symbiontes, éliminant les algues excédentaires jusqu'à l'obtention d'une densité « normale ». La troisième méthode fait référence à l'intégration des cycles de division de l'hôte et du symbionte (Fitt, 2000).

Sachant que ces anémones hermatypiques blanchissent, il serait intéressant d'étudier, entre autre de façon quantitative et physiologique, les mécanismes de ce blanchiment. Les facteurs qui induisent ce phénomène devraient également être définis afin d'être ensuite comparés aux facteurs causant le blanchiment corallien. Dans cette optique, des observations et des prémices d'expérience de blanchiment artificiel ont été réalisées afin de tester la faisabilité d'un tel travail de recherche.

Chapitre II :

OBJECTIFS ADDITIONNELS

L'étude de la problématique du blanchiment corallien réclame sans cesse de nouvelles techniques et de nouveaux moyens expérimentaux. En outre, l'anémone de mer *Aiptasia sp.* est très répandue, se reproduit facilement et est une réelle nuisance pour les conservateurs d'aquariums. Elle est facilement maintenue dans des petits aquariums équipés de modestes instruments d'aération et de filtration. Par ailleurs, selon Muscatine *et al.* (1991), les mécanismes de physiologie cellulaire semblent assez similaires au niveau du processus de blanchiment chez *Aiptasia* et chez les scléactiniaires.

Par conséquent, dans cette seconde partie, nous avons tenté de démontrer la pertinence d'utiliser l'anémone de mer hermatypique *Aiptasia sp.* comme matériel de laboratoire (potentielle « souris blanche ») dans l'étude du blanchiment des coraux.

Dans ce volet, nous avons essayé de mettre en évidence les possibilités d'une approche cinétique du blanchiment en utilisant l'anémone de mer tropicale *Aiptasia pulchella* : via des mesures de densité zooxanthellaire chez des anémones saine et blanchie d'une part, et suite à l'induction d'un choc thermique (froid ou chaud) sur des individus sains, d'autre part.

Les individus sain et blanchi ont également été observés en microscopie électronique à transmission afin de détecter d'éventuels virus ou bactéries au sein de leurs tissus, comme cela a été précédemment réalisé pour les coraux.

Chapitre III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Mesure de la densité en zooxanthelles

Une anémone de mer (*Aiptasia pulchella*) saine, ainsi qu'une anémone blanchie, ont été prélevées à partir d'un des aquariums de l'Université de Liège. Elles ont ensuite été conservées dans du glutaraldéhyde 2,5 % dilué dans l'eau de mer. La préparation des échantillons et des coupes est similaire à celle des coraux, explicitée dans la première partie de ce travail.

Sur la base de coupes semi-fines (0,5 μm) d'anémones saine et blanchie (Fig. 110) observées au microscope optique (Olympus BX 50), des comptages de zooxanthelles ont pu être réalisés. La densité en zooxanthelles dans l'endoderme, pour chaque coupe, a été calculée par extrapolation, en comptant le nombre de zooxanthelles sur les photos tirées des observations en microscopie et en connaissant la superficie de ces photos (Fig. 111) ainsi que celle de l'endoderme de l'organisme observé sur la coupe.

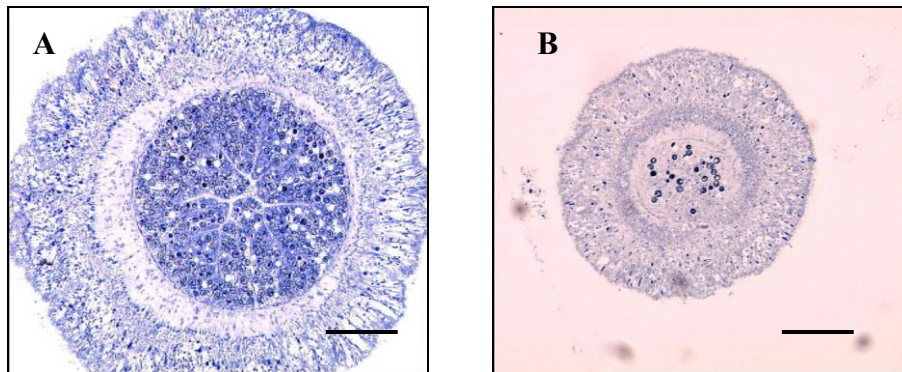


Figure 110: Photos au microscope optique de coupes semi-fines d'une anémone saine (A) et d'une anémone blanchie (B) (O. Ladrrière). Barres : 100 μm .

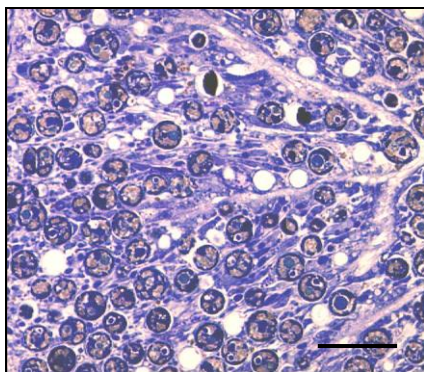


Figure 111 : Photo au microscope optique d'une zone de l'endoderme d'anémone saine en coupe semi-fine (O. Ladrrière). Barre : 20 μm .

Des moyennes ont été calculées pour chaque « état » (saine ou blanchie) et des tests statistiques simples ont été réalisés pour les différentes coupes au sein du même individu.

II. Expérience de blanchiment artificiel

Trois individus sains ont été prélevés d'un aquarium, placés dans de l'eau de mer (sortant du filtre de l'aquarium) et soumis, pour deux d'entre eux, à un choc thermique. Le premier fut mis dans de l'eau préalablement refroidie et maintenu au frigo à 6°C, et le second dans de l'eau réchauffée et maintenu dans une étuve à 32°C, et ce durant 6h. La troisième anémone fut conservée comme témoin à température ambiante (22°C) avec oxygénation de l'eau.

Le blanchiment a été mesuré selon une fonction de l'expulsion des zooxanthelles dans l'eau environnante. Des échantillons d'eau (60 ml) ont été prélevés, filtrés (filtres de 47 mm de diamètre et de porosité de 0,2 µm) et observés sur lames au microscope optique (sous lumière composée, Fig.112, et en épifluorescence) avant le choc, juste après le choc (après 6h), après 72h (à T°C ambiante) et encore après 96h pour l'anémone témoin. Des moyennes ont été calculées pour chacun des prélèvements d'eau, pour chacune des conditions (chaud et froid). Ces moyennes ont pu être calculées sur base de comptages sur photos prises aléatoirement sur le filtre observé. Elles ont ensuite été rapportées au volume d'eau filtrée.

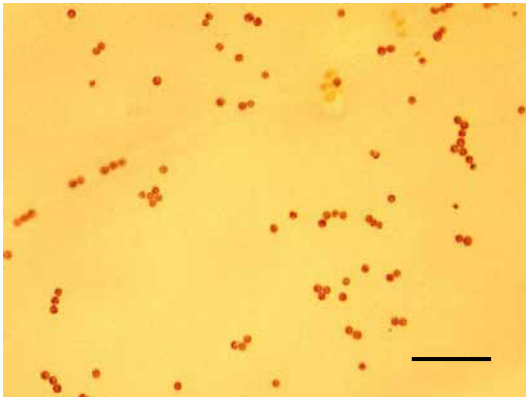


Figure 112 : Exemple de photo prise au microscope optique sur un morceau de filtre sur lequel un échantillon d'eau a été filtré après 72h au niveau de l'anémone témoin (O. Ladrière). Barre 100 µm.

III. Observations en microscopie électronique à transmission (TEM)

Des coupes fines ont été réalisées sur les deux types d'individus, sain et blanchi, et observées au microscope électronique à transmission (techniques détaillées dans la Partie 1, chap.3, p. 23) afin d'observer au niveau structural leur « état de santé » et de mettre en évidence d'éventuels virus ou bactéries (cfr. Objectifs Partie 1, p. 18).

Chapitre IV : RÉSULTATS

I. Mesure de la densité en zooxanthelles dans l'endoderme

Pour chacune des deux anémones, saine et blanchie, 12 coupes (semi-fines) réparties sur 4 lames de microscopie ont été réalisées le long des tentacules. Les coupes sur une même lame constituent une série dans le sens où les coupes sont successives. En fonction de la superficie de la coupe, entre 4 et 14 photos de l'endoderme ont été prises afin de couvrir l'entièreté du tissu.

Les zooxanthelles qui se trouvent sur ces photos ont été dénombrées. Ensuite, par coupe et puis par lame, des moyennes ont été réalisées et exprimées en fonction de l'unité de surface de l'endoderme. Ces moyennes, avec leurs écart-types, sont reprises en annexe (Annexe 4) et représentées par les graphiques suivants, pour chacun des états (saine Fig. 113, blanchie Fig. 114). Il a été dénombré entre 2 et 18 fois plus de zooxanthelles dans l'animal sain que dans l'individu blanchi.

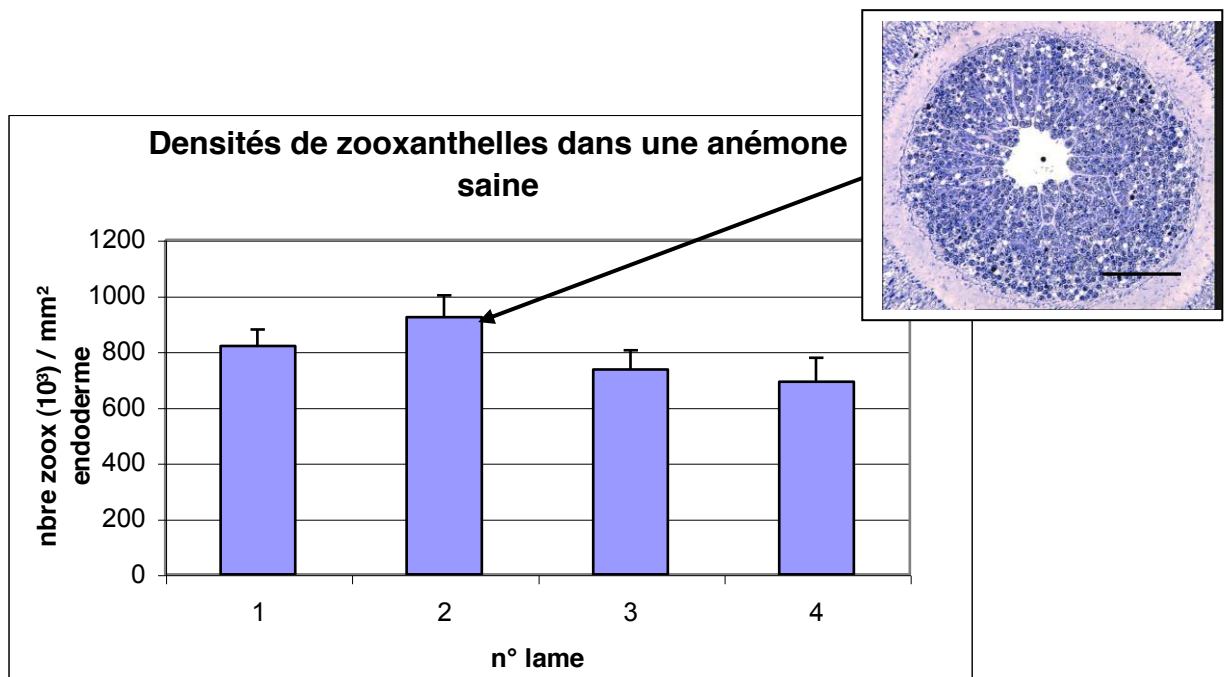


Figure 113 : Densités des zooxanthelles dans l'endoderme d'une anémone de mer saine, moyennées par série de coupes (avec barres d'erreur). Barre d'échelle : 100 µm.

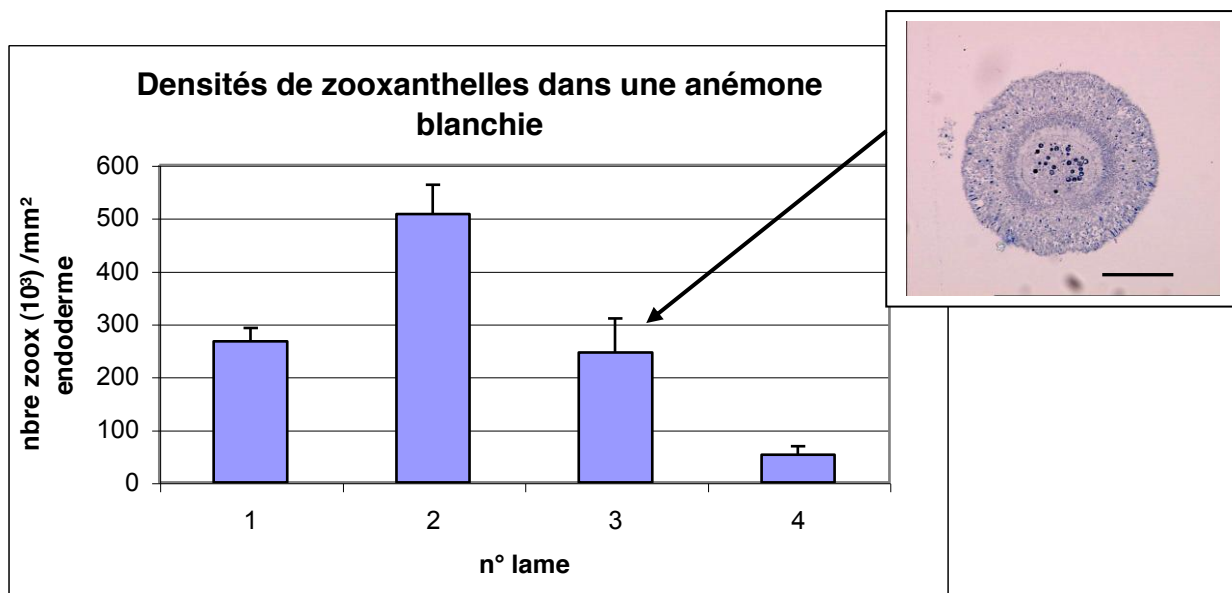


Figure 114 : Densités des zooxanthelles dans l'endoderme d'une anémone de mer blanche, moyennées par série de coupes (avec barres d'erreur). Barre d'échelle : 100 µm.

Des différences significatives sont observées entre les séries de coupes (lames) de l'anémone saine ($p < 0,001$) de même qu'entre les lames de l'anémone blanche ($p < 0,001$). Ceci démontre une hétérogénéité dans la distribution des zooxanthelles le long des tentacules, chez l'individu sain, d'une part, et chez l'individu atteint de blanchiment, d'autre part.

La densité moyenne en zooxanthelles de l'endoderme, pour chaque individu, a également été calculée. Ces moyennes « par état » sont de $773,15 \pm 116,97$ 10³ zooxanthelles/mm² d'endoderme pour l'anémone saine et de $303,52 \pm 159,77$ 10³ zooxanthelles/mm² d'endoderme pour l'anémone blanche. Elles sont reprises dans la figure 115, avec en (1) l'anémone saine et en (2) l'anémone blanche.

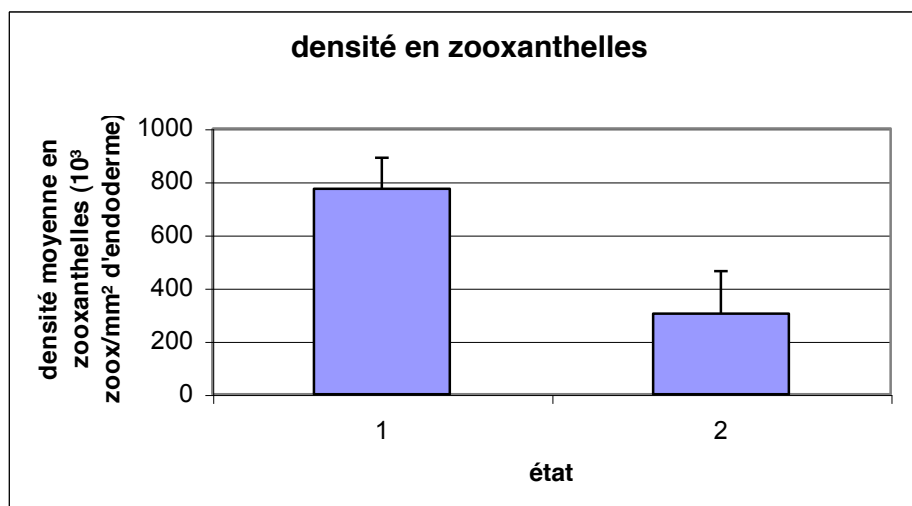


Figure 115 : Moyennes (et barres d'erreur) des densités de zooxanthelles pour (1) l'anémone saine et (2) l'anémone blanche

Comme un seul individu de chaque état a été prélevé, aucun test statistique n'a pu être réalisé entre ces « états ». Il convient de rappeler que cette partie du travail

consiste en une approche tout à fait préliminaire. Cela dit, la grande différence de densité en zooxanthelles dans les tentacules, observée entre ces deux organismes, suggère néanmoins qu'il existe une différence à plus grande échelle.

II. Expérience de blanchiment artificiel

Une estimation de l'importance du blanchiment est suggérée par le comptage des zooxanthelles expulsées dans l'eau environnante à la suite d'un choc thermique. Une anémone de mer est soumise à une température de 6°C pendant 6h et une seconde à une température de 32°C durant le même laps de temps. Une troisième anémone est maintenue à température ambiante comme témoin. L'eau de mer dans laquelle sont conservées les anémones est échantillonnée afin de vérifier qu'aucune zooxanthelle n'est présente au début de l'expérience. Comme cela a été explicité dans la section « matériels et méthodes » de la présente partie (p. 58), les moyennes de zooxanthelles expulsées sont tirées de comptages effectués sur les photos des échantillons d'eau filtrée pour les deux types de chocs thermiques ainsi que pour l'anémone témoin à température ambiante, après 6h de choc, après 72h (à température ambiante) et après 96h pour le témoin. Les tableaux de moyennes sont repris en annexe (Annexe 4) et illustrés par les figures suivantes (Fig. 116 à 119).

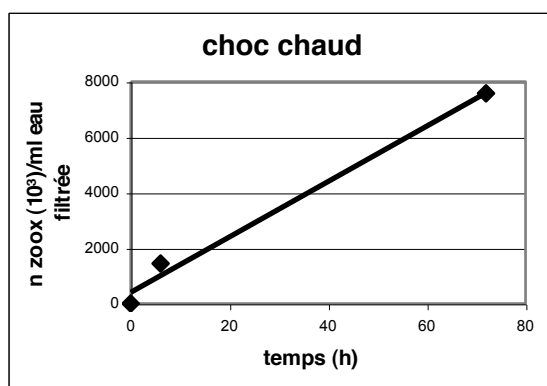


Figure 116 : Quantité de zooxanthelles expulsées au cours du temps par l'anémone soumise à 32°C durant 6h.

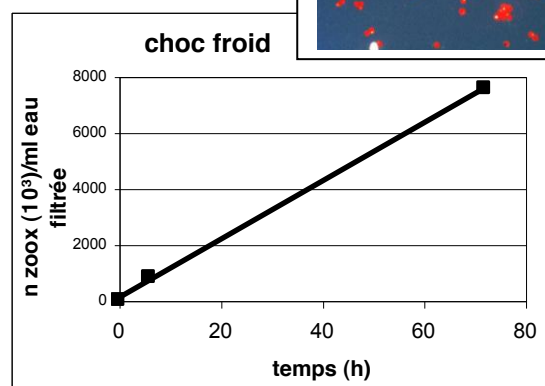


Figure 117 : Quantité de zooxanthelles expulsées au cours du temps par l'anémone soumise à 6°C durant 6h.

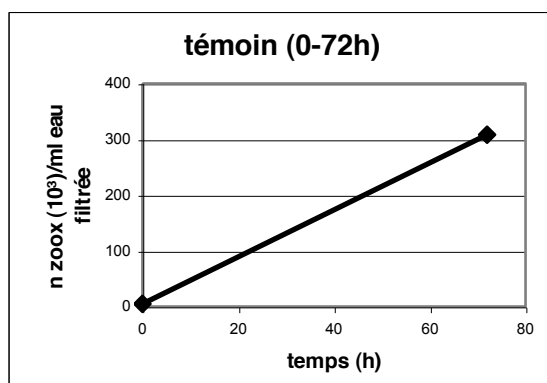


Figure 118 : Quantité de zooxanthelles expulsées au cours du temps par l'anémone témoin à température ambiante, entre 0 et 72h.

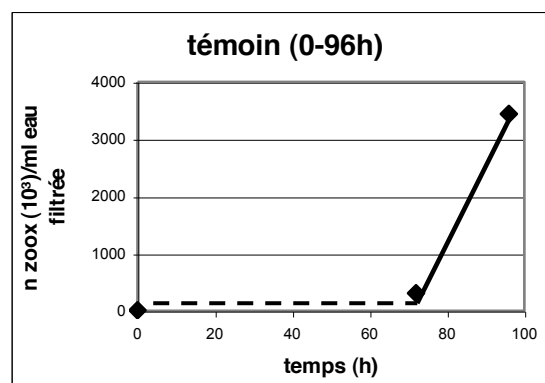


Figure 119 : Quantité de zooxanthelles expulsées au cours du temps par l'anémone témoin à température ambiante, entre 0 et 96h. Une forte augmentation est observée entre 72 et 96h (stress ?).

Aucune différence significative n'est constatée entre les deux types de choc thermique. Par contre, la différence entre la quantité de zooxanthelles expulsées par les anémones « choquées » et celle de l'anémone témoin est hautement significative lorsque les barres d'erreur (écart-types) des moyennes calculées (Fig. 120) sont prises pour témoin.

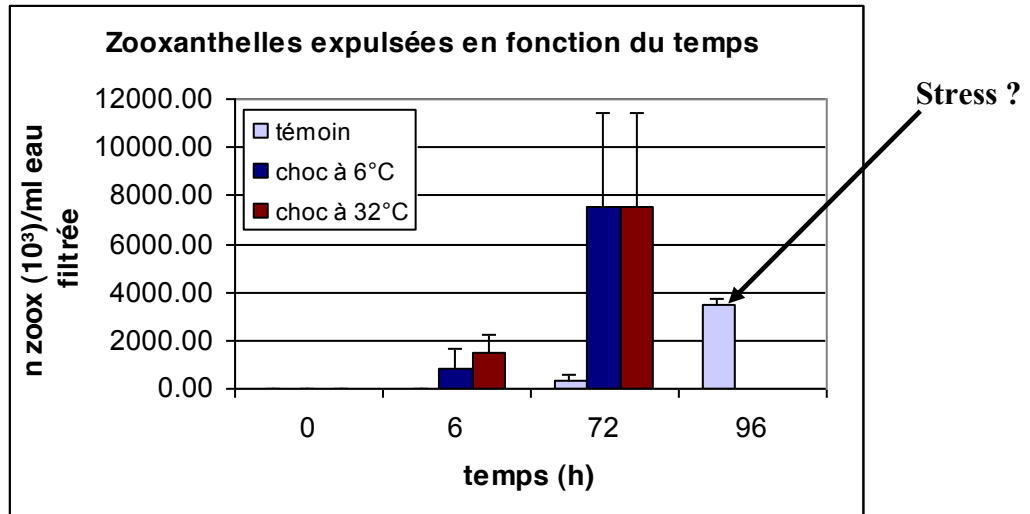


Figure 120 : Moyennes des quantités de zooxanthelles expulsées au cours du temps (et barres d'erreur), pour les différentes conditions testées.

Le blanchiment des anémones -ou plutôt l'expulsion des zooxanthelles- a continué après la période de choc thermique et jusqu'à la mort des organismes (plus de 120 h plus tard). L'anémone témoin (avant le « stress » détecté entre 72 et 96h d'expérience) a également expulsé ses algues symbiotiques mais beaucoup plus lentement que les individus soumis à une variation de température. À la suite de cette manipulation préliminaire, nous pouvons conforter l'hypothèse selon laquelle un phénomène naturel d'échange de symbiotes existe.

La vitesse d'expulsion des zooxanthelles pour les anémones stressées est de $105,04 \cdot 10^3$ zoox/ml/h en moyenne (entre 0 et 72h, sachant que la période 0-6h correspond au choc thermique). L'anémone à température ambiante présente une vitesse d'expulsion de $4,21 \cdot 10^3$ zoox/ml/h en moyenne sur la même durée, avec cependant une accélération en fin de vie correspondant à une vitesse de $130,42 \cdot 10^3$ zoox/ml/h entre 72 et 96h. L'anémone, à ce moment, pourrait subir un stress. Des conditions non idéales, telles qu'une mauvaise oxygénation et un manque de lumière, auraient pu engendrer le phénomène observé d'augmentation de l'expulsion des zooxanthelles dans l'eau environnante.

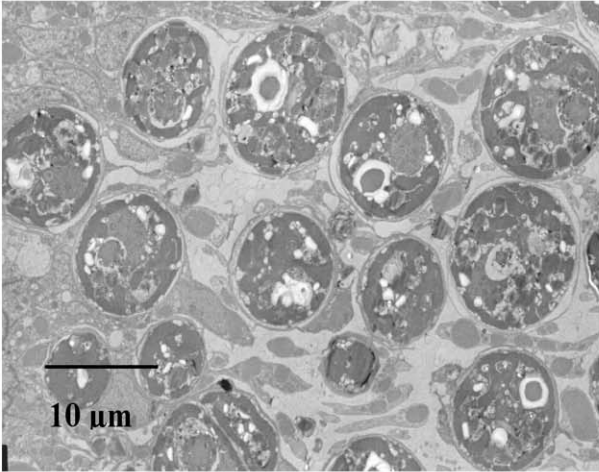


Figure 121 : Endoderme d'*Aiptasia pulchella* saine.

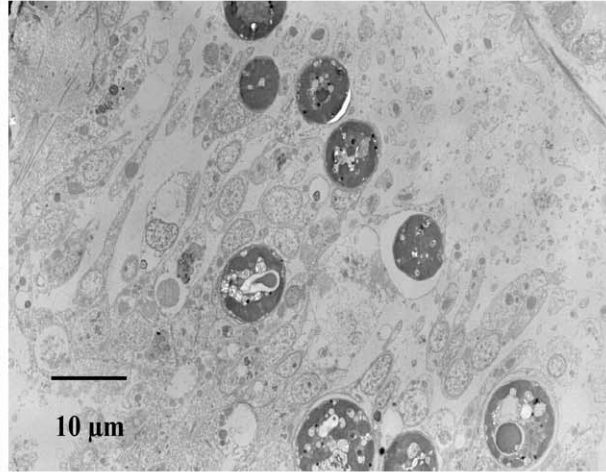


Figure 122 : Endoderme d'*Aiptasia pulchella* blanchie.

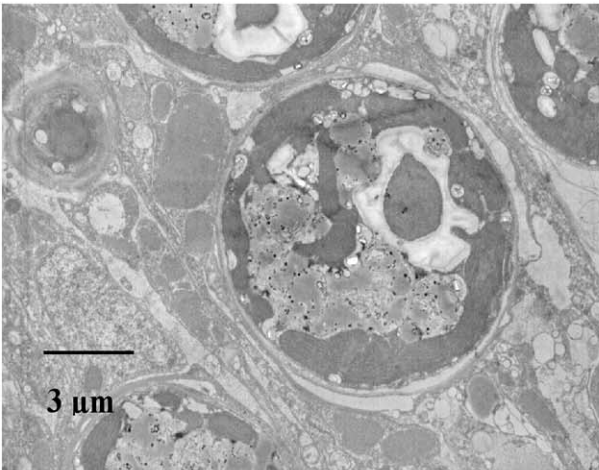


Figure 123 : Zooxanthelle dans l'endoderme d'*Aiptasia pulchella* saine.

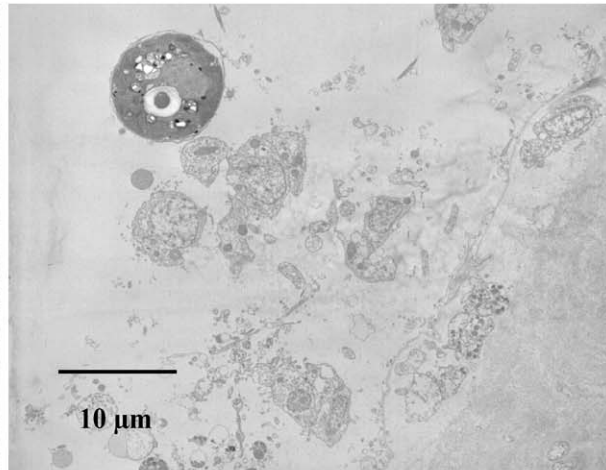


Figure 124 : Zooxanthelle libre dans l'endoderme d'*Aiptasia pulchella* blanchie.

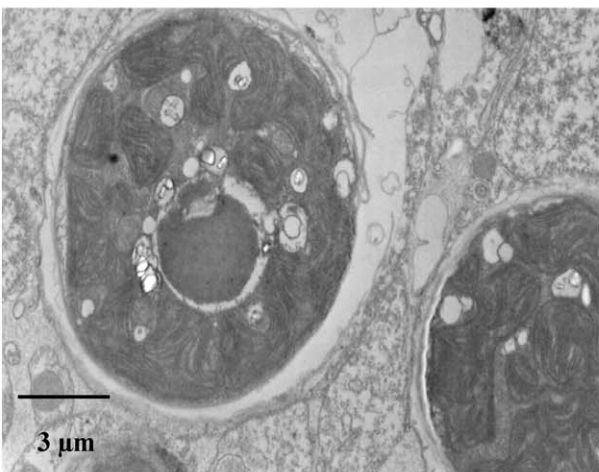


Figure 125 : Zooxanthelle dans l'endoderme d'*Aiptasia pulchella* blanchie.

III. Observations au microscope électronique à transmission (TEM)

Comme nous l'avons expérimenté pour les coraux, dans la première partie de ce travail, les observations des anémones de mer saine et blanchie ont été réalisées séparément pour chaque état. Cependant, les photos obtenues vont être présentées selon une approche comparative et ce, à différents niveaux. Il est, par ailleurs, important de rappeler que, comme pour les coraux, la portion de l'individu observé est très réduite par rapport au volume total de l'organisme considéré. En effet, si l'on suppose une anémone de 0,5 cm de rayon de base et 2 cm de haut, le volume observé est d'environ $4,4 \cdot 10^{-4}$ mm³ (70 nm d'épaisseur x surface d'une grille de 2 mm de diamètre x 5 grilles par individu) soit moins de 1/3.000.000ième du volume total de l'animal. De la même manière, si l'on considère un tentacule de 0,5 mm de rayon de section et entre 2 et 2,5 mm de long, nous aurons observé moins de 1/4000ième du volume d'un tentacule (pour chaque anémone).

L'observation se porte, en premier, sur l'aspect général des tissus et plus particulièrement de l'endoderme. Chez l'anémone saine, l'endoderme est bien « rempli » et contient un grand nombre de zooxanthelles (Fig. 121). L'animal blanchi (Fig. 122) possède un tissu interne beaucoup plus clairsemé avec un nombre de zooxanthelles inférieur à celui de son homologue sain. Les zooxanthelles sont bien incluses dans l'endoderme et adhèrent à la paroi vacuolaire de la cellule hôte chez l'individu non blanchi (Fig. 123). Il n'en est pas de même chez l'anémone atteinte de blanchiment où les zooxanthelles peuvent se retrouver détachées du tissu (Fig. 124) ou en début de résorption (Fig. 125). Le matériel de réserve semble, en outre, moins abondant. Il est important de noter que cette dernière observation est différente de celle réalisée sur les coraux blanchis, à ce propos.

De nombreux virus ont été observés dans l'anémone saine (Fig. 126 et 127) et dans l'anémone blanchie (Fig. 128 et 129). On pourrait dès lors se demander si ce genre d'infection n'est pas caractéristique de la vie en aquarium en circuit fermé. L'infection virale semble toutefois plus importante dans l'organisme blanchi (Fig. 130). Tout porte à croire qu'il s'agit de virus parce que l'ordre de grandeur des éléments observés oscille autour de 100 nm (pour chaque point de la plaque virale sur la photo). Ils se multiplient en très grand nombre et, cet aspect « gaufré » observé sur les photos, est caractéristique des infections virales (hyperstructuration classique selon le Docteur J. Piette du laboratoire de virologie de l'ULg). Les plages virales situées dans le cytoplasme des cellules hôtes ne sont pas isolées par une membrane au sein d'une vésicule. Les virus se développent généralement dans un viroplasma, constitué par l'extension du réticulum endoplasmique. Ces virus présumés paraissent être des virus nus, à capsidie icosaédrale¹, non enveloppés. On assiste à une sorte de cristallisation du virus au sein du cytoplasme (toujours selon le Dr. Piette).

L'anémone saine pourrait se trouver à un stade d'infection virale précédant le phénomène de blanchiment, que l'on retrouve de façon plus avancée chez l'individu blanchi.

¹ L'icosaèdre régulier est le cinquième des polyèdres réguliers. Il a 20 faces, 30 arêtes et 12 sommets. Les faces sont des triangles équilatéraux. Les sommets sont des angles pentaèdres (www.alain.be/icosaedre.html).

Figure 126 : Plaque virale chez *Aiptasia pulchella* saine.

Figure 127 : Plaques virales (flèches) chez *Aiptasia pulchella* saine.

Figure 128 : Plaque virale chez *Aiptasia pulchella* blanchie.

Figure 129 : Plaques virales (flèches) chez *Aiptasia pulchella* blanchie.

Figure 130 : Plaque virale chez *Aiptasia pulchella* blanchie. Chaque point (boule) est un virus.

Chapitre V :

DISCUSSION

I. Discussion de la densité en zooxanthelles dans les anémones saine et blanchie

Selon les coupes considérées, entre 2 et 18 fois plus de zooxanthelles sont recensées chez l'anémone saine par rapport à son homologue blanchi, et ce pour une même unité de surface. Cette différence peut paraître étonnamment faible lorsque l'on regarde les vues d'ensemble réalisées sur les coupes. Cependant, il faut noter que les sections coupées de l'individu blanchi étaient plus petites et possédaient donc moins de tissu endodermique que celles de l'individu sain. Voilà qui peut donner l'impression que l'organisme blanchi possède encore moins de zooxanthelles dans ses tissus que l'anémone non blanchie.

Une hypothèse pourrait suggérer que, dans la nature, une rétraction des tissus s'opère lors de la perte de zooxanthelles. Ceci aurait alors tendance à fausser le rapport entre des comptages réalisés sur ces deux types d'état, la surface endodermique observée n'étant plus la même qu'à l'origine...

Par ailleurs, une hétérogénéité de la distribution des zooxanthelles le long des tentacules a été révélée. En effet, il peut être remarqué que la zone la plus distale du tentacule (lame n°1) possède une densité moins importante en zooxanthelles que la zone qui suit directement (lame n°2). Cette différence résulterait peut-être d'une adaptation à un taux d'éclairement optimal dans cette zone. La partie la plus extrême du tentacule est en effet sujette à une trop forte luminosité et donc à un risque d'inhibition de la photosynthèse. Le maximum de densité zooxanthellaire se situe juste après cette zone. Ensuite, lorsque que l'on se rapproche du corps de l'anémone, une diminution de la densité en zooxanthelles s'observe le long du tentacule (de la lame n°2 à la lame n°4, cfr. Fig. 113, p. 59 et Fig. 114, p. 60). Une telle diminution du nombre de zooxanthelles, lors du rapprochement vers la base des tentacules, peut être envisagée avec l'idée d'une diminution de l'accès à la lumière au fur et à mesure que les tentacules se rapprochent et s'ombrent mutuellement.

En plus d'une hétérogénéité dans la distribution du nombre de zooxanthelles, il est également envisageable de trouver une hétérogénéité dans la distribution des différentes souches d'algues symbiotiques. En effet, vu que ces différentes souches possèdent vraisemblablement des besoins différents (e.a. de luminosité), il serait logique de les retrouver à des endroits différents de l'animal qui les héberge. Ainsi, des zones, où des souches de zooxanthelles plus résistantes à un type de stress sont « épargnées », pourraient se voir être le siège d'un phénomène de récupération interne par propagation de ces souches, qui ont résisté, jusqu'alors confinées en certains endroits. Il serait dès lors intéressant de tester la variabilité génétique de ces zooxanthelles.

II. Discussion de l'expérience de blanchiment artificiel

L'étude cinétique du blanchiment d'anémones à la suite d'un choc thermique nous montre qu'aucune différence significative ne peut être établie entre les deux conditions de stress testées (6h à 6 ou 32°C). La vitesse d'expulsion des zooxanthelles des anémones choquées est plus de 20 fois supérieure à celle de l'anémone témoin durant les 72 premières heures. Une augmentation de la vitesse d'expulsion des algues de ce dernier individu est ensuite observée. Cela est probablement dû au fait que les conditions de conservation des anémones ne sont pas adéquates et occasionnent dès lors un stress après un certain temps (problème d'oxygénation ou, plus vraisemblablement, d'illumination et ralentissement de la photosynthèse).

Cette expérience devrait évidemment être étendue à un nombre de réplicats suffisamment important, avec des conditions expérimentales bien définies et standardisées, et avec un meilleur système de maintenance (bonne oxygénation des petits aquariums, contrôle des différents paramètres chimiques de l'eau, lumière suffisante,...). Cependant, ce travail consistait en une approche préliminaire de ce genre d'expérimentation, qui fera l'objet de deux mémoires en biologie à part entière au cours de l'année académique prochaine.

Ce test nous a tout de même permis de mettre en évidence l'induction de l'expulsion de zooxanthelles par l'application d'un stress (supplémentaire) que constitue le choc thermique, à chaud ou à froid.

III. Discussion des observations réalisées au TEM

Les observations ultrastructurales d'anémones de mer saine, d'une part, et blanchie, d'autre part, ont révélé une différence notable de l'état du tissu endodermique et des zooxanthelles qu'il héberge, chez ces deux individus. L'anémone saine présente un endoderme bien rempli de zooxanthelles qui adhèrent à la paroi des vacuoles des cellules hôtes. L'anémone blanchie, par contre, révèle des algues beaucoup moins nombreuses, laissant place à des espaces de résorption et se détachant parfois du tissu.

La présence de matériel de réserve moins abondant chez les zooxanthelles d'anémones blanchies, contrairement à celles des coraux souffrant du même phénomène, est intéressante. Dans le premier cas, nous pourrions envisager un événement stressant qui pousserait les algues dans leurs retranchements, celle-ci devant alors utiliser leurs ressources pour survivre au mieux. Dans le second cas, nous pourrions imaginer un phénomène naturel d'expulsion des symbiotes, où un signal serait donné aux algues, leur permettant ainsi de faire des réserves avant de se retrouver libres dans l'eau de mer.

Des virus ont pu être mis en évidence chez les deux individus, sous forme de plaques à l'aspect gaufré. Ces plaques contiennent de quelques dizaines à plusieurs milliers de virus. Elles semblent toutefois plus abondantes (car plus facilement rencontrées) chez l'organisme blanchi. Les deux anémones prélevées proviennent du même aquarium et peuvent donc avoir subi la même infection virale, avec un décalage dans le temps. Ce phénomène est très certainement une conséquence du confinement en

aquarium en circuit fermé. En effet, un grand nombre de virus a déjà pu être mis en évidence dans l'eau, à la sortie du filtre d'un tel circuit (Fig. 131). L'anémone considérée comme saine pourrait donc se trouver dans un premier stade de blanchiment induit par une infection virale. La différence entre les deux individus correspondrait à un décalage dans le temps, soit de l'infection proprement dite, soit de la réponse à l'infection ; l'individu blanchi ayant peut-être répondu plus rapidement et plus fortement à ces virus. De plus, l'infection virale présente ici paraît se trouver en cycle lytique. Les virus, une fois multipliés dans la cellule, vont induire son éclatement pour ainsi pouvoir se répandre dans les autres cellules de l'organisme. Les cellules infectées sont donc, logiquement, destinées à mourir. Il peut être supposé qu'il y ait une combinaison accablante des effets de cette infection, d'autant plus en milieu fermé. Elle induirait l'expulsion des algues et provoquerait, en parallèle, la mort des cellules.

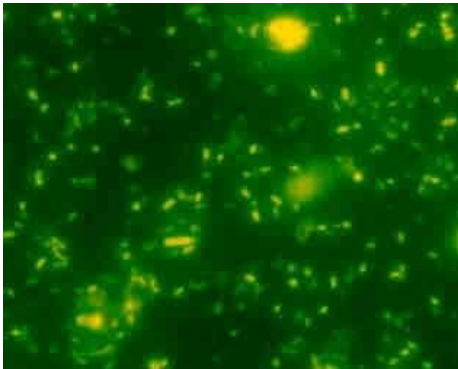


Figure 131 : Mise en évidence des populations de virus « libres », marqués au Sybrgreen, à la sortie du filtre d'un aquarium en circuit fermé (au microscope optique en épifluorescence, M. Poulicek).

Contrairement aux infections bactériennes qui peuvent être relativement ponctuelles (et qui n'ont pas été observées ici), les infections virales sont généralement répandues dans l'organisme. Cela a été confirmé par les présentes observations.

IV. Conclusion de la partie II

Les anémones étudiées dans ce volet présentent des différences ultrastructurales notables selon qu'elles sont saines ou blanchies. Les premières possèdent un endoderme rempli de zooxanthelles qui adhèrent presque parfaitement à la membrane des vacuoles des cellules hôtes les hébergeant. Les organites constitutifs de l'algue y sont bien différenciés. Les secondes possèdent en moyenne trois fois moins de symbiontes algaux. Ces derniers semblent se rétracter avec une tendance au détachement par rapport à l'endoderme les contenant. Le calcul des densités en zooxanthelles dans l'endoderme présente une hétérogénéité de la distribution des algues le long des tentacules ; ceci pouvant être l'illustration d'une adaptation afin de trouver l'éclairement optimal nécessaire à la photosynthèse.

Par ailleurs, des virus, sous forme de plaques virales, ont été détectés à l'intérieur de ces individus, quel que soit leur état de blanchiment. L'anémone blanchie semble, cependant, présenter une infection virale plus importante.

Enfin, l'induction du blanchiment par l'application d'un choc thermique a pu être vérifiée par l'expérience réalisée dans ce travail. En effet, les anémones soumises à un choc expulsent une vingtaine de fois plus de zooxanthelles que l'anémone maintenue

à température ambiante. Cette dernière subit tout de même un stress au-delà de 72h de maintien, dans des conditions vraisemblablement non idéales.

L'ensemble de ces observations et expérimentations serviront de base à des développements dans un travail ultérieur. Ce volet n'étant qu'une étape préliminaire à ce type d'étude, un nombre de réplicats suffisant et des conditions standardisées devront être considérés.

Les perspectives apparaissent intéressantes (après contrôles) pour que l'anémone *Aiptasia sp.*, actuellement considérée comme une peste par tous les conservateurs d'aquariums publics, trouve un intérêt en tant que modèle expérimental pour l'étude du blanchiment corallien.

Partie III :
Conclusion générale et
perspectives

CONCLUSION GÉNÉRALE et Perspectives

I. Conclusion générale

Le présent travail a permis de répondre à la plupart des objectifs déterminés au début de cette étude. L'analyse ultrastructurale de coraux sains et blanchis issus de milieux naturels et d'aquariums a révélé la présence de bactéries dans l'endoderme de trois échantillons (un individu sain, un individu blanchi naturellement et un individu infecté artificiellement en laboratoire). Le volume des coupes observées en microscopie électronique à transmission est tellement relatif par rapport au volume de l'individu considéré, qu'il n'est pas permis d'exclure une éventuelle infection bactérienne chez les autres individus échantillonnés. Par ailleurs, le corail sain qui présente des bactéries dans ses tissus pourrait se trouver dans une phase préliminaire du blanchiment car, en toute logique, l'individu doit être infecté avant de blanchir. Aucune plaque virale n'a été identifiée dans ces coraux mais un virus isolé semblerait, toutefois, avoir été observé chez un individu atteint de blanchiment.

Ces observations de la structure fine de l'endoderme des différents échantillons ont permis de définir des critères dans l'évaluation de l'état de blanchiment chez un corail. Ces critères concernent, outre la densité des zooxanthelles au sein de l'endoderme, la structuration interne de l'algue et la proportion relative de ses différents organites constitutifs, qui apparaissent plus élevées chez les individus sains. La présence de zooxanthelles détachées du tissu et d'espaces périplasmiques (entre l'algue et sa cellule hôte) plus importants chez les individus blanchis semble également être un bon élément du diagnostic du blanchiment corallien. L'observation du mucus au microscope électronique à balayage a révélé la présence d'un plus grand nombre de zooxanthelles dans cette couche mucopolysaccharidique, chez les organismes subissant un blanchiment.

Par ailleurs, les conditions expérimentales et les divers protocoles nécessaires à l'étude de la diversité génétique des communautés bactériennes associées aux madrépores et présentes dans l'eau de mer ont pu être déterminés. C'est également le cas pour la visualisation en épifluorescence de bactéries ciblées par des anticorps marqués. Ces protocoles peuvent, dès lors, être appliqués à toute une gamme d'échantillons et faire l'objet de nouvelles perspectives.

L'étude du blanchiment chez l'anémone de mer *Aiptasia pulchella* comme nouvel outil potentiel dans l'étude du blanchiment corallien a, dans la seconde partie de ce mémoire, mis en évidence les mêmes constatations que celles obtenues pour les coraux au niveau ultrastructural. En effet, les anémones blanchies, possèdent moins d'algues symbiotiques que les saines. Ces algues ont tendance à se rétracter et à se détacher du tissu. Les anémones présentent une hétérogénéité dans la distribution des zooxanthelles le long des tentacules. La répartition hétérogène des différentes souches d'algues symbiotiques pourrait avoir des implications dans la récupération suite à un stress induisant un blanchiment. Une (des) souche(s) qui ont résisté au stress pourraient alors se multiplier et se répandre à d'autres régions tissulaires de l'individu concerné. Cette hypothèse va à l'appui de la théorie de « récupération interne ». De plus, les deux

anémones observées présentent, contrairement aux coraux, de nombreuses plaques virales. Enfin, l'étude préliminaire de la cinétique du blanchiment prouve que l'induction d'un choc thermique (chaud ou froid) conduit à l'expulsion d'un nombre important de zooxanthelles, en plus d'un éventuel échange naturel de symbiontes avec le milieu environnant.

II. Perspectives

L'observation en microscopie électronique peut être étendue à d'autres échantillons. En effet, les « images de recherche » de bactéries et de virus sont, à présent, mieux définies.

En ce qui concerne l'étude de la diversité génétique des bactéries associées aux coraux, il faudrait à présent réaliser une étude comparative poussée au niveau des communautés associées aux coraux sains et blanchis, avec et sans poissons territoriaux, des bactéries contenues dans les intestins de ces poissons et dans des échantillons d'eau prélevée à différentes distances des colonies étudiées. Cela, afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les coraux associés à des poissons Pomacentridae présenteraient plus de résistance au blanchiment et afin de définir quelles sont les espèces de bactéries qui diffèrent d'un individu blanchi d'un individu sain de la même espèce, voire de la même colonie. Nous envisageons de continuer dans cette perspective dans le cadre d'une thèse de doctorat.

L'étude de la cinétique de blanchiment chez *Aiptasia* ayant pu être amorcée dans ce mémoire, elle fera l'objet de travaux à part entière l'année prochaine. Ce travail se basera sur un plus grand nombre d'individus, sera mieux standardisé et pourra étudier plusieurs facteurs impliqués dans le blanchiment de ces anémones, et indirectement celui des coraux. Un aspect particulier concernera les HSP, expression des « protéines de stress » chez ces organismes.

L'hétérogénéité de la distribution des différentes souches de zooxanthelles dans les tissus coralliens a déjà été constatée. Il serait dès lors intéressant de tester la variabilité génétique de ces souches à différents niveaux dans l'organisme hôte et de mieux observer ainsi cette distribution de souches algales.

Un volet virologie supplémentaire pourrait être ouvert dans la continuité du présent travail afin d'étudier plus profondément la physiologie, le mode de reproduction et les effets des virus ayant été découverts. Cependant, une meilleure résolution en microscopie est nécessaire afin de pouvoir étayer les hypothèses avancées dans le présent travail. Un modèle cellulaire animal devra en outre être choisi afin de permettre à ces virus de se reproduire.

Les souches bactériennes achetées à l'Université de Gand pourront faire l'objet d'expériences d'infection en laboratoire sur des coraux élevés en aquarium et de recherches dans différentes voies selon l'hypothèse bactérienne du blanchiment corallien (étude génétique, physiologique, morphologique, ...). Des travaux en collaboration avec l'EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes) et l'Université de Perpignan, l'Université de Nice et le CEB de Monaco (centre de biologie marine) sont envisagés dès la rentrée prochaine.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Baker, A.C. 2001.** Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411:765-766, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.23.*
- **Baker, A.C. 2003.** Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis : diversity, ecology and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu Rev Ecol Syst* 34:661-689, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 8.*
- **Baker, A.C. and Rowan, R. 1997.** Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Carribean and eastern Pacific. *Proc 8th Int Coral Reef Symp* 2:1301-1306.
- **Banaszak, A.T. and Trench, R.K. 1995.** Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. I. Response of the algal symbionts in culture and *in hospite*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:213-232, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E. and Rosenberg, E. 2000.** Penetration of the Coral Bleaching Bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, July 2000, p. 3031-3036, Vol. 66, No. 7.
- **Ben-Haim, Y., Banin, E., Kushmaro, A., Loya, Y. and Rosenberg, E. 1999.** Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*. *Environ Microbiol* 1:223-229, in *Kushmaro et al., 2001.*
- **Ben-Haim, Y. and Rosenberg, E. 2002.** A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar Biol* (2002) 141:47-55.
- **Ben-Haim, Y., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J. and Rosenberg, E. 2003.** *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:309-315.
- **Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M. and Rosenberg, E. 2003.** Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl Env Microbiol*, July 2003, p.4236-4242.
- **Brown, B. E. 1997.** Coral bleaching : causes and consequences, p. 65-74. In *Proc 8th Int Coral Reef Symp, vol.1.*
- **Brown, B.E., Dunne, R.P., Scoffin, R.P. and Le Tissier, M.D.A. 1994.** Solar damage in intertidal corals. *Mar Ecol Prog Ser* 105:219-230, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **Buddemeier, R.W. and Fautin, D.G. 1993.** Coral bleaching as an adaptative mechanism. *BioScience* 43:320-326, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Buddemeier, R.W., Fautin, D.G. and Ware, J.R. 1997.** Acclimation, adaptation and algal symbiosis in reef-building scleractinian corals. *Proc 6th Int Conf Coel Biol, The Netherlands. 1995* 1:3-10, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Bussers, J.C. and Vandewalle, P. 2000.** Analyse fonctionnelle des peuplements bactériens associés aux scléactiniaux, in « Les Récifs Coralliens, 2^{ème} partie : aspects biologiques », p. 351-388. *OCEANIS, Institut Océanographique Editions (Paris).*
- **Coffroth, M.A., Lasker, H.R. and Oliver, J. 1988.** Coral mortality outside of the Eastern Pacific during 1982-83 : Relationship to El Niño. *Pp.141-182 in*

Some Ecological Consequences of the 1982/83 El Niño Event to Marine Life.
P.W. Glynn. Ed. Elsevier, Amsterdam. In Kinzie et al., 2001.

- **Coles, S.L. and Fadlallah, Y.H. 1991.** Coral reef survival and mortality at low temperatures in the Arabian Gulf: new species-specific lower temperature limits. *Coral Reefs* 9:231-237, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **Davin, E. 2002.** Comparaison méthodologique des bibliothèques de clones et DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pour décrire la diversité moléculaire des cyanobactéries. *Travail de fin d'études, Rennequin Sualem, Liège.*
- **D'Elia, C. F., Buddemeier, R. W. and Smith, S. V. 1991.** Workshop on coral bleaching, coral reef ecosystems and global changes. *Report of proceedings. June 1991. Maryland Sea Grant College, College Park, Md.*
- **Edmundes, J.P. 1991.** Extent and effect of black band disease. *Coral Reefs* 10:161-165, in *Rosenberg & Loya, 2004, Chap. 11.*
- **Fautin, D. G. and Buddemeier, R. W. 2004.** Adaptative bleaching : a general phenomenon. *Hydrobiologia* 530/531: 459-467.
- **Fitt, W.K. and Warner, M.E. 1995.** Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. *Biol Bull (Woods Hole)* 187:298-307, in *Rosenberg & Loya, 2004, Chap. 25.*
- **Fitt, W.K. 2000.** Cellular Growth of Host and Symbiont in a Cnidarian-Zooxanthellar Symbiosis. *Biol Bull* 198:110-120.
- **Frias-Lopez, J., Zerkle, L.A., Bonheyo, T. and Fouke, W.B. 2002.** Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black-band diseased, and dead coral surfaces. *Appl Environ Microbiol* 68:2214-2228.
- **Gates, R. D., Beghdasarian, G. and Muscatine, L. 1991.** Temperature stress causes host cells detachment in symbiotic cnidarians : implications for coral bleaching. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 182: 324-332.
- **Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G. 1990.** Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63, in *Wilmotte et al., 2002.*
- **Gleason, D.F. and Wellington, G.M. 1993.** Ultraviolet radiation and coral bleaching. *Nature* 365:836-838, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **Glynn, P. W. 1984.** Widespread coral mortality and the 1982-1983 El Niño warming event. *Environ. Conserv.* 11:133-146, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Glynn, P. W. 1991.** Coral reef bleaching in the 1980s and possible connections with global warming. *Trends Ecol. Evol.* 6:175-179.
- **Glynn, P. W. 1991.** Elimination of two reef building hydrocorals following the 1982-83 El Niño event. *Science* 253: 69-71.
- **Glynn, P. W. 1993.** Coral reef bleaching ecological perspectives. *Coral Reefs* 12:1-17, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **Goreau, T.F. 1964.** Mass expulsion of zooxanthellae from Jamaican reef communities after Hurricane Flora. *Science* 145:383-386, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Goreau, T.J. 1992.** Bleaching and reef community change in Jamaica : 1951-1991. *Am. Zool.* 32:683-695, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Hoegh-Guldberg, O. and Smith, G.J. 1989.** The effect of sudden changes in temperature, irradiance and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* (Esper 1797) and *Seriatopora hystrix* (Dana 1846). *J Exp Mar Biol Ecol* 129:279-303, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*

- **Hoegh-Guldberg, O. and Salvant, B. 1995.** Periodic mass bleaching and elevated sea temperatures : bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 121: 181-190.
- **Hoegh-Guldberg, O. 1999.** Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshwater Res* 50:839-866, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **Huppert, A. and Stone, L. 1998.** Chaos in the Pacific's coral bleaching cycle. *Am Nat* 152:447-459, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 7.*
- **Iglesias-Prieto, R., Matta, J.L., Robis, W.A. and Trench, R.K. 1992.** Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:10302-10305, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Israely T., Banin, E. and Rosenberg, E. 2001.** Growth, differentiation and death of *Vibrio shiloi* in coral tissue as a function of seawater temperature. *Aquat Microb Ecol* 24:1-8.
- **Jokiel, P. L.** Temperature stress and coral bleaching, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.23.*
- **Jokiel, P. L. and Coles, S. L. 1977.** Effects of temperature on the mortality and growth of Hawaiian reef corals. *Mar Biol* 43:201-208, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **Jokiel, P. L. and Coles, S. L. 1990.** Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperatures. *Coral Reefs* 8 : 155-162.
- **Kinzie, R.A. and Buddemeier, R.W. 1996.** Reefs Happen. *Global Change Biol* 2:479-494, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Kinzie, R. A., Takayama, M., Santos, S. R. and Coffroth M. A. 2001.** The Adaptive Bleaching Hypothesis : Experimental tests of critical assumptions. *Biol. Bull.* 200: 51-58, Feb. 2001.
- **Kobluk, D.R. and Lysenko, M.A. 1994.** "Ring" bleaching in southern Caribbean *Agaricia agaricites* during rapid water cooling. *Bull. Mar. Sci.* 54:142-150, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Kushmaro, A., Loya, Y., Fine, M. and Rosenberg, E. 1996.** Bacterial infection and coral bleaching. *Nature* 380:396.
- **Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M. and Loya, Y. 1997.** Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Mar Ecol Prog Ser* 147:159-165.
- **Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., Ben-Haim, Y. and Loya, Y. 1998.** Effects of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio shiloi* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171 : 131-137.
- **Kushmaro, A., Rosenberg, E. and Loya, Y. 1999.** Species-specific properties of the coral mucus microbial communities. In *Kushmaro & Loya, 2004, chap. 11.*
- **Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E. and Rosenberg, E. 2001.** *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1383-1388.
- **Ladrière, O., Decloux, N., Vandewalle, P. and Poulicek, M. 2006.** The sea anemone *Aiptasia* sp. : a potential new laboratory material for the study of coral bleaching. *Abstract-poster in the proceedings of the 10th Bioforum, University of Liege, Belgium, May 17th 2006.*

- **LaJeunesse, T.C., Loh, W.K.W., van Woesik, R., Hoegh-Guldberg, O., Schmidt, G.W. and Fitt, W.K. 2003.** Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals relative to those of the Caribbean. *Limnol Oceanogr* 2046-2054, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 8.*
- **Léonard, L. 2006.** Diversité génotypique et toxigénicité des cyanobactéries dans les lacs belges et africains. *Travail de fin d'études, Rennequin Sualem, Liège.*
- **Lesser, M.P. and Shick, J.M. 1989.** Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida* : primary production, photo-inhibition, and enzymatic defenses against oxygen toxicity. *Mar. Biol.* 102:243-255, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Lesser, M.P., Stochaj, W.R., Tapley, D.W. and Shick, J.M. 1990.** Bleaching in coral reef anthozoans : effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs* 8:225-232, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 25.*
- **McAuley, P.J. 1994.** Interactions between hosts and symbionts in algal invertebrate intracellular symbiosis. *Bot J Scotl* 47:97-112, in *Fitt, 2000.*
- **McClanahan, T.** Coral bleaching, diseases and mortality in the western indian ocean. *Dans Coral Health and Disease de Rosenberg & Loya, 2004, chap.7.*
- **Mitchell, R. and Chet, I. 1975.** Bacterial attack of corals in polluted seawater. *Microb Ecol* 2:227-233, in *Rosenberg & Loya, 2004, Chap. 11.*
- **Muscatine, L. and Pool, R.R. 1979.** Regulation of numbers of intracellular algae. *Proc R Soc Lond* 204:131-139, in *Fitt, 2000.*
- **Muscatine, L., Grossman, D. and Doino, J. 1991.** Release of symbiotic algae by tropical sea-anemones and coral after cold shock. *Mar Ecol Prog Ser* 77:233-243, in *Rosenberg & Loya, 2004, Chap. 25.*
- **Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden A.G. 1993.** Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology, Mar.1993, p. 695-700.*
- **Nakano, Y., Yamazato, K., Masuhara, H. and Ito, S. 1997.** Responses of Okinawan reef-building corals to artificial high salinity. *Galaxia* 13:181-195, in *Kinzie et al., 2001.*
- **Palowski, J., Holzmann, M., Fahrni, J.F., Pochon, X. and Lee, J.J. 2001.** Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera : 2. Dinoflagellates. *J Eukaryot Microbiol* 48 :368-373, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.8.*
- **Patterson, K.L., Porter, J.W. and Ritchie, K.E. 2002.** The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (13): 8725-8730, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.11.*
- **Pochon, X., Palowski, J., Zaninetti, L. and Rowan, R. 2001.** High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar Biol* 139:1069-1078, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.8.*
- **Poulicek, M. 2006.** Ecologie des récifs coralliens. *Notes de cours du DEA en Océanologie, Université de Liège.*
- **Poulicek, M., Ladrière, O., Decloux, N., Vandewalle, P. and Michel, Ch. 2006.** *Aiptasia*, a potential « white mouse » material for laboratory work in coral bleaching. Submitted.

- **Reimer, A.A. 1971.** Observations on the relationships between several species of tropical Zoanthids (Zoantidae, Coelenterata) and their zooxanthellae. *J Exp Mar Biol Ecol* 7:207-214, in Fitt, 2000.
- **Ritchie, K.B., Dennis, J.H., McGrath, T. and Smith, G.W. 1994.** Bacteria associated with bleached and nonbleached areas of *Montastrea annularis*. In *Rosenberg & Loya, 2004, chap. 11*.
- **Ritchie, K.B. and Smith, G.W. 1995.** Preferential carbon utilization by surface bacterial communities from water mass, normal, and white-band diseased *Acropora cervicornis*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4(4):345-352, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.11*.
- **Ritchie, K.B. and Smith, G.W. 1997.** Physiological comparison of bacterial communities from various species of scleractinian corals. *Proc 8th Int Coral Reef Symp1*:521-526.
- **Rohwer, F., Breitbart, M., Jara, J., Azam, A. and Knowlton, N. 2001.** Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs* 20: 85-91.
- **Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, A. and Knowlton, N. 2002.** Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 243:1-10.
- **Rosenberg, E. and Loya, Y. 1999.** *Vibrio shiloi* is the etiological (causative) agent of *Oculina patagonica* bleaching : General implications. *Reef Encounter* 25:8-10, in *Kinzie et al., 2001*.
- **Rosenberg, E. and Loya, Y (Eds.). 2004.** Coral Health and Disease. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- **Rowan, R. 1998.** Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J Phycol* 34:407-417, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.8*.
- **Rowan, R. and Powers, J.D. 1991a.** A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* 251:1348-1351, in *Kinzie et al., 2001*.
- **Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A.C. and Jara, J. 1997.** Landscape ecology of algal symbiont communities explains variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388:265-269, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.8*.
- **Ruppert, E. E. and Barnes, R. D. 1996.** *Invertebrate zoology, 6th edition.* *Harcourt Eds.*
- **Santavy, D.L. and Peters, D.C. 1997.** Microbial pests : coral disease in the western Atlantic. *Proc 8th Int Coral Reef Symp 1*:607-612, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.11*.
- **Sawyer, S., J. and Muscatine, L. 2001.** Cellular mechanisms underlying temperature-induced bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *The Journal of Experimental Biology* 204, 3443-3456.
- **Steen, R.G. and Muscatine, L. 1987.** Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *Biol. Bull.* 172:246-263, in *Kinzie et al., 2001*.
- **Suefuji, M. and Van Woesik, R. 2001.** Coral recovery from the 1998 bleaching event is facilitated in *Stegastes* (Pisces: Pomacentridae) territories, Okinawa, Japan. *Coral Reefs* 20(4):385-386, in *Theunis, 2005*.
- **Szmant, A.M. and Gassman, N.J. 1990.** The effects of prolonged “bleaching” on the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*. *Coral Reefs* 8:217-224, in *Rosenberg & Loya, 2004, chap.23*.

- **Tannock, G., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J. and Gopal, P.K. 2000.** Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*, June 2000, p. 2578-2588.
- **Theunis, L. 2005.** Les Pomacentridae associés aux Scléactiniaires : incidence sur le blanchissement. *Mémoire de DEA en Océanologie, ULg.*
- **Theunis, L. and Poulicek, M. 2006.** Damsel fishes associated with coral patches : a bacterial protective effect against coral bleaching? *Abstract-poster in the proceedings of the 10th Bioforum, University of Liege, Belgium, May 17th 2006.*
- **Toren, A., Landau, L., Kushmaro, A., Loya, Y. and Rosenberg E. 1998.** Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Appl Environ Microbiol* 64:1379-1384, in Kushmaro et al., 2001.
- **Trench, R.K. 1992.** Microalgal-invertebrate symbiosis, current trends. *Encyclopedia of Microbiology, vol3. Academic Press, London, pp129-142, in Rosenberg & Loya, 2004.*
- **Van Woessik, R., De Vantier, L.M. and Glazebrook, J.S. 1995.** Effects of cyclone Joy on nearshore coral communities of the Great Barrier Reef. *Mar Ecol Prog Ser* 128:261-270, in Rosenberg & Loya, 2004, chap.25.
- **Veron, J.E.N., Pichon, M., Wallace, C.C. and Wijsman-Best, M. 1977.** Scleractinia of eastern Australia. *Australian Institute of Marine Science Monograph Series.*
- **Ware, J.R., Fautin, D.G. and Buddemeier, R.W. 1996.** Patterns of coral bleaching : modeling the adaptive bleaching hypothesis. *Ecological Modelling* 84:199-214, in Fautin & Buddemeier, 2004.
- **Warner, M.E., Fitt, W.K. and Schmidt, G.W. 1996.** The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae *in hospite* from four different species of reef coral : a novel approach. *Plant Cell Environ.* 19:291-299, in Kinzie et al., 2001.
- **Wilkinson, C. R. 2000.** Status of coral reefs of the world : 2000. *Australian Institute of Marine Science, Cape Ferguson, Queensland, Australia, 363 pp.*
- **Wilmotte, A., Demonceau, C., Goffart, A., Hecq, J.H., Demoulin, V. and Crossley, A.C. 2002.** Molecular and pigment studies of the picophytoplankton in a region of the Southern Ocean (42-54°S, 141-144°E) in March 1998. *Deep-Sea Research II*, 49:3351-3363.
- **Yonge, C.M. and Nichols, A.G. 1931.** Studies on the physiology of corals. IV. The structure, distribution, and physiology of the zooxanthellae. *Sci Rep Great Barrier Reef Exped I:135-176, in Fitt, 2000.*
- **Zhongtang, Y. and Morrison, M. 2004.** Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug.2004, p.4800-4806.

- Le Petit Larousse Illustré, 2002.
- **Sites internet :**
 - www.centrescientifique.mc
 - www.calacademy.org
 - <http://fr.wikipedia.org>
 - www.molbiol.edu.ru
 - www.siremlab.com
 - www.alain.be/icosaedre.html
 - www.le-dictionnaire.org

Annexes

Annexe 1 : réactifs et solutions

Biologie moléculaire/génétique

A. Echantillonnage

- Ethanol 100%
- Tampon de lyse : 40 mM EDTA
400 mM NaCl
0,75 M saccharose
50 mM Tris-HCl, pH=8,3

B. Extraction de l'ADN génomique

- Lysozyme (MBI-Fermentas, DE) : 50 mg/mL
- SDS : 10 %
- Protéinase K (MBI-Fermentas, DE) : 20 mg/ml
- Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (VWR International, UK) : 25/24/1 (V/V/V) (pH = 8)
- Chloroforme/alcool isoamylique (MERCK, DE) : 24/1 (V/V)
- NaAc : 3 M (pH = 5,6)
- Ethanol pur (VWR International, UK)
- Ethanol 70 %
- TE⁻⁴ : 10 mM Tris-HCl, pH = 7,4
0,1 mM Na₂EDTA, pH = 8
- ou Kit Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food (Promega)
- + billes de verre 0,1 mm (Poly Labo)

C. Purification

- kit Wizard[®] DNA Clean Up System (Promega)
- Isopropanol 80 % (T°C ambiante) (MERCK, DE)
- TE⁻⁴ à 80°C

D. PCR

- Tampon pour la Super Taq Plus Polymérase (HT Biotechnology, UK)
100 mM Tris-HCl, pH = 9
15 mM MgCl₂
500 mM KCl
1 % triton X-100 (détergent)
0,1 % (p/v) stabilisant
- Amorces PCR (Eurogentec) :

- 357F : 5'-CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AG-3'
(Tm(2AT+4GC) : 58°C)
 - 518R : 5'-ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GG-3'
(Tm(2AT+4GC) : 56°C)
 - 907R : 5'-CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT-3'
(Tm(2AT+4GC) : 56°C)
 - GC357F : 5'-CGC-CCG-CCG-CGC-CCC-GCG-CCC-GGC-
CCG-CCG-CCC-CCG-CCC-CCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG-
3' (Tm(2AT+4GC) : 218°C)
- Super Taq Plus polymérase (HT Biotechnology, UK)
 - dNTP (MBI -Fermentas, DE)
 - BSA (Bovine Serum Albumine), 10 mg/mL (Sigma, USA)
 - Ou kit AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase System (Invitrogen™)
 - Thermocycleur ICycler (BioRad, USA)

E. Electrophorèse

- Solution de charge (loading dye) : 45 % bleu de bromophénol
45 % glycérol à 99 %
10 % EDTA (0,5 M)
- TAE 50X (Tris-Acétate-EDTA) : 2 M Tris-HCl
1 M d'acide acétique glacial (Vel)
0,5 M EDTA
- Marqueurs de longueur

Marqueur pBR 322 DNA/AluI (MBI-Fermentas, DE) :

Le vecteur de clonage pBR 322 est digéré par l'enzyme de restriction AluI ce qui génère 17 fragments (en pb) de 908, 659, 656, 521, 403, 281, 257, 226, 100, 90, 63, 57, 49, 46, 19, 15, 11.

- Gel de migration 1,5 % (agarose MP Roche, DE)
- + générateur de potentiel PowerPac 300 (BioRad, USA) et cuve à électrophorèse (BioRad, USA, SUB-CELL® GT 25x15cm)

F. DGGE

- Formamide désionisée (Sigma, USA)
- Urée (BioRad, USA)
- Acrylamide/Bis acrylamide Protogel 37,5 : 30 % (National Diagnostics, USA)
- Persulfate d'ammonium (APS) (National Diagnostics, USA) : dissoudre 200 mg dans 2 mL d'eau désionisée

- N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine (Temed) (National Diagnostics, USA) : solution prête à l'emploi
- GelStar[®] (BioWhittaker, USA) : dans un tube Falcon, diluer 2 µL de GelStar[®] dans 15 mL d'eau désionisée
- TAE 1X
- TAE 50X
- Solution de charge (loading dye)

- Marqueur DGGE :
Composé d'amplicons de *Cylindrospermum* PCC7417, *Calothrix* 328, *Aphanizomenon* 202a et *Nostoc* 152 obtenus avec les amorces 378F et 781RGC(a) et d'amplicons de *Microcystis* 130 et *Synechococcus* GL50636 obtenus avec 378F et 781RGC(b) (don de P. Rajaniemi, Helsinki University, Finlande).

- + Cuve Dcode[™] Universal Mutation Detection System (BioRad, USA) et générateur PowerPac 300 (BioRad, USA)

Annexe 2 : Protocoles de biologie moléculaire utilisés

I. Extraction de l'ADN bactérien

A) Extraction de filtres

L'ADN bactérien est extrait des prélèvements sur filtre selon le protocole de Giovannoni *et al.*, 1990, modifié par Wilmotte *et al.*, 2002. Les filtres sont conservés dans 2 ml de tampon de lyse.

➤ Lyse enzymatique

Après décongélation de l'échantillon baignant dans le tampon de lyse, 50 µl de lysozyme (50 mg/ml) sont ajoutés et l'échantillon est directement mis à incuber durant 20 min dans un bain-marie à 37°C.

À la suite de cette incubation, 100 µl de SDS 10% et 30 µl de protéinase K sont incorporés aux échantillons. Ensuite, il faut placer le flacon de phénol/chloroforme/alcool isoamylique avec les échantillons dans le bain-marie jusqu'à ce que la température atteigne 56°C.

Toujours sous hotte, 2 ml de phénol/chloroforme/ alcool isoamylique à 56°C sont ajoutés. Le tube est ensuite doucement remué et incubé 10 min à 56°C.

➤ Extraction

Les échantillons sont centrifugés pendant 15 min à 3500 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube Falcon® de 15 ml. L'ADN se trouve exclusivement dans la phase supérieure (aqueuse) tandis que les protéines se trouvent à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Dans la phase organique se trouvent les débris.

2 ml de chloroforme/ alcool isoamylique incubé préalablement à 56°C sont ajoutés. Le tube est remué doucement et mis à incuber 20 min à 56°C.

➤ Précipitation

Une centrifugation des échantillons à 3500 rpm durant 15 min est à nouveau réalisée. Ensuite, 450 µl du surnageant sont transférés dans plusieurs eppendorfs® de 1,5 ml. 45 µl de NaAc 3M (acétate de sodium) sont rajoutés à chacun des tubes afin de favoriser la précipitation de l'ADN, soit 1/10 V NaAc 3M et 2 V d'éthanol. Les tubes sont ensuite mélangés par inversion.

990 µl d'éthanol pur sont ensuite incorporés aux échantillons et les tubes mélangés. L'éthanol pur permet la précipitation de l'ADN sans le dénaturer. L'ADN précipite ainsi durant une nuit à -20°C.

Le lendemain, les échantillons sont centrifugés pendant 20 min à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé et 1 ml d'éthanol 70% est ajouté aux culots. L'ADN se trouve

dans le précipité. Le rinçage à l'éthanol 70% permet l'élimination des sels et des impuretés.

Les échantillons sont à nouveau centrifugés à 13 000 rpm durant 10 minutes, le surnageant éliminé et le culot laissé à sécher pendant 30 min.

50 µl de TE⁻⁴ sont ajoutés au premier tube de la série de tubes constituant l'échantillon entier. A l'aide d'une pipette, le contenu du premier tube est transféré dans le deuxième. Le contenu de ce dernier est transféré dans le troisième, et ainsi de suite. Au final, il ne demeure plus qu'un seul Eppendorf[®] dans lequel sont rassemblés les contenus des différents tubes d'une même série.

➤ Purification

La purification se réalise à l'aide du kit Wizard[®] DNA Clean Up System de Promega. Ce kit contient une seringue que l'on remplira de résine (thiocyanate de guanidium) fournie avec le kit et qui sera fixée sur une mini-colonne (matrice de silice qui lie l'ADN). Le tout est placé sur un système de pompe à vide permettant d'éliminer les solvants organiques, les dernières impuretés présentes après l'extraction de l'ADN et, in fine, de récupérer l'ADN.

Les tubes sont mis au bain-marie à 55°C pendant 5 à 10 minutes, de même que la résine. Cette incubation permet de dissoudre les culots. La mini colonne et la seringue sont fixées au système de pompe à vide et le TE⁻⁴ est préchauffé au bain-marie à 80°C.

1 ml de résine chaude est ajouté à l'échantillon contenant l'ADN. Le tout est mélangé plusieurs fois par inversion. Ce mélange résine/ADN est déposé dans la mini-colonne. Le vide est réalisé afin de faire passer le mélange sur le filtre de la mini-colonne qui est rincée 2 fois avec 1 ml d'isopropanol 80%. Cette étape doit cependant se réaliser très rapidement car la résine durcit vite à température ambiante, d'une part et, car la succion créée par le vide, en absence de solution, pourrait abîmer le filtre sur lequel se trouve l'ADN, d'autre part. Il est donc nécessaire d'effectuer cette manipulation échantillon après échantillon.

Les mini-colonnes sont ensuite placées sur des nouveaux Eppendorf[®] et mis à centrifuger 2,5 min à 12 400 rpm. Le possible isopropanol résiduel se voit ainsi éliminé.

De nouveaux Eppendorf[®] sont utilisés pour récupérer les mini-colonnes. 50 µl de TE⁻⁴ à 80°C sont ajoutés et les tubes avec mini-colonnes sont centrifugés 30 secondes à 12 400 rpm pour récupérer l'ADN. Les mini-colonnes sont alors jetées et les échantillons congelés.

B) Extraction de bouts de corail

Le kit Wizard[®] Magnetic DNA Purification System For Food de Promega a été utilisé pour extraire l'ADN bactérien à partir de bouts de coraux. Cependant, une étape a été ajoutée au protocole pour « arracher » le mucus du reste du morceau. Cette étape intervient après avoir placé le morceau de corail dans un tube Eppendorf[®] de 2 ml auquel on a rajouté 500 µl du tampon de lyse A (du kit utilisé). Elle consiste en l'ajout

de billes de verre (0,1 μm de diamètre) autoclavées, qui vont arracher le mucus lors de l'agitation du tube sur vortex pendant 15 minutes, à puissance maximale.

Ensuite, en suivant le protocole Promega, 5 μl de RNase A sont rajoutés aux échantillons avant de remettre les tubes sur le vortex pendant 5 min. Puis, un ajout de 250 μl de tampon de lyse B est effectué et un mélange de 2 min sur vortex est réalisé. Les échantillons incubent alors 20 minutes à température ambiante.

750 μl de solution de précipitation sont ajoutés à chaque tube qui sont alors passés sur vortex durant 2 minutes. Le morceau de corail détaché de son mucus est enlevé (et remis dans un autre tube au congélateur) et une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm est effectuée sur les tubes. Le liquide est par la suite récupéré et mis dans un nouveau tube de 2 ml ; les billes de verre sont jetées.

Avant de pouvoir utiliser la solution de microbilles MagneSil[®] PMPs, il faut secouer le flacon vigoureusement durant 15 à 30 secondes pour s'assurer que les particules sont correctement suspendues à nouveau. Après cela, 50 μl de MagneSil[®] PMPs sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite vortexé (il est important de noter le volume dans le tube).

Un volume d'isopropanol équivalent à 8/10ième du volume de l'échantillon est ajouté et le tube est mélangé par inversion 10 à 15 fois. Le tout est incubé 15 min à température ambiante (22-25°C) en mélangeant de temps à autre.

Les tubes sont ensuite insérés sur le support MagneSphere[®] Technology Magnetic Separation Stand et laissés en place durant 1 minute. Le liquide est alors pipeté tout en laissant les tubes sur le support. Les tubes sont retirés du support et on y ajoute 250 μl de tampon de lyse B. Ils sont inversés 2-3 fois pour bien les mélanger puis placés sur le support pendant 1 minute et le liquide est enlevé. Cette opération est réalisée 3-4 fois.

Les échantillons sont resuspendus dans 1 ml d'éthanol 70% (solution de lavage). Les tubes sont remis sur le support pendant 1 min et le liquide est jeté. Cette étape est également répétée 3-4 fois en veillant bien à enlever un maximum de liquide au dernier lavage. Les tubes sèchent alors sous la hotte durant environ 1 h à température ambiante.

La dernière étape consiste à rajouter 100 μl d'eau DEPC (autoclavée et filtrée sur filtre de 0,2 μm de maille ; sans nucléases) et à vortexer les échantillons puis les incuber 10 min à 65°C. Le liquide contenant l'ADN est alors récupéré après 1 minute sur le support de séparation. Le volume de l'échantillon est amené à 100 μl avec de l'eau DEPC si tel n'était pas le cas. Les échantillons sont alors mis au congélateur.

II. Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour constituer un gel d'1,5%, il convient de mélanger 0,75 g d'agarose à 50 ml de tampon TAE 1X (pour le type de bac utilisé). L'agarose est dissout dans le tampon, au four à micro-ondes. Le gel est ensuite coulé dans un petit bac avec un peigne et laissé à polymériser une heure environ. Une fois polymérisé, il est placé dans une cuve à électrophorèse contenant du TAE 1X (Fig. X). Par puits, 12 μl d'ADN mélangés à 3 μl

de bleu de charge sont injectés. Le gel est ensuite mis à migrer 45 min à 90 Volts. Pour pouvoir être visualisé, le gel est baigné dans du bromure d'éthidium environ 30 sec puis rincé durant 20 min dans l'eau. La visualisation s'opère sous lampe UV.

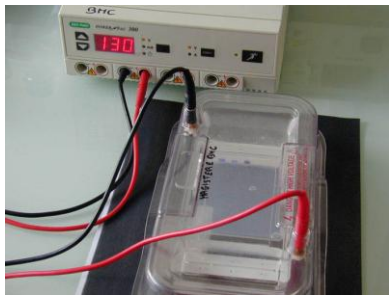


Figure X: photo d'une cuve d'électrophorèse et générateur associé.

III. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou DGGE

Avant de pouvoir couler les gels, il convient de monter le dispositif et de préparer les solutions dénaturantes. Les vitres et les espaceurs sont lavés au détergent et ensuite rincés à l'eau désionisée puis à l'alcool. Les vitres, séparées par les espaceurs, sont placées entre des pinces et déposées sur le support (Fig. Y).

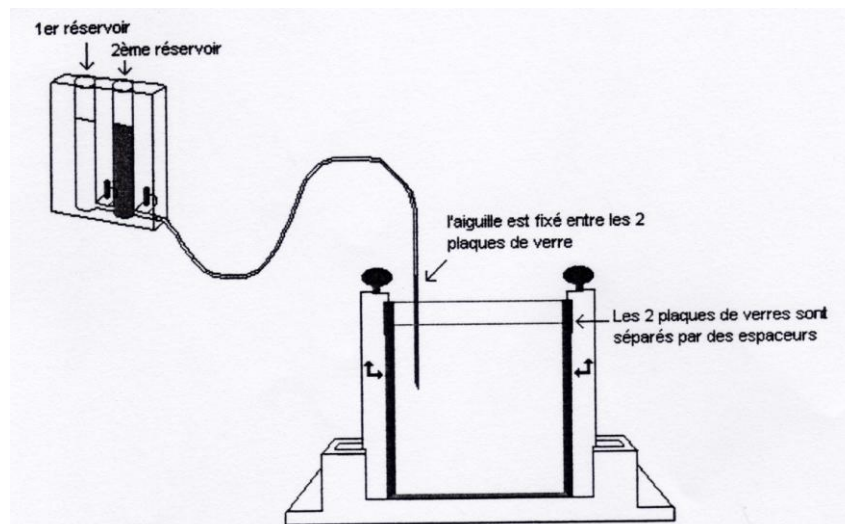


Figure Y : schéma du dispositif et du montage réalisé pour couler le gel (Davin, 2002).

Deux solutions d'acrylamide sont réalisées : une sans produit dénaturant (0 %) et une totalement dénaturante (100 %, 7 M d'urée et 40 % de formamide).

Les solutions sont amenées à un volume de 100 ml à l'aide d'eau désionisée et filtrées avec des unités de filtration Nalgène® de maille 0,22 µm. Elles sont alors conservées à 4°C. Avant utilisation, les cristaux d'urée qui se sont formés dans la solution dénaturante à 100 % sont dissous durant quelques minutes au bain-marie à 55°C, en agitant légèrement.

Le premier gel, le gel dénaturant, est ensuite préparé. Quel que soit le gradient de dénaturation désiré (40-65 %, 30-60 %), le gel est préparé à partir des solutions dénaturantes à 0 et 100 %.

Une aiguille, reliée par un tuyau au robinet de sortie des réservoirs, est placée entre les deux vitres à proximité d'un des espaceurs. La solution la moins dénaturante (11 ml, 1 ml comme témoin de polymérisation) est versée dans le réservoir de gauche (le plus éloigné du robinet de sortie) et le canal situé entre les deux réservoirs est également rempli de cette solution (en ouvrant légèrement le robinet de gauche). La solution la plus dénaturante est ensuite versée dans le second réservoir. L'homogénéisation des solutions se fait à l'aide d'une puce magnétique et d'un agitateur sous le deuxième compartiment. Les deux robinets sont alors ouverts en même temps pour couler le gel. Le principe des vases communicants permet la formation du gradient. Par la suite, une couche d'eau désionisée est directement ajoutée pour que le niveau du gel soit bien horizontal et éviter le contact entre le gel et l'air (qui perturberait la polymérisation). La polymérisation s'effectue durant une heure et demi à température ambiante (toujours sous la hotte).

Afin de couler le second gel (stacking gel), il convient de d'abord évacuer la couche d'eau se trouvant au-dessus du premier gel et de placer le peigne entre les vitres mais sans l'y enfoncer. Le stacking gel est coulé selon la composition voulue et laissé à polymériser une heure en présence du peigne enfoncé à fond.

Après la polymérisation de second gel, la cuve d'électrophorèse est remplie avec du TAE 1X et chauffée à 65°C pendant environ 1h30 à puissance maximale ($\Delta T^{\circ}\text{C} = 200^{\circ}\text{C}$). Les gels sont placés sur le support à insérer dans la cuve et les puits sont rincés avec du tampon pour éliminer les éventuels petits morceaux de gels détachés qui perturberaient le dépôt des échantillons. Les produits PCR sont mélangés à une solution de charge dans les proportions 5/1 (20 μl d'ADN et 5 μl de solution de charge) et chargés sur le gel (de même que le marqueur). Le support est ensuite inséré dans la cuve (Fig. Z). La migration s'opère à 1230 V.h à 60°C pour un gel à 6,5 % (200V pendant un peu plus de 6h) ou à du 1200 V.h pour un gel à 8 % (75V pendant 16h).

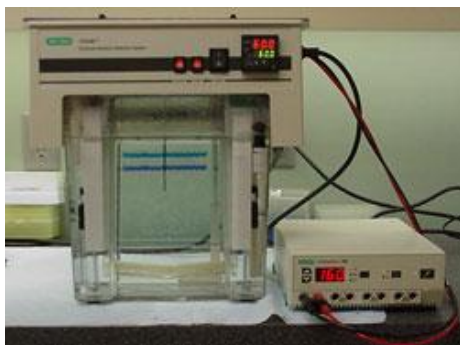


Figure Z : Photo de la cuve de migration pour la DGGE (www.siremlab.com)

Après l'électrophorèse, le gel est refroidi en plaçant les vitres sous l'eau. La plaque supérieure est retirée et la seconde, sur laquelle repose le gel, est déposée dans du tampon TAE 1X. Le Gelstar[®] (2 μl dilué dans 15 ml d'eau distillée) est étalé sur toute la surface du gel et laissé durant 30 minutes à l'abri de la lumière, sous papier aluminium. Le Gelstar[®] est ensuite éliminé et le gel est trempé à nouveau dans du TAE 1X. Le gel est alors scanné dans un appareil Fluo Imager (BioRad, USA) à 530 nm.

Pour un séquençage ultérieur, les bandes sont excisées sous UV, à l'aide d'un scalpel lavé à l'éthanol avant chaque excision, en commençant par les bandes moins visibles. Chaque bande est placée dans un tube Eppendorf[®] de 1,5 ml avec 50 μl de TE⁻⁴. Ces tubes sont alors conservés à -20°C.

Annexe 3

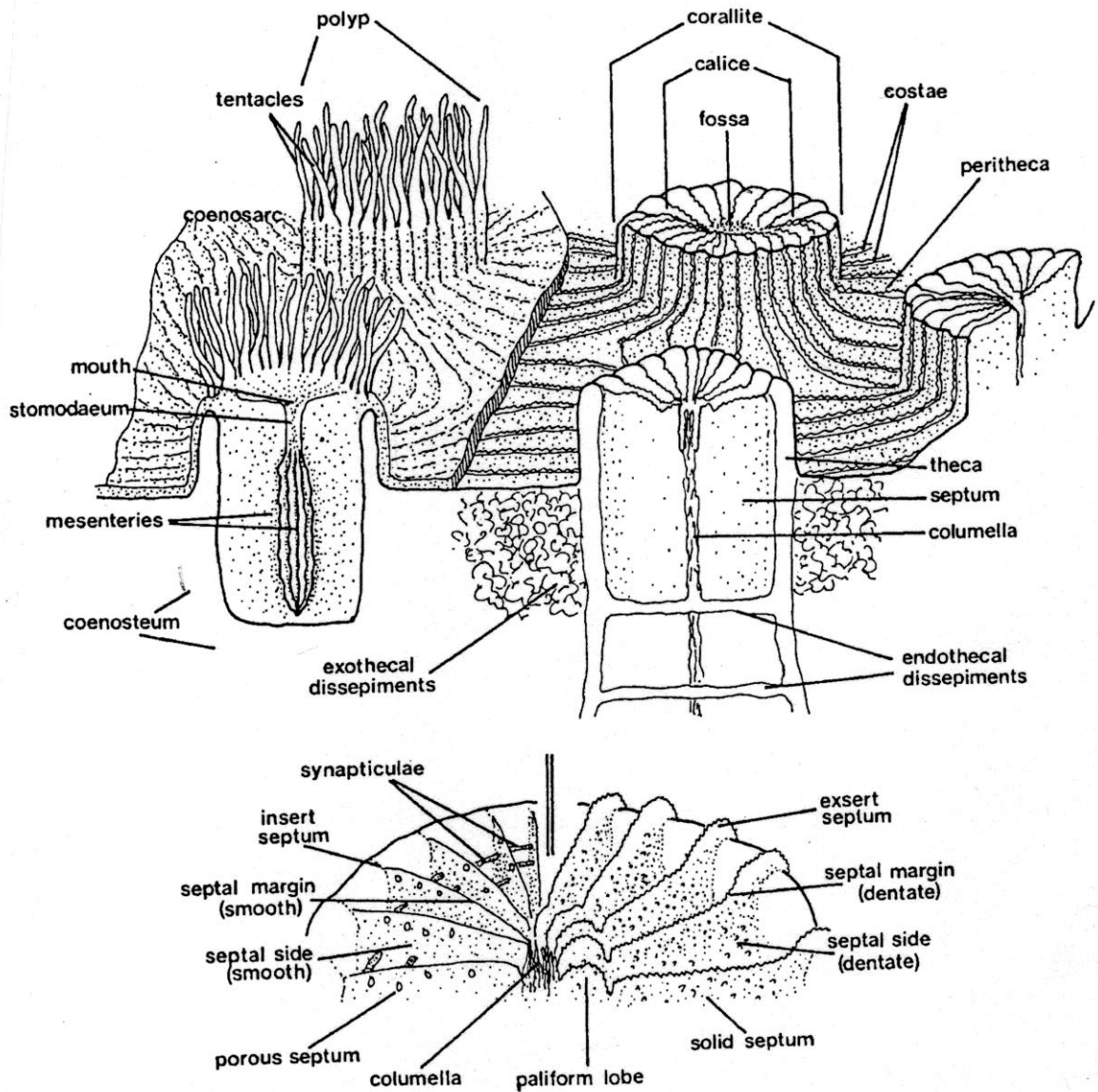


Figure 1 : Eléments du squelette corallien, utiles à la caractérisation systématique de la colonie (Poulicek, 2006).

Annexe 4 :

I. Tableaux des densités en zooxanthelles chez l'anémone de mer *Aiptasia pulchella*

I.1. Anémone saine

05-56 Anb-0	05-56 Anb-1	05-56 Anb-2	05-56 Anb-3	zoox(10 ³)/mm ² endoderme	
776.00	832.00	832.00	896.00		
832.00	792.00	944.00	784.00		
824.00	696.00	784.00	904.00		
776.00	784.00	824.00	816.00		x 10 ³
802.00	776.00	846.00	850.00	moyAnb	818.50
30.20	57.32	68.62	59.28	éc-typ	59.20
05-56 A2nb-0	05-56 A2nb-1	05-56 A2nb-2	05-56 A2nb-3		
1088.00	968.00	808.00	808.00		
880.00	960.00	1008.00	952.00		
976.00	920.00	848.00	936.00		
984.00	776.00	872.00	944.00		
1000.00	944.00	992.00	992.00		
944.00	1016.00	912.00	832.00		
888.00	888.00	760.00	936.00		x10 ³
965.71	924.57	885.71	914.29	moyA2nb	922.57
71.21	76.71	91.65	67.52	éc-typ	78.54
05-56 A3nb-0	05-56 A3nb-1	05-56 A3nb-2			
728.00	784.00	744.00			
712.00	688.00	672.00			
752.00	632.00	680.00			
688.00	832.00	704.00			
680.00	896.00	840.00			
744.00	824.00	800.00			
664.00	680.00	624.00			
632.00	736.00	680.00			
624.00	672.00	680.00			
664.00	776.00	776.00			
824.00	792.00	848.00			
848.00	728.00	776.00			
736.00	728.00	704.00			
768.00	736.00				x10 ³
718.86	750.29	732.92		moyA3nb	734.05
66.41	71.91	69.94		éc-typ	68.95
05-56 A4nb-0	05-56 A4nb-1	05-56 A4nb-2	05-56 A4nb-3		

696.00	704.00	664.00	584.00		
560.00	736.00	552.00	616.00		
632.00	600.00	704.00	680.00		
704.00	680.00	640.00	736.00		
792.00	848.00	648.00	688.00		
808.00	784.00	616.00	584.00		
784.00	648.00	600.00	640.00		
728.00	552.00	736.00	776.00		
816.00	536.00	840.00	824.00		
728.00	776.00	648.00	728.00		x10 ³
724.80	686.40	664.80	685.60	moy A4nb	690.40
81.86	103.33	80.13	81.15	éc-typ	86.57
moynb	773.12	x10 ³			
éc-ytp	116.96	x10 ³			

I.2. Anémone blanche

06-2 Ab	zoox(10³)/mm² endoderme					
296.00						
248.00						
256.00					x10 ³	
266.67				moy A	266.67	
25.72				éc-typ	25.72	
06-2 A2b-0	06-2 A2b-1	06-2 A2b-2	06-2 A2b-3			
552.00	424.00	528.00	480.00			
568.00	432.00	456.00	552.00			
568.00	512.00				x10 ³	
562.67	456.00	492.00	516.00	moy A2	507.20	
9.24	48.66	50.91	50.91	éc-typ	55.58	
06-2 A3b-0	06-2 A3b-1	06-2 A3b-2	06-2 A3b-3			
216.00	216.00	256.00	344.00			
200.00	200.00	176.00	192.00			
200.00	360.00	216.00	184.00			
288.00	232.00	368.00	288.00		x10 ³	
226.00	252.00	254.00	252.00	moy A3	246.00	
42.02	73.18	82.72	77.43	éc-typ	64.30	
06-2 A4b						
72.00						
48.00						
32.00						
56.00					x10 ³	
52.00				moy A4	52.00	
16.65				éc-typ	16.65	
moyb	303.52	x10 ³				
éc-typ	159.77	x10 ³				

II. Tableaux des comptages de zooxanthelles expulsées lors de l'expérience de blanchiment artificiel

EL = eau libre	
EL1	lame 1 avant choc (témoin)
EL2	lame 2 avant choc
ELC1	après 6h à 32°C (lame 1)
ELC2	après 6h à 32°C (lame 2)
ELF1	après 6h à 6°C (lame 1)
ELF2	après 6h à 6°C (lame 2)
EL3	après 72h à T° ambiante après choc
EL3T	après 72h à T° ambiante aqua témoin (avec anémones sans choc)
EL4T	après 96h à T° ambiante

EL1	EL2	ELC1	ELC2	ELF1	ELF2	EL3	EL3T	EL4T	n zoox(10 ³) /ml eau	
0	0	1925.6	2118.16	962.8	770.24	4428.88	96.28	433.26		
0	0	2166.3	2021.88	433.26	2647.7	3562.36	192.56	1251.64		
0	0	336.98	1733.04	96.28	3032.82	6787.74	336.98	13671.76		
0	48.14	1107.22	1203.5	48.14	1973.74	10446.38	433.26	1251.64		
0	0	2070.02	1588.62	240.7	336.98	12083.14	240.7	1203.5		
0	0	722.1	818.38	288.84	1492.34	11264.76	96.28	288.84		
48.14	0	144.42	1299.78	144.42	336.98	14778.98	48.14	2455.14		
0	0	144.42	1540.48	288.84	433.26	5632.38	144.42	577.68		
0	0	192.56	2214.44	1155.36	770.24	6643.32	914.66	914.66		
0	0	914.66	1877.46	1492.34	0		577.68	914.66		
		2503.28	1925.6	1155.36	96.28			722.1		
		2743.98						3803.06		
								6354.48		
								336.98		
								1059.08		
								24070		
								770.24		
								962.8		
								4284.46		
moyEL	4.81	moy ELC	1448.39	moy ELF	827.13	moy EL3	8403.10	3859.55	moy EL4T	3438.21
éc-typ	14.82	éc-typ	781.23	éc-typ	849.63	moy EL3T	308.10	270.61	éc-typ	5920.97

temps (h)	0.00	6.00	72.00	96.00
témoin	4.81	0.00	308.10	3438.21
choc à froid	4.81	827.13	7567.61	0.00
choc à chaud	4.81	1448.39	7567.61	0.00
(moy choc ch et fr)		1137.76		
vit bl choc	7562.79	72.00	105.04	40-72h
vit bl témoin	303.28	72.00	4.21	10-72h
	3130.11	24.00	130.42	72-96h
			x10 ³	