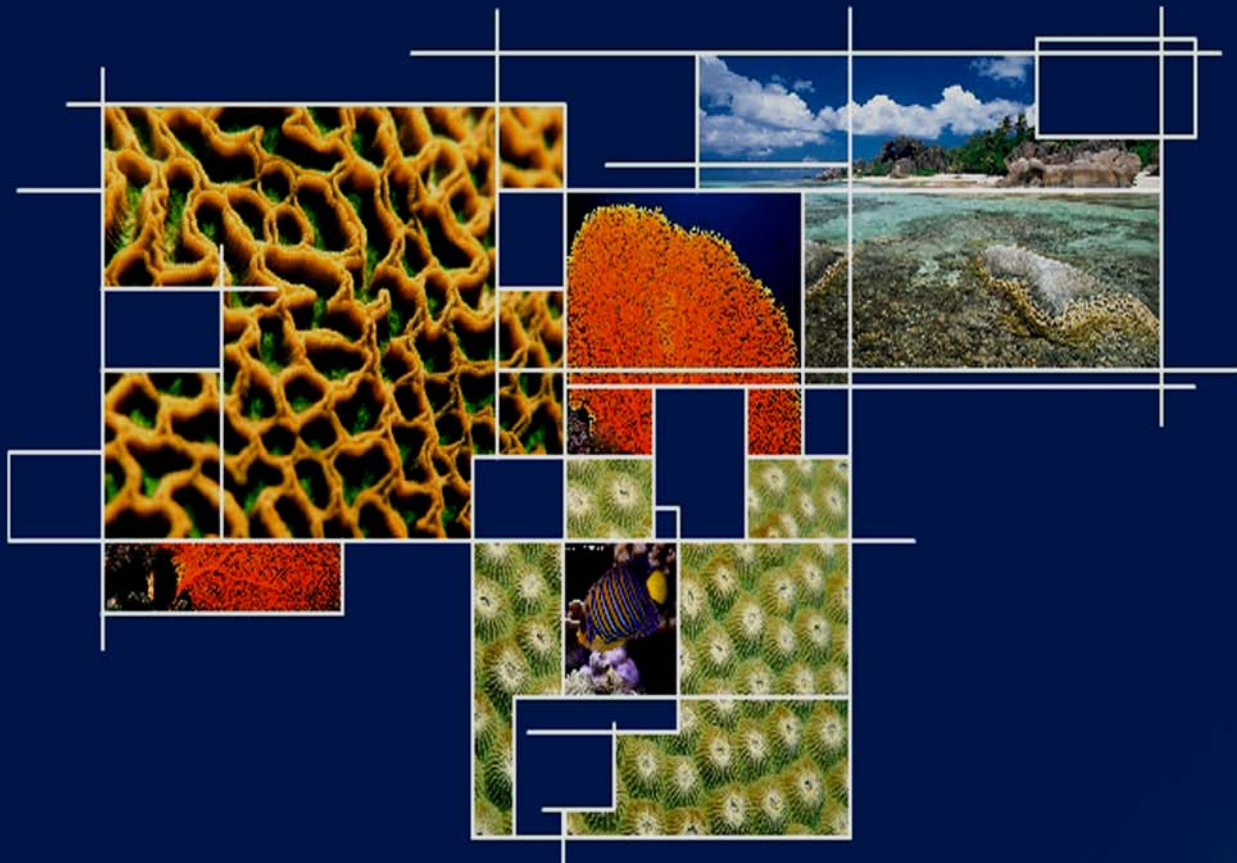


L'anémone hermatypique *Aiptasia pallida* Verrill (1864) :

photophysiology en rapport avec
le phénomène de blanchiment



Mémoire présenté par Stéphane ROBERTY en vue de
l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques
(orientation biologie animale)

Année académique 2006-2007

Promoteur du mémoire : Dr Mathieu Poulicek
Laboratoire d'écologie animale et d'écotoxicologie
Unité d'écologie marine



Université de Liège

Table des matières

Chapitre 1 - Introduction

1. Les récifs coralliens	1
<i>1.1 Biologie et morphologie des anémones de mer hermatypiques</i>	1
<i>1.2 La symbiose avec les zooxanthelles</i>	2
Généralités	2
Rôle dans la nutrition des coraux	2
Historique	3
Une grande diversité au service d'une symbiose	3
<i>1.3 Répartition des récifs coralliens</i>	4
2. Le blanchiment des coraux	5
<i>2.1 Le phénomène de blanchiment</i>	5
<i>2.2 Historique</i>	5
<i>2.3 Hypothèses à la base du blanchiment</i>	6
Facteurs environnementaux et anthropiques	6
Hypothèse adaptative du blanchiment (ABH)	6
Hypothèse bactérienne	7
Hypothèse oxydative du blanchiment	8
• Quelques notions sur la photosynthèse	8
• Le stress oxydatif chez les coraux	8
• Mécanismes de production des ROS	9
• Effets des ROS	9
• Les systèmes de protection	9
<i>2.5 Les mécanismes d'adaptation face au blanchiment</i>	10
<i>2.6 Importance des récifs coralliens</i>	11
<i>2.7 Les impacts du blanchiment</i>	11
3. L'utilisation de mesures de fluorescence chlorophyllienne pour évaluer l'activité de l'appareil photosynthétique et son adaptation à la lumière	11
Bases photophysiques de la fluorescence	12
Notion de 'rendement' de fluorescence	12
Chapitre 2 - Objectifs du mémoire	13

Chapitre 3 - Matériel et méthodes

1. Matériel biologique	14
1.1 Description d' <i>Aiptasia pallida</i> .	14
1.2 Maintien des organismes en aquarium d'acclimatation	14
2. Expérimentation	14
2.1 Maintien des organismes en conditions de stress	14
2.2 Protocole expérimental général	15
3. Méthodes	15
3.1 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne	15
Le fluorimètre	15
La courbe d'induction après adaptation à l'obscurité	16
La courbe d'induction après adaptation à la lumière	16
Mesure des rendements de transport d'électrons et des processus de dissipation en fonction de l'intensité lumineuse	17
Calcul de la vitesse du transport d'électrons	17
3.2 Protocole appliqué à la mesure de la fluorescence chlorophyllienne	18
3.3 Protocole appliqué à la mesure de la respiration	18
3.4 Détermination de la densité en zooxanthelles	19
3.5 Analyse pigmentaire des échantillons à l'HPLC	19
Technique d'extraction des pigments	19
Principe de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	19
Appareil utilisé	19
Gradient de solvant et débit	20
Pigments analysés et leur temps de rétention	20
3.6 Analyses statistiques	20

Chapitre 4 - Résultats

1. Mesures sur les populations d'anémones « témoin »	21
1.1 Fluorescence de la chl a	21
1.1.1 Evolution de la fluorescence minimale et maximale	21
1.1.2 Evolution du taux relatif de transport d'électrons	22
1.2 Densités en zooxanthelles	23
1.3 Résultats de l'analyse pigmentaire	24

2. Mesures sur les anémones ayant subi un stress lumineux	24
2.1 <i>Résultats de la fluorescence de la chl a</i>	24
2.1.1 Evolution de la fluorescence minimale et maximale	24
2.1.2 Evolution de l'efficacité du PSII et du Non-Photochemical Quenching	25
2.1.3 Evolution du taux relatif de transport d'électrons	26
2.1.4 Evolution de la courbe de montée de fluorescence	26
2.2 <i>Densités en zooxanthelles</i>	27
2.3 <i>Mesure de la respiration</i>	28
2.4 <i>Analyse pigmentaire</i>	29
2.5 <i>Observations comportementales</i>	31
3. Mesures sur les anémones ayant subi un stress à l'obscurité	31
3.1 <i>Fluorescence de la chl a</i>	31
3.1.1 Evolution de la fluorescence minimale et maximale	31
3.1.2 Evolution de l'efficacité du PSII et du Non-Photochemical Quenching	32
3.1.3 Evolution du taux relatif de transport d'électrons	33
3.2 <i>Densités en zooxanthelles</i>	34
3.3 <i>Mesures de la respiration</i>	35
3.4 <i>Analyse pigmentaire</i>	36
3.5 <i>Résultats des observations comportementales</i>	38
 Chapitre 5 - discussion	
1. Photophysiology des anémones « témoin »	39
1.1 <i>Fluorescence de la Chl a</i>	39
1.1.1 Fluorescence maximale et rendement de dissipation thermique	39
1.1.3 Vitesse relative du transport d'électrons	39
1.1.2 Efficacité photochimique du PSII	40
1.2 <i>Densités en zooxanthelles</i>	40
1.3 <i>Concentration pigmentaire</i>	41
2. Effets d'un stress lumineux sur <i>Aiptasia pallida</i>	42
2.1 <i>Fluorescence de la Chl a</i>	42
2.1.1 rETR et ϕNPQ	42
2.1.2 Efficacité photochimique du PSII	42
2.1.3 Courbes d'induction de fluorescence	43
2.2 <i>Respiration des <i>Aiptasia pallida</i> et leurs zooxanthelles</i>	43

Table des matières

2.3 Evolution des densités en zooxanthelles et de leur contenu en pigment	44
2.5 Comportement des anémones	45
3. Effets d'un stress à l'obscurité sur <i>Aiptasia pallida</i>	45
3.1 Fluorescence de la Chl a	45
3.2 Respiration des <i>Aiptasia pallida</i> et de leurs zooxanthelles	45
3.3 Evolution des densités en zooxanthelles et de leur contenu en pigment	46
3.5 Comportement des anémones	46
 Chapitre 6 - Conclusions	 47

Bibliographie	I
----------------------	----------

Annexes	XI
----------------	-----------

Remerciements

Les résultats des recherches ont été obtenus grâce à la collaboration active de Mathieu Poulicek et du Professeur Thomé qui m'ont fait confiance et ouvert largement l'accès à leurs laboratoires. Grâce à plusieurs de leurs collaborateurs,

Fabrice Franck pour ses explications éclairées et son matériel,

Mr Michel pour ses colonies d'Aiptasia,

Ove et le petit Ranjeet pour la qualité d'eau offerte aux anémones,

Ophélie et ses conseils éclairés,

Tous les membres du labo pour leur accueil,

j'ai pu mener à bien toutes les expériences nécessaires.

Enfin, pour clore la liste quelques proches. Stéphanie qui a accepté mes sautes d'humeur et qui était chaque fois là quand j'en avais besoin, mes amis et plus particulièrement le Dr Moule pour leur bienveillance et mes « vieux » qui m'ont encouragé à user mes fonds de pantalon sur les bancs de l'unif.



Introduction

Les récifs à scléractiniaires comptent avec les forêts tropicales humides, parmi les écosystèmes les plus complexes et les plus productifs. La biodiversité y est plus élevée que partout ailleurs sur le globe. Vieux de 40 millions d'années, ce type d'édifice biologique qui longe les côtes d'une centaine de pays dans le monde, se révèle être par ses apports et ses qualités intrinsèques, une source de revenus, de nutrition et de protection extrêmement importante. Mais depuis quelques décennies, les récifs du monde entier subissent de multiples agressions naturelles (blanchiment, *Acanthaster planci*, ...) et anthropiques (remblais, activités touristiques, ... ; [Sebens, 1994](#)). Parmi celles-ci, un phénomène de plus en plus fréquent, intense et étendu contribue aujourd'hui à leur déclin : le blanchiment.

1. Les récifs coralliens

La trame des récifs coralliens est essentiellement constituée d'organismes appartenant à l'embranchement des Cnidaires et à la classe des Zoanthaires - autrefois appelés Hexacoralliaires – il s'agit plus précisément des Scléractinaires (coraux dur ou madrépores). De très nombreuses espèces appartenant à cet ordre, de même que certaines appartenant à l'ordre des Actiniaires (anémones de mer), sont dites hermatypiques dû à la présence dans leurs tissus d'algues symbiotiques unicellulaires appelées zooxanthelles ([Ruppert and Barnes, 1996](#) ; [Poulicek, 2007](#)).

1.1 Biologie et morphologie des anémones de mer hermatypiques

Contrairement à beaucoup d'autres Cnidaires, les coraux et les anémones ne présentent que le stade polype du cycle de vie classique des Coelentérés : alternance forme méduse/polype. Fixés sur le substrat, ils se nourrissent de zooplancton grâce à leurs tentacules munis de cellules urticantes. Ces cellules particulièrement abondantes au niveau de la couronne tentaculaire sont appelées cnidocytes. Les produits de leur « chasse » sont ensuite transférés vers la cavité gastro-vasculaire, où aura lieu la digestion (Fig. 1a). Cette cavité présente la particularité d'être divisée en septa radiaux longitudinaux augmentant ainsi la surface d'échange entre l'animal et le contenu gastrique (Fig. 1b).

Les Cnidaires possèdent deux types de tissus (Fig. 1b et c). L'ectoderme d'une part, le plus externe est principalement constitué de cellules piliers, nerveuses, de remplacement et de recouvrement ainsi que de cnidocytes. Le gastroderme d'autre part, le plus interne, tapisse la cavité digestive et contient des cellules à mucus, glandulaires, ciliées et musculaires. C'est également dans ce tissu que sont localisées les zooxanthelles ([Day, 1994](#) ; [Baudesson, 2007](#)). Ces deux tissus sont séparés par une couche anhyste gélatineuse appelée mésoglée ([Ruppert and Barnes, 1996](#); [Lecointre and Le Guyader, 2001](#) ; [Poulicek, 2007](#)).

Les Cnidaires peuvent se reproduire de deux manières différentes : sexuée ou asexuée. La première, très complexes est encore fort méconnue à l'heure actuelle. Néanmoins, elle dépendrait de facteurs tels que la température et/ou la lunaison. Les gamètes mâles une fois libérés, fécondent les ovules au sein des colonies ou en pleine eau et forment une larve planula qui se transformera en un polype viable. La reproduction asexuée, quant à elle, se fait par bourgeonnement à partir d'une colonie ou par lacération pédale comme cela se passe notamment chez les anémones de mer du genre *Aiptasia* ([Veron, 2000](#) ; [Davy and Turner, 2003](#) ; [Poulicek, 2007](#)).

1.2 La symbiose avec les zooxanthelles

Généralités

La diversité et la structure des récifs coralliens trouvent leur origine dans la symbiose mutualiste entre de nombreux invertébrés et leurs endosymbiontes photosynthétiques (Hallock, 2001). Ces derniers favorisent la croissance de leur hôte. Une algue unicellulaire du genre *Symbiodinium* communément appelée zooxanthelle a établi ce type de relations symbiotique avec de nombreux hôtes : protistes, porifères, mollusques et cnidaires (Glynn, 1996 ; Rowan, 1998). Dans la plupart des cas, ces algues sont intracellulaires et enveloppées dans un complexe vacuolaire hôte et un complexe membranaire algal (Wakefield *et al.*, 2000 ; Baudesson, 2007), où elles ne sont jamais digérées. Elles sont acquises par l'hôte, soit par transmission verticale (transfert de la colonie mère vers l'oocyte), soit par transmission horizontale à partir de l'environnement (Trench, 1997).

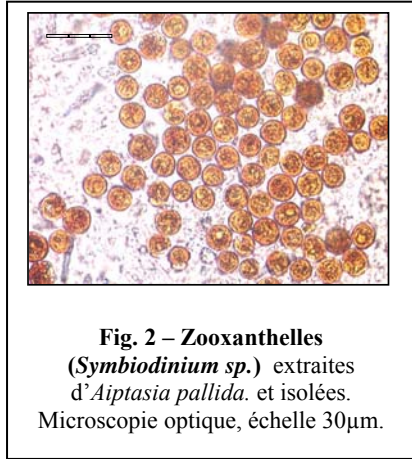


Fig. 2 – Zooxanthelles
(*Symbiodinium sp.*) extraites
d'*Aiptasia pallida*. et isolées.
Microscopie optique, échelle 30µm.

Rôle dans la nutrition des coraux

Les coraux, tout comme les autres animaux sessiles, dépendent des substances nutritives présentes dans le milieu environnant. Les madrépores sont essentiellement carnivores et se nourrissent du zooplancton qui remonte vers les couches superficielles dès la tombée de la nuit. Les polypes qui étaient alors contractés durant la journée s'épanouissent et déploient des milliers de tentacules près à harponner le premier animalcule venu. Une fois capturée, la proie est dirigée vers la bouche soit par les tentacules eux-mêmes, soit par un film muqueux mis en mouvement, à la manière d'un tapis roulant actionné par des cils microscopiques. Ces derniers servent également à l'élimination du sable et des déchets organiques.

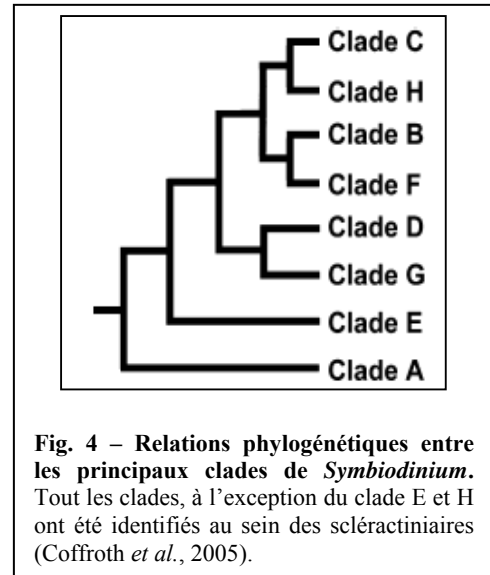
Cependant, les eaux tropicales chaudes et claires dans lesquelles vivent les coraux sont oligotrophes (pauvres en nutriments) et contiennent trop peu de plancton pour satisfaire les besoins nutritifs des madrépores. Les zooxanthelles jouent donc un rôle essentiel dans le métabolisme alimentaire des colonies coralliennes hermatypiques en compensant le déficit de nourriture offerte par le milieu. Ces dinoflagellés qui peuvent atteindre une densité de plusieurs millions de cellules par cm² de tissu hôte (LaJeunesse, 2002), constituent un « tapis » photosynthétique et deviennent les producteurs primaires de cet écosystème. Nonante-cinq pour cent des produits de la photosynthèse et du métabolisme des zooxanthelles (sucres, peptides, glycérols), complètent les besoins respiratoires et physiologiques de l'hôte (Fig. 3a ; Trench, 1979 ; Falkowski *et al.*, 1984 ; Muscatine, 1990). De plus, de par leur capacité à absorber en permanence le CO₂ nécessaire à la photosynthèse, elles facilitent considérablement la précipitation du carbonate de calcium essentiel à l'établissement de l'exosquelette des Scléractiniaires (Fig. 3b ; Dimijian, 2000).

Par ailleurs, l'hôte fournit aux algues une protection mais également une source d'azote et de phosphore issue de la dégradation des substances organiques lors de la digestion. Il arrive néanmoins que certaines espèces comme *Aiptasia sp.* puissent vivre sans leurs symbiontes lorsqu'une source alternative de nourriture est disponible (Van Oppen, 2004). La circulation globale des substances entre animaux et végétaux qui s'effectue généralement tout au long de la chaîne alimentaire est extrêmement courte dans l'association cnidaires-zooxanthelles,

limitant ainsi la perte des éléments nutritifs. Cette optimisation des transferts d'énergie a permis l'implantation de régions récifales écologiquement très productives dans des milieux oligotrophes.

Historique

Ce fut [Brandt \(1881\)](#), qui appela zooxanthelles les petites algues brun-jaune associées avec des cellules animales. Ensuite, [Freudenthal \(1962\)](#) décrit pour la première fois le cycle de vie, la morphologie et donna le nom de *Symbiodinium microadriaticum* à l'ensemble des dinoflagellés symbiotiques associés à des hôtes invertébrés. Depuis, les recherches ont bien évolué. Les multiples observations comportementales, physiologiques, ultrastructurales et plus particulièrement les études de génétique moléculaire ont démontré que cette espèce que l'on pensait pandémique, s'est avérée être extrêmement diversifiée ([Trench, 1992](#)). Les résultats issus des analyses génétiques réalisées depuis une vingtaine d'années, appuyées par des études phylogénétiques sur les chloroplastes et les mitochondries ([Takabayashi et al., 2004](#)), ont conduit au développement et à l'adoption d'une classification au sein de laquelle le genre *Symbiodinium* est divisé en huit clades distincts (de A à H ; Fig. 4) dont chacun contient de multiples races ou « espèces » ([LaJeunesse, 2002, 2005](#) ; [Baker, 2003](#) ; [LaJeunesse et al., 2003, 2004](#)).



Une grande diversité au service d'une symbiose

Cette grande diversité au niveau des zooxanthelles et leurs différentes possibilités d'association avec de nombreux taxons hôtes suggèrent une variabilité importante au niveau de la spécificité de cette symbiose. Un aperçu des appariements hôte-symbionte montre que les types de zooxanthelles ne sont pas distribués au hasard chez les espèces animales. Il y aurait ainsi une spécificité au sein de laquelle les membres d'une même espèce hôte porteraient le même taxon ou le même type de *Symbiodinium* ([Baker et al., 1997](#)). Néanmoins, dans la nature, les organismes hôtes peuvent maintenir une faible quantité de symbiontes mineurs à l'intérieur d'une population homogène de zooxanthelles « classiques ». Donc, ce que l'on pensait être une spécificité, pourrait être en réalité, le résultat d'une exclusion compétitive entre les différents clades de *Symbiodinium* dans certaines conditions naturelles ([LaJeunesse, 2002](#)). Certaines espèces de madrépores sont capables de s'associer avec une grande variété de zooxanthelles, alors que d'autres ne contiennent qu'un seul type de symbionte. Parallèlement, certaines algues généralistes sont largement distribuées géographiquement et trouvées dans de nombreuses espèces. D'autres, quant à elles, paraissent endémiques à certains lieux et ne peuvent former des symbioses qu'avec un hôte en particulier, elles sont alors spécialistes ([Baker, 1999, 2003](#) ; [LaJeunesse, 2002, 2003](#)).

Dans la plupart des cas, ce sont les conditions environnementales telles que la profondeur, le rayonnement solaire, la température, la latitude, la longitude et l'ontogénie de l'hôte qui dictent les différents appariements ([Rowan et al., 1997](#) ; [LaJeunesse and Trench, 2000](#) ; [LaJeunesse, 2004](#) ; [Coffroth and Santos, 2005](#)). Ces différentes associations pourraient trouver leur origine chez les zooxanthelles qui, suivant leur clade, présenteraient des

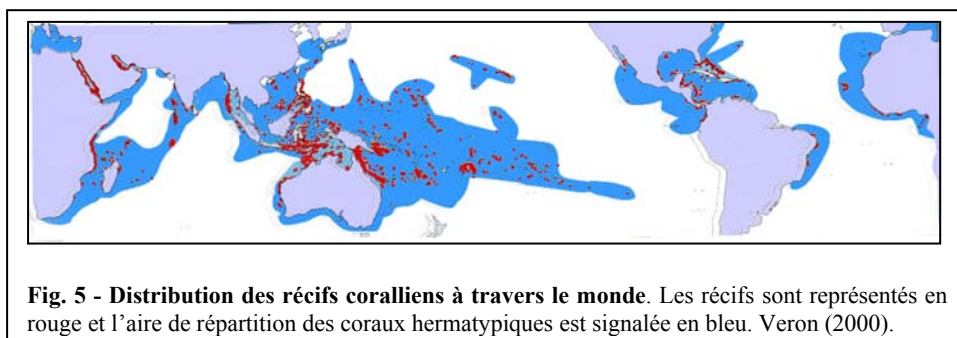
sensibilités différentes aux stress thermiques (Iglesias-Prieto *et al.*, 1992 ; Iglesias-Prieto and Trench, 1997 ; Jones *et al.*, 1998 ; Warner *et al.*, 1999), au rayonnement solaire et par conséquent à la profondeur (Iglesias-Prieto *et al.*, 2004). Ainsi, des expériences réalisées dans les Caraïbes sur *Montastraea faveolata* et *M. annularis*, semblent indiquer que les colonies de ces deux scléactiniaires présentent quatre clades de *Symbiodinium* suivant une distribution bathymétrique particulière : les types A, B et D sont présents dans les eaux peu profondes (0 à 6 m) alors que le type C est trouvé plus bas (3 à 14 m) (Rowan and Knowlton, 1995 ; Rowan *et al.*, 1997 ; Baker, 1999, 2001 ; LaJeunesse, 2002). Ensuite la mise en culture des zooxanthelles de clade A a mis en évidence la production d'acides aminés de type mycosporine, jouant un rôle dans la protection contre les UV ; ce qui pourrait expliquer pourquoi elles sont maintenues en surface et non dans des zones plus profondes (Banaszak *et al.*, 2000, 2006). L'identification des différents clades de zooxanthelles vivant à forte et faible luminosité, montre que la photo-adaptation n'est pas le seul moyen que les coraux ont pour répondre aux changements journaliers et saisonniers de rayonnements solaires. Ces différentes découvertes soulèvent une hypothèse selon laquelle, un changement de partenaire symbiotique créerait une association plus adaptée aux nouvelles conditions environnementales, il s'agit de l'hypothèse adaptative du blanchiment (Baker, 2001 ; Kinzie *et al.*, 2001 ; Buddemeier *et al.*, 2004).

1.3 Répartition des récifs coralliens

Comme vu précédemment, la symbiose entre les zooxanthelles et les madrépores présente de nombreux avantages pour les deux partenaires, mais en échange, elle réclame des conditions de vie strictes dictées par les algues symbiotiques. Par conséquent, les récifs coralliens ne pourront s'établir que là où les facteurs écologiques suivants sont réunis :

- une température optimale comprise entre 22 et 28°C et supérieure à 18°C en hiver (Veron, 2000),
- une salinité de 32 à 40‰ (non diluée par de l'eau douce en provenance des embouchures fluviales) (Veron, 2000),
- suite à l'activité photosynthétique de leur endosymbionte, les madrépores ne pourront vivre que dans une eau claire et dans les limites de la zone photique. Ainsi, au fur et à mesure que l'on plonge en profondeur, le nombre d'espèces, le taux de recouvrement et le taux de croissance diminuent (Veron, 2000).

Les récifs coralliens vont donc être distribués dans les régions tropicales, principalement entre 35° de latitude nord et 35° de latitude sud (Fig. 5). Ils ne seront pas présents devant les grands fleuves de l'Afrique, de l'Inde et de l'Amérique du sud, qui charrient des grandes quantités d'alluvions et de matières organiques. Ils seront absents sur l'Est de l'Atlantique et du Pacifique, à cause de la présence d'upwellings et de courants d'eau froide (Benguela en Afrique et Humboldt en Amérique du Sud).



Il existe au niveau mondial, deux grandes zones de répartition des récifs : la zone indopacifique qui contient la plus grande diversité au niveau génétique, spécifique et au niveau des familles. Géographiquement, elle comprend la mer Rouge, l'Océan Indien, le Pacifique tropical central (avec la Malaisie, les Philippines, l'Indonésie ainsi que la Grande Barrière de Corail) et le Pacifique occidental avec ses nombreux archipels. La seconde province est l'Atlantique qui présente une diversité et une richesse spécifique moindre par rapport à la zone indopacifique ; elle comprend principalement les Caraïbes et les Bermudes. On peut également trouver quelques récifs pauvres en espèces sur les côtes africaines occidentales ainsi que sur les côtes brésiliennes (Veron, 2000 ; Poulicek, 2007). Plus récemment, de vrais « récifs » se sont établis dans l'est du bassin méditerranéen ; ils sont considérés comme des extensions de la zone mer Rouge (Poulicek, 2007).

2. Le blanchiment des coraux

2.1 Le phénomène de blanchiment

Ces dernières décennies, les récifs coralliens subissent de nombreuses dégradations, aussi bien à l'échelle locale que mondiale (Stone *et al.*, 1999). Parmi les nombreuses pathologies auxquelles ils font face (maladie des bandes noires, des bandes jaunes, des bandes rouges...), l'une d'entre-elles augmente en fréquence et en sévérité (Wilkinson, 1999), il s'agit du blanchiment corallien. Ce processus qui n'est pas limité aux coraux, mais qui est développé par tous les organismes vivant en symbiose avec des dinoflagellés du genre *Symbiodinium*, peut être défini comme étant l'altération de la couleur de l'animal suite à la perte partielle ou presque complète des populations de zooxanthelles et/ou à la dégradation des pigments au sein de ces algues (Lesser *et al.*, 1990 ; Brown, 1997a, 1997b ; Kinzie *et al.*, 2001 ; Douglas 2003).

Lors du blanchiment, les zooxanthelles sont éliminées, laissant ainsi apparaître le squelette calcaire à travers les tissus hôtes devenus transparents (Douglas, 2003). Les voies d'élimination de ces algues sont diverses : exocytose, nécrose, apoptose et détachement des cellules hôtes (Gates *et al.*, 1992, Ladrière, 2007).

Cette pathologie est actuellement considérée comme étant une réaction à des conditions environnementales anormales et elle est observée suite à la variation de paramètres physico-chimiques du milieu (Hoegh-Gulberg and Smith, 1989 ; Jones, 1997) qui sont souvent accompagnés par la production d'agents oxydants (Brown, 1997a, 1997b ; Downs *et al.*, 2000). Il a également été constaté que le blanchiment pouvait être provoqué, dans des conditions particulières, par des agents pathogènes (Rosenberg and Ben-Haim, 2002).

2.2 Historique

Le blanchiment des coraux, à grande échelle, dans l'Océan Pacifique a été décrit pour la première fois par Glynn en 1984. Depuis, ce phénomène survient de plus en plus fréquemment et sur une plus grande étendue, dans les Caraïbes (Hughes, 1994), l'Océan Indien (Brown *et al.*, 1996) et l'Océan Pacifique (Hoegh-Gulberg and Salvat, 1995).

Bien que les déclencheurs environnementaux de ces événements soient divers, la communauté scientifique s'accorde à dire que la première variable responsable du blanchiment est l'élévation de la température (Hoegh-Gulberg, 1999). En effet, les épisodes de blanchiment de masse, enregistrés jusque maintenant, coïncident avec les températures de surface élevées

et le phénomène El Niño. Pour la première fois, en 1998, un phénomène de blanchiment massif a été enregistré sur l'ensemble des récifs du globe. Certaines régions, comme Singapour, n'en avaient encore jamais été touchée auparavant (ICRS, 1998). Selon certaines estimations, environ un sixième des récifs coralliens a été détruit sur une période de 9 mois (Wilkinson, 2000). Lors de cet épisode et parmi ces récifs, de nombreuses colonies massives sont mortes, dont certaines étaient âgées de plusieurs centaines d'années (ICRS, 1998).

D'après Hoegh-Guldberg (1999), la fréquence de blanchiment ne va pas cesser d'augmenter et elle devrait même devenir annuelle d'ici 2050. Certaines régions comme l'Asie du Sud-Est, les Caraïbes et la Grande Barrière australienne pourraient voir leurs récifs blanchir systématiquement, suite à des variations saisonnières de la température de l'eau dès 2020. À terme, il est possible que les coraux ne puissent pas s'adapter à ces stress répétitifs. Ils deviendraient alors moins compétitifs face aux macroalgues qui prendraient progressivement leur place.

2.3 Hypothèses à la base du blanchiment

Facteurs environnementaux et anthropiques

Une réduction de la densité en zooxanthelles ou de leur contenu pigmentaire peut être attribué à divers facteurs environnementaux tel qu'une basse (Goreau, 1964) ou une haute salinité (Nakano *et al.*, 1997), des niveaux bas et élevés d'irradiation (particulièrement les UV) (Lesser and Shick, 1989 ; Banaszak and Trench, 1995), des maladies (Kushmaro *et al.*, 1996 ; Rosenberg and Loya, 1999), des températures basses (Steen and Muscatine, 1987 ; Kobluk and Lysenko, 1994) et des températures élevées (Iglesias-Prieto *et al.*, 1992 ; Warner *et al.*, 1996), ainsi que des combinaisons de ces différents facteurs. Bien qu'ils puissent avoir lieu à l'échelle locale, les blanchiments massifs deviennent de plus en plus fréquents et sont généralement associés à des températures élevées liées aux phénomènes El Niño (Glynn, 1984 ; Coffroth *et al.*, 1988 ; Glynn, 1991). De la même manière et plus récemment, ils sont associés à des températures plus élevées de la surface de la mer durant la période estivale (SSTs) (Glynn, 1991 ; Hoegh-Guldberg, 1999). Différents polluants tels que le Diuron® et l'Atrazine® (herbicides ; Fabricius, 2005), de même que le cyanure utilisé par la pêche (Jones and Stevens, 1997), peuvent induire le phénomène de blanchiment. À la suite de tels événements, la perte des zooxanthelles par l'hôte peut être partielle ou presque complète avec, pour conséquence, si la symbiose n'est pas rétablie, la mort d'un grand nombre de colonies coralliennes et l'altération considérable de la composition de la communauté récifale (Goreau, 1992).

Hypothèse adaptative du blanchiment (ABH)

La persistance des récifs au cours des temps géologiques (Kinzie and Buddemeier, 1996 ; Buddemeier *et al.*, 1997 ; Buddemeier and Smith, 1999) et l'aspect multifacette de la relation symbiotique qui semble apparaître chez certaines espèces hôtes (Rowan and Powers, 1991 ; Baker and Rowan, 1997, Rowan, 1998) ont donné naissance à l'hypothèse adaptative du blanchiment (Buddemeier and Fautin, 1993). Selon cette hypothèse, la perte des photosymbiontes pourrait potentiellement permettre à certaines espèces hôtes d'établir une nouvelle association avec une population différente de zooxanthelles dominantes, avec pour résultat, la formation d'un nouvel holobionte ou écoespèce (association hôte-symbionte) mieux adapté aux nouvelles caractéristiques environnementales (Buddemeier and Fautin, 1993 ; Ware *et al.*, 1996).

Cette théorie adaptative repose sur cinq suppositions fondamentales :

- de nombreux types de *Symbiodinium sp.* et d'espèces hôtes peuvent coexister,
- une grande diversité de photosymbiontes peuvent vivre au sein de nombreux hôtes, mais pas forcément tous, et vice-versa,
- les différentes combinaisons possibles entre les hôtes et les zooxanthelles peuvent différer physiologiquement, en réponse à un stress et donc affecter la survie du symbionte, de l'hôte et peut être même de l'holobionte tout entier,
- le blanchiment offre l'opportunité à l'hôte d'être recolonisé par des algues dominantes différentes, d'origine autochtones ou allochtones,
- les écoespèces sensibles aux stress ont un avantage compétitif par rapport aux autres en conditions non stressantes (Buddemeier and fautin, 1993 ; Ware *et al.*, 1996).

Hypothèse bactérienne

Comme vu précédemment, les récifs coralliens blanchissent suite à des modifications de certains facteurs écologiques, mais dans certaines conditions, le blanchiment peut être induit par des agents pathogènes. En effet selon Kushmaro et ses collègues (1998), l'élévation seule de la température ne semble pas conduire au blanchiment. Suite à ce réchauffement, un agent pathogène deviendrait plus virulent vis-à-vis du corail et pourrait donc induire le phénomène. Le microorganisme pathogène responsable du blanchiment d'*Oculina patagonica* en Méditerranée est une bactérie Gram-négative du genre *Vibrio*. *Vibrio shiloi* (Fig. 6) était présent dans tous les *O. patagonica* blanchis et absent des individus sains. Après inoculation de *V. shiloi* à ces coraux en aquarium, ceux-ci se mirent à blanchir (Kushmaro *et al.*, 2001).

La première étape du processus d'infection consiste en l'adhésion du pathogène à un récepteur β -galactoside localisé au niveau du mucus recouvrant l'ectoderme corallien (Toren *et al.*, 1998). Cette liaison est dépendante de la température. Entre 16 et 20°C elle n'a pas lieu, par contre, entre 25 et 30°C elle se réalise de manière importante (Kushmaro *et al.*, 2001). Après l'adhésion, *Vibrio shiloi* pénètre à l'intérieur du tissu hôte et se multiplie intracellulairement. Après un certain laps de temps, elle se différencie en bactérie viable mais incapable de se diviser. A ce stade, la bactérie produit des toxines extracellulaires qui en présence de NH_4Cl se fixent sur la membrane des zooxanthelles. Ces toxines induisent ensuite l'ouverture d'un canal permettant l'entrée de NH_3 , qui détruit le gradient de pH au niveau des thylakoïdes et bloque les électrons de la chaîne photosynthétique. S'en suit alors l'arrêt de la photosynthèse et la lyse intracellulaire des algues (Ben-Haim *et al.*, 1999).

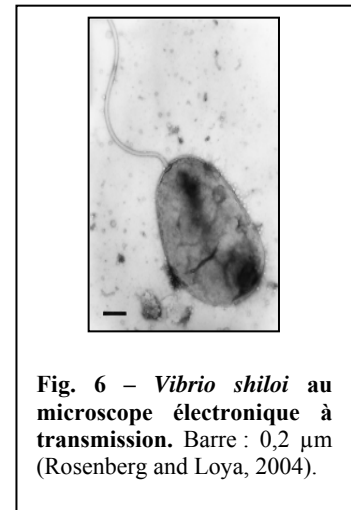


Fig. 6 – *Vibrio shiloi* au microscope électronique à transmission. Barre : 0,2 μm (Rosenberg and Loya, 2004).

Plus récemment, un second agent pathogène, *Vibrio coralliilyticus*, a été découvert dans les récifs de Zanzibar (Océan Indien) et d'Eilat (Mer Rouge). Cette bactérie infecte le corail *Pocillopora damicornis* et dépend de la température pour être virulente, tout comme *V. shiloi* chez *O. patagonica* (Ben-Haim *et al.*, 2003). D'autres souches de Vibrionaceae sont suspectées d'être responsables du blanchiment d'autres espèces, mais la démonstration n'a pas encore été apportée jusqu'ici (*V. harveyi*, notamment).

Hypothèse oxydative du blanchiment

- Quelques notions sur la photosynthèse

Chez les végétaux, la photosynthèse se déroule dans les chloroplastes et plus particulièrement au niveau des thylakoïdes. Ceux-ci contiennent des unités photosynthétiques appelées photosystèmes (pigments couplés à des protéines) absorbant l'énergie lumineuse. Généralement, deux photosystèmes (PSII et PSI) entrent en jeu et opèrent en série dans l'oxydation de l'eau, la réduction du NADP^+ et la production d'ATP ([Morishige and Dreyfuss, 1998](#)). Le PSII et le PSI sont composés d'un centre réactionnel (RC) constitué respectivement d'une chlorophylle P_{680} et d'une P_{700} recevant l'énergie lumineuse, des antennes ou « Light-harvesting Complex (LHC) », qui les entourent ([Raven, et al., 1992](#)).

La photosynthèse réalisée par les plantes est dictée par la lumière visible (400-700 nm de longueur d'onde). La première étape de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique consiste en l'absorption de photons par le système antennaire (LHC). L'énergie d'excitation fait alors passer la chlorophylle P_{680} à l'état singulet excité, ensuite, celle-ci transfère un électron à la phéophytine et aux plastoquinones (PQ), Q_A et Q_B . Q_B^{2-} compense sa charge négative en prenant deux protons du stroma. Les molécules de PQ protonées ($\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$), diffusent vers le cytochrome B_6f où elles sont oxydées. Les électrons provenant de cette réaction sont cédés au Cyt f. L'oxydation de PQH_2 s'accompagne de la libération de deux protons dans le lumen intervenant dans la constitution d'une force motrice qui permettra la conversion d'ADP en ATP. Les électrons une fois sur le Cyt f, sont transférés à la plastocyanine (PC) qui réduit la Chl P_{700} du PSI. Finalement, les électrons passent successivement par divers accepteurs (A_0 , A_1 , F_A , F_B), dont la Ferredoxine (Fd) réduite, qui agit comme réducteur du NADP^+ en NADPH (Fig. 7 ; [Tóth, 2006](#)).

- Le stress oxydatif chez les coraux

Chez les végétaux et les animaux, les processus aérobiques tels que la respiration et la photosynthèse conduisent à la production continue de *Reactive Oxygen Species* (ROS) principalement au niveau des mitochondries, des chloroplastes et des peroxysomes ([Appel and Hirt, 2004](#)). Dans des conditions physiologiques normales ces molécules sont éliminées par les différents complexes enzymatiques et non-enzymatiques du système de défense anti-agents oxydants ([Alscher et al., 1997](#)). Cependant, l'équilibre entre la production et l'élimination de ces ROS peut être perturbé par des facteurs environnementaux pouvant être biotiques : imposés par d'autres organismes, ou abiotiques : résultant d'une altération de l'environnement physique ou chimique ([Appel and Hirt, 2004](#)). Une irradiance importante, des basses ou des hautes températures auraient pour conséquence d'augmenter rapidement la concentration intracellulaire de ces composés et de dépasser les capacités de détoxification des cellules ([Prasad et al., 1994](#)).

Dans les symbioses cnidaires-dinoflagellés, l'exposition à de tels facteurs environnementaux (températures élevées) peut inhiber la photosynthèse réalisée par les algues et augmenter la production de ROS ([Lesser et al., 1990](#) ; [Lesser, 1996](#) ; [Perez et al., 2001](#)). Cette augmentation pourrait causer des dommages cellulaires ([Perez and Weis, 2006](#)), déclencher des processus apoptotiques et nécrotiques, qui conduisent à la perte d'intégrité du tissu gastrodermique contenant l'algue (blanchiment ; [Dunn et al., 2004](#)).

- Mécanismes de production des ROS

Dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques, si l'apport de photons est en excès par rapport à ce qui peut être utilisé pour l'assimilation du CO₂, l'état rédox du pool de plastoquinones est « surréduit ». Par conséquent, la séparation des charges ne peut plus être complète et conduit au phénomène de photoinhibition (Fig. 8 ; [Hideg et al., 2002](#)). Dans de telles conditions, l'accumulation d'énergie d'excitation au niveau du LHC (Light Harvesting Complex) et du RC (centre réactionnel) du PSII favorise la production de chlorophylles excitées à l'état triplet (³Chl). Celles-ci peuvent ensuite interagir avec l'oxygène et former des composés plus réactifs (ROS), par transfert d'énergie ou par des réactions de transfert d'électrons. Cela conduit principalement à la formation d'oxygène singulet (¹O₂) et à des réductions séquentielles en ions superoxydes (HO₂[•]), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et radical hydroxyle (OH[•]) (Fig. 9 ; [Klotz, 2002](#)).

Les ROS produites dans les zooxanthelles vont ensuite diffuser chez l'hôte. Comme le montre la figure 10, le stress oxydatif qui en résulte, induit, à travers l'activation du facteur de transcription NFκB, la régulation de NOS (Nitric Oxide Synthases ; [Mendes et al., 2003](#)). Cette dernière, catalyse la conversion de l'arginine, du NADPH et de l'O₂ en NO (Oxyde Nitrique), en citrulline et en NADP⁺ ([Perez and Weis, 2006](#)). L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO[•]), peut ensuite réagir avec l'O₂^{•-} et former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻ ; [Fridovich, 1986](#)).

- Effets des ROS

L'oxygène singulet produit au sein des chloroplastes est hautement réactif, il peut déstabiliser la membrane thylakoïde par peroxydation lipidique ([Asada, 1996](#)) et entraver le système de renouvellement de la protéine D1 du RC du PSII ([Nishiyama et al., 2004](#)). Cependant, des travaux récents suggèrent que les dommages oxydatifs au niveau du PSII ne seraient qu'une étape secondaire qui découlerait des dégradations au niveau du cycle de Calvin ([Jones et al., 1998](#)). Les radicaux superoxydes, quant à eux, donnent naissance à des oxydants plus puissants tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ([Fridovich, 1986](#)). Cette molécule non chargée, peut diffuser facilement à travers les membranes biologiques et causer des dommages significatifs une fois à l'intérieur du cytosol corallien ([Downs et al., 2002](#)). Le peroxynitrite (ONOO⁻) peut inactiver plusieurs étapes de la chaîne de transport mitochondriale et de la synthèse d'ATP, mais aussi accroître la production de ROS. Il est également capable d'inactiver les Mn-SOD (Super Oxyde Dismutase) et d'influencer l'homéostasie en augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale ; ce qui libérerait des molécules potentiellement pro-apoptotiques telles que le cytochrome *c* des mitochondries ([Radi et al., 2000](#)).

- Les systèmes de protection

La production de grandes quantités de ROS est une conséquence inévitable de la réduction photosynthétique de l'oxygène par les zooxanthelles. Le corail hôte et ses symbiontes ont donc dû s'adapter et développer des stratégies efficaces pour contrer l'accumulation de ces composés potentiellement dangereux.

Tout d'abord, le comportement de l'hôte : - contraction-dilatation du polype ([Brown et al., 2002](#)), - la morphologie de l'individu ou de la colonie, sa structure squelettique ([Enriquez et al., 2005](#)), - l'absorption de rayons lumineux par des protéines spécifiques hôtes telles que les MAAs (mycosporine-like amino acids), peuvent potentiellement moduler la lumière

disponible et donc avoir un impact sur le stress oxydatif (Lesser, 1996 ; Salih *et al.*, 2000 ; Dove *et al.*, 2001 ; Dove, 2004).

Si malgré ces différentes adaptations morphologiques et comportementales, l'irradiance est toujours trop importante, les organismes photosynthétiques ont développé un système qui dissipe rapidement l'excédent d'énergie lumineuse sous forme de chaleur. Il s'agit du *Non-Photochemical Quenching* (NPQ) qui peut être quantifié par une réduction de l'activité fluorescente de la chlorophylle (Muller *et al.*, 2001). Le NPQ peut être divisé en trois constituants (qE, qT, qI) dont le principal et le plus important est qE. Celui-ci est initié par un gradient de protons créé à travers la membrane thylakoïdienne. L'acidification de la lumière des thylakoïdes pourrait catalyser la dé-époxydation de xanthophylles spécifiques tels que la violaxanthine en zeaxanthine chez les plantes supérieures et les chlorophytes (Niyogi, 1999), et la diadinoxanthine en diatoxanthine dans de nombreuses classes de microalgues y compris les dinophyceae (Lavaud *et al.*, 2004).

Les végétaux et les animaux ont également développé un système de défense antioxydante hautement efficace (Foyer *et al.*, 1994). Ce système d'élimination des ROS repose sur différents types de mécanismes enzymatiques tels que : les Superoxyde Dismutases (SOD), les Ascobate Peroxidasés (APX), les Glutathione Peroxidasés (GPX) et les Catalases (CAT). Le but central de ces processus consiste à éliminer $^1\text{O}_2$ au niveau du site de production et à éliminer ou à réduire le flux d'intermédiaires oxygénés tels que O_2^- et H_2O_2 afin de prévenir la formation de HO^\cdot , hautement réactif et très instable (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Au dessus de certaines concentrations en ROS, les défenses antioxydantes du corail ne sont plus efficaces, ne peuvent plus compenser l'apport de ces composés et sont susceptibles de subir des stress oxydatifs. Le corail pourrait alors éliminer la source de production des ROS en expulsant ses zooxanthelles. En effet, la théorie oxydative du blanchiment corallien propose que le blanchiment soit l'ultime défense contre le stress oxydatif (Downs *et al.*, 2000).

De part la grande diversité du genre *Symbiodinium* (Coffroth and Santos, 2005), les zooxanthelles peuvent présenter un grand nombre de réponses génotypiques et phénotypiques à la lumière (Savage *et al.*, 2002 ; Robinson and Warner, 2006) ainsi que des susceptibilités différentielles aux stress thermiques. Les algues de différents clades pourraient alors montrer des niveaux de stress oxydatif différents (Perez and Weis, 2006).

2.5 Les mécanismes d'adaptation face au blanchiment

Les réponses des coraux face à l'augmentation de température, suggèrent que, dans la plupart des cas, les coraux vivent à proximité de leur limite thermique supérieure (Lesser, 1997). Cette constatation pourrait être vue implicitement comme étant une preuve de leur incapacité à s'adapter à l'augmentation de température au cours de ces derniers siècles (Hoegh-Guldberg, 1999). Cependant, la différence de sensibilité aux températures et aux irradiations importantes entre les écoespèces coralliennes (association entre un corail et une population majoritaire de zooxanthelles d'un clade particulier), indique qu'une acclimatation et une adaptation restent néanmoins possibles (Brown, 1997 ; Warner *et al.*, 2006). Malheureusement, un tel processus pourrait s'étendre sur des centaines voire des milliers d'années soit beaucoup plus lentement que les changements climatiques qui nous affectent, et donc, pousser les récifs coralliens que nous connaissons à disparaître à terme.

2.6 Importance des récifs coralliens

Les récifs coralliens comptent avec les forêts tropicales humides, parmi les écosystèmes les plus complexes et les plus fragiles, où la biodiversité est plus élevée que partout ailleurs sur le globe (entre un et neuf millions d'espèces). Vieux de 40 millions d'années, ce type d'édifice biologique qui longe les côtes d'une centaine de pays dans le monde, se révèle être, par ses apports et ses qualités intrinsèques, une source de revenus, de nutrition et de protection côtière extrêmement importante pour les populations locales et les pays en voie de développement. En effet, ils fournissent entre 10 et 12% de la récolte annuelle de poissons dans les pays tropicaux et sont essentiels pour la survie des populations résidant à proximité des récifs. De plus, la beauté de ceux-ci attire chaque année des millions de touristes et de plongeurs, et constitue la principale ressource économique pour de nombreux pays en particulier les petites nations insulaires (Fidji, Maurice). Et enfin, de part leurs capacités à produire des substances bio-actives pour leur propre défense face aux prédateurs, aux compétiteurs ou encore aux perturbations environnementales, les organismes récifaux deviennent une cible majeure pour la recherche pharmaceutique et biotechnologique (Souter and Lindén, 2000).

2.7 Les impacts du blanchiment

Le blanchiment des cnidaires aura des effets physiologiques et écologiques importants. En effet, les symbiontes fournissent une partie de l'énergie nécessaire, à la maintenance, la croissance et la reproduction de nombreuses colonies de coraux (Szmant and Gassman, 1990). Donc, la perte de ces algues suite à un stress aura pour conséquence de diminuer le taux de croissance (Lesser, 1996), la calcification (Muscantine, 1990) et les capacités reproductrices des coraux (Szmant and Gassman, 1990). Le blanchiment est également accompagné d'une augmentation du taux de respiration, d'une diminution du contenu lipidique, du contenu en hydrates de carbone et en protéines chez l'hôte (Glynn, 1990). Enfin, les coraux blanchis sont plus sensibles aux infections parasitaires, bactériennes et virales (Kushmaro *et al.*, 1996) pouvant conduire à la mort de l'organisme (Kleppel *et al.*, 1989).

Ces différentes perturbations peuvent notamment, réduire la couverture coralliaire, réduire la diversité spécifique et induire des changements de composition dans la communauté récifale (Connell, 1997). De plus, suite à l'altération de leur calcification, les coraux sont susceptibles à la fois : de subir des dommages importants lors de tempêtes ou de tsunamis et d'être envahis par des organismes érodeurs (Mokady *et al.*, 1998). Enfin, ils pourraient ne plus être compétitifs pour l'espace, face aux organismes à croissance plus rapide tels que les macroalgues, les éponges et d'autres invertébrés (Glynn, 1993).

Par ailleurs, les récifs représentent une source importante de revenus et de ressources (tourisme, pêche, protection côtière, médecine), générant des milliers d'emplois et des millions de dollars. Par conséquent, la dégradation de cet écosystème aura des effets globaux extrêmement importants au niveau socio-économique.

3. L'utilisation de mesures de fluorescence chlorophyllienne pour évaluer l'activité de l'appareil photosynthétique et son adaptation à la lumière

La photosynthèse est l'un des processus métaboliques les plus importants chez les plantes. Les mesures de l'activité photosynthétique peuvent par conséquent transmettre des informations importantes sur l'état de santé des plantes. Dans le domaine de la recherche sur la photosynthèse, la fluorescence de la chl *a* compte parmi les méthodes les plus couramment utilisées, aussi bien dans les études fondamentales qu'en écophysiologie (Papageorgiou and

[Govindjee, 2004](#)). Il s'agit d'une méthode non invasive et très sensible, qui permet la mesure *in vivo* de l'activité photosynthétique, sans préparation standardisée ou compliquée.

Bases photophysiques de la fluorescence

La molécule de chlorophylle peut exister sous différents états d'énergie, correspondant au passage d'un électron du système de doubles liaisons conjuguées dans différentes orbitales moléculaires. Les niveaux d'énergie peuvent être représentés par un diagramme (Fig. 11). L'état fondamental de la molécule est un état singulet de faible énergie (S_0). Lors de l'absorption d'un photon ($h\nu$), un état singulet de plus haute énergie est atteint : S_1 , lorsque l'énergie du photon correspond à celle de la lumière rouge et S_2 , pour la lumière bleue. A la suite de l'absorption d'un photon, la molécule tend à revenir rapidement à son état fondamental. En partant de S_2 , une part de l'énergie est toujours perdue sous forme de chaleur, ce qui mène à l'état S_1 . A partir de S_1 , plusieurs processus peuvent entrer en compétition : la perte complète du reste de l'énergie sous forme de chaleur, l'émission d'un photon de fluorescence de couleur rouge, ou la formation d'un état excité triplet (T_1) par inversion de spin électronique (non-montré sur la Fig. 11). En solution, l'ensemble de ces processus de désactivation se réalise en quelques milliardièmes de seconde après l'absorption d'un photon (le processus d'absorption lui-même peut être considéré comme instantané). Dans un centre réactionnel photosynthétique (comme le RC du PSII), ces différents processus peuvent également se produire. Cependant, ils entrent en compétition avec la réaction photochimique de transfert de l'électron « énergisé » vers un accepteur d'électron.

Notion de 'rendement' de fluorescence

Etant donné que, par principe, le transfert d'électrons entre en compétition avec les processus de désactivation de la chlorophylle, il est possible d'utiliser des mesures de fluorescence afin de déterminer le rendement du transfert d'électrons. Par exemple, si le rendement du transfert d'électrons augmente, ceux de la fluorescence et de la désactivation thermique doivent diminuer. D'une manière générale, on définit le rendement d'un processus comme un nombre pouvant prendre une valeur allant de 0 à 1. Il est égal à la probabilité que le processus en question se produise. Il est noté par la lettre Φ de l'alphabet grec. Considérons, par exemple, le rendement de la fluorescence, Φ_F . Au niveau d'une molécule de chlorophylle donnée, Φ_F est égal à la probabilité que cette chlorophylle, une fois excitée, émette un photon de fluorescence. Au niveau d'une large population de molécules, Φ_F est aussi égal au nombre de molécules qui, parmi les molécules excitées, émettent un photon de fluorescence. Il en va ainsi des autres rendements.

Par définition, la somme des rendements des processus de désactivation de l'état excité vaut 1. Soit Φ_F , Φ_H et Φ_P , respectivement les rendements de fluorescence, de désactivation thermique et de photochimie, on peut écrire :

$$\Phi_F + \Phi_H + \Phi_P = 1 \text{ (on néglige en général le processus de formation de l'état triplet)}$$

Cette équation simple fait bien apparaître qu'une variation dans le rendement d'un des processus affectera automatiquement les rendements des deux autres.



But du mémoire

Le blanchiment constitue actuellement une des principales menaces qui pèsent sur les récifs coralliens. Afin de mieux prévoir ces phénomènes dans le futur et de protéger ces écosystèmes riches et essentiels à bien des égards, il est primordial d'en comprendre les mécanismes.

L'étude de cette problématique, réclame sans cesse de nouvelles techniques et de nouveaux moyens expérimentaux. Dans ce cadre, nous avons utilisé des *Aiptasia pallida*, il s'agit de petites anémones de mer tropicales très répandues, qui se reproduisent facilement et constituent une réelle nuisance pour les conservateurs d'aquariums marins. Elles sont aisément maintenues dans des petits aquariums faiblement équipés. De plus, selon certains auteurs (Muscatine *et al.*, 1991), les mécanismes physiologiques de blanchiment chez *Aiptasia sp.* seraient assez similaires à ceux des scléractiniaires.

Par conséquent, dans un premier temps, nous avons tenté de démontrer la pertinence d'utiliser ces organismes hermatypiques comme matériel de laboratoire dans l'étude du blanchiment corallien.

Ensuite, nous avons voulu connaître l'impact de la lumière sur le blanchiment corallien. Pour tenter de répondre à cette question, l'état photophysologique des zooxanthelles a été étudié durant 10 jours, à fortes et à faibles intensités lumineuses. A cette fin, des mesures de fluorescence de la chlorophylle *a* ont été réalisées avec un fluorimètre continu. La respiration des organismes en conditions de stress lumineux a été calculée sur base de données provenant de l'oxymètre. Finalement, la variation de pigmentation des zooxanthelles a été analysée à l'aide de chromatogrammes HPLC. Parallèlement à ce travail, une étude morphologique sur les mêmes individus, dans les mêmes conditions a été réalisée par Charlotte Baudesson.

L'ensemble des résultats physiologiques et morphologiques, devrait permettre d'en savoir plus sur le rôle que joue la lumière et donc la photosynthèse sur le blanchiment corallien. De plus, suivant les résultats, il pourrait s'avérer que les anémones utilisées dans ce mémoire constituent un excellent modèle de laboratoire dans l'étude du blanchiment corallien.



Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1 Description d'*Aiptasia pallida*.



Fig. 12 – *Aiptasia* sp.

Les *Aiptasia pallida* que nous avons utilisés pour mener à bien les expériences de ce mémoire, sont des anémones de mer appartenant à l'embranchement des cnidaires, à la super classe des anthozoaires, à la classe des zoanthaires, à l'ordre des actiniaires et à la famille des Aiptasiidae. Ces organismes qui ont été prélevés dans les bassins de l'aquarium Dubuisson de Liège, présentent à l'extrémité apicale de leur colonne lisse, un disque oral plat entouré de nombreux tentacules cylindrique (Fig. 12 ; chez *A. pallida*. Ces anémones tropicales faisant quelques centimètres de haut, peuvent présenter des fines bandes et des petites taches de couleur blanche, elles sont solitaires, actives le jour et vivent en symbiose avec des zooxanthelles qui leurs confèrent leur couleur brune (Erhardt and Knop, 2005).

1.2 Maintien des organismes en aquarium d'acclimatation

Une fois collectées, les anémones ont été stabilisées et acclimatées dans un aquarium de 150L d'eau de mer en provenance de l'aquarium de Liège. Un substrat constitué de sable coquillier ainsi qu'un décor composé de pierres et de squelettes de madrépores ont permis l'installation de nombreux organismes marins y compris les anémones de mer. Deux poissons de la famille des Pomacentridea ont assuré un développement optimal des colonies bactériennes intervenant dans la filtration biologique de l'eau, complétée par une filtration mécanique sur mousse de polyéthylène. Une pompe externe et deux bulleurs ont agité et oxygéné l'eau. Par la présence de zooxanthelles dans les tissus de l'anémone, il a été nécessaire de fournir une quantité importante de lumière, donc, un ensemble de cinq néons a été placés sur une des faces longitudinales (3 néons) et sur la face supérieure (2 néons) de l'aquarium. Grâce à cette installation et à un nourrissage hebdomadaire à base de nauplies d'artémia, les anémones ont pu croître et se reproduire sous des intensités lumineuses allant de 45 à 90 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$. Afin de se familiariser avec les appareils et les techniques, une population d'*Aiptasia pallida* de 10 individus a été analysée au fluorimètre continu et à l'HPLC.

2. Expérimentation

2.1 Maintien des organismes en conditions de stress

Afin d'étudier l'impact de la lumière sur le blanchiment d'*Aiptasia pallida*, il a été nécessaire d'élaborer des aquariums de manière à ce que les organismes qui y vivent perçoivent des intensités lumineuses de manière homogène. Pour ce faire, nous avons utilisé deux aquariums de 60 L, munis d'un filtre, d'une pompe, d'une résistance, d'un bulleur et d'un néon de 15W. Ensuite, nous les avons adaptés comme suit :

- pour le stress à l'obscurité, l'aquarium a été emballé dans de l'aluminium afin d'éviter tout éclairage extérieur et une plaque perforée de polystyrène expansé a été placée sous le néon de 15W ;

- pour induire un stress lumineux sur nos anémones, un spot halogène de 300W a été placé en face d'une des parois de l'aquarium. Afin d'éviter toute augmentation de la

température de l'eau par cet éclairage, un récipient remplis d'eau froide a été intercalé entre l'aquarium et la source lumineuse.

Grâce à ces modifications, les anémones disposées dans des pondoirs (bacs en plastiques microperforés) ont perçu de manière homogène des rayons photosynthétiquement assimilables (PAR) compris entre 0 et 1 μmol de photon/ m^2s lors du stress à l'obscurité et entre 450 et 600 μmol de photon/ m^2s lors du stress lumineux.

2.2 Protocole expérimental général

De manière générale voici comment se sont déroulées les deux expériences :

- une fois collectées, les anémones sont maintenues au minimum 15 jours dans l'aquarium d'acclimatation avant toute expérimentation,
- dès ce délai passé, les organismes sont placés dans les conditions de stress à une température de 26°C, au cours desquelles 6 à 8 individus sont prélevés à 0h (témoin), 24h, 48h, 96h, 168h et enfin 240h après le début de l'expérience. Le nourrissage à base de nauplies d'*artemia* s'effectue à 96h ;
- directement après prélèvement de l'aquarium expérimental, les individus sont délicatement vidés de l'eau contenue dans leur cavité gastrique. Ils sont pesés avec une balance de précision, mesurés et conditionnés dans une boîte isotherme ($\pm 25^\circ\text{C}$) à l'obscurité pour être transportés jusqu'à l'institut de botanique en vue des analyses photophysologiques ;
- ensuite, trois (obscurité) ou cinq (lumière) individus sont successivement analysés avec un fluorimètre continu (Handy-PEA, Hansatech). Finalement, la respiration de trois individus restants (sur les 6 ou 8 au départ), est mesurée avec un oxymètre (Hansatech);
- après analyse, les 3 échantillons de la respiration ainsi que la moitié de chaque échantillon de la fluorescence chlorophyllienne sont fixés dans du formol 3,5%. La seconde moitié de ces derniers est quant à elle congelée dans de l'eau de mer à -20°C en attente de l'analyse pigmentaire à l'HPLC ;
- les échantillons congelés et fixés sont broyés à l'aide d'un mortier dans l'acétone et dans de l'eau de mer filtrée, afin de réaliser les analyses pigmentaires et les comptages de zooxanthelles, respectivement.

3. Méthodes

3.1 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

Le fluorimètre

Il existe de nombreux appareils capables de mesurer l'intensité de la fluorescence émise par un échantillon photosynthétique, comme des anémones de mer. Le fluorimètre que nous avons utilisé (fluorimètre Handy-PEA, de la firme Hansatech ; Fig. 13) comporte une source de lumière LED (light emitting diodes) produisant une lumière d'excitation rouge (maximum d'intensité à 660 nm) bien absorbée par la chlorophylle *a*. L'intensité de la lumière d'excitation peut être fixée à une valeur comprise entre 10 et 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La fluorescence est ensuite mesurée à des longueurs d'onde supérieures à 710 nm à raison d'une mesure toutes les 10 microsecondes pendant les 2 premières millisecondes d'éclairement, puis



toutes les 100 microsecondes par la suite. L'appareil est prévu pour des mesures sur des feuilles, ou des suspensions d'algues en suspensions mais s'est également avéré efficace pour des anémones *in toto* et *in vivo*.

La courbe d'induction après adaptation à l'obscurité

Lorsqu'on mesure la fluorescence émise par un échantillon photosynthétique après l'avoir replacé à l'obscurité pendant quelques minutes, on constate que la fluorescence varie au cours du temps à partir du début de l'éclairement (avec le fluorimètre). Elle augmente d'abord pendant environ une seconde et diminue ensuite plus lentement. La montée initiale de fluorescence est généralement qualifiée d'« induction de fluorescence » et présente une courbe caractéristique (Strasser *et al.*, 2000). Ainsi, pour un échantillon adapté à l'obscurité, on définit deux valeurs : $-F_0$ qui correspond à l'intensité minimale de la fluorescence (au début de l'éclairement) ; $-F_M$ qui correspond à l'intensité maximale de la fluorescence.

Pourquoi cette variation de la fluorescence se produit-elle ?

Lorsque la lumière est suffisamment intense, elle provoque transitoirement la réduction de l'accepteur d'électrons Q_A dans tous les PSII de l'échantillon exposé, suite à la réaction photochimique de transfert d'électrons, catalysée par la chlorophylle du PSII. Ainsi, la montée de fluorescence traduit le passage des PSII d'un état ouvert, photochimiquement actif et faiblement fluorescent (Q_A est oxydé), à un état fermé, photochimiquement inactif et fortement fluorescent (Q_A est réduit). Cette montée de fluorescence comporte plusieurs phases (délimitées par les points d'inflexion notés J et I), qui ne seront pas discutées ici. Il est également intéressant de noter que la forme et la durée de la montée de fluorescence dépendent de l'intensité de la lumière d'excitation. On dira que la lumière est saturante pour ce processus lorsque son intensité est suffisamment élevée pour qu'un rapport maximal entre F_M et F_0 soit obtenu (typiquement un rapport de l'ordre de 4 à 5). Dans ce cas, la montée dure généralement moins d'une seconde et on peut l'enregistrer grâce à un bref éclairement qui sera qualifié de 'pulse saturant'.

La courbe d'induction après adaptation à la lumière

Il est possible d'adapter un échantillon à la lumière pendant quelques minutes, puis d'enregistrer immédiatement les variations de fluorescence produites par un pulse saturant. Dans ce cas, on observe de nouveau une montée de fluorescence, mais d'amplitude moindre par rapport à un échantillon adapté à l'obscurité. Pour l'échantillon ainsi adapté à la lumière, on définit : F_S et F_M' qui correspondent respectivement à l'intensité minimale (début du pulse saturant) et maximale de la fluorescence.

Pourquoi il y a-t-il une montée de fluorescence alors que l'échantillon a été préalablement adapté à la lumière ?

Ceci résulte du fait qu'à l'état stationnaire obtenu sous cette lumière, la population de PSII comporte deux sous-populations : une sous-population de PSII ouverts (qui diminue lorsque l'intensité lumineuse augmente) et une population de PSII fermés. La montée de fluorescence traduit donc la fermeture des PSII ouverts restant.

Pour quelle raison le niveau de F_M' est-il inférieur au niveau de F_M alors que dans les deux cas, les PSII sont à l'état fermé ?

La diminution du rendement de fluorescence après adaptation à la lumière résulte de l'établissement de processus de dissipation de l'énergie lumineuse sous forme thermique. On parle dans la littérature d'extinction non-photochimique de la fluorescence ('NPQ', ou 'non-photochemical quenching'). Ainsi, lorsque l'appareil photosynthétique est exposé à la lumière, il s'y adapte en dissipant une partie de l'énergie absorbée sous forme de chaleur. L'importance de ce processus dépend de l'intensité lumineuse : à faible intensité, l'extinction non-photochimique est faible (utilisation maximale de l'énergie) tandis qu'à forte intensité, l'extinction non-photochimique est importante (dissipation efficace de l'excès d'énergie).

Mesure des rendements de transport d'électrons et des processus de dissipation en fonction de l'intensité lumineuse

Il est possible de réaliser des expériences au cours desquelles on adapte progressivement un échantillon à une intensité lumineuse croissante, en l'exposant à une succession de périodes de lumière d'intensités choisies. On enregistre la montée de fluorescence au cours d'un pulse saturant donné à la fin de chaque période. On obtient alors un couple de valeurs de F_S et de F_M' pour chaque intensité lumineuse utilisée, ainsi que les valeurs F_O et F_M de l'échantillon adapté à l'obscurité au début de l'expérience (Hendrickson *et al.*, 2004).

Des travaux théoriques (Genty *et al.*, 1989 ; Strasser *et al.*, 2000 ; Hendrikson *et al.*, 2004) ont permis de montrer qu'il était possible de dériver des paramètres de rendement à partir de ces valeurs. Les plus utiles et ceux qui ont été utilisés dans le cadre de ce mémoire sont rassemblés dans le Tableau 1.

Tabl. 1 – Formules des différents rendements calculés lors de l'analyse de fluorescence

Rendement		Formule	Signification
$\Phi_{PSII_{MAX}}$	Eq. 1	$\Phi_{PSII_{MAX}} = \frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_O}{F_M}$	rendement photochimique maximum du PSII, mesuré après adaptation à l'obscurité
Φ_{PSII}	Eq. 2	$\Phi_{PSII} = \frac{F_V'}{F_M'} = \frac{F_M' - F_S}{F_M'}$	rendement photochimique du PSII à la lumière.
Φ_{NPQ}	Eq. 3	$\Phi_{NPQ} = \frac{F_S}{F_M'} - \frac{F_S}{F_M}$	rendement de la dissipation thermique à la lumière par le processus d'extinction non-photochimique.
$\Phi_{f,D}$	Eq. 4	$\Phi_{f,D} = \frac{F_S}{F_M}$ pour l'échantillon adapté à l'obscurité, $F_S = F_O$.	somme des rendements de fluorescence et de dissipation thermique (autre que celle due à l'extinction non-photochimique).

Pour l'échantillon adapté à la lumière, il résulte des équations 2, 3 et 4 que, la somme de Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} et $\Phi_{f,D}$ vaut 1. Cela signifie que ces trois termes de rendement suffisent à rendre compte de l'utilisation de la lumière absorbée.

Calcul de la vitesse du transport d'électrons

On a également calculé la vitesse du transport d'électrons ETR (Electron Transport Rate) qui est égale au produit de Φ_{PSII} et du flux de lumière absorbé par le PSII (ABS_{PSII}) dans l'échantillon (Genty *et al.*, 1989 ; Maxwell and Johnson, 2000) :

$$ETR = \Phi_{PSII} \times ABS_{PSII} = \Phi_{PSII} \times PFD \times L \times \alpha \quad (\text{Eq. 5})$$

où PFD est l'intensité de la lumière incidente ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), L est la proportion de lumière absorbée par l'échantillon par rapport à la lumière incidente et α est le coefficient de partage de la lumière absorbée entre les deux photosystèmes.

Les facteurs L et α étant difficiles à évaluer, le produit de Φ_{PSII} par l'intensité de la lumière incidente (PFD) a alors été calculé. Nous avons obtenu ainsi une valeur relative rETR qui est proportionnelle à la vitesse de transport d'électrons.

$$rETR = \Phi_{PSII} \times PFD \div ETR \quad (\text{Eq. 6})$$

La mesure de rETR en fonction de l'intensité lumineuse permet d'établir une courbe de saturation du transport d'électrons sur une échelle relative, comparable d'un échantillon à un autre.

3.2 Protocole appliqué à la mesure de la fluorescence chlorophyllienne

Pour mesurer l'état photophysiological des zooxanthelles au sein même des anémones et obtenir les différents rendements du tableau 1 et rETR, le protocole de mesures suivant a été appliqué avec le fluorimètre (Tabl. 2).

Tabl. 2 – Protocole appliqué avec le fluorimètre

N° de pulse	Intensité de la période pré-illuminatoire ($\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$)	Durée de la période de pré-illumination (sec)	Intensité du pulse lumineux ($\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$)	Durée du pulse lumineux (sec)
1 et 2	0	100	3500	2
3 et 4	25	100	3500	2
5 et 6	50	100	3500	2
7 et 8	100	100	3500	2
9 et 10	200	100	3500	2
11 et 12	400	100	3500	2

Pour réaliser cette analyse, chaque individu est épongé et disposé dans le LeafClip (Hansatech). Etant donné que les zooxanthelles sont localisées principalement au niveau de la couronne tentaculaire (Ladrière, 2006 ; Baudesson, 2007), celle-ci a été orientée vers la source lumineuse du fluorimètre. Une fois le protocole arrivé à terme, les informations sur la fluorescence de l'échantillon photosynthétique sont récupérées à l'aide du logiciel Handy-PEA fournit avec l'appareil.

3.3 Protocole appliqué à la mesure de la respiration

Chaque échantillon (3 par prélèvement) est placé avec 1,5 ml d'eau de mer dans la cellule de l'oxymètre (Hansatech). La mesure de la respiration comprise entre 10 et 15 min est récupérée avec le logiciel Oxy-Rec fourni avec l'oxymètre. Après analyse, l'échantillon est fixé et la densité de zooxanthelles est déterminée selon la même méthode que pour les anémones provenant de la fluorescence (voir ci-après). La respiration de l'échantillon ($\mu\text{mol O}_2/(\text{g/ml}).\text{min}$) est, quant à elle, obtenue en divisant le coefficient de la droite de

concentration en O₂ en fonction du temps, par le produit de la masse de l'échantillon et du volume de la cellule de l'oxymètre (Eq. 7).

$$respiration = \frac{(Coeff)}{(masse \times 1,5)} \quad (\text{Eq. 7})$$

3.4 Détermination de la densité en zooxanthelles

A la fin de la mesure de la fluorescence, les individus sont coupés en deux parties égales. La première est fixée dans du formol 3,5 %, l'autre est congelée pour l'analyse pigmentaire. Après fixation, la masse est mesurée avec une balance de précision et l'anémone (moitié) est broyée avec un mortier dans de l'eau de mer filtrée (filtre : Acrodisc de 3,5µm). 200 µl du broyat sont injectés dans un hématocytomètre pour être visualisés au microscope optique. Le nombre de zooxanthelles est ensuite comptabilisé dans 15 carrés de l'hématocytomètre, et la procédure est répétée 5 fois. La densité en algues de l'échantillon est ensuite déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{Zx}{gr} = \frac{\left(\left(\frac{Zx}{Carré} \right) \times 250.000 \times V_{broya} \right)}{Masse} \quad (\text{Eq. 8})$$

3.5 Analyse pigmentaire des échantillons à l'HPLC

Technique d'extraction des pigments

La demi anémone congelée est placée dans un mortier. On y verse ensuite 4 ml d'Acetone (Fluka®) et on broie jusqu'à extraction complète des pigments. La solution est ensuite placée à -20°C, au minimum 48h, avant d'être centrifugée (Hettich universal 30 RF) à 14500 RPM pendant 10 min à 2°C. Le surnageant est alors prêt pour le passage à l'HPLC.

Principe de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Il s'agit d'un type de chromatographie dans laquelle les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le flux d'une phase mobile liquide. Les séparations résultent de la différence entre les vitesses de progression des divers analytes suivant leurs affinités pour l'une ou l'autre phase.

Appareil utilisé

L'HPLC utilisée pour l'analyse pigmentaire de nos anémones et de leurs zooxanthelles est composée :

- d'un passeur d'échantillon thermostatisé à 4°C de type Waters 717 plus autosampler ;
- d'un dégazeur de type Waters « in line degasser » ;
- d'un système de contrôle et d'une pompe de type Waters 600s controller et 616 pump ;
- d'un détecteur à barrette de diodes de type Waters 996 photodiode array detector ;
- d'une pré colonne de type Waters Sentry Nova-pak C₁₈ de porosité 60 Å, taille des grains est de 4µm et sa dimension, de 3.9 x 20 mm ;
- d'une colonne de type Waters Nova-pak C₁₈ cartridge de porosité 60 Å, la taille des grains est de 4µm et sa dimension, de 3.9 x 150 mm ;

Le traitement des résultats sous la forme de chromatogramme ainsi que l'identification des différents pigments grâce à leur spectre d'absorption, est rendu possible grâce au logiciel Millennium³² chromatography manager.

Gradient de solvant et débit

Les gradients de solvant et les débits appliqués lors de la méthode d'analyse et de lavage sont rassemblés dans le tableau 3.

Pigments analysés et leur temps de rétention

Les pigments ont été déterminés sur base du travail de Venn et ses collègues (2006). La teneur en Chl *a*, Chl *c* et β -carotène au sein des *Aiptasia pallida* a été déterminée grâce à des standards pigmentaires (Tabl 4).

Tabl. 4 – Pigments analysés avec leur temps de rétention et leur spectre d'absorption

Pigments	Temps de rétention (min)	Spectre d'absorption
Chl <i>c</i>	5,19 \pm 0,01	456
Peridinin	6,07 \pm 0,01	474
<i>Cis</i> -peridinin	6,50 \pm 0,02	330, 467
Diadinoxanthine	8,29 \pm 0,03	427, 445, 476
Diatoxanthine	8,95 \pm 0,03	427, 452, 480
Chl <i>a</i>	17,49 \pm 0,07	433, 664
Chl <i>a</i> (Stéréoisomère)	18,30 \pm 0,06	431, 664
Phaeophytine	20,82 \pm 0,61	410, 665
β -carotène	22,04 \pm 0,04	454, 480

3.6 Analyses statistiques

L'ensemble des données de ce mémoire ont été analysées avec le logiciel SigmaStat 3.5 (Sigma-Aldrich). Des ANOVA à une voie ont été utilisées lorsque la population suivait la loi normale. Lorsque ce n'était pas le cas, le test de Kruskal-Wallis était appliqué. Les tests *post hoc* utilisés sont ceux de Bonferroni (ANOVA 1) et de Dunn (si Kruskal-Wallis), ils permettent d'identifier les traitements qui diffèrent entre eux dans les analyses de variance. L'ensemble des rapports des tests statistiques est sur le CD-ROM en annexe.



Résultats

1. Mesures sur les populations d'anémones « témoin »

Une population d'*Aiptasia pallida* de 10 individus, vivant dans les conditions d'acclimatation a été analysée au fluorimètre continu et à l'HPLC. Cela a permis de se familiariser avec les différents appareils et techniques, et d'obtenir la concentration pigmentaire ainsi que les différents rendements issus de la fluorescence de la chl *a*, à une lumière comprise entre 45 à 90 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$.

1.1 Fluorescence de la chl *a*

1.1.1 Evolution de la fluorescence minimale et maximale

Les mesures de fluorescence minimale, F_0 ou F_S (à partir du deuxième flash) et les mesures de fluorescence maximale, F_M ou F_M' (à partir du deuxième flash) sont reprises dans le tableau suivant (Tabl. 5).

Tabl. 5 - Evolution de la fluorescence minimale et maximale avec l'intensité pré-illuminatoire (moyenne \pm écart-type)

Int. pré-illuminatoire ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	0	25	50	100	200	400
Moy. F_0 (F_S)	468,90 $\pm 171,38$	501,50 $\pm 162,06$	516,95 $\pm 153,60$	541,85 $\pm 159,65$	561,15 $\pm 141,81$	548,25 $\pm 142,32$
Moy. F_M (F_M')	1185,25 $\pm 233,29$	1107,50 $\pm 263,72$	1100,05 $\pm 228,65$	1009,85 $\pm 228,11$	899,50 $\pm 180,72$	725,00 $\pm 173,50$

L'analyse statistique des valeurs de la fluorescence minimale ne montre aucune variation significative avec l'augmentation d'intensité lumineuse pré-illuminatoire. Par contre, la fluorescence maximale diminue progressivement (Fig. 14) et diffère significativement entre F_M (F_M') à 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et F_M' à 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kruskal-Wallis à une voie : $dl = 5$; $P=0,001$; Dunn : $P < 0,05$).

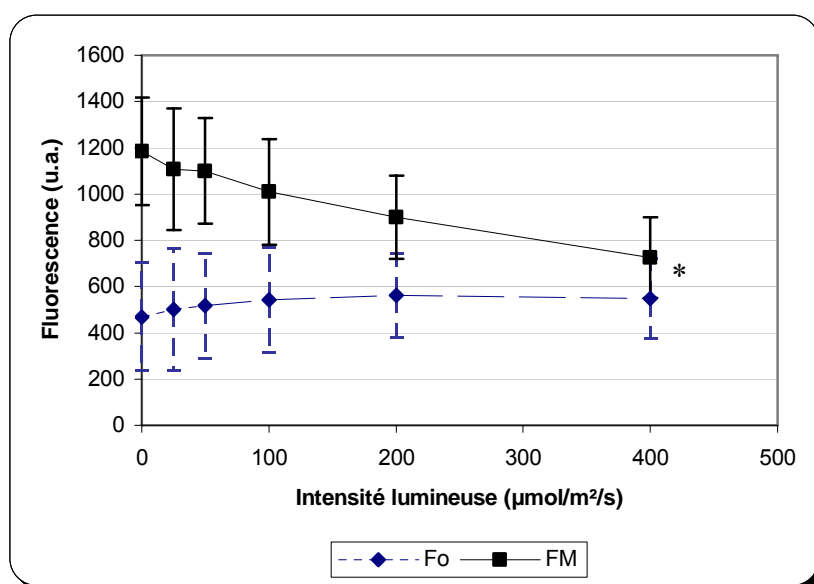


Fig. 14 - Evolution de F_0 (F_S) et F_M (F_M') avec l'augmentation de l'intensité pré-illuminatoire. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

1.1.2 Evolution du taux relatif de transport d'électrons

Les valeurs du taux relatif de transport d'électrons et son évolution avec l'intensité pré-illuminatoire, sont reprises dans le tableau 6 et la figure 15.

Tabl. 6 - Evolution du taux relatif de transport d'électrons avec l'intensité pré-illuminatoire (moyenne \pm écart-type)

Int. pré-illuminatoire ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	0	25	50	100	200	400
Moy. rETR	0,00	13,80	26,73	46,92	76,08	98,73
	$\pm 0,00$	$\pm 1,91$	$\pm 3,82$	$\pm 6,91$	$\pm 12,07$	$\pm 19,71$

Le taux relatif de transport d'électrons augmente progressivement avec l'intensité lumineuse (précédant les flashes à $3000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), jusqu'à atteindre un certain niveau de saturation à $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 15). Le rETR à 25, 50, 100, 200 et $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est statistiquement différent par rapport au rETR à $0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kruskal-Wallis à une voie : $dl = 5$; $P < 0,001$; Dunn : $P < 0,05$).

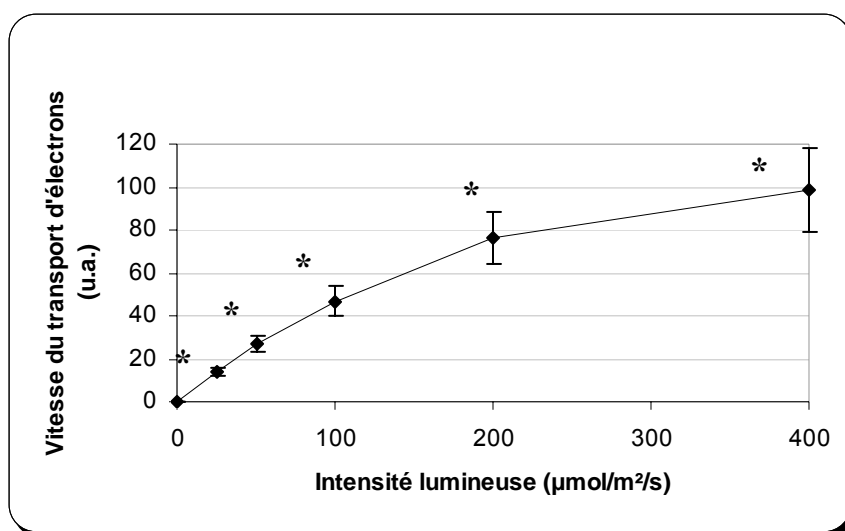


Fig. 15 - Evolution de rETR avec l'augmentation de l'intensité pré-illuminatoire.
Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

1.1.3 Evolution de l'efficacité du PSII et du Non-Photochemical Quenching

L'évolution de l'efficacité du PSII (ΦPSII), de ΦNPQ et de $\Phi\text{f,D}$ avec l'intensité pré-illuminatoire est notée dans le tableau suivant (Tabl. 7).

Tabl. 7 - Evolution des rendements d'utilisation (ΦPSII) et de dissipation ($\Phi\text{f,D}$ et ΦNPQ) d'énergie (moyenne \pm écart-type)

Int. pré-illuminatoire ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	0	25	50	100	200	400
Moy. ΦPSII	0,61	0,55	0,53	0,47	0,38	0,25
	$\pm 0,11$	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$	$\pm 0,07$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$
Moy. ΦNPQ	0,00	0,03	0,03	0,08	0,15	0,29
	$\pm 0,01$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,07$
Moy. $\Phi\text{f,D}$	0,39	0,42	0,43	0,45	0,47	0,46
	$\pm 0,11$	$\pm 0,10$	$\pm 0,10$	$\pm 0,10$	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$

Comme le montre la figure 16, le rendement d'utilisation d'énergie au niveau du PSII (Φ_{PSII}) diminue en fonction de l'intensité pré-illuminatoire, tandis que le rendement de dissipation thermique (Φ_{NPQ}) augmente. Au niveau statistique, seul Φ_{PSII} et Φ_{NPQ} à 100, 200 et 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ diffèrent significativement par rapport à 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kruskal-Wallis à une voie : $dl = 5$; $P < 0,001$; Dunn : $P < 0,05$).

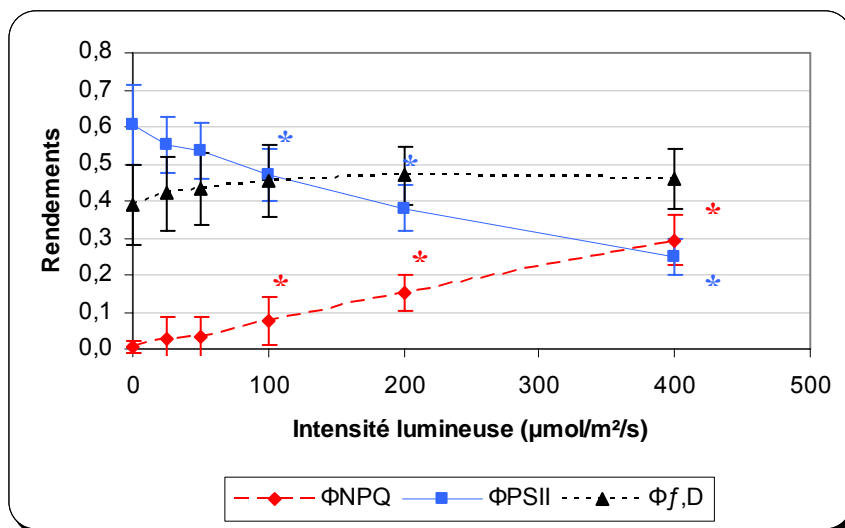


Fig. 16 - Evolution des rendements d'utilisation (Φ_{PSII}) et de dissipation d'énergie ($\Phi_{f,D}$ et Φ_{NPQ}). Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

1.2 Densités en zooxanthelles

Le nombre de zooxanthelles, la masse et la densité en zooxanthelles par anémone sont repris dans le tableau 8 et la figure 17.

Tabl. 8 – Densités en zooxanthelles au sein des anémones non stressées (moyenne \pm écart-type)

Nbr Zx/Anémone (N)	Masse des anémones (g)	Densité en zooxanthelles (N.g^{-1})
1,19.10 ⁶ $\pm 0,76.10^6$	0,060 $\pm 0,035$	116,51.10 ⁶ $\pm 31,26.10^6$

Comme le montre la courbe de tendance de la figure 17 (droite), la densité en zooxanthelles diminuerait avec l'augmentation de la masse d'anémone.

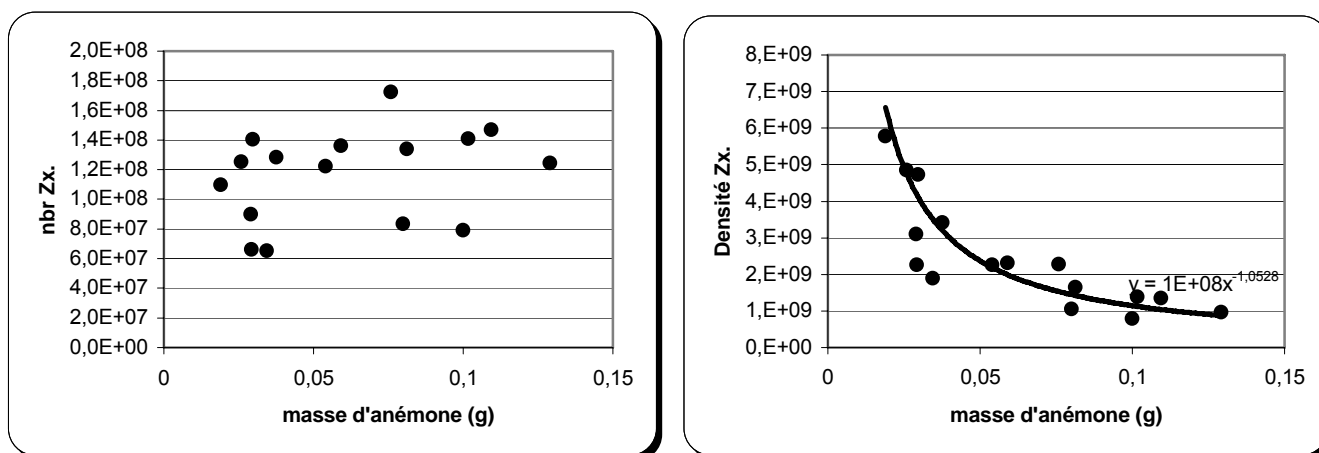


Fig. 17 – Densité de zooxanthelles (gauche) et densité de zooxanthelles par gramme d'anémone (droite)

1.3 Résultats de l'analyse pigmentaire

Le tableau 9 reprend les concentrations moyennes de la chl *a* totale, de la chl *c* et du β -carotène, contenues dans les échantillons passés à l'HPLC et les concentrations moyennes de ces différents pigments rapportées sur le nombre moyen de zooxanthelles par échantillon.

Tabl. 9 – Concentration de la chl *a* totale, de la chl *c* et du β -carotène chez *Aiptasia pallida* (moyenne \pm écart-type)

	Chl <i>a</i> totale	Chl <i>c</i>	β -carotène
Concentration moyenne par demi anémone (μg)	33,70	10,59	0,84
\pm	30,19	9,12	0,76
Concentration moyenne par zooxanthelle (pg/Zx)	6,62	2,08	0,16
\pm	1,48	0,45	0,04

2. Mesures sur les anémones ayant subi un stress lumineux

2.1 Résultats de la fluorescence de la chl *a*

Durant 10 jours, 30 anémones ont été soumises à un stress lumineux. Après des durées croissantes (0, 24, 48, 96, 168, 240h), 5 individus sont prélevés, la fluorescence de la Chl *a* est alors mesurée et les résultats qui en découlent sont calculés.

2.1.1 Evolution de la fluorescence minimale et maximale

L'évolution de la fluorescence minimale F_0 (1^{er} flash) et de la fluorescence maximale F_M (1^{er} flash) mesurées sur 30 individus au total (6 prélèvements x 5 individus), soumis à des PAR (radiations photosynthétiquement assimilables) de 450 à 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, est reprise et illustrée dans le tableau et la figure suivants (Tabl. 10, Fig. 18).

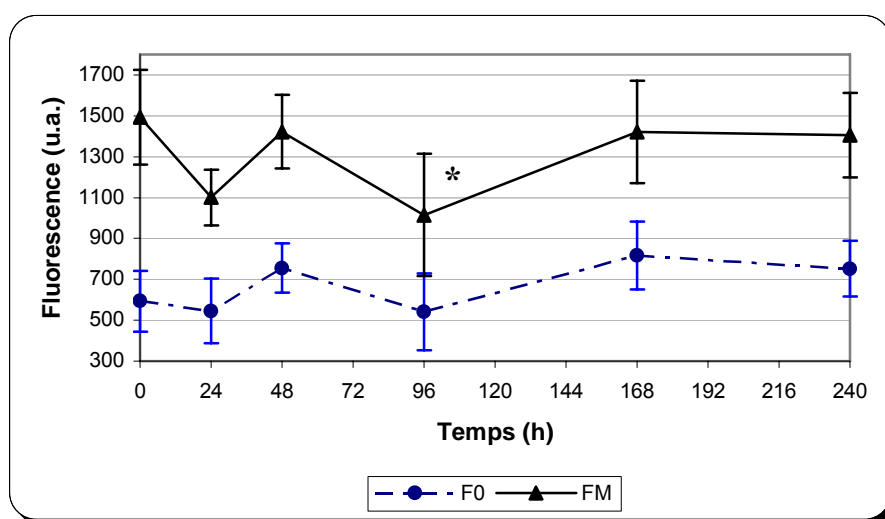


Fig. 18 – Evolution de la fluorescence minimale et maximale fonction du temps sous une intensité lumineuse allant de 450 à 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

Tabl. 10 – Evolution de la fluorescence minimale et maximale au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. F_0 (F_S)	593,60 $\pm 158,27$	545,00 $\pm 120,75$	755,00 $\pm 187,70$	540,80 $\pm 165,53$	816,80 $\pm 136,76$	751,60 $\pm 187,37$
Moy. F_M ($F_{M'}$)	1494,20 $\pm 136,36$	1101,00 $\pm 180,84$	1422,60 $\pm 299,04$	1014,80 $\pm 249,31$	1420,80 $\pm 206,54$	1406,60 $\pm 277,18$

Une analyse de variance à une voie ne montre aucune variation significative de F_0 au cours de l'expérience ($dl = 5$; $P = 0,034$). Par contre, la fluorescence maximale (F_M) présente des variations statistiquement significatives au cours du stress (ANOVA 1 ; $dl = 5$; $P = 0,013$). Le test *post hoc* montre que seule la valeur de F_M à 96h, diffère par rapport au témoin à 0h (Bonferroni t-test ; $dl = 5$; $P = 0,016$).

2.1.2 Evolution de l'efficacité du PSII et du Non-Photochemical Quenching

Les moyennes des rendements d'utilisation (Φ_{PSII}) et de dissipation thermique d'énergie (Φ_{NPQ}) encodées dans le tableau 11, sont calculées à partir des valeurs de fluorescence obtenues au 12^{ième} flash du fluorimètre continu (intensité pré-illuminatoire de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

Tabl. 11 – Evolution des rendements d'utilisation (Φ_{PSII}) et de dissipation thermique (Φ_{NPQ}) d'énergie au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. Φ_{PSII}	0,61 $\pm 0,08$	0,51 $\pm 0,07$	0,47 $\pm 0,10$	0,47 $\pm 0,06$	0,42 $\pm 0,08$	0,46 $\pm 0,11$
Moy. Φ_{NPQ}	0,33 $\pm 0,04$	0,25 $\pm 0,08$	0,32 $\pm 0,08$	0,29 $\pm 0,06$	0,33 $\pm 0,04$	0,32 $\pm 0,06$

L'analyse statistique de l'évolution de Φ_{NPQ} tout au long de l'application d'un stress lumineux, ne montre aucune variation significative (ANOVA 1 ; $dl = 5$; $P = 0,096$). Par contre, le même test réalisé sur les valeurs d'efficacité du PSII (Φ_{PSII}), présente une différence statistiquement significative entre les traitements (ANOVA 1 ; $dl = 5$; $P = 0,035$). La comparaison multiple montre que Φ_{PSII} à 168h diffère significativement par rapport au témoin (Bonferroni t-test ; $dl = 5$; $P = 0,009$; Fig. 19).

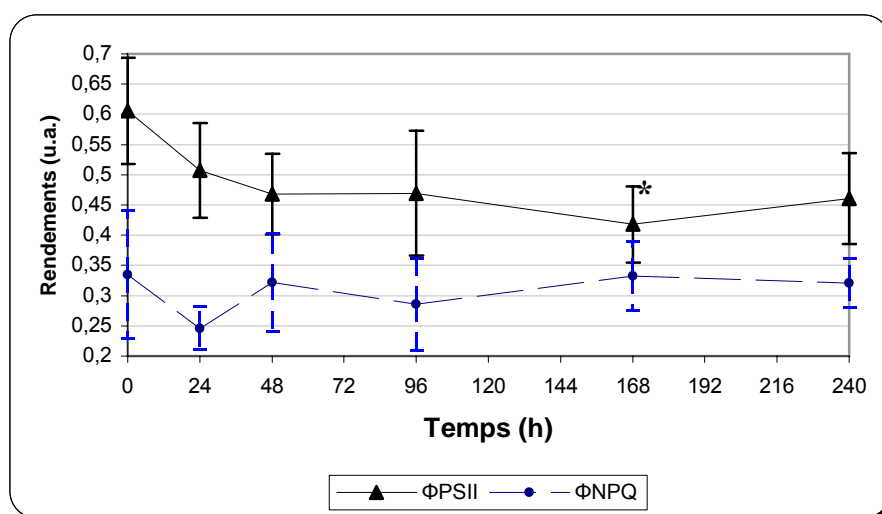


Fig. 19 - Evolution des rendements d'utilisation (Φ_{PSII}) et de dissipation thermique (Φ_{NPQ}) d'énergie au cours du temps sous une intensité lumineuse allant de 450 à 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

Alors que le rendement de dissipation thermique d'énergie via le NPQ reste stable au cours de l'expérience, le rendement d'utilisation par le photosystème II diminue. Par rapport au témoin, il y a une perte d'efficacité allant de 10 % pour les premières 24h et jusqu'à 15 – 20 % à partir de 168h.

2.1.3 Evolution du taux relatif de transport d'électrons

Les moyennes et les écart-types du taux relatif de transport d'électrons sont encodées dans le tableau 12. Elles sont calculées sur base des valeurs de fluorescence obtenues au 12^{ième} flash du protocole appliqué avec le fluorimètre continu.

Tabl. 12 – Evolution du taux relatif de transport d'électrons au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. rETR	72,20	77,02	64,06	75,56	70,44	70,92
	$\pm 10,84$	$\pm 8,26$	$\pm 8,28$	$\pm 2,78$	$\pm 9,09$	$\pm 11,22$

Le rETR reste relativement stable tout au long de l'expérience (Fig. 20). De plus, aucune valeur ne diffère significativement par rapport au témoin (Kruskal-Wallis à une voie ; dl = 5 ; P = 0,389).

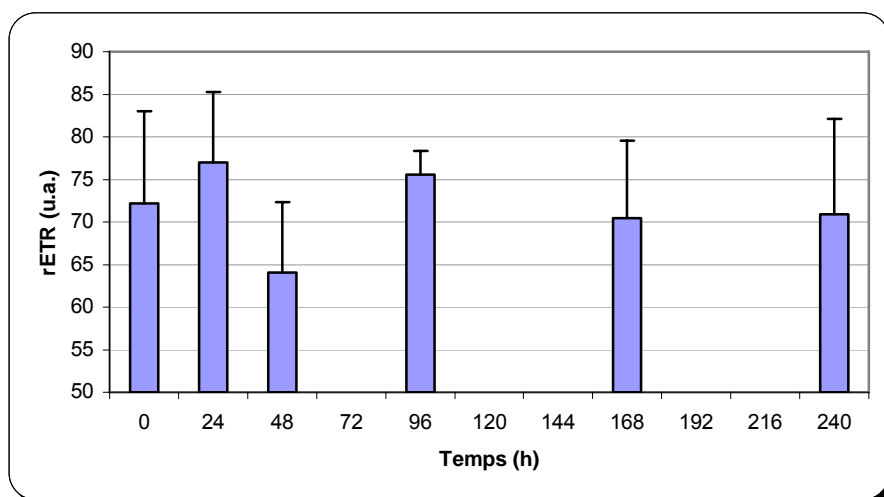


Fig. 20 - Evolution de rETR au cours du temps sous une intensité lumineuse allant de 450 à 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

2.1.4 Evolution de la courbe de montée de fluorescence

L'un des premiers résultats que donnent le fluorimètre continu est la montée initiale de fluorescence ou d'induction de fluorescence. Elle présente une courbe caractéristique (OJIP) comportant plusieurs phases délimitées par les points d'inflexion notés J et I. Sur base de la forme de celle-ci, on peut tirer des informations sur l'état physiologique de l'appareil photosynthétique des zooxanthelles (principalement sur le PSII). L'induction de fluorescence obtenue avec le 1^{er} flash du fluorimètre continu a été comparée entre les différents prélèvements (Fig. 21).

Le comparatif des courbes de montée de fluorescence normalisées semble montrer, que seul le point d'inflexion J à 2 ms varie grandement au cours de l'expérience. La fluorescence de J

augmente de ± 100 après 24h, encore de ± 70 après 48h et semble se stabiliser jusqu'à 96h. Ensuite jusqu'à 240h, elle diminue légèrement par rapport à son maxima mais reste néanmoins bien supérieure de ± 120 par rapport à 0h. Le tableau 13 reprend l'évolution de ses moyennes et leur écart-type, tout au long du stress lumineux.

Tabl. 13 – Comparaison des positions du point d'inflexion J de la courbe d'induction de fluorescence au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. J	564,62	658,30	730,64	726,88	693,44	681,09
	$\pm 81,08$	$\pm 70,55$	$\pm 47,58$	$\pm 42,82$	$\pm 90,38$	$\pm 69,20$

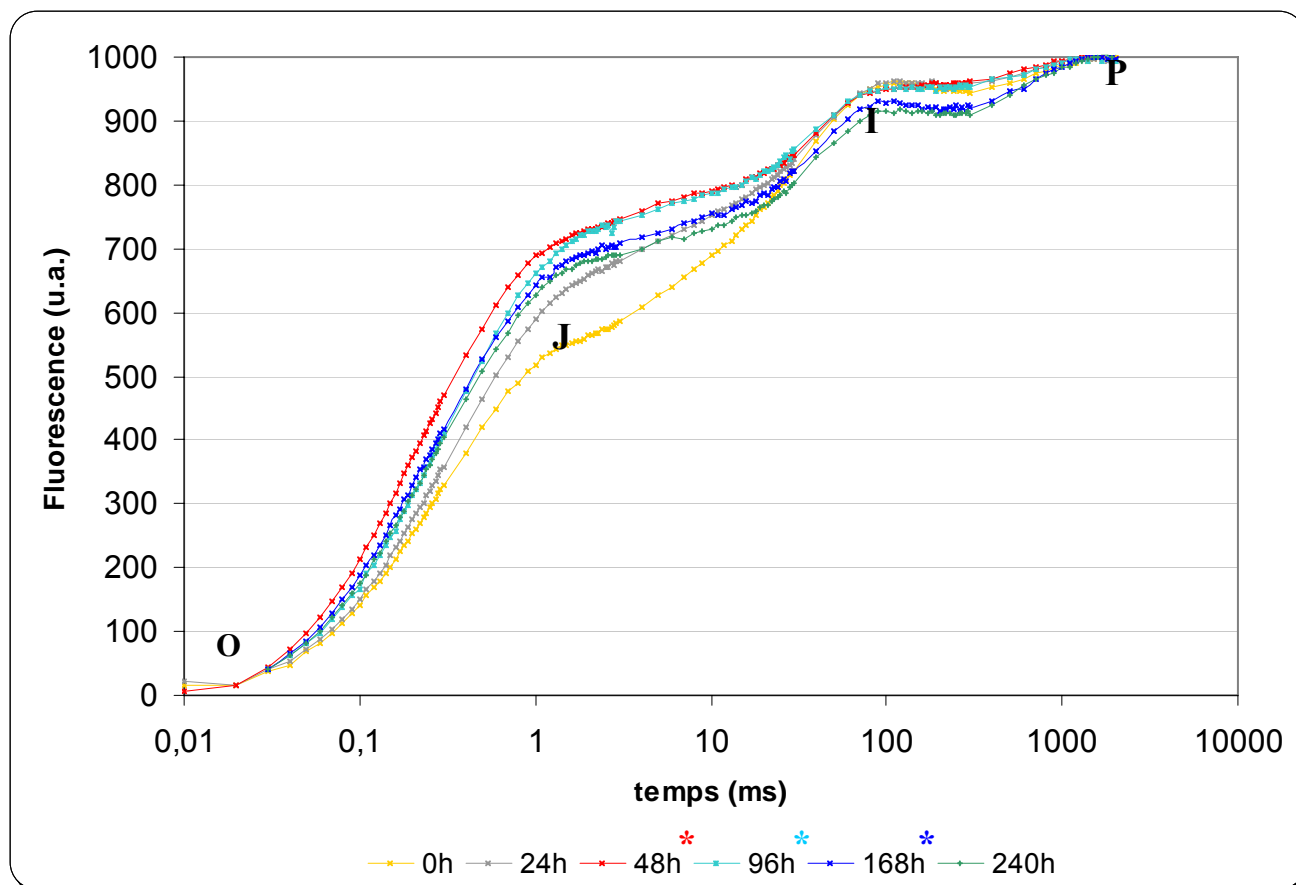


Fig. 21 – Comparatif des courbes d'induction de fluorescence normalisées, au cours du stress lumineux. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*) et les différents points d'inflexions (O ; J ; I ; P) sont indiqués.

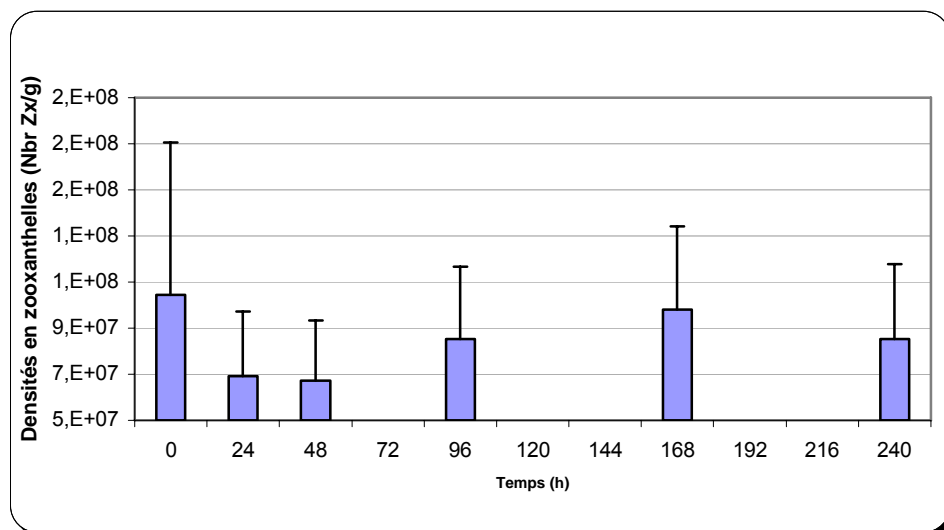
Suite à ces différentes constatations, l'analyse statistique de l'induction de fluorescence a uniquement porté sur les valeurs de fluorescence au point d'inflexion J à 2 millisecondes. L'analyse de variance à une voie montre une différence significative entre les différents traitements ($dl = 5$; $P = 0,010$). La comparaison multiple des traitements (Bonferroni) par rapport au contrôle montre que seul J, à 48h ($dl = 5$; $P = 0,004$), 96h ($dl = 5$; $P = 0,005$) et 168 h ($dl = 5$; $P = 0,035$), diffère significativement par rapport au début du stress (0h).

2.2 Densités en zooxanthelles

L'ensemble des densités en zooxanthelles au cours des 10 jours de stress lumineux est repris dans le tableau suivant (Tabl. 14) et illustrés dans la figure 22.

Tabl. 14 – Evolution de la densité en zooxanthelles au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

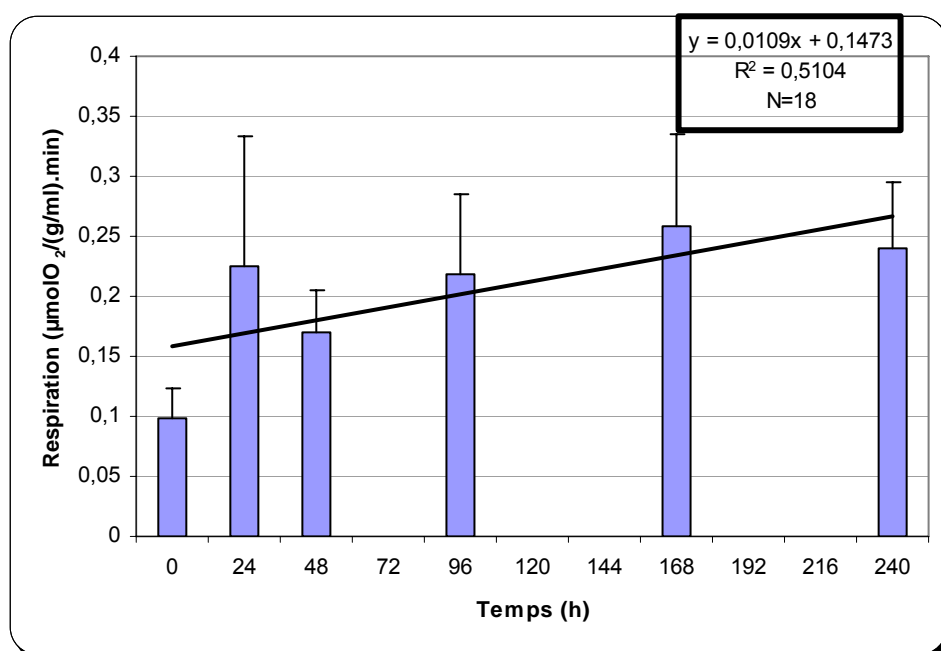
Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. Zx/gr	120,55.10 ⁶ \pm 82,47.10 ⁶	74,30.10 ⁶ \pm 32,23.10 ⁶	80,83.10 ⁶ \pm 23,77.10 ⁶	94,64.10 ⁶ \pm 29,87.10 ⁶	84,30.10 ⁶ \pm 20,53.10 ⁶	66,19.10 ⁶ \pm 22,03.10 ⁶

**Fig. 22 – Evolution des densités en zooxanthelles au cours du temps, au sein des *Aiptasia pallida* soumises à un stress lumineux allant de 450 à 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.**

Il n'y aucune différence statistiquement significative au niveau de la densité en zooxanthelles durant le stress lumineux (Kruskal-Wallis à une voie ; dl = 5 ; P = 0,462).

2.3 Mesure de la respiration

La respiration moyenne de l'holobionte, réalisée sur 3 individus à chacun des 6 prélèvements, est rapportée dans le tableau 15 et illustrée sur la figure suivante (Fig. 23).

**Fig. 23 – Evolution de la respiration d'*Aiptasia pallida* in toto au cours du stress lumineux ainsi que la courbe de tendance.**

Tabl. 15 – Evolution de la respiration des *A. pallida* au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. respi	-0,0983 \pm 0,0256	-0,2242 \pm 0,1091	-0,1704 \pm 0,0341	-0,2191 \pm 0,0657	-0,2584 \pm 0,0770	-0,2392 \pm 0,0555

L'analyse de la variance réalisée sur la respiration n'a pas montré de différence significative (ANOVA 1 ; dl = 5 ; $P = 0,113$). Néanmoins, lorsque l'on regarde la figure 23 et sa courbe de tendance, on voit une augmentation de la respiration au cours du temps. Le coefficient de corrélation de la courbe est significatif (intervalle de confiance 95%, $P > 0,4555$)

2.4 Analyse pigmentaire

Afin de connaître le contenu pigmentaire, les moitiés des anémones provenant de l'analyse de la fluorescence de la chl *a* ont été broyées et passées à l'HPLC. Une fois les pics de pigments obtenus, l'aire de ceux-ci est divisée par la densité en zooxanthelles de chaque échantillon. A l'exception d'un échantillon qui présentait des valeurs aberrantes (problème d'extraction), tous les autres résultats ont été analysés et la moyenne de ceux-ci est reprise dans le tableau 16. De plus, la chlorophylle *a*, ses stéréoisomères et ses produits de dégradation (phaeophytine) ont été additionnés afin d'obtenir la chl *a* totale. Il en est de même pour la peridinine et la cis-peridinine, ainsi que pour le pool de diadinoxanthine et diatoxanthine (Dd – Dt).

Tabl. 16 – Evolution du contenu pigmentaire des zooxanthelles (aire/densité Zx) au cours du stress lumineux (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Chl <i>c</i>	0,00392 \pm 0,00348	0,00327 \pm 0,00133	0,00333 \pm 0,00189	0,00135 \pm 0,00085	0,00128 \pm 0,00045	0,00101 \pm 0,00058
β -carotène	0,00030 \pm 0,00031	0,00021 \pm 0,00002	0,00015 \pm 0,00011	0,00015 \pm 0,00010	0,00008 \pm 0,00004	0,00009 \pm 0,00009
Perid. tot	0,01250 \pm 0,00628	0,00835 \pm 0,00188	0,00733 \pm 0,00366	0,00542 \pm 0,00326	0,00449 \pm 0,00184	0,00401 \pm 0,00263
Dd - Dt	0,00317 \pm 0,00232	0,00264 \pm 0,00062	0,00223 \pm 0,00127	0,00173 \pm 0,00096	0,00135 \pm 0,00055	0,00120 \pm 0,00086
Chl <i>a</i>	0,01123 \pm 0,00602	0,00767 \pm 0,00206	0,00592 \pm 0,00259	0,00482 \pm 0,00300	0,00390 \pm 0,00146	0,00363 \pm 0,00270

Comme on peut le voir sur la figure 24 et les courbes de tendances, la chl *a* et la peridinine contenues en quantités relativement équivalentes dans les zooxanthelles, diminuent tout au long du stress lumineux. En effet, la quantité de ces pigments diminue d'abord de moitié après 48h, puis plus lentement jusqu'à atteindre un tiers de la valeur initiale à 168 et 240h. La chl *c* et le pool Dd-Dt, présents en quantités bien inférieures par rapport aux deux premiers pigments, suivent à peu près la même tendance vers la fin de l'expérience. Ils atteignent également le tiers leur valeur initiale à 240h. Le β -carotène, par rapport aux autres pigments, est présent en très faible quantité dans les zooxanthelles (Fig. 25). Toutefois, il diminue de la même manière que la chl *a* et il atteint la moitié de sa valeur après 48h et le tiers après 168h.

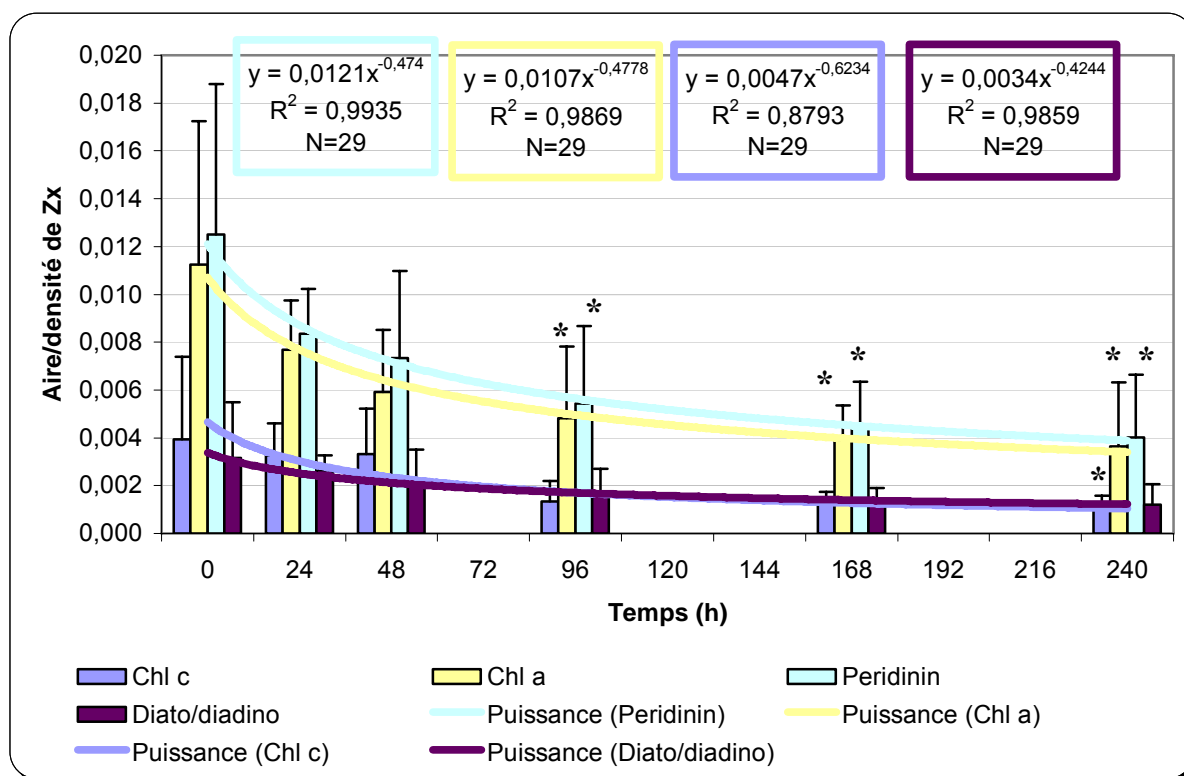


Fig. 24 – Evolution des pigments (excepté β -carotène) des zooxanthelles au cours du stress lumineux ainsi que les courbes de tendance des différents pigments. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

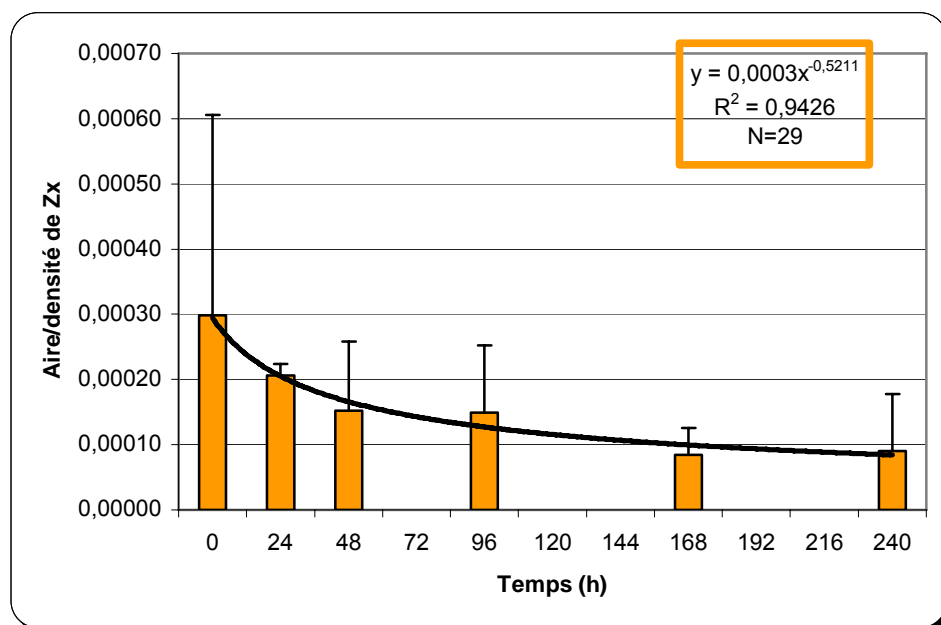


Fig. 25 – Evolution du β -carotène des zooxanthelles au cours du stress lumineux ainsi que sa courbe de tendance.

Au niveau statistique, il n'y a pas de différence significative au cours du stress pour le β -carotène et le pool Dd – Dt. Cela est probablement dû à la variabilité importante des échantillons témoins. Par contre, les valeurs des trois derniers pigments varient significativement durant les 10 jours d'expérience. Pour la peridinine (ANOVA 1 ; dl = 5 ; P = 0,013) et la chl a (ANOVA 1 ; dl = 5 ; P = 0,014), la comparaison multiple via le test de

Bonferroni montre que seules les valeurs à 96, 168 et 240h diffèrent significativement. Pour la peridinine : $dl = 5$; $P_{96} = 0,026$; $P_{168} = 0,010$; $P_{240} = 0,006$ et pour la chl *a* : $dl = 5$; $P_{96} = 0,028$; $P_{168} = 0,010$; $P_{240} = 0,007$. Le test de Kruskal-Wallis réalisé sur les données de chl *c* est également significatif ($dl = 5$; $P = 0,009$), mais seule la valeur à 240h est statistiquement différente de celle du contrôle (Dunn ; $dl = 5$; $P < 0,05$). L'ensemble des coefficients de corrélations des courbes de tendance sont significatifs ($P > 0,4487$; $\alpha = 0,05$).

2.5 Observations comportementales

Des notes sur le comportement des anémones ont été prises durant l'expérience. Les anémones, une fois soumises aux PAR du stress lumineux, se déplacent dans le pondoir vers la face opposée à la source lumineuse endéans les premières 24h. Lors du nettoyage des parois du pondoir, ce dernier a été retourné de manière à ce que les *A. pallida* soient soumises aux intensités lumineuses les plus élevées. Après 4h seulement, elles se sont à nouveau déplacées vers la face opposée. Tout au long de l'expérience, les couronnes tentaculaires ont toujours été orientées vers le spot halogène, mais la colonne n'a jamais été dilatée dans cette direction.

3. Mesures sur les anémones ayant subi un stress à l'obscurité

3.1 Fluorescence de la chl *a*

Pour réaliser le stress à l'obscurité, les *Aiptasia pallida* ont été placées dans un aquarium où percevaient des PAR allant de 0 à $1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Malheureusement, au moment du prélèvement à l'aquarium de Liège, le nombre d'individus disponibles était assez restreint. Nous avons donc dû diminuer le nombre d'individus à analyser et le ramener à 18 au lieu de 30. Comme pour le stress lumineux, la fluorescence de la chl *a* est mesurée sur 3 individus à 6 reprises (0h, 24h, 48h, 96h, 168h, 240h) et les nombreux résultats qui en découlent, sont calculés à partir des formules du tableau 1 (p18).

3.1.1 Evolution de la fluorescence minimale et maximale

L'évolution de la fluorescence minimale F_0 (1^{er} flash) et de la fluorescence maximale F_M (1^{er} flash) mesurées tout au long du stress à l'obscurité est reprise et illustrée dans le tableau (Tabl. 17) et le graphique suivants (Fig. 26).

Tabl. 17 – Evolution de la fluorescence minimale et maximale à l'obscurité (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. F_0 (F_S)	489,33 $\pm 77,80$	560,67 $\pm 293,42$	351,33 $\pm 42,44$	452,67 $\pm 49,90$	552,67 $\pm 132,79$	472,33 $\pm 147,52$
Moy. F_M ($F_{M'}$)	1273,00 $\pm 108,60$	1246,67 $\pm 524,78$	1225,33 $\pm 177,74$	1080,67 $\pm 270,04$	1217,33 $\pm 346,11$	1149,00 $\pm 154,24$

Les analyses de variance à une voie ne montrent aucune variation significative de F_0 et de F_M au cours de l'expérience ($dl = 5$; $P_{F_0} = 0,586$; $P_{F_M} = 0,969$). La figure 26, confirme également ces résultats, puisque visuellement, on voit très peu de variations de valeurs par rapport aux témoins.

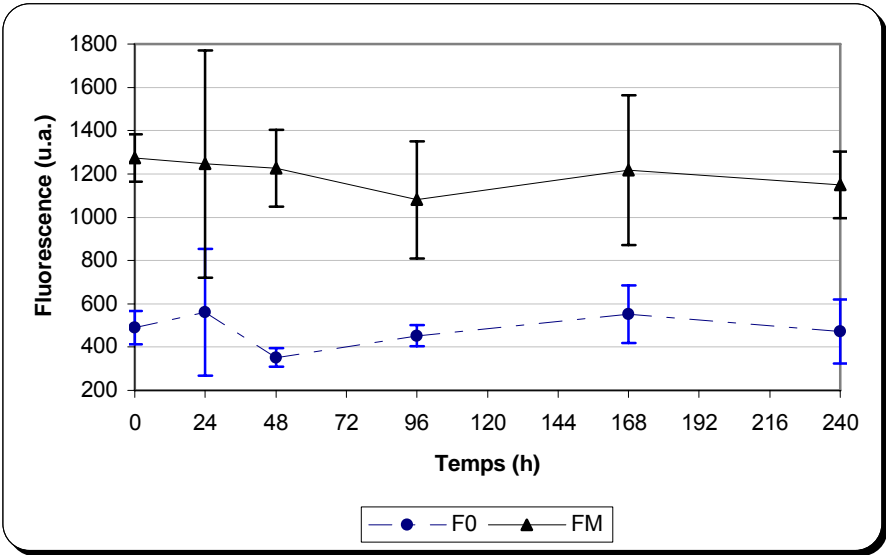


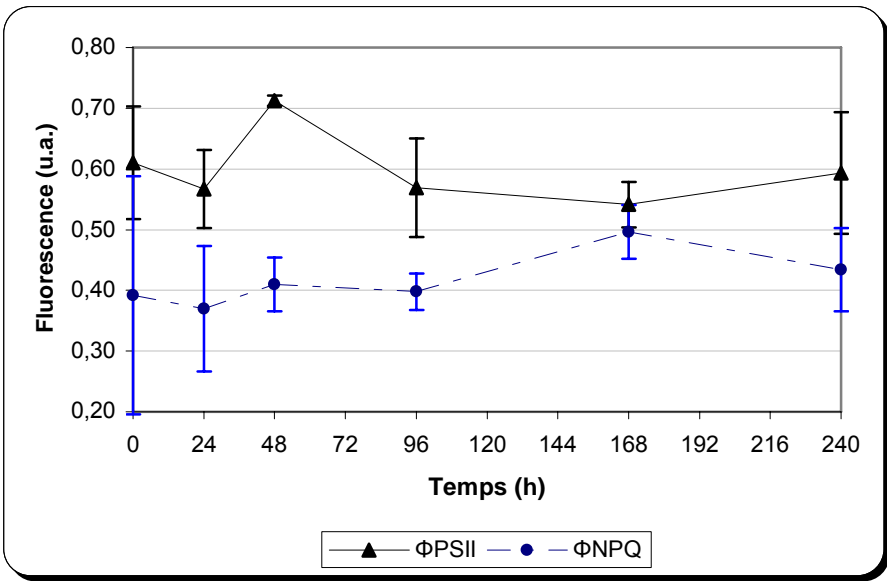
Fig. 26 – Evolution de la fluorescence minimale et maximale au cours du temps sous une intensité lumineuse allant de 0 à 1 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.1.2 Evolution de l’efficacité du PSII et du Non-Photochemical Quenching

Les moyennes des rendements d’utilisation (ΦPSII) et de dissipation thermique d’énergie (ΦNPQ) encodées dans le tableau 18, sont calculées à partir des valeurs de fluorescence obtenue au 12^{ième} flash du fluorimètre continu.

Tabl. 23 – Evolution des rendements d’utilisation (ΦPSII) et de dissipation thermique (ΦNPQ) d’énergie à l’obscurité (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. ΦPSII	0,61	0,57	0,71	0,57	0,54	0,59
	$\pm 0,09$	$\pm 0,06$	$\pm 0,01$	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$	$\pm 0,10$
Moy. ΦNPQ	0,39	0,37	0,41	0,40	0,50	0,43
	$\pm 0,20$	$\pm 0,10$	$\pm 0,04$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,07$



Graph. 27 - Evolution des rendements d’utilisation (ΦPSII) et de dissipation thermique (ΦNPQ) d’énergie au cours du temps sous une intensité lumineuse allant de 0 à 1 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Comme le montre la figure 27 et l'analyse statistique de l'évolution de ΦNPQ tout au long du stress à l'obscurité, aucune variation significative (ANOVA 1 ; dl = 5 ; $P = 0,699$) n'ont été observées. Il en est de même pour les valeurs d'efficacité du PSII (ANOVA 1 ; dl = 5 ; $P = 0,131$).

3.1.3 Evolution du taux relatif de transport d'électrons

Les moyennes et les écart-types du taux relatif de transport d'électrons sont encodés dans le tableau 24. Ils sont calculés sur base des valeurs de fluorescence obtenue au 12^{ième} flash du protocole appliqué avec le fluorimètre continu.

Tabl. 24 – Evolution du taux relatif de transport d'électrons à l'obscurité (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. rETR	84,08 $\pm 9,40$	75,10 $\pm 19,09$	90,53 $\pm 11,90$	69,52 $\pm 10,49$	46,86 $\pm 5,14$	59,08 $\pm 28,05$

Le rETR présente des résultats statistiques non significatifs (ANOVA 1 ; dl = 5 ; $P = 0,051$). Cependant, la tendance selon laquelle le rETR diminue au cours du temps est néanmoins observée (Fig. 28).

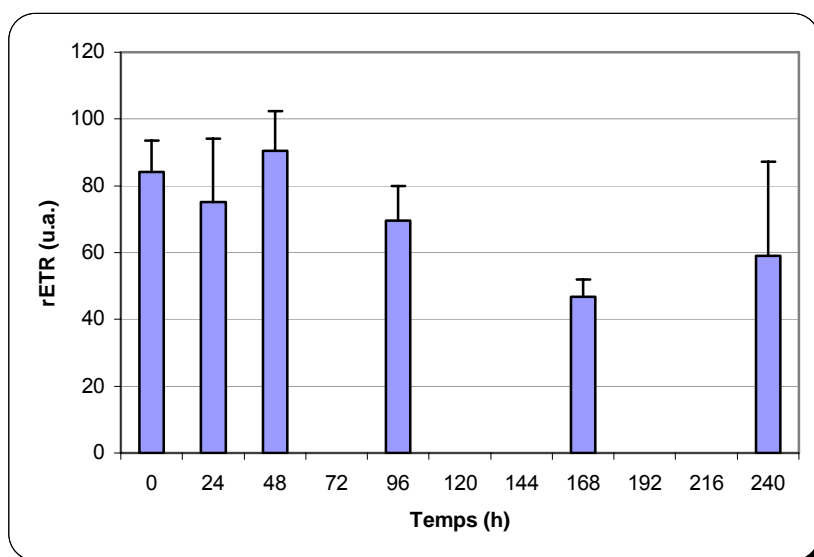


Fig. 28 - Evolution de rETR au cours du temps à l'obscurité (0 à 1 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.1.4 Evolution de la courbe de montée de fluorescence

Le comparatif des courbes de montée de fluorescence normalisées semble montrer, que seul le point d'inflexion J à 2 ms varie grandement au cours de l'expérience. La fluorescence de J diminue de ± 120 après 24h, encore de ± 45 après 48h et remonte à ± 465 à 96h où elle se stabilise jusqu'à 240h (Fig. 29). Le tableau 25 reprend l'évolution de ses moyennes et leur écart-type, tout au long du stress à l'obscurité.

Tabl. 25 – Comparaison des positions du point d'inflexion J de la courbe d'induction de fluorescence (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. J	539,58 $\pm 72,25$	416,64 $\pm 38,55$	368,36 $\pm 36,80$	473,24 $\pm 150,00$	469,31 $\pm 23,64$	460,22 $\pm 76,10$

Suite à ces différentes constatations, l'analyse statistique de l'induction de fluorescence s'est uniquement portée sur les valeurs de fluorescence au point d'inflexion J à 2 millisecondes. Un t de Student a été utilisé pour comparer J à 0h et 48h et il montre une différence statistiquement significative (dl = 5 ; P = 0,022).

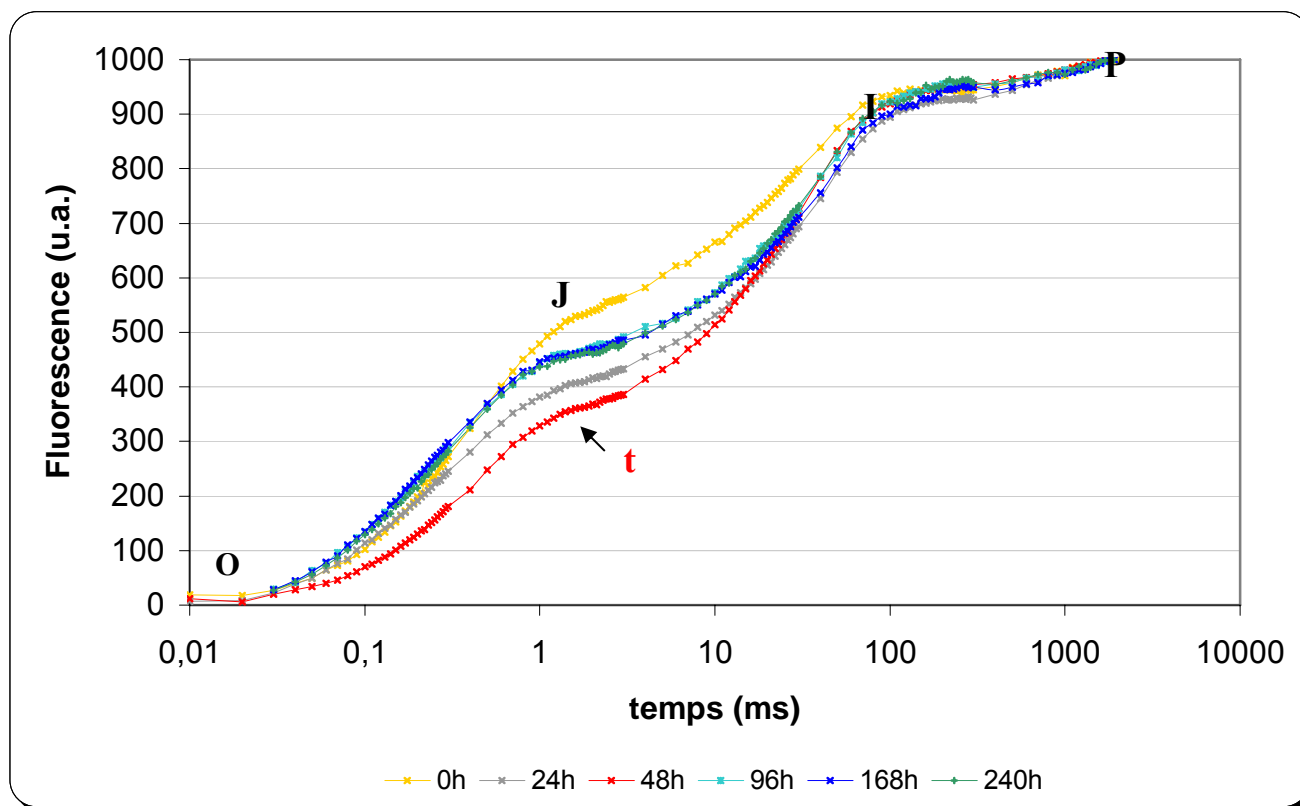


Fig. 29 – Comparatif des courbes d'induction de fluorescence normalisées, au cours du stress à l'obscurité. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (t) et les différents points d'inflexions (O ; J ; I ; P) sont indiqués.

3.2 Densités en zooxanthelles

La densité en zooxanthelles au sein des *Aiptasia pallida* est calculée au cours du temps, pendant les 10 jours d'exposition à l'obscurité. Elle est calculée après broyage, par comptage avec un hématocytomètre comme pour le stress lumineux. Les résultats issus des échantillons provenant de l'analyse de fluorescence sont repris dans le tableau suivant (Tabl. 26) et illustrés dans la figure 30.

Tabl. 26 – Evolution de la densité en zooxanthelles au du stress à l'obscurité (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. Zx/gr	$105,70.10^6$	$82,70.10^6$	$61,42.10^6$	$60,62.10^6$	$105,04.10^6$	$87,87.10^6$
	$\pm 11,75.10^6$	$\pm 34,32.10^6$	$\pm 15,33.10^6$	$\pm 31,60.10^6$	$\pm 42,00.10^6$	$\pm 53,77.10^6$

L'analyse de la variance à une voie réalisée sur les valeurs de densités en zooxanthelles ne montre pas de résultats statistiquement significatifs (dl = 5 ; P = 0,468), probablement en raison de la variabilité importante.

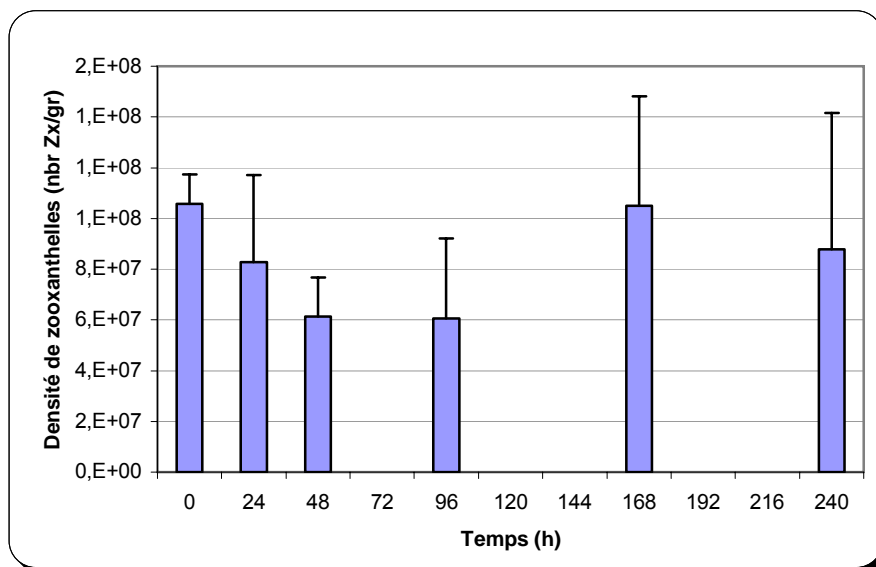


Fig. 30 – Evolution des densités en zooxanthelles au sein des *Aiptasia*

3.3 Mesures de la respiration

La respiration moyenne de l'holobionte est réalisée sur 3 individus, à chacun des 6 prélèvements, est rapportée dans le tableau 27 et illustrée sur le graphique suivant (Fig. 31).

Tabl. 27 – Evolution de la respiration des *Aiptasia p.* et des zooxanthelles à l'obscurité (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
Moy. respi	-0,1277	-0,2481	-0,1394	-0,2535	-0,4371	-0,3008
	$\pm 0,0491$	$\pm 0,1581$	$\pm 0,0285$	$\pm 0,0690$	$\pm 0,1603$	$\pm 0,1257$

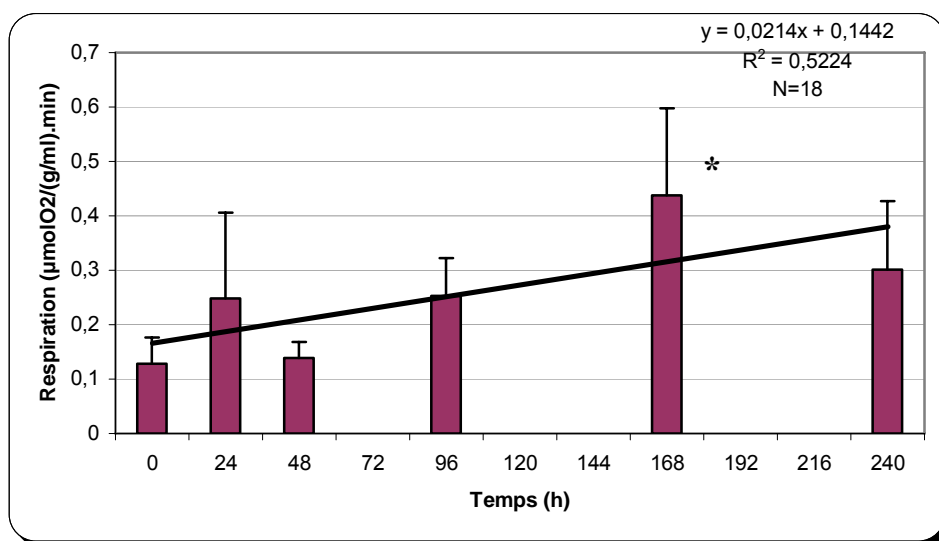


Fig. 31 – Evolution de la respiration d'*Aiptasia pallida in toto* au cours du stress à l'obscurité ainsi que la courbe de tendance et sa formule. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

Les tests statistiques ont donné un résultat significatif (ANOVA 1 ; dl = 5 ; $P = 0,049$). La comparaison multiple par le test de Bonferroni montre que seule la respiration à 168h diffère significativement par rapport aux témoins (dl = 5 ; $P = 0,026$). Enfin, lorsque l'on regarde le graphique (Fig. 31) et sa courbe de tendance, on voit clairement une augmentation de la respiration au cours du temps. Le coefficient de corrélation de cette courbe est significatif ($P > 0,4555$; $\alpha = 0,05$).

3.4 Analyse pigmentaire

Afin de connaître le contenu pigmentaire, les moitiés des anémones provenant de l'analyse de la fluorescence de la chl *a* ont été broyées et passées à l'HPLC, comme pour le stress lumineux. Une fois les pics de pigments obtenus, l'aire de ceux-ci est divisée par la densité de zooxanthelles de chaque échantillon. Tous les résultats ont été analysés et la moyenne de ceux-ci est reprise dans le tableau 28. De plus, la chlorophylle *a*, ses stéréoisomères et ses produits de dégradation (phaeophytine) ont été additionnés sommés afin d'obtenir la chl *a* totale, il en est de même pour la peridinine et la cis-peridinine, ainsi que pour le pool de diadinoxanthine et diatoxanthine (Dd – Dt).

Tabl. 28 – Evolution du contenu pigmentaire des zooxanthelles (aire/densité Zx) à l'obscurité (moyenne \pm écart-type)

Temps	0h	24h	48h	96h	168h	240h
chl <i>c</i>	0,01790 $\pm 0,01187$	0,00366 $\pm 0,00108$	0,01137 $\pm 0,00189$	0,00135 $\pm 0,00701$	0,00308 $\pm 0,00051$	0,00117 $\pm 0,00038$
β -carotène	0,00208 $\pm 0,00176$	0,00068 $\pm 0,00023$	0,00015 $\pm 0,00011$	0,00124 $\pm 0,00052$	0,00060 $\pm 0,00008$	0,00063 $\pm 0,00023$
Perid. tot	0,04543 $\pm 0,03126$	0,01553 $\pm 0,00316$	0,02685 $\pm 0,01217$	0,01596 $\pm 0,00105$	0,01518 $\pm 0,00242$	0,00696 $\pm 0,00227$
Dd - Dt	0,01452 $\pm 0,01051$	0,00508 $\pm 0,00114$	0,00906 $\pm 0,00411$	0,00510 $\pm 0,00005$	0,00476 $\pm 0,00104$	0,00217 $\pm 0,00068$
chl <i>a</i>	0,04044 $\pm 0,02671$	0,01548 $\pm 0,00222$	0,02806 $\pm 0,01230$	0,01638 $\pm 0,00015$	0,01560 $\pm 0,00317$	0,00695 $\pm 0,00203$

Comme on peut le voir sur le graphique (Fig. 32) et les courbes de tendances, la chl *a* et la peridinine contenues en quantités relativement équivalentes dans les zooxanthelles, diminuent tout au long du stress à l'obscurité. En effet, la quantité de ces pigments diminue d'abord de moitié après 24h, puis plus lentement jusqu'à atteindre un quart de la valeur initiale à 240h.

La chl *c*, présente en quantité bien inférieure par rapport aux deux premiers pigments, suit la même tendance tout au long de l'expérience. Elle atteint également un quart de sa valeur initiale à 240h. Les deux pigments impliqués dans le non-photochemical quenching, à savoir la diadinoxanthine (Dd) et la diatoxanthine (Dt), diminuent également au cours du stress mais de manière moins marquée. La quantité du pool de Dd-Dt, présente dans les individus témoins, est divisée par quatre après 240h.

Le β -carotène, par rapport aux autres pigments, est présent en très faible quantité dans les zooxanthelles (Fig. 33). Mais il diminue franchement après 240h puisque la quantité atteint le dixième de la mesurée sur les témoins.

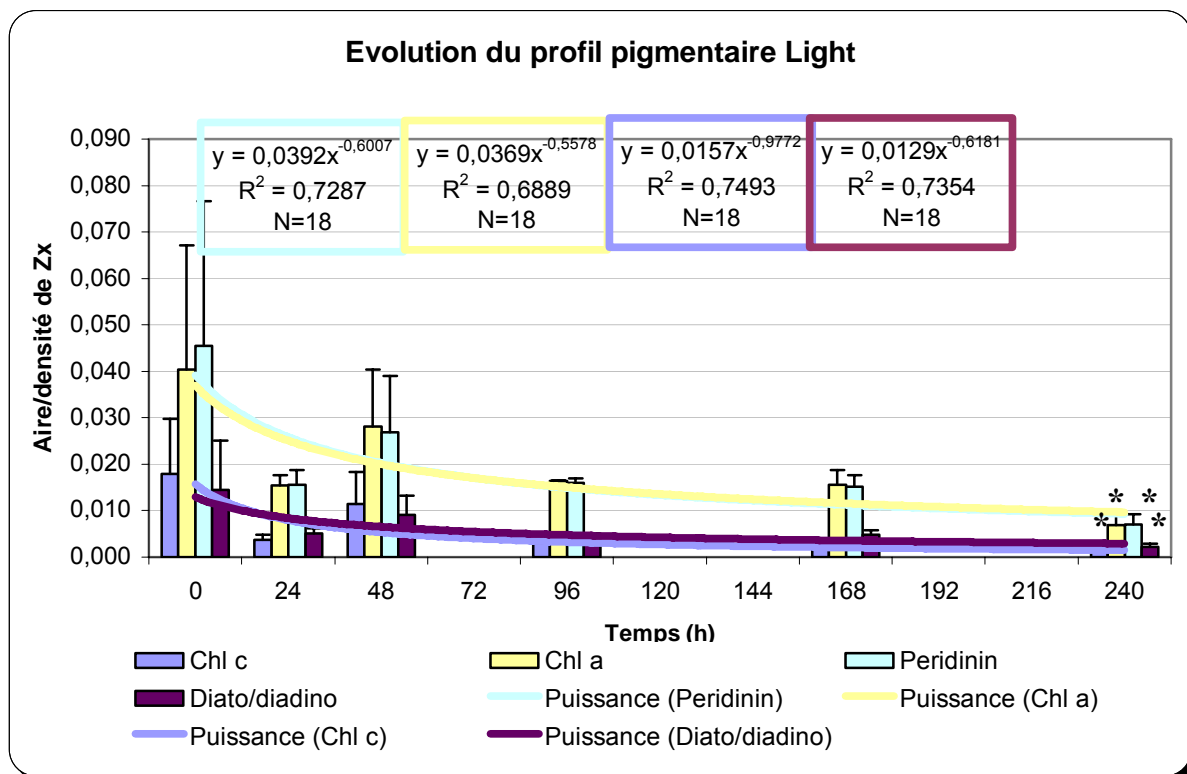


Fig. 32 – Evolution de la quantité des pigments (excepté β -carotène) des zooxanthelles au cours du stress à l'obscurité ainsi que les courbes de tendance des différents pigments. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

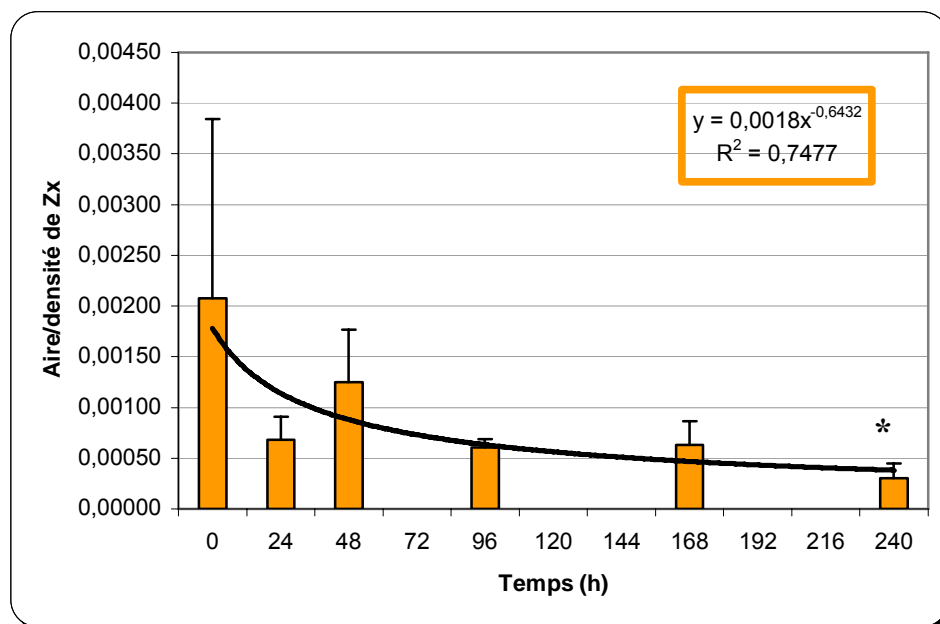


Fig. 33 – Evolution du β -carotène des zooxanthelles au cours du stress lumineux ainsi que sa courbes de tendance. Les différences significatives par rapport aux témoins sont notées (*).

La quantité de tous les pigments diffère significativement au cours du stress (Tabl. 29). La comparaison multiple via la méthode de Dunn montre que seules les valeurs à 240h diffèrent significativement par rapport aux témoins (pour tous les pigments ; $dl = 5$; $P < 0,05$). Quant

aux courbes de tendance, l'ensemble des coefficients de corrélation sont significatifs avec un intervalle de confiance de 99% ($P > 0,4487$).

**Tabl. 29 – Résultats pigmentaires significatifs (Kruskal-Wallis)
du stress à l'obscurité**

Pigments	dl	P value
Chl <i>c</i>	5	0,022
β -carotène	5	0,036
Chl <i>a</i>	5	0,043
Peridinin	5	0,042
Dd-Dt	5	0,044

3.5 Résultats des observations comportementales

Les anémones une fois soumises aux stress à l'obscurité, se déplacent dans le pondoir jusqu'à atteindre l'interface air-eau dès les premières 24h. De plus, elles étendent leur colonne en direction de la surface.



Discussion

1. Photophysiology des anémones « témoin »

1.1 Fluorescence de la Chl *a*

1.1.1 Fluorescence maximale et rendement de dissipation thermique

Au cours de l'analyse de fluorescence de la Chl *a*, une diminution de la fluorescence maximale est observée parallèlement à l'augmentation de l'intensité lumineuse. Celle-ci illustre tout simplement la mise en place d'une extinction non photochimique (NPQ). En effet, les calculs de rendements de la dissipation thermique (ϕNPQ) réalisés sur la population d'anémones « témoin », montrent que ϕNPQ prend des proportions de plus en plus importantes avec l'intensité pré-illuminatoire. Dans notre cas, à 400 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, pour 10 photons absorbés par le photosystème II, 3 sont dissipés, majoritairement par le cycle des xanthophylles (dé-époxydation de la diadinoxanthine en diatoxanthine).

Cette mise en place de l'extinction non photochimique s'explique par le fait qu'avec l'augmentation d'intensité lumineuse, de plus en plus de PSII ouverts se ferment. Cela a pour conséquence de diminuer la proportion de Q_A susceptible d'accepter un électron. Dans de telles conditions, l'énergie lumineuse au niveau des antennes du PSII est en excès par rapport à ce qui peut être assimilé par le cycle de Calvin. Par conséquent, celle-ci sera dissipée sous forme de chaleur par l'extinction non photochimique.

Nos résultats coïncident avec les résultats de plusieurs études ([Brown *et al.*, \(1999\)](#) ; [Warner and berry-Lowe, 2006](#)) selon lesquelles, le ratio des xanthophylles (constituant principal du NPQ) augmente parallèlement à l'intensité lumineuse et la diminution journalière de l'efficacité photochimique des zooxanthelles de nombreux madrépores. Par ailleurs, le ϕNPQ ($(F_s/F_m') - (F_s/F_m)$) dans ce travail n'est pas calculé de la même manière que le NPQ dans la littérature sur les coraux ($F_m - F_m'/F_m'$). Afin de rendre toute comparaison possible, nous avons calculé ce dernier : en moyenne il est égal à $0,73 \pm 0,36$. Nos valeurs confirment tout à fait celles obtenues par [Warner et Berry-Lowe \(2006\)](#), où le NPQ est compris entre 0,5 et 0,8. Il en est de même pour le travail de [Robinson et Warner \(2006\)](#) où le NPQ de 4 clades de zooxanthelles est compris entre 0,6 et 0,8 à 600 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$.

1.1.3 Vitesse relative du transport d'électrons

Pour rappel, la vitesse relative du transport d'électrons (rETR) est égale au produit de l'efficacité photochimique du PSII et de la lumière incidente. Il ne s'agit pas ici d'une valeur absolue, mais d'une valeur relative, directement proportionnelle à la vitesse de transport d'électrons. Nos résultats montrent que rETR augmente de manière linéaire avec l'augmentation d'intensité lumineuse jusqu'à atteindre un plateau à 400 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Cela démontre deux choses, d'une part que le rendement photochimique dans nos conditions d'acclimatation est maximal, d'autre part, que la saturation de la chaîne de transport d'électrons est maximale à 400 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Elle ne pourra pas fonctionner plus vite ! Par conséquent, les intensités lumineuses supérieures à 400 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ conduiront à un excès d'énergie pouvant être important, au niveau des PSII. L'effet que peut avoir cet excès sera discuté plus loin. Les valeurs de rETR obtenues par [Hoegh-Guldberg et Jones \(1999\)](#) sur les dinoflagellés de *Porites cylindrica*, corroborent les nôtres. En effet, à 400 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, elles sont respectivement égales à ± 100 et 98 ± 20 .

1.1.2 Efficacité photochimique du PSII

De manière générale, au cours du protocole lumineux appliqué avec le PEA, la population de PSII comporte deux sous-populations : une sous-population de PSII ouverts et une sous-population de PSII fermés. En augmentant l'intensité lumineuse, le nombre de PSII (ouverts) possédant une Q_A oxydée diminue. Parallèlement, la population de PSII fermés augmente et l'efficacité photochimique du PSII diminue. Nos résultats confirment cette hypothèse, puisqu'ils montrent que l'efficacité photochimique du PSII est d'environ 0,60 au départ et qu'elle diminue ensuite progressivement jusqu'à atteindre 0,30 à 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Par ailleurs, nos valeurs de ϕPSII de départ ($0,61 \pm 0,11$) sont similaires à celles de nombreux travaux réalisés sur les madrépores (Tabl. 30 ; Salih *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1999 ; Ralph *et al.*, 2002 ; Bhagooli and Hidaka, 2003 ; Robinson and Warner, 2006 ; Warner and Berry-Lowe, 2006). Enfin, la tendance qu'a ϕPSII à diminuer en fonction de l'augmentation de l'intensité lumineuse, a largement été démontrée dans la littérature. Nos résultats vont dans le sens de ce qui a été décrit comme un phénomène de photoinactivation journalier des coraux. En effet, Brown et ses collègues (1999) ont observé une diminution journalière de l'efficacité photochimique des zooxanthelles sur sept espèces de madrépores. Celle-ci diminue jusqu'à atteindre son minimum (0,3) entre midi et le début de l'après midi, lorsque les intensités lumineuses sont les plus importantes. Ensuite, elle remonte progressivement avec la diminution de l'intensité lumineuse, jusqu'à atteindre son niveau de départ à la tombée de la nuit. Cette photoinactivation aux heures de fortes intensités lumineuses, pourrait alors induire la production de grandes quantités de ROS qui auraient des effets délétères sur les différents constituants algaux et hôtes.

Tabl. 30 – Valeur de ϕPSII chez les zooxanthelles en cultures et de différentes espèces de madrépores

	ϕPSII (u.a.)	Espèces
Salih <i>et al.</i> , 1998	Entre 0,50 et 0,60	<i>Pocillopora damicornis</i>
Brown <i>et al.</i> , 1999	Entre 0,50 et 0,55	<i>Goniastrea aspera</i>
Ralph <i>et al.</i> , 2002	Entre 0,50 et 0,60	<i>Pocillopora damicornis</i>
Bhagooli and Hidaka, 2003	Entre 0,40 et 0,65	<i>P. contigua</i> , <i>P. ryukyuensis</i> , <i>S. pistillata</i> , <i>G. fascicularis</i>
Robinson and Warner, 2006	Entre 0,55 et 0,65	<i>Symbiodinium</i> sp., (F2, A1, B1, A1.1)
Warner and Berry-Lowe, 2006	Entre 0,55 et 0,65	<i>M. faveolata</i> , <i>M. annularis</i> , <i>A. cervicornis</i>
Warner <i>et al.</i> , 2006	Entre 0,50 et 0,70	<i>M. faveolata</i> , <i>M. annularis</i> , <i>M. cavernosa</i> , <i>P. astroides</i> ,...

1.2 Densités en zooxanthelles

Il est difficile de comparer les densités en zooxanthelles obtenue dans ce mémoire avec celles obtenues chez les madrépores. En effet, l'expression des densités d'endosymbiontes photosynthétiques chez les coraux est généralement exprimée en nombre de zooxanthelles par centimètre carré. Cela est dû à la présence de l'exosquelette qui compterait pour beaucoup dans la masse des échantillons. De plus, il est extrêmement difficile d'extraire quantitativement l'ensemble du tissu. Afin de permettre la comparaison, la surface d'une anémone de 0,2 g a été calculée. La colonne a été considérée comme un cylindre et les tentacules comme des cônes. La surface totale de cet individu de taille moyenne est donc de

12 cm². Les comptages réalisés dans ce travail montrent qu'il y a environ 1,2 millions de zooxanthelles par anémone ce qui représente 120 millions de zooxanthelles par gramme d'individu. Lorsqu'on exprime les densités en zooxanthelles en fonction de la surface, on obtient $\pm 500.000 \text{ zx/cm}^2$. Dans la littérature, cette valeur est, suivant les espèces hôtes, deux à quatre fois plus importante (Tabl. 31). Cette différence pourrait être due aux antécédents des anémones avant prélèvement. En effet, un stress avant prélèvement (ou lors du prélèvement) aurait pour effet de diminuer les densités en zooxanthelles et la population initiale ne pourrait pas être rétablie dans un aussi court laps de temps.

Tabl. 31 – Densités en zooxanthelles chez les organismes hermatypiques

Espèce	Densités en zx	Unités	
<i>Porites caribaoerum</i>	4.36 ± 0.29	$\text{polyp}^{-1} \times 10^6$	Lesser <i>et al.</i> , 1990
<i>Porites caribaoerum</i>	$4.59 \pm 1,08$	$\text{polyp}^{-1} \times 10^6$	Lesser <i>et al.</i> , 1990
<i>Tridacna gigas (mollusque)</i>	19.8 ± 0.8	$\times 10^7 \cdot \text{cm}^{-2}$	Buck <i>et al.</i> , 2002
<i>Goniastrea aspera</i>	0.54 ± 0.08	$\times 10^7 \cdot \text{cm}^{-2}$	Brown <i>et al.</i> , 2002
<i>Goniastrea aspera</i>	0.54 ± 0.08	$\times 10^7 \cdot \text{cm}^{-2}$	Brown <i>et al.</i> , 2002
<i>Montastrea annularis</i>	3 à 4	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Warner <i>et al.</i> , 2002
<i>Plexaura kuna (octocoralliaire)</i>	$2,11 \pm 0,05$	$\text{cm} \times 10^6$	Lasker, 2003
	2,5	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Lasker, 2003
<i>Montastrea franksi</i>	$2 \pm 0,5$	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Porites porites</i>	1	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Porites astroides</i>	$1,5 \pm \pm 0,25$	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Favia fragum</i>	$2,6 \pm 0,5$	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Montastrea cavernosa</i>	$1,8 \pm 0,1$	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Stilophora pistillata</i>	$2,5 \pm 0,5$	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Franklin <i>et al.</i> , 2006
<i>Pocillopora damicornis</i>	1.36 ± 0.06	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Hill and Ralph, 2006
<i>Acropora nobilis</i>	2.25 ± 0.55	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Hill and Ralph, 2006
<i>Cyphastrea serailia</i>	4.74 ± 0.63	$\text{cm}^{-2} \times 10^6$	Hill and Ralph, 2006

Nos résultats montrent également que, plus la taille des anémones est grande, plus la densité en *Symbiodinium* diminue. Cela pourrait être dû au fait que les zooxanthelles sont principalement situées au niveau de la couronne tentaculaire (Ladrière, 2006 ; Baudesson, 2007). Or, les parties de l'animal intervenant le plus dans le calcul de sa masse sont la colonne et le pied et ceux-ci ne contiennent que peu de symbiontes. Suite à cette constatation, lorsque un animal grossit, la taille de l'ensemble pied-colonne augmente grandement par rapport à celle de la couronne tentaculaire. Donc le nombre absolu de zooxanthelles pourraient augmenter légèrement avec la taille des *Aiptasia pallida* mais le rapport réalisé sur la masse de celle-ci masque cette augmentation.

1.3 Concentration pigmentaire

Sur base des résultats HPLC, chez *Aiptasia pallida*, la concentration en chl *a* totale est de $6,62 \pm 1,48 \text{ pg/zx}$, de $2,08 \pm 0,45 \text{ pg/zx}$ pour la chl *c* et enfin, de $0,16 \pm 0,04 \text{ pg/zx}$ pour le β -carotène. Excepté pour le β -carotène, pour lequel, à ma connaissance il n'y a aucune valeur dans la littérature, les concentrations en chl *a* et en chl *c* par zooxanthelles sont du même ordre de grandeur que celle obtenue chez de nombreuses espèces de madrépores (Tabl. 32).

Tabl. 32 – Concentration en chl a et chl c dans les zooxanthelles de scléractiniaires (pg/zx)

Espèce	chl a	chl c	
<i>Porites caribaoerum</i>	3.23 ± 2,03	1,34 ± 0,80	Lesser <i>et al.</i> , 1990
<i>Montastrea franksi</i>	3 ± 0,5	1 ± 0,1	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Porites porites</i>	4,5 ± 1	1,4 ± 0,3	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Porites astroides</i>	3 ± 0,5	0,8 ± 0,2	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Favia fragum</i>	4 ± 1	0,6 ± 0,2	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Montastrea cavernosa</i>	7 ± 1	2 ± 0,5	Venn <i>et al.</i> , 2006
<i>Montastrea franksi</i>	5 et 9 (profondeur)		Savage <i>et al.</i> , 2002

2. Effets d'un stress lumineux sur *Aiptasia pallida*

2.1 Fluorescence de la Chl a

2.1.1 rETR et ϕ NPQ

La vitesse relative du transport d'électrons (rETR) de même que le NPQ, semblent ne pas varier au cours du stress par rapport au contrôle. Cela indique que ce qui limite rETR à l'intensité saturante ($12^{\text{ième}}$ flash) n'est pas la proportion de PSII actif, mais la vitesse à laquelle peut fonctionner le cycle de Calvin (phase sombre de la photosynthèse). Nos valeurs n'ont que peu changé par rapport celles de la population d'*Aiptasia pallida* « témoin » (ϕ NPQ = $\pm 0,33$; NPQ = $\pm 0,63$; rETR = ± 73). Donc, pour ϕ NPQ, elles confirment toujours celles obtenues par Warner et Berry-Lowe (2006), ($0,5 < \text{NPQ} < 0,8$) et celles du travail de Robinson et Warner (2006) où le NPQ de 4 clades de zooxanthelles est compris entre 0,6 et 0,8 à 600 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Quant à nos valeurs de rETR, elles corroborent les résultats précédemment obtenus par Ulstrup *et al.*, (2006), pour lesquels, le rETR des polypes de *Pocillopora damicornis* est égal à 77 ± 13 .

2.1.2 Efficacité photochimique du PSII

L'efficacité photochimique du photosystème II, pour rappel nous donne des informations sur la capacité qu'ont les PSII à transformer l'énergie lumineuse en énergie photochimique. Au cours de l'expérience de stress lumineux, cette capacité diminue avec le temps d'exposition. Ce résultat ne peut être expliqué que par une photoinhibition partielle des PSII localisés dans la membrane thylakoïdienne des zooxanthelles. Après 168h de stress à 450-600 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, 25 % des PSII ne sont plus fonctionnels.

Des mesures équivalentes ont été réalisées sur cinq espèces de scléractiniaires et les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur que les nôtres (0,6 – 0,5 à 170 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ et 0,5 – 0,2 à 1000 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$; Bhagooli et Hidaka, 2003). De plus, Bhagooli et Hidaka (2004) montrent une photoinhibition réversible chez *Stylophora pistillata* et *Platygyra ryukyuensis*, exposés à 520 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ et à 26°C et à 1015 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (ϕ PSII diminue de 20 à 40% par rapport au contrôle). Cela suggère que la photoinhibition partielle, que nous observons lors de notre expérience, pourrait être réversible. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait, après le stress, remettre les individus en acclimatation et mesurer à nouveau ϕ PSII. Si le temps nécessaire à ce dernier pour atteindre sa valeur initiale est relativement court (endéant les 30h), il s'agira d'une photoinhibition dynamique. Si non, il s'agirait d'une photoinhibition chronique où la protéine D1 du PSII est totalement dégradée (Gorbunov *et al.*, 2001).

2.1.3 Courbes d'induction de fluorescence

Dans la nature, il existe deux types de population de PSII qui résultent d'une différence dans la capacité, du côté accepteur, à accepter un électron (hétérogénéité du côté réducteur). Cette dernière fait référence aux côtés réducteurs du RC du PSII qui montrent des variations au niveau du flux d'électrons allant du centre réactionnel vers les plastoquinones secondaires. Les PSII avec RC actif, au sein desquels l'accepteur primaire d'électrons réduit (Q_A^-) est réoxydé par l'accepteur secondaire d'électron Q_B , sont appelés *Q_B reducing center* (PSII_A). Inversement, les PSII à RC inactifs, dans lesquels Q_A^- est réoxydé 1000 fois plus lentement sont appelés *Q_B non-reducing center* (PSII_x ; Chylla et al., 1987 ; Melis, 1991).

Les valeurs de J augmentent significativement après 48h et restent relativement stables jusqu'à 240h. On peut déjà constater que la réponse au stress lumineux est très rapide (après 24h elle est presque maximale). Or, cette augmentation relative du point J dans les courbes de montée de fluorescence peut être attribuée à l'augmentation de la proportion de *Q_B non-reducing*, dans lesquels Q_B est incapable d'oxyder Q_A (Strasser et al., 2000). Cela a pour conséquence d'inactiver et donc de diminuer les capacités de transfert d'électrons au-delà de Q_A . Cette tendance confirme celle obtenue par Hill et Ralph (2006) sur trois espèces de scléractiniaires.

Des travaux réalisés par Warner et ses collègues (1999) montrent que la protéine D1 sur laquelle est localisé Q_B , est endommagée durant un blanchiment corallien. Dans ces conditions, les capacités fonctionnelles de Q_B sont alors compromises et son aptitude à accepter des électrons de Q_A (localisé sur la protéine D2 du RC) et à les transmettre au reste de la chaîne de transport d'électron est réduite (Guenther and Melis, 1990 ; Dau, 1994). Par conséquent, les dommages lumineux au niveau de la protéine D1 sont probablement liés à un processus dépendant de l'augmentation en PSII Q_B non-reducing (Hill and Ralph, 2006). Et donc cette augmentation pourrait être une étape conduisant au blanchiment par stress oxydatif (via la photoinhibition).

2.2 Respiration des *Aiptasia pallida* et leurs zooxanthelles

Bien qu'aucun résultat significatif n'ait été mis en évidence sur les mesures de respiration, vraisemblablement en raison d'un échantillonnage trop faible, la tendance à l'augmentation de la respiration.

Le stress lumineux auquel sont soumis les *Aiptasia pallida* a pour effet d'apporter des photons en excès par rapport à ce qui peut être utilisé pour l'assimilation du CO_2 , l'état rédox du pool de plastoquinones est alors « surréduit ». Par conséquent, la séparation des charges ne peut plus être complète et conduit au phénomène de photoinhibition (Hideg et al., 2002). Dans de telles conditions, l'accumulation d'énergie d'excitation au niveau des antennes et du RC du PSII, favorise la production de chlorophylles excitées à l'état triplet (3Chl). Celles-ci peuvent ensuite interagir avec l'oxygène et former des ROS par transfert d'énergie ou par des réactions de transfert d'électrons. Ces composés hautement réactifs peuvent entre autre déstabiliser la membrane des thylakoïde par peroxydation lipidique (Asada, 1996) et entraver le système de renouvellement de la protéine D1 du RC du PSII (Nishiyama et al., 2004).

Etant donné la mise en évidence du phénomène de photoinhibition partielle par la mesure de la fluorescence de la Chl *a* de même que la désorganisation importante des thylakoïdes visualisée au microscope électronique à transmission par Charlotte Baudesson (2007), on peut grandement supposer que les zooxanthelles des *Aiptasia pallida*, soumises à une luminosité importante, subissent un stress oxydatif. Il est également intéressant de souligner que même

sans le phénomène de photoinhibition, les *Aiptasia pallida* peuvent subir un stress oxydatif lors du stress lumineux (450 à 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). En effet, le rETR est à saturation maximale à 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ et donc à une intensité lumineuse plus importante, il y aura forcément un excédant d'énergie au niveau du PSII. Suite à ces différentes constatations, on peut facilement expliquer l'augmentation de la respiration au cours du stress lumineux. En effet, afin de se protéger un maximum du stress oxydatif, l'anémone et ses zooxanthelles sont obligées de produire de grandes quantités d'enzymes antioxydantes (SOD, CAT et APX). De plus, la photoinhibition nécessite le renouvellement de la protéine D1. La conséquence directe de ces deux processus de protection est la dépense d'énergie plus importante, en relation directe avec l'augmentation de l'activité respiratoire. A ma connaissance, il n'existe pas dans la littérature de données sur la respiration d'individu en entier et dans les conditions d'un stress lumineux.

2.3 Evolution des densités en zooxanthelles et de leur contenu en pigment

Par définition et pour rappel, le blanchiment corallien est un processus développé par tous les organismes vivant en symbiose avec des dinoflagellés du genre *Symbiodinium*. Il consiste en l'altération de la couleur de l'animal suite à la perte partielle ou complète des populations de zooxanthelles et/ou à la dégradation des pigments au sein de ces algues (Lesser *et al.*, 1990; Brown, 1997a, 1997b ; Kinzie *et al.*, 2001 ; Douglas 2003).

Les densités de *Symbiodinium* obtenues par comptage ne montre aucune variation significative au cours du stress lumineux. Néanmoins, les observations de Charlotte Baudesson (2007) montrent que les zooxanthelles se dégradent et que leurs thylakoïdes se désorganisent. Dans la plupart des cas, les études sur le blanchiment portent sur le facteur lumière couplé au facteur température. Il n'y aura donc aucune comparaison possible avec les données de la littérature, puisque dans cette étude, seuls les effets du facteur lumière sur la densité de zooxanthelles ont été étudiés. Comme le montre le tableau 33, les zooxanthelles ne seraient expulsées en grande quantité que lors d'un stress thermique et lumineux.

Nos résultats montrent que la quantité de l'ensemble des pigments a tendance à diminuer au cours du stress lumineux. Cette diminution est significative dès 96h pour la Chl *a* et la peridinine et l'est également à 240h pour la Chl *c*. Même le pool de diadinoxanthine et de diatoxanthine a tendance à diminuer au cours du stress lumineux, alors que ces molécules qui constituent le cycle des xanthophylles chez les dinoflagellés (Lavaud *et al.*, 2004), devraient logiquement augmenter avec l'intensité lumineuse. De plus, cette diminution généralisée des pigments ne peut être imputée à une diminution du nombre de zooxanthelles, puisque celui-ci ne varie vraisemblablement pas au cours du stress. Donc d'après la définition, il s'agit bien ici d'un phénomène de blanchiment. Par ailleurs, le pouvoir antioxydant du β -carotène (Halliwell and Gutteridge, 1999), expliquerait la diminution de la quantité de ce pigment par zooxanthelles au cours du stress lumineux. En effet, les résultats de la fluorescence de la chlorophylle *a* ainsi que la désorganisation des thylakoïdes (Baudesson, 2007), suggèrent qu'un stress oxydatif a bien eu lieu lors de notre expérience. Par conséquent, il se pourrait que le β -carotène soit utilisé comme un antioxydant non-enzymatique¹.

La tendance qu'ont la chl *a* et chl *c* à diminuer suite à un stress a largement été démontrée dans la littérature (Tabl. 33). En effet, Lesser (1989) montre que la concentration de ces deux pigments chez les zooxanthelles d'*A. pallida*, diminue de 30% après un stress lumineux. Les stress thermique et lumineux de 2h, appliqués par Hill et Ralph (2006) sur trois espèces de madrépore, montrent également une réduction des concentration en chl *a* et chl *c*, pouvant

¹ Il faut également signaler que selon les travaux réalisés par Mobley et Gleason (2003), la quantité de caroténoïdes dans les tissus d'*Aiptasia pallida* n'est pas influencée par un nourrissage exogène à base de nauplies d'*Artémia* sp.

aller jusqu'à 25 de la concentration initiale. Finalement, *Tridacna gigas* (mollusque hermatypique) soumis à un stress lumineux très important ($2428 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), voit la concentration de ces deux pigments réduite à zéro (Buck et al., 2002). Notre stress lumineux étant inférieur en intensité, il est normal que les résultats ne soient pas similaires à ceux de Buck et al. (2002).

2.5 Comportement des anémones

Un paramètre extrêmement important à prendre en compte chez les *Aiptasia pallida* et les anémones de mer en général, est leur capacité à se déplacer, se contracter et se dilater. Les quelques observations comportementales réalisées montrent que le niveau d'irradiance est trop important pour les anémones et les zooxanthelles. En effet, quelques heures après le début du stress lumineux, l'ensemble des anémones s'était déplacé sur la face opposée à la source lumineuse et présentait une colonne contractée. Des comportements comparables ont été observés chez les coraux durs ou lorsque l'intensité lumineuse était trop importante. Le polype était contracté, et inversement (Brown et al., 2002). Ces comportements suggèrent deux hypothèses, d'une part, la présence d'un système de communication très rapide entre les zooxanthelles et l'anémone hôte. D'autre part, la présence de cellules hôtes spécialisées dans la perception de l'intensité lumineuse. Dans tout les cas, de part leur capacité à fuir les mauvaises conditions, les *Aiptasia p.* présentent un avantage supplémentaire par rapport aux coraux.

3. Effets d'un stress à l'obscurité sur *Aiptasia pallida*

3.1 Fluorescence de la Chl *a*

Le faible échantillonnage réalisé lors du stress à l'obscurité ($0-1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) ne nous permet pas d'obtenir de résultats significatifs à partir de valeurs tirées de la fluorescence de la Chl *a*. Néanmoins, certaines tendances sont visibles et méritent d'être discutées.

La fluorescence minimale, maximale, l'efficacité photochimique du PSII et le Non-Photochemical Quenching ne montrent aucune variation significative au cours des dix jours de stress à l'obscurité. On peut donc dire que la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques des zooxanthelles n'est que peu perturbée par l'absence de lumière.

Lors de sa synthèse, le PSII a besoin d'être photoactivé pour incorporer l'atome de magnésium nécessaire à sa constitution. Dans le cas de notre expérience, la lumière manque et le renouvellement des centres réactionnels des photosystèmes II s'en trouve ralenti. C'est probablement la raison pour laquelle, la vitesse relative du transport d'électrons montre une tendance à la diminution à la suite du stress à l'obscurité. Mais dans ces conditions, comme il n'y a pas de lumière cela ne posera aucun problème à l'anémone et ses zooxanthelles.

Les valeurs du point J de la courbe d'induction normalisée ne varie pas de manière significative. Néanmoins, on observe une tendance à la diminution. Donc au cours de ce stress, la proportion de PSII à Q_B reducing center (PSII_A) aurait tendance à augmenter. Pour rappel, il s'agit des PSII avec RC actif, aux seins desquels l'accepteur primaire d'électrons réduit (Q_A^-) est réoxydé par l'accepteur secondaire d'électrons Q_B (Chylla et al., 1987).

3.2 Respiration des *Aiptasia pallida* et de leurs zooxanthelles

La respiration confondue des *Aiptasia pallida* et de leurs zooxanthelles augmente au cours du stress jusqu'à être trois à quatre fois supérieure. L'hôte et ses symbiontes font donc face à des dépenses énergétiques importantes. A l'obscurité, les *Symbiodinium* privées de lumière sont incapables de réaliser la photosynthèse. Par conséquent, elles fournissent très peu de sucres, peptides, glycérols et d'oxygène à l'hôte. Démunie de sa principale source énergétique, l'hôte doit réagir ; ce qui suffit à expliquer l'augmentation de la respiration. Tout comme déjà dit lors du stress lumineux, suite à l'absence de donnée sur la respiration d'organisme *in toto*, aucune comparaison n'a pu être réalisée.

Charlotte Baudesson qui s'est occupée du volet morphologique de l'étude des stress chez *A. pallida* lumineux, démontre qu'au cours du stress à l'obscurité, l'hôte voit ses tissus se déstructurer. Ensuite il réagit, en augmentant la différenciation de ses cellules interstitielles en cnidocytes au niveau de l'ectoderme. Ces modifications lui permettraient alors de maximiser ses chances de capturer des proies dans le milieu environnant (Baudesson, 2007) et de compenser alors le faible apport en nutriments de ses endosymbiontes.

3.3 Evolution des densités en zooxanthelles et de leur contenu en pigments

Les densités de zooxanthelles obtenues à partir de comptages ne montrent aucune évolution significative tout au long de la mise à l'obscurité. Il se pourrait tout simplement que la période de temps choisie pour l'expérience soit trop courte. En effet, Titlyanov *et al.*, (2001) ont étudié la dynamique de la photo-acclimatation à faible intensité lumineuse chez *Stylophora pistillata*. Les résultats qui ressortent, montrent que les premiers changements de densité de zooxanthelles s'opèrent dans les quarante jours après le début du stress. Dans le cas de notre expérience, la durée ne portait que sur 10 jours, il serait donc intéressant de prolonger la période de stress à l'obscurité afin de voir si la densité en zooxanthelles diminue.

La totalité des pigments de l'algue diminue significativement après 240 h de stress à l'obscurité. D'après la définition du blanchiment corallien, nous assistons à ce phénomène. Cependant, nos résultats sont en contradiction totale avec ce qui a été montré par le passé. Des études sur le terrain ont montré que la réponse acclimatatoire des zooxanthelles aux faibles intensités lumineuses, incluent une augmentation de la concentration en Chl *a* (par ex : Falkowski and Dubinsky, 1981). L'absence presque totale de lumière au cours de notre expérience doit être la cause de cette différence. En effet, une enzyme intervenant dans l'une des voies de synthèse de la chl *a* nécessite d'être activée par la lumière pour pouvoir la synthétiser. De plus en l'absence de lumière, les algues n'ont plus besoin de produire de pigments puisqu'ils ne serviront à rien. Le mécanisme de synthèse de ceux-ci dépendrait donc d'une manière ou d'une autre de l'intensité lumineuse.

3.5 Comportement des anémones

A l'inverse de ce qui a été observé lors du stress lumineux, les analyses comportementales sur les anémones montrent qu'une fois soumises à l'obscurité, elles se déplacent dans le pondoir jusqu'à atteindre l'interface air-eau et elles dilatent leur colonne en direction de la surface. Ce comportement démontre que l'obscurité agit bien comme un stress, et que les *Aiptasia pallida* cherche à se rapprocher de la source lumineuse. Cela suggère une nouvelle fois un système de perception d'intensité lumineuse et/ou de communication entre l'hôte et les zooxanthelles. Celui-ci offrirait alors la possibilité aux anémones de se déplacer dans le milieu tant que les conditions optimales ne sont pas réunies.



Conclusions

L'ensemble des résultats de ce travail a permis de répondre aux objectifs fixés au début de cette étude. L'analyse de la courbe d'induction de fluorescence constitue un nouvel outil puissant qui permet de suivre les événements physiologiques initiant le blanchiment corallien. La montée de fluorescence dans les conditions contrôles montre chez *Aiptasia pallida* la même séquence polyphasique (OJIP) que celle trouvée chez les scléactiniaires. De plus, les résultats pigmentaires et photophysiques obtenus sur les *Aiptasia pallida* « témoins » confirment ceux obtenus chez les coraux. Par conséquent, cette anémone de mer qui présentent de nombreux avantages par rapport aux madrépores (pas de squelette, maintient facile en aquarium...) pourrait constituer un excellent modèle pour l'étude du blanchiment corallien.

Notre étude montre qu'un stress lumineux a des effets importants sur la photophysologie des zooxanthelles et sur l'hôte. En effet, sous de fortes intensités lumineuses, les zooxanthelles d'*Aiptasia pallida* voient la proportion de leurs PSII Q_B non reducing augmenter, conduisant à un phénomène de photoinhibition partielle. Suite à ces perturbations, l'excédant d'énergie d'excitation au niveau des antennes du photosystème II, réagit avec l'oxygène et favorise la production de grandes quantités d'agents oxydants. Ces composés hautement réactifs ont pour effet de déstabiliser les structures cellulaires de l'hôte et des zooxanthelles (Baudesson, 2007).

A l'inverse de ce qui se passe lors du stress lumineux, les différents constituants de la photosynthèse chez les zooxanthelles sont peu affectés par le stress à l'obscurité. Néanmoins, l'absence de lumière empêche la réalisation de la photosynthèse. Dans la symbiose, les zooxanthelles ne réalisent plus leur part du travail, l'hôte est alors contraint de trouver des sources de nourritures alternatives. Par conséquent, celui-ci augmente sa population de cnidocyte et maximise ainsi ses chances de capturer des proies dans le milieu environnant.

Bien qu'aucune réduction de la densité en zooxanthelles n'ait été observée, la diminution des concentrations de l'ensemble des pigments indique que les anémones blanchissent suite à un stress lumineux ou à l'obscurité.

Dans le futur, il serait intéressant de recommencer l'expérience sur un plus grand nombre d'*Aiptasia pallida* et certains scléactiniaires et de les exposer à différentes intensités lumineuses jusqu'à 1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. On pourrait ensuite combiner ces différents stress lumineux avec des stress thermiques de différentes intensités. Les mêmes analyses que celles réalisées dans ce mémoire pourraient être effectuées chaque heure pendant les premières 8h, puis toutes les 24h la première semaine et enfin, tous les trois jours jusqu'à deux mois. En plus de ces analyses, il faudrait déterminer génétiquement à quels clades appartiennent les zooxanthelles et utiliser d'autres marqueurs de stress (HSPs hôte, HSPs symbionte, stress oxydatifs, ...). Parallèlement, la même expérience pourrait être réalisée sur des zooxanthelles de différents clades en culture pure. De cette manière, nous pourrions connaître l'impact qu'ont les organismes hôtes sur la photophysologie des zooxanthelles ainsi que leurs différentes sensibilités aux stress. Il serait également intéressant d'établir une norme de blanchiment, englobant à la fois des critères morphologiques et physiologiques.



Bibliographie

- **Alscher, R.G., Donahue, J.H., Cramer, C.L. (1997)** Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiology Plantarum* 100:224–33. *In Appel and Hirt (2004).*
- **Apel K, Hirt, H. (2004)** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- **Asada K. (1999)** The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601–39. *In Appel and Hirt (2004).*
- **Asada, K. (1996).** Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: Baker, N.R. (Ed.), *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 128–150. *In Warner et Berry-Lowe (2006).*
- **Baker, A.C. (2001)** Ecosystems - Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411:765-766.
- **Baker, A.C. (2003)** Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34:661-689.
- **Baker, A.C., Rowan, R., Knowlton, N. (1997)** Symbiosis ecology of two Caribbean Acroporid corals. *Proc 8th Int Coral Reef Sym*, vol. 2, pp 1295-1300. *In Coffroth et Santos (2005).*
- **Baker, A. C. (1999)** The Symbiosis Ecology of Reef-Building Coral.
- **Baker, A.C., Rowan, R. (1997)** Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and eastern Pacific. *Proceedings of the Eighth International Coral Reef Symp. (Panama) 2*: 1301–1306. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Banaszak, A.T., LaJeunesse, T.C., Trench, R.K. (2000)** The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249:219–33. *In Baker (2003).*
- **Banaszak, A.T., Santos, M.G., LaJeunesse, T.C., Lesser, M.P. (2006)** The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337:131-146.
- **Banaszak, A.T., 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 194: 213–232. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Barber, J. (1998)** Photosystem two. *Biochim. Biophys. Acta*. 1365:269–77. *In Appel and Hirt (2004).*
- **Baudesson, C. (2007)** L'anémone hermatypique *Aiptasia pallida* Verrill (1864) : un modèle pour l'étude du blanchiment ? Histologie ultrastructurale et effets du facteur lumière. Mémoire de licence en sciences biologiques (orientation biologie animale)
- **Ben-Haim, Y., Banin, E., Kushmaro, A., Loya, Y., Rosenberg, E.. (1999)** Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*. *Environmental Microbiology*. 1:223–29. *In Rosenberg and Falkovitz (2004).*
- **Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E. (2003)** Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4236-4242.
- **Bhagooli, R., Hidaka, M. (2003)** Comparison of stress susceptibility of in hospite and isolated zooxanthellae among five coral species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 291:181-197

- **Bhagooli, R., Hidaka, M. (2004)** Photoinhibition, bleaching susceptibility and mortality in two scleractinian corals, *Platygyra ryukyuensis* and *Stylophora pistillata*, in response to thermal and light stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 137:547-555
- **Brandt, K. (1881)** Über das Zusammenleben von Thieren und Algen. *Verh. Physiologischen Ges.* Berlin. 1881-1882:22-26.
- **Brown, B.E. (1997a)** Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16:S129-S138.
- **Brown, B.E., Dunne, R.P., Chansang, H. (1996)** Coral bleaching relative to elevated seawater temperature in the Andaman Sea (Indian Ocean) over the last 50 years. *Coral Reefs* 15:151-152. *In Brown (1997).*
- **Brown, B.E. (1997b)** Adaptations of reef corals to physical environmental stress. *Advance in Marine Biology* 31:222–299. *In Downs et al. (2002).*
- **Brown, B.E., Ambarsari, I., Warner, M.E., Fitt, W.K., Dunne, R.P., Gibb, S.W., Cummings, D.G. (1999)** Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs* 18:99-105
- **Brown, B.E., Downs, C.A., Dunne, R.P., Gibb, S.W. (2002)** Preliminary evidence for tissue retraction as a factor in photoprotection of corals incapable of xanthophyll cycling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 277: 129–144.
- **Buddemeier, R.W., Smith, S.V. (1999)** Coral adaptation and acclimatization: a most ingenious paradox. *American Zoologist* 39: 1–9. *In Fautin and Buddemeier (2004).*
- **Buddemeier, R.W., Fautin, D. G. (1993)** Coral bleaching as an adaptive mechanism. *BioScience* 43: 320–326. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Buddemeier, R.W., Baker, A.C., Fautin, D.G., Jacobs, J.R. (2004)** The adaptive hypothesis of bleaching. In *Coral health and disease*, 427-444. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- **Buddemeier, R.W., Fautin, D.G., Ware, J.R. (1997)** Acclimation, adaptation and algal symbiosis in reef-building scleractinian corals. *Proceedings of the Sixth International Conference on Coelenterate Biology*, Noordwijkerhout, The Netherlands. 1995 1: 3–10. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Buck, B.H., Rosenthal, H., Saint-Paul, U. (2002)** Effect of increased irradiance and thermal stress on the symbiosis of *Symbiodinium microadriaticum* and *Tridacna gigas*. *Aquatic Living Resources* 15:107-117
- **Chylla, R.A., Garab, G., Withmarsh (1987)** Evidence for slow turnover in a fraction of Photosystem II complexes in thylakoid membranes. *Biochimica Biophysica Acta* 894:561-571
- **Coffroth, M.A., Lasker, H. R. Oliver, J. (1988)** Coral mortality outside of the Eastern Pacific during 1982–83: Relationship to El Nino. Pp. 141–182 in *Some Ecological Consequences of the 1982/1983 El Nino Event to Marine Life*. P. W. Glynn, ed. Elsevier, Amsterdam. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Coffroth, M.A., Santos, S.R. (2005)** Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* 156:19-34
- **Connell, J.H. (1997)** Disturbance and recovery of coral assemblages. *Coral Reefs* 16, Suppl: S101-S113. *In Saxby (2000).*
- **Dau, H. (1994)** Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol* 60:1-23
- **Davy, S.K., Turner, J.R. (2003)** Early development and acquisition of zooxanthellae in the temperate symbiotic sea anemone *Anthopleura ballii* (Cocks). *Biological Bulletin* 205:66-72.

- **Day, R.J. (1994)** Algal Symbiosis in Bunodeopsis - Sea-Anemones with Auxiliary Structures. Biological Bulletin 186:182-194.
- **Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005)** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochimica Biophysica Acta 1706: 12-39. *In Tóth (2006).*
- **Dimijian, G.G. (2000)** Evolving together : the biology of symbiosis, part1. BUMC Proceedings 13, 217-226.
- **Douglas, A.E. (2003)** Coral bleaching - how and why? Marine Pollution Bulletin 46:385-392.
- **Dove, S., (2004)** Scleractinian corals with photoprotective host pigments are hypersensitive to thermal bleaching. Marine Ecology Progress Series 272, 99–116. *In Warner et Berry-Lowe (2006).*
- **Dove, S.G., Hoegh-Guldberg, O., Ranganathan, S., (2001)** Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP like proteins. Coral Reefs 19, 197–204.
- **Downs, C.A., Fauth, J.E., Halas, J.C., Dustan, P., Bemiss, J., Woodley, C.M. (2002)** Oxidative stress and seasonal coral bleaching. Free Radical Biology and Medicine 33:533-543.
- **Downs, C.A., Mueller, E., Phillips, S., Fauth, J., Woodley, C. M. (2000)** A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastrea faveolata*) during heat stress. Marine Biotechnology 2:533–544. *In Downs et al. (2002).*
- **Dunn, S.R., Thomason, J.C., Le Tissier, M.D.A, Bythell, J.C. (2004)** Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. Cell Death and Differentiation 11:1213-1222.
- **Erhardt, H., Knop, D. (2005)** Corals : Indo-Pacific field guide. Ikan Unterwasserarchiv. 305pp.
- **Enriquez, S., Mendez, E.R., Iglesias-Prieto, R., (2005)** Multiple scattering on corals enhances light absorption by symbiotic algae. Limnology and Oceanography 50, 1025-1032.
- **Fabricius, K. E. (2005)** Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. Marine Pollution Bulletin 50: 125-146
- **Falkowski, P.G., Dubinsky, Z., Muscatine, L., Porter, J.W. (1984)** Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. Bioscience 34: 705-709. *In Coffroth and Santos (2005).*
- **Falkowski , P.G., Dubinsky, Z. (1981)** Light-shade adaptation of Stylophora pistillata: a hermatypic coral from the gulf of Eilat. Nature (London) 289:172-174.
- **Foyer, C., Lelandis, M., Kunert, K.J. (1994)** Photooxidative stress in plants. Physiologia Plantarum 92: 696-717. *In Saxby (2000).*
- **Frank, H.A., and Cogdell, R. J. (1996)** Carotenoids in photosynthesis. Photochemical Photobiology 63, 257–264. *In Pinto et al. (2000).*
- **Franklin, D.J., Cedres, C.M.M., Hoegh-Guldberg, O. (2006)** Increased mortality and photoinhibition in the symbiotic dinoflagellates of the Indo-Pacific coral Stylophora pistillata (Esper) after summer bleaching. Marine Biology 149:633-642
- **Freudenthal, H.D. (1962)** Symbiodinium gen nov and *Symbiodinium microadriaticum* sp nov, a zooxanthella - taxonomy, life cycle, and morphology. Journal of Protozoology 9: 45-52.
- **Fridovich, I. (1986)** Biological effects of the superoxide radical. Archives of Biochemics and Biophysics. 247:1–11. *In Lesser (2006).*
- **Gates, R.D., Muscatine, L. (1992)** Three Methods for Isolating Viable Anthozoan Endoderm Cells with Their Intracellular Symbiotic Dinoflagellates. Coral Reefs 11:143-145.

- **Genty B., Briantais J.-M., Baker N. (1989)** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta* 990: 87-92.
- **Glynn, P.W. (1984)** Widespread coral mortality and the 1982/83 El Nino warming event. *Environmental Conservation* 11:133-146. *In Brown (1997).*
- **Glynn, P.W. (1996)** Coral reef bleaching: facts, hypotheses and implications. *Global Change Biology* 2: 495-509. *In Coffroth and Santos (2005).*
- **Glynn, P.W. (1990)** Coral mortality and disturbances to coral reefs in the tropical eastern Pacific. *Global Ecological Consequences of the 1982-1983 El-Nino Southern Oscillation*. P. W. Glynn(eds.). Elsevier, Amsterdam. *In Saxby (2000).*
- **Glynn, P.W. (1991)** Coral reef bleaching in the 1980's and possible connections with global warming. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 175–179. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Glynn, P.W. (1993)** Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs* 12: 1-17.
- **Gorbunov, M.Y., Kolber, Z.S., Lesser, M.P., Falkowski, P.G. (2001)** Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. *Limnology and Oceanography* 46:75-85
- **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. *American Zoology* 32: 683–695. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Guenther, J.E., Melis, A. (1990)** The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. *Photosynthesis Research* 23:105-109
- **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999)** Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford Univ. Press. 936 pp. *In Lesser (2006).*
- **Hallock, P. (2001)** Coral reefs, carbonate sediments, nutrients and global change. In Stanley Jr. GD (ed) *The History and Sedimentology of Ancient Reef Systems*. Springer-Verlag, New York, pp 387-427. *In Coffroth and Santos (2005).*
- **Hendrickson, L., Furbank, R., Chow, W. (2004)** A simple alternative approach for assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 82: 73-81.
- **Hideg, E., Barta, C., Kalai, T., Vass, I., Hideg, K., Asada, K. (2002)** Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photo inhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiology* 43:1154–64. *In Appel and Hirt (2004).*
- **Hill, R., Ralph, P.J. (2006)** Photosystem II heterogeneity of in hospite zooxanthellae in scleractinian corals exposed to bleaching conditions. *Photochemistry and Photobiology*, in press.
- **Hirose, M., Kinzie, R.A., Hidaka, M. (2001)** Timing and process of entry of zooxanthellae into oocytes of hermatypic corals. *Coral Reefs* 20:273-280.
- **Hoegh-Guldberg, O., Salvat, B. (1995)** Periodic mass-bleaching and elevated sea temperatures - bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French-Polynesia. *Marine Ecology Progress Series* 121:181-190. *In Brown (1997).*
- **Hoegh-Guldberg, O., Jones, R.J. (1999)** Photoinhibition and photoprotection in symbiotic dinoflagellates from reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series* 183:73-86.

- **Hoegh-Guldberg, O. (1999)** Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research* 50:839-866
- **Hoegh-Guldberg, O., Smith, G.J. (1989)** The effects of sudden changes in light, temperature and salinity on population density and export of the zooxanthellae from the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129: 279-303. *In Jones et al. (1998).*
- **Hughes, T.P. (1994)** Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science* 265:1547-1551. *In Brown (1997).*
- **ICRS (1998)** Statement on Global Coral Bleaching in 1997-1998, International Coral Reef Society, October 15 1998. *In Hoegh-Guldberg (1999).*
- **Iglesias-Prieto, R., Beltran, V.H., LaJeunesse, T.C., Reyes-Bonilla, H., Thome, P.E. (2004)** Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:1757-1763.
- **Iglesias-prieto, R., Matta, J.L., Robins, W.A., Trench, R.K. (1992)** Photosynthetic Response to Elevated-Temperature in the Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium Microadriaticum* in Culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:10302-10305.
- **Iglesias-Prieto, R., Trench, R.K. (1997)** Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. *Marine Biology* 130:23
- **Jones, R.J., Hoegh-Guldberg, O., Larkum, A.W.D., Schreiber, U. (1998)** Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell and Environment* 21:1219-1230.
- **Jones, R.J., Steven, A.L. (1997)** Effects of cyanide on coral in relation to cyanide fishing on reefs. *Marine and Freshwater Research.* 48:517-522.
- **Jones, R.J. (1997)** Zooxanthellae loss as a bioassay for assessing stress in corals. *Marine Ecology Progress Series.* 149:163-171. *In Jones et al. (1998).*
- **Karako-Lampert, S., Katcoff, D.J., Achituv, Y., Dubinsky, Z., Stambler N. (2005)** Responses of *Symbiodinium microadriaticum* clade B to different environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology And Ecology* 318 : 11-20.
- **Kinzie, R.A. III, Takayama, M., Santos, S.R., Coffroth, M.A. (2001)** The adaptive bleaching hypothesis: Experimental tests of critical assumptions. *Biological Bulletin* 200: 51-58.
- **Kinzie, R.A. III, Buddemeier, R. W. (1996)** Reefs Happen. *Global Change Biology* 2: 479–494. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Kleppel, G. S., Dodge, R. E., Reese, C.J. (1989)** Changes in pigmentation associated with the bleaching of stony corals. *Limnology and Oceanography* 34: 1331-1335. *In Saxby (2000).*
- **Klotz, L.-O. (2002)** Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biological Chemistry* 383:443–56. *In Appel and Hirt (2004).*
- **Kobluk, D. R., Lysenko, M. A. (1994)** “Ring” bleaching in southern Caribbean *Agaricia agaricites* during rapid water cooling. *Bulletin Marine Sciences* 54: 142–150. *In Kinzie et al. (2001).*
- **Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., 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. *In Rosenberg and Falkovitz (2004).*

- **Kushmaro A., Rosenberg E., Fine M., Ben-Haim Y., Loya Y. (1998)** Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series* 171: 131-137.
- **Kushmaro, A., Loya, Y., Fine, M., Rosenberg, E. (1996)** Bacterial infection and coral bleaching. *Nature* 380: 396. *In Kinzie et al. (2001)*.
- **Ladrière, O. (2006)** Le blanchiment des coraux : implications microbiennes et nouvelle voie d'investigation. Mémoire de Master en Océanologie, Ulg
- **LaJeunesse, T.C. (2002)** Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology* 141:387-400.
- **LaJeunesse, T.C. (2005)** "Species" radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the miocene-pliocene transition. *Molecular Biology and Evolution* 22:570-581.
- **LaJeunesse, T.C., Bhagooli, R., Hidaka, M., DeVantier, L., Done, T., Schmidt, G.W., Fitt, W.K., Hoegh-Guldberg, O. (2004)** Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Marine Ecology-Progress Series* 284:147-161.
- **LaJeunesse, T.C., Loh, W.K.W., van Woesik, R., Hoegh-Guldberg, O., Schmidt, G.W., Fitt, W.K. (2003)** Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean. *Limnology and Oceanography* 48:2046-2054.
- **LaJeunesse, T.C., Trench, R.K. (2000)** Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biological Bulletin* 199:126-134.
- **Larkum, T. (1996)** How dinoflagellates make light work with peridinin *Trends Plant Sci.* 1, 247–248. *In Pinto et al. (2000)*.
- **Lasker, H.R. (2003)** Zooxanthella densities within a Caribbean octocoral during bleaching and non-bleaching years. *Coral Reefs* 22:23-26
- **Lavaud, J., Rousseau, B., Etienne, A.L., (2004)** General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *Journal Phycology* 40, 130–137. *In Warner et Berry-Lowe (2006)*.
- **Lecointre, G., Le Guyader, H. (2001)** Classification phylogénétique du vivant 2^e édition. Editions Belin. Saint-Amand-Montrond.
- **Lesser, M.P. (1989)** Photobiology of Natural-Populations of Zooxanthellae from the Sea-Anemone *Aiptasia-Pallida* - Assessment of the Hosts Role in Protection Against Ultraviolet-Radiation. *Cytometry* 10:653-658
- **Lesser, M.P. (1996)** Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 41:271-283.
- **Lesser, M.P. (1997)** Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* 16:187-192.
- **Lesser, M.P. (2006)** Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68:253-278.
- **Lesser, M.P., Stochaj, W.R., Tapley, D.W., 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.

- **Lesser, M.P., Shick, J.M. (1989)** Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photo-inhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Marine Biology* 102: 243–255. *In Kinzie et al. (2001)*.
- **Lesser, M.P., Farrell, J.H. (2004)** Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs* 23:367-377
- **Maxwell, K., Johnson, G. (2000)** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal Experimental Botany* 51: 659-668.
- **Mehler, A. H. (1951)** Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry Biophysics* 33:65–77. *In Downs et al. (2002)*.
- **Melis, A. (1991)** Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica Biophysica Acta* 1058:87-106
- **Mendes, A.F., Caramona, M.M., Carvalho, A.P. and Lopes, M.C. (2003)**. Differential roles of hydrogen peroxide and superoxide in mediating IL-1- induced NF-kappa B activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 88, 783-793. *In Perez and Weis (2006)*.
- **Mobley, K.B., Gleason, D.F. (2003)** The effect of light and heterotrophy on carotenoid concentrations in the Caribbean anemone *Aiptasia pallida* (Verrill). *Marine Biology* 143:629-637
- **Mokady, O., Y. Loya, Y., Lazar, B. (1998)** Ammonium contribution from boring bivalves to their coral host: A mutualistic symbiosis? *Marine Ecological Progress Series* 169: 295-301. *In Saxby (2000)*.
- **Morishige, D.T., Dreyfuss, B.W. (1998)** Light-harvesting complexes of higher plants. *Photosynthesis: A comprehensive treatise*. A. S. Raghavendra (eds.). Cambridge University Press, United Kingdom. p. 376.
- **Muller, P., Li, X.P., Niyogi K.K. (2001)** Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125:1558-1566.
- **Muscatine, L. (1990)** The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Ecosystems of the World: Coral Reefs*. Z. Dubinsky (eds.). Elsevier, Amsterdam. p. 75-87. *In Coffroth and Santos (2005)*.
- **Muscatine, L., Grossman, D., Doino, J. (1991)** Release of symbiotic algae by tropical sea-anemones and coral after cold shock. *Marine Ecological Progress Series* 77:233-243. *In Rosenberg and Loya (2004)*.
- **Nakano, Y., Yamazato, K., Masuhara, H., Ito, S. (1997)** Responses of Okinawan reef-building corals to artificial high salinity. *Galaxia* 13: 181–195. *In Kinzie et al. (2001)*.
- **Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H., Murata, N., (2004)** Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochemical Journal*. 43, 11321–11330. *In Warner et Berry-Lowe (2006)*.
- **Niyogi, K.K., (1999)** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333–359. *In Warner et Berry-Lowe (2006)*.
- **Papageorgiou GC, Govindjee (2004)** Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration. Springer, Dordrecht.
- **Perez, S., Weis, V. (2006)** Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *Journal of Experimental Biology* 209:2804-2810.

- **Perez SF, Cook CB, Brooks WR (2001)** The role of symbiotic dinoflagellates in the temperature-induced bleaching response of the subtropical sea anemone *Aiptasia pallida*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 256:1-14.
- **Plantivaux, A., Furla, P., Zoccola, D., Garello, G., Forcioli, D., Richier, S., Merle, P.L., Tambutte, E., Tambutte, S., Allemand, D. (2004)** Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine* 37:1170-1181
- **Poulliceck, M. (2007)** Ecologie des récifs coralliens. Notes de cours du Master en Océanologie, Université de Liège.
- **Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994)** Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*. 6:65–74. *In Appel and Hirt (2004)*.
- **Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Rubbo, H. (2000).** The biological chemistry of peroxynitrite. In *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (ed. L. J. Ignarro), pp. 57-82. New York: Academic Press. *In Perez and Weis (2006)*.
- **Ralph, P.J., Gademann, R., Larkum, A.W.D., Kuhl, M. (2002)** Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues. *Marine Biology* 141:639-646
- **Raven, P.H., Evert, R.F. (1992)** *Biology of Plants* 5th Ed. Worth Publishers Inc., New York. 791 pp.
- **Robison, J.D., Warner, M.E. (2006)** Differential impacts of photoacclimation and thermal stress on the photobiology of four different phylotypes of Symbiodinium (Pyrrhophyta). *Journal of Phycology* 42:568-579
- **Rosenberg, E., Ben-Haim, Y. (2002)** Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology* 4:318-326.
- **Rosenberg, E., Falkovitz, L. (2004)** The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annual Review of Microbiology* 58:143-159.
- **Rosenberg, E., 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., Loya, Y. (2004)** *Coral Health and Disease*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- **Rowan, R. (1998)** Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *Journal of Phycology* 34: 407-417. *In Coffroth and Santos (2005)*.
- **Rowan, R., Knowlton, N. (1995)** Intraspecific Diversity and Ecological Zonation in Coral Algal Symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:2850-2853.
- **Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A., Jara, J. (1997)** Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388:265-269.
- **Rowan, R. (1998)** Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *Journal of Phycology* 34: 407–417. *In Kinzie et al. (2001)*.
- **Rowan, R., 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., Powers, J. D. (1991b)** Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine Ecology Progress Series* 71: 65–73. *In Kinzie et al. (2001)*.
- **Ruppert, E. E., Barnes, R.D. (1996)** *Invertebrate Zoology*, Sixth Edition. Harcourt College Publishers.

- **Salih, S., Hoegh-Guldberg, O., Cox, G. (1997)** Bleaching responses of symbiotic dinoflagellates in corals: the effects of light and elevated temperature on their morphology and physiology. Proceeding of the Australian Coral Reef Society 75th Anniversary Conference , 199-216
- **Salih, A., Larkum, A.W.D., Cox, G., Kühl, M., Hoegh-Guldberg, O., (2000)** Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408, 850–853. *In Warner et Berry-Lowe (2006).*
- **Savage, A.M., Trapido-Rosenthal, H., Douglas, A.E. (2002)** On the functional significance of molecular variation in Symbiodinium, the symbiotic algae of Cnidaria: photosynthetic response to irradiance. *Marine Ecology-Progress Series* 244:27-37
- **Saxby, T. (2000)** Coral Bleaching : the synergistic effects of temperature and photoinhibition.
- **Sebens, K.P. (1994)** Biodiversity of Coral Reefs: What are We Losing and Why? *American Zoology* 34: 115-133. *In Hoegh-Guldberg (1999).*
- **Souter D.W., Lindén O. (2000)** The health and future of coral reef systems. *Ocean and Coastal Management* 43: 657-688.
- **Steen, R.G., Muscatine, L. (1987)** Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *Biological Bulletin.* 172: 246–263. *In Kinzie et al. (2001)*
- **Stone, L., Huppert, A., Rajagopalan, B., Bhasin, H. Loya, Y. (1999)** Mass coral reef bleaching: a recent outcome of increased El Nino activity? *Ecology Letters* 2:325–330. *In Downs et al. (2002).*
- **Strasser, R., Srivastava, A., Tsimili-Michael, M. (2000)** The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Dans: “Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation” (Mohanty, Yunus et Pathre, Eds.), pp. 443-480, Taylor & Francis, Londres.
- **Szmant, A. M., 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.
- **Takabayashi, M., Santos, S.R., Cook, C.B. (2004)** Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *Journal of Phycology* 40: 160-164. *In Coffroth et Santos (2005).*
- **Titlyanov, E.A., Titlyanova, T.V., Yamazato, K., van Woesik, R. (2001)** Photo-acclimation dynamics of the coral *Stylophora pistillata* to low and extremely low light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263:211-225
- **Toren, A., Landau, L., Kushmaro, A., Loya, Y., Rosenberg, E. (1998)** Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1379-1384.
- **Toth, S.Z. (2006)** Analysis and Application of the Fast Chl a Fluorescence (OJIP) Transient Complemented with Simultaneous 820 nm Transmission Measurements. Thèse présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur en sciences, mention biologique.
- **Trench, R. K. (1979)** The Cell Biology of Plant-Animal Symbioses. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 485-531. *In Saxby (2000).*
- **Trench, R.K. (1997)** Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal±invertebrate symbioses. In: Lessios HA, MacIntyre IG (eds) Proc 8th int coral Reef Symp. Vol. 2. Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panama, pp 1275-1286. *In Hirose et al. (2001).*
- **Trench, R.K. (1992)** Microalgal-invertebrate symbiosis, current trends. *Encyclopedia of Microbiology*, vol 3. Academic Press, London, pp129-142. *In Rosenberg and Loya (2004).*

- **Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., Kobayashi, H.. (1999)** A recessive Arabidopsis mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. Plant Cell 11:1195–206. *In Appel and Hirt (2004).*
- **Ulstrup, K.E., Ralph, P.J., Larkum, A.W.D, Kuhl, M. (2006)** Intra-colonial variability in light acclimation of zooxanthellae in coral tissues of Pocillopora damicornis. Marine Biology 149:1325-1335
- **Van Oppen, M.J.H. (2004)** Mode of zooxanthella transmission does not affect zooxanthella diversity in acroporid corals. Marine Biology 144:1-7.
- **Venn, A.A., Wilson, M.A., Trapido-Rosenthal, H.G., Keely, B.J., Douglas, A.E. (2006)** The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, Symbiodinium. Plant Cell and Environment 29:2133-2142
- **Veron, J. E. N., (2000)** Corals of the World [three volumes]. Australian Institute of Marine Science, Townsville, Queensland, Australia.
- **Wakefield, T.S., Farmer, M.A., Kempf, S.C. (2000)** Revised description of the fine structure of in situ "Zooxanthellae" genus Symbiodinium. Biological Bulletin 199:76-84.
- **Ware, J. R., Fautin, D.G., Buddemeier, R.W. (1996)** Patterns of coral bleaching: modeling the adaptive bleaching hypothesis. Ecological Modelling 84: 199–214. *In Fautin and Buddemeier (2004).*
- **Warner, M.E., Berry-Lowe, S. (2006)** Differential xanthophyll cycling and photochemical activity in symbiotic dinoflagellates in multiple locations of three species of Caribbean coral. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 339:86-95.
- **Warner, M.E., Fitt, W.K., Schmidt, G.W. (1999)** Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:8007-8012.
- **Warner, M.E., Fitt, W.K., 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 Environment 19: 291–299.
- **Warner, M.E., Chilcoat, G.C., McFarland, F.K., Fitt, W.K. (2002)** Seasonal fluctuations in the photosynthetic capacity of photosystem II in symbiotic dinoflagellates in the Caribbean reef-building coral Montastraea. Marine Biology 141:31-38
- **Wilkinson, C.R. (2000)** Status of coral reefs of the world : 2000. Australian Institute of Marine Science, Cape Ferguson, Queensland, Australia, 363 pp. *In Douglas (2003).*

Le blanchiment constitue actuellement la principale menace affectant les récifs coralliens. Afin de mieux prévoir ces phénomènes dans le futur et de protéger ces écosystèmes riches et essentiels à bien des égards, il est primordial d'en comprendre les mécanismes.

L'étude de cette problématique, réclame sans cesse de nouvelles techniques et de nouveaux moyens expérimentaux. Dans ce cadre, nous avons utilisé des *Aiptasia pallida*, il s'agit de petites anémones de mer tropicales très répandues, qui se reproduisent facilement et constituent une réelle nuisance pour les conservateurs d'aquariums marins. Elles sont facilement maintenues dans des petits aquariums faiblement équipés. De plus, selon certains auteurs (Muscatine et al., 1991), les mécanismes physiologiques de blanchiment chez *Aiptasia* seraient assez similaires à ceux des scléractiniaires.

Par conséquent, dans un premier temps, nous avons tenté de démontrer la pertinence d'utiliser ces organismes hermatypiques comme matériel de laboratoire dans l'étude du blanchiment corallien. Ensuite, nous avons voulu connaître l'impact de la lumière sur le blanchiment corallien.

Pour tenter de répondre à cette question, l'état photophysologique des zooxanthelles a été étudié durant 10 jours, à fortes et à faibles intensités lumineuses. A cette fin, des mesures de fluorescence de la chlorophylle a ont été réalisées avec un fluorimètre continu, encore très peu utilisé à l'heure actuelle. La respiration des organismes en conditions de stress a été calculée sur base de données provenant de l'oxymètre. Finalement, la variation de pigmentation des zooxanthelles a été analysée à l'aide de chromatogrammes HPLC. Parallèlement à ce travail, une étude morphologique sur les mêmes individus, dans les mêmes conditions a été réalisée par Charlotte Baudesson.

Les résultats obtenus ont démontrés que l'analyse de la courbe d'induction de fluorescence constitue un nouvel outil puissant permettant de suivre les événements physiologiques initiant le blanchiment corallien. De plus, ils montrent pour la première fois une hétérogénéité du photosystème II chez les zooxanthelles d'*Aiptasia pallida*. En condition de stress lumineux, celles-ci voient l'efficacité photochimique de leurs PSII diminuer et la proportion de PSII Q_B non reducing augmenter. Ces deux processus conduisant alors à la photoinhibition, phénomène inducteur de *Reactive Oxygen Species*. Sous ces intensités lumineuses la quantité de la plupart des pigments diminue, indiquant un phénomène de blanchiment. De plus, les résultats sur la densité montre que la dégradation de la pigmentation de l'endosymbionte n'est pas nécessairement un pré requis pour l'expulsion des algues.

A l'inverse de ce qui se passe lors du stress lumineux, les zooxanthelles soumises à des PAR de 0 à 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ voient la proportion de PSII à Q_B reducing center (PSIIa) qui tend à augmenter. La quantité de tous les pigments diminue, mais la densité de zooxanthelles ne change pas au cours du temps. L'absence de lumière a de gros effets sur l'activité métabolique des anémones, probablement parce que l'hôte doit compenser l'arrêt de apport de composés par les zooxanthelles.

De nombreux résultats obtenus dans cette étude sur *Aiptasia pallida* confirment ceux obtenus chez les madrépores. Par conséquent, cette anémone de mer qui présentent de nombreux avantages par rapport aux coraux durs (pas de squelette, maintient facile, abondante...) pourrait réellement constituer un excellent modèle d'étude pour le blanchiment corallien.