

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

CARACTÉRISATION DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE ASSOCIÉE À TROIS  
ESPÈCES DE CORAUX SCLÉRACTINIENS : *GALAXEA FASCICULARIS*,  
*PAVONA CACTUS* ET *TURBINARIA RENIFORMIS*

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

comme exigence partielle du programme de  
maîtrise en Gestion de la faune et de ses habitats

PAR

PASCALE TREMBLAY

Mars, 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

*À mes parents qui m'ont transmis  
leur amour de la nature*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux nombreuses personnes qui ont rendu possible la réalisation de ce travail. Mes remerciements les plus sincères sont en premier lieu adressés à mes deux codirecteurs de recherche, Dre Christine Ferrier-Pagès et Dr Markus Weinbauer, pour m'avoir accordé leur confiance lors de mes premiers pas dans cet univers fascinant du monde microbien chez les coraux. Je remercie également mon directeur de recherche, Dr Christian Nozais, sans qui la réalisation de ce projet n'aurait pas été possible. Merci à vous trois pour vos conseils avisés et votre disponibilité, malgré les kilomètres qui nous ont souvent séparés ou vos nombreuses occupations. Ce fut une grande chance et un privilège de vous avoir comme mentors.*

*Toute ma gratitude au Dr Denis Allemand, directeur scientifique du Centre Scientifique de Monaco (CSM), de m'avoir intégrée au sein de son laboratoire et qui a su reconnaître en moi la passionnée que je suis. Merci au Dr Louis Legendre, directeur du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer (LOV), et au Dr John Dolan, chef de l'équipe de Biogéochimie et d'écologie microbienne du LOV, de m'avoir accueillie au sein de leur équipe. Je remercie M. Michel Boisson, secrétaire général du CSM, de m'avoir permis d'effectuer mon projet dans son laboratoire. Je remercie également le Dr Patrick Rampal, président du conseil d'administration du CSM, de son attention particulière à l'égard de nos recherches.*

*Un merci spécial au Dr Magella Guillemette, directeur du Comité de programmes des études avancées en biologie de l'Université du Québec à Rimouski et mon patron en*

*de partage et d'échanges scientifiques. Merci aussi à tous ceux qui m'ont donné des grands ou petits coups de main en répondant à mes questions. Et puis un grand merci à tous ceux qui ont fait de ces deux années de maîtrise une si belle aventure.*

*Enfin, mes remerciements infinis aux familles Tremblay et Gagnon, j'ai vraiment souffert de ne pas pouvoir passer plus de temps auprès de vous tous. Toute ma gratitude, à mes parents, Marcel et Diane, pour leur soutien inconditionnel, pour avoir su accepter mon envol soudain et ces longs mois d'absence qui se transformeront en longues années. Un immense remerciement à mes amis (es) sans qui mes débuts dans la science n'auraient pas été pareils. Un merci tout spécial à Stéphanie pour son amitié et ses innombrables aller-retour entre Rimouski et l'aéroport Pierre-Elliott Trudeau de Montréal, mais surtout pour son soutien durant les moments les plus difficiles et pour tellement de choses encore... Merci à Lisa-Marie, ma tronche, sans qui je ne me serais jamais rendue à la maîtrise, pour toutes ces soirées à étudier jusqu'aux petites heures de la nuit. Merci à Éric et ses dinoflagellés. Merci à Kaven pour ses discussions sans fin. Et merci à Martin, sinon ce n'aurait pas été la même chose...*

*Enfin, merci à Galaxea fascicularis, Pavona cactus et Turbinaria reniformis qui ont sacrifié de précieux polypes pour l'avancement de la science. Maintenant que cette course touche à sa fin, une étape s'achève et une autre commence... Ce n'est pas facile de trouver les mots qu'il faut. Je vous prie de bien vouloir excuser mes maladresses et mes éventuels oublis.*

***Vous resterez tous gravés dans ma et mon mémoire!!!***

## **AVANT-PROPOS**

Ce mémoire est présenté sous la forme de deux articles dont un est à soumettre et un second est en préparation.

### **Financement**

Ce projet a été financé (achat de matériels et support financier à l'étudiante) par le Centre Scientifique de Monaco, ainsi que par le Dr Markus Weinbauer de l'équipe de Biogéochimie et d'écologie microbienne du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer et par le Dr Christian Nozais du Laboratoire des écosystèmes aquatiques de l'Université du Québec à Rimouski.

### **Contributions des auteurs**

La contribution des auteurs est présentée en fonction de leur ordre d'apparition dans la liste des auteurs des articles, sauf pour la Dre Christine Ferrier-Pagès qui apparaît en fin de liste en tant que superviseuse du projet.

Bien que Markus Weinbauer, Cécile Rottier, Yann Guéraldel, Christian Nozais et Christine Ferrier-Pagès soient coauteurs de ces articles, le manuscrit doit être considéré comme le mémoire de l'étudiant. Cependant, les contributions de M. Weinbauer, C. Nozais et C. Ferrier-Pagès ne se sont pas limitées à la supervision, ils ont aussi apporté leur aide durant le processus de rédaction. Par ailleurs, C. Ferrier-Pagès a contribué à élaborer les plans d'expérience et M. Weinbauer à préparer les techniques moléculaires utilisées. Les

## RÉSUMÉ

Dernièrement, plusieurs études *in situ* ont examiné l'interaction entre les coraux et les microorganismes autotrophes et hétérotrophes contenus dans leur tissu, leur mucus ainsi que dans leur squelette. C'est surtout grâce au mucus, et à sa richesse en composés carbonés que les coraux favorisent la croissance des bactéries. Des études ont suggéré que les coraux pouvaient être associés à des microorganismes spécialisés, dont des bactéries fixatrices d'azote et des bactéries productrices d'antibiotiques ou de vitamines qui les protégeraient contre les pathogènes. Certaines études, qui restent cependant rares, ont concentré leurs efforts sur l'effet de la température sur l'association coraux-bactéries. L'élévation de la température de l'eau peut en effet favoriser le développement des pathogènes, leur transmission à l'hôte et diminuer la résistance de l'hôte. Cependant, les bases exactes de la relation existant entre les coraux et les bactéries ne sont pas encore connues tout comme l'impact de la température. Dans cette étude, nous avons caractérisé la composition des communautés bactériennes de l'eau de mer et de celles associées aux tissus et au squelette de trois espèces de coraux constructeurs de récifs (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* et *Turbinaria reniformis*), en conditions normales et en conditions de stress de température. Nous avons également étudié l'influence du mucus produit par les coraux sur la composition des communautés de microorganismes.

La première partie de cette étude (chapitre II) a consisté à décrire les communautés bactériennes de l'eau de mer et celles associées au complexe tissu/mucus et au squelette dénudé des trois espèces de coraux étudiés, et ce, en relation avec la composition et la quantité de mucus produite. Les coraux ont été incubés en aquarium dans les mêmes conditions de culture, en dehors de tout stress. Ensuite, la composition de la communauté bactérienne associée au complexe tissu/mucus et au squelette des coraux ainsi qu'à l'eau de mer a été analysée par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) à partir d'amplicons du gène d'ARNr 16S. Les résultats ont montré que la communauté bactérienne associée aux tissus est spécifique à l'espèce corallienne tandis que celle associée au squelette est plus homogène pour les trois espèces. L'excrétion de mucus est significativement différente pour les trois espèces de coraux avec un taux d'excrétion plus élevé chez *G. fascicularis* ( $178,2 \pm 17,4$  nmol C mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) que chez *P. cactus* ( $48,4 \pm 3,3$  nmol C mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) et *T. reniformis* ( $18,4 \pm 1,4$  nmol C mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Le mucus de *G. fascicularis* et *P. cactus* contient principalement du galactose et du glucose comparativement au mucus de *T. reniformis* qui contient du glucose et du xylose. Le séquençage des bandes a montré deux nouveaux genres bactériens (< 90 % de similarité) associés au tissu de *P. cactus*. La plus haute richesse apparente a été retrouvée dans le tissu de *G. fascicularis*, lequel présente également le plus haut taux d'excrétion de mucus. Ceci suggère que les différences observées quant à la quantité et la composition du mucus excrété peuvent partiellement expliquer les différences retrouvées dans la composition des communautés bactériennes entre les tissus des trois espèces coralliennes, même si d'autres facteurs peuvent influencer cette composition.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	v
AVANT-PROPOS.....	ix
RÉSUMÉ .....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ORALES PAR AFFICHE.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES .....	xxi
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
ÉTAT DES CONNAISSANCES ET PROBLÉMATIQUE .....	3
ESPÈCES MODÈLES.....	11
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	12
<b>CHAPITRE II : BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE TISSUE AND SKELETON OF THREE SCLERACTINIAN CORALS: RELATIONSHIP WITH MUCUS EXCRETION AND COMPOSITION.....</b>	<b>17</b>
RÉSUMÉ .....	21
ABSTRACT .....	22
INTRODUCTION .....	23
MATERIALS AND METHODS.....	25
RESULTS.....	32
DISCUSSION.....	35
CONCLUSION.....	43
ACKNOWLEDGMENTS .....	44
LITERATURE CITED.....	45



## LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ORALES PAR AFFICHE

**Tremblay, P.**, M.G. Weinbauer, C. Nozais, C. Rottier et C. Ferrier-Pagès\*, 2008. Bacterial community associated with tissue and skeleton of three scleractinian coral species: *Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*, 11<sup>th</sup> International Corals Reef Symposium, 7 au 11 juillet, Fort Lauderdale, Florida, USA.

**Tremblay, P.\***, M.G. Weinbauer, C. Nozais, C. Rottier et C. Ferrier-Pagès, 2008. Bactéries solitaires cherchent « corauxcataires », *Colloque La biologie dans tous ses états, Conservation et biodiversité : les enjeux d'un héritage*, 13 au 14 mars, Université du Québec à Rimouski, Canada.

\* Présentatrice de l'affiche

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviations	Descriptions francophones	Descriptions anglophones
<b>BBD</b>	Maladie de la bande noire	Black band disease
<b>CFB</b>	<i>Cytophaga-Flavobacter/Flexibacter-Bacterioides</i>	
<b>DGGE</b>	Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant	Denaturing gradient gel electrophoresis
<b>DOC</b>	Carbone organique dissous	Dissolved organic carbon
<b>FL1</b>	Fluorescence verte	Green fluorescence
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne	Polymerase chain reaction
<b>SSC</b>	-	Side scatter
<b>WBDI</b>	Maladie de la bande blanche de type I	White band disease type I
<b>WP2</b>	Maladie de la peste blanche de type II	White plague type II
<b>YBD</b>	Maladie de la tache/bande jaune	Yellow blotch/band disease

---

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE II

- Table 1. Results of the factorial analysis of variance (ANOVA) for apparent richness and apparent Shannon index with two factors (species and compartments) and six replicates. ....49
- Table 2. Results of post-hoc test analysis (Tukey's test) for apparent richness (top of the matrix) and apparent Shannon index (bottom of the matrix) with two factors (species and compartments) and six replicates. The results for seawater were calculated with one factor and six replicates for species/compartments and three replicates for seawater. Only the significant values are presented (ns for non significant). .....50
- Table 3. 16S rDNA sequences of bacteria and archaea isolated from the tissue and skeleton of three coral species (*G. fascicularis*, *P. cactus* and *T. reniformis*) and seawater. Bands were excised from DGGE gels and sequenced. ....51

### CHAPITRE III

- Tableau 1. Résultats de l'analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs croisés (espèces et aquariums) sur la richesse apparente et l'indice de Shannon apparent en circuit fermé avec trois réplicats. ....72
- Tableau 2. Résultats du test non paramétrique de Sheirer-Ray-Hare sur la richesse apparente et de l'analyse de variance (ANOVA) sur l'indice de Shannon apparent à

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

- Fig. 1. Distribution géographique de *Galaxea fascicularis* (Veron 2000). ..... 11
- Fig. 2. Distribution géographique de *Pavona cactus* (Veron 2000). ..... 11
- Fig. 3. Distribution géographique de *Turbinaria reniformis* (Veron 2000). ..... 11

### CHAPITRE II

- Fig. 1. Amount of organic carbon excreted ( $\text{nmol C mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) by the three coral species *Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*. Mean ( $n = 3$ ) and standard error. .... 52
- Fig. 2. Monosaccharides produced by the three coral species (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*). ..... 53
- Fig. 3. Example of bacterial DGGE band pattern obtained for coral tissue and seawater. The main bands obtained in all samples from the same coral species or from seawater have been sequenced and identified. .... 54
- Fig. 4. a) Bacterial apparent richness and b) bacterial apparent Shannon index (mean  $\pm$  standard error) for the three species (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and

Fig. 3. a) Richesse apparente et b) indice de Shannon apparent (moyenne  $\pm$  erreur-type) pour trois espèces de coraux (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus*, *Turbinaria reniformis*) et l'eau de mer en circuit ouvert ou fermé (circuit ouvert : n = 6 et 4 pour les tissus coralliens et l'eau de mer, circuit fermé : n = 5 et 2 pour les tissus coralliens et l'eau de mer). .....77

Fig. 4. Analyse de groupement (UPGMA) effectuée sur les échantillons de tissus coralliens de trois espèces, *Galaxea fascicularis* (G), *Pavona cactus* (P), *Turbinaria reniformis* (T) et sur l'eau de mer (W) dans deux aquariums (1 et 2) en circuit ouvert. Six boutures des deux espèces et quatre échantillons d'eau ont été utilisés. ....78

Fig. 5. Analyse de groupement (UPGMA) effectuée sur les échantillons de tissus coralliens de trois espèces, *Galaxea fascicularis* (G), *Pavona cactus* (P), *Turbinaria reniformis* (T) et sur l'eau de mer (W) en circuit fermé. Cinq boutures des deux espèces et quatre échantillons d'eau ont été utilisés. ....79

## CHAPITRE IV

Fig. 1. Experimental design for coral (CT) and seawater (ST) tanks at two temperatures (26 and 31°C). .....108

Fig. 2. Bacterial abundance (bacteria ml<sup>-1</sup>, mean  $\pm$  standard error) for seawater samples in coral (CT) and seawater (ST) tanks at two temperatures (26 and 31°C) during a twelve day incubation. Three samples per day were used in each of the six aquaria, except for day 0, 2 and 4 where only three tanks were considered. ....109

Fig. 8. Cluster analysis (UPGMA) made with skeleton samples of the three species, *Galaxea fascicularis* (G), *Pavona cactus* (P), *Turbinaria reniformis* (T) and the seawater (W) at two temperature (26 and 31°C). Five nubbins from three parent colonies were used for each coral species and each temperature and water samples were considered in duplicate. ....115

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## ÉTAT DES CONNAISSANCES ET PROBLÉMATIQUE

Les procaryotes sont parmi les organismes les plus diversifiés de la planète, et cette diversification se retrouve incontestablement dans les récifs coralliens, où les procaryotes colonisent la colonne d'eau, le sédiment et sont mêmes associés aux organismes benthiques comme les coraux. Chez les coraux, cependant, les procaryotes sont largement méconnus (Rohwer *et al.*, 2002), la plupart des études s'étant focalisées sur les zooxanthelles, dinoflagellés symbiotiques contribuant largement au budget énergétique de l'association. La faible connaissance des associations procaryotes-coraux résulte en partie par le manque d'outils d'analyse disponibles pour caractériser cette diversité bactérienne (Bourne et Munn, 2005). Les techniques de culture traditionnelles sont largement inefficaces et hautement sélectives (Rohwer *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2004). De plus, les microhabitats utilisés par les bactéries dans le corail sont nombreux (Bourne et Munn, 2005) ce qui en complexifie l'étude. Elles sont associées au mucus (Kellogg, 2004 ; Bourne et Munn, 2005 ; Ritchie, 2006), à la surface des tissus coralliens (Frias-Lopez *et al.*, 2002), aux tissus eux-mêmes (Banin *et al.*, 2000 ; Bourne et Munn, 2005) et au squelette (Rohwer *et al.*, 2002). Une communauté diversifiée est aussi présente dans l'eau environnante et les sédiments (Frias-Lopez *et al.*, 2002 ; Bourne et Munn, 2005). Les bactéries associées aux coraux sont divisées en quatre groupes fonctionnels : 1) les bactéries ayant possiblement un rôle dans la nutrition du corail ; 2) les bactéries pathogènes ; 3) les bactéries probiontes aidant à la croissance des bactéries bénéfiques et limitant la croissance des pathogènes et 4) les bactéries purement commensales n'ayant aucun impact sur les trois autres groupes (Klaus *et al.*, 2005).



production et d'excrétion ne sont que sommairement connus. Le mucus forme généralement une barrière physique, protégeant les tissus des coraux. L'action des vagues et des courants cause l'abrasion de cette barrière, qui doit être constamment « reconstruite » par les mucocytes (Brown et Bythell, 2005).

C'est surtout grâce au mucus, et à sa richesse en composés carbonés, que les coraux favorisent la croissance des bactéries (Rohwer *et al.*, 2002). Le mucus est en effet constitué d'une fraction importante de matière organique dissoute (56 à 80 %) qui est rapidement reminéralisée par les bactéries (Brown et Bythell, 2005). La colonisation du mucus par les procaryotes forme un biofilm à la surface des coraux. Cet assemblage de bactéries et d'archaea est beaucoup plus diversifié et contient des concentrations supérieures aux communautés bactériennes de la colonne d'eau (Kellogg, 2004). Par contre, la contribution des bactéries au carbone contenu dans le mucus est faible (< 0,1 % du carbone total contenu dans le mucus).

La composition des communautés bactériennes associées au mucus peut dépendre de facteurs tels que la présence d'antibiotiques, l'apport de bactéries de la colonne d'eau, la composition et la production du mucus lui-même (Brown et Bythell, 2005), la variabilité génétique, les conditions environnementales dont la qualité physico-chimique de l'eau (température, salinité et concentration en nutriments), ainsi que la proximité du récif à la côte (Guppy et Bythell, 2006). Les coraux peuvent contrôler la composition des assemblages bactériens du mucus. Par exemple, les bactéries fixatrices d'azote ou inhibant la croissance des pathogènes peuvent être favorisées, car elles sont bénéfiques au corail

l'environnement des tissus coralliens devient anoxique la nuit en raison de la respiration des zooxanthelles. Il en résulterait alors une alternance entre la photosynthèse des zooxanthelles de jour et la fixation d'azote des bactéries la nuit. Cependant, les bases exactes de la relation existant entre les coraux et ce type de bactéries ne sont pas encore connues. D'autres études ont montré la présence de bactéries productrices d'antibiotiques, qui protégeraient les coraux contre les pathogènes (Rohwer *et al.*, 2002) ou productrices de vitamines (Ritchie, 2006). D'autres associations sont aussi spécifiques, telles que celle observée entre des *gamma*-protéobactéries et les espèces de *Porites* (*P. furcata* et *P. asteroides*) ou bien encore l'association entre *Cytophaga-Flavobacter/Flexibacter-Bacterioides* (CFB) et le corail *Diploria strigosa*, une espèce produisant beaucoup de mucus. Or, les CFB sont particulièrement adaptées pour briser les polysaccharides (Rohwer *et al.*, 2002). Finalement, la communauté bactérienne associée aux tissus coralliens sains est unique et se distingue de celle présente dans la colonne d'eau par sa diversité et l'abondance de ses populations (Frias-Lopez *et al.*, 2002).

Les bactéries peuvent également être associées avec le squelette des coraux (Rohwer *et al.*, 2002). Une propriété commune à l'ensemble des biominéraux est la présence d'une fraction organique, dénommée matrice organique, intimement liée à la structure squelettique. Cette matrice ne résulte pas d'une incorporation des tissus coralliens, mais d'une sécrétion dirigée de molécules spécifiques pouvant servir à la colonisation microbienne.

activités humaines et les changements climatiques couplés aux oscillations extrêmes d'El Niño contribuent donc à l'apparition de nouvelles maladies chez les coraux qui ont pris des proportions épidémiques dans certaines régions, ce qui constitue un problème écologique majeur (Ben-Haim et Rosenberg, 2002).

On observe ainsi l'apparition de nombreuses maladies dont la maladie de la bande noire (black band disease, BBD) causée par un regroupement bactérien comprenant des cyanobactéries (Cooney *et al.*, 2002 ; Frias-Lopez *et al.*, 2002). L'agent causal de la peste blanche de type II (white plague type II, WP2) est *Aurantimonas corallicida* (Denner *et al.*, 2003), de l'ordre des Rhizobiales (*alpha*-protéobactéries). Pour sa part, la maladie de la bande blanche de type I (white band disease type I, WBD1) trouve son origine dans une espèce de *Vibrio* (Richardson *et al.*, 2001). La varicelle blanche (white pox) est liée à la présence de *Serratia marcescens*, une *gamma*-protéobactérie d'origine humaine (Patterson *et al.*, 2002). Les tumeurs coralliennes sont aussi d'origine bactérienne avec des espèces de *Vibrio* comme pathogènes (Breitbart *et al.*, 2005). Le blanchissement des coraux peut être provoqué par des espèces de *Vibrio*. Par exemple, *Vibrio coralyticus* s'attaque à *Pocillopora damicornis* en Australie (Ben-Haim et Rosenberg, 2002). Les *Vibrio* sont aussi responsables de la maladie de la tache/bande jaune (yellow blotch/band disease, YBD) (Cervino *et al.*, 2004).

L'élévation de la température de l'eau peut favoriser le développement des pathogènes, leur taux de croissance, leur transmission et diminuer la résistance de l'hôte (Jones *et al.*, 2004 ; Rosenberg et Ben-Haim, 2002) car les propriétés antibactériennes du

## ESPÈCES MODÈLES

Les trois espèces de coraux scléactiniaires utilisées dans ce travail sont : *Galaxea fascicularis* (Linnaeus, 1767) de la famille des Oculinidae, *Pavona cactus* (Forskål, 1775) de la famille des Agaricidae et *Turbinaria reniformis* Bernard, 1896 de la famille des Dendrophylliidae.



Fig. 1. Distribution géographique de *Galaxea fascicularis* (Veron, 2000).

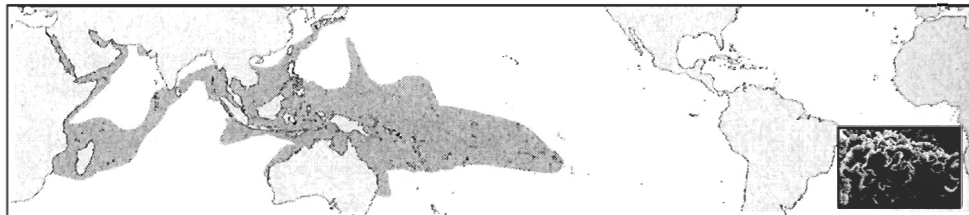


Fig. 2. Distribution géographique de *Pavona cactus* (Veron, 2000).

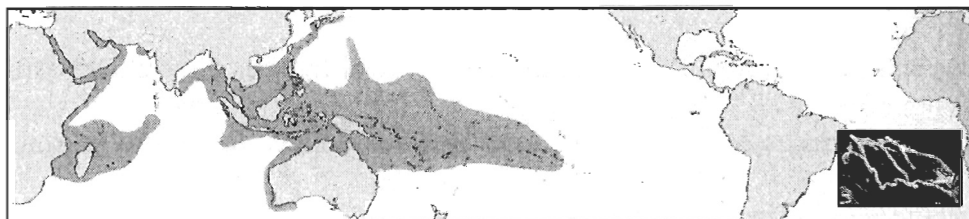


Fig. 3. Distribution géographique de *Turbinaria reniformis* (Veron, 2000).

en laboratoire permettent de manipuler le système et de donner une autre vision du fonctionnement de l'association coraux-bactéries. Par ailleurs, les bactéries associées aux coraux de culture sont de bons indicateurs de leur santé et leur analyse ainsi que la compréhension de leur fonctionnement seront des paramètres utiles en aquaculture ou lors de transplantations.

Le but général de cette étude était de caractériser la diversité bactérienne associée aux espèces de coraux *G. fascicularis*, *P. cactus* et *T. reniformis* maintenus en conditions de culture et de définir l'influence du mucus produit par les coraux sur ces communautés. La communauté bactérienne de l'eau de mer environnant les coraux a aussi été prise en compte, pour fin de comparaison. Les objectifs spécifiques poursuivis visaient à :

- Décrire les communautés bactériennes de l'eau de mer et celles associées au mucus, au complexe tissu/mucus et au squelette dénudé des trois espèces de coraux étudiés. Les questions posées sont : 1) est-ce que les communautés bactériennes sont différentes selon l'espèce de corail étudiée et selon les structures coralliennes observées (complexe tissu/mucus ou squelette) et 2) est-ce que la communauté bactérienne de l'eau de mer diffère de celle associée aux coraux?

- Décrire la relation entre la composition et la quantité de mucus produite par les espèces de coraux et la composition de la communauté bactérienne en termes de nombre d'espèces et de la diversité. En effet, il a été supposé que certaines espèces bactériennes sont plus aptes à utiliser les mucopolysaccharides composant le mucus que d'autres.

l'abondance relative des phylotypes ne peuvent pas être évaluées avec une telle empreinte génétique. De telles analyses sont par contre possibles en utilisant le pyroséquençage ou le clonage intensif (Curtis *et al.*, 2002 ; Sogin *et al.*, 2006), mais ces techniques sont laborieuses et coûtent cher. Nous avons également quantifié les concentrations de carbone total dissous dans l'eau de mer afin de mesurer le taux d'excrétion du mucus par les coraux et utilisé la technique de chromatographie en phase gazeuse (Zanetta *et al.*, 1999) pour évaluer les différents pourcentages des sucres présents dans le mucus. Finalement, la cytométrie en flux a permis de déterminer facilement l'abondance bactérienne dans l'eau de mer en peu de temps (Gasol et del Giorgio, 2000 ; Brussaard, 2004).

## **CHAPITRE II**

# **BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE TISSUE AND SKELETON OF THREE SCLERACTINIAN CORALS: RELATIONSHIP WITH MUCUS EXCRETION AND COMPOSITION**

Article à soumettre

***BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE TISSUE  
AND SKELETON OF THREE SCLERACTINIAN CORALS:  
RELATIONSHIP WITH MUCUS EXCRETION AND COMPOSITION***

**Pascale Tremblay<sup>1,2</sup>, Markus G. Weinbauer<sup>3</sup>, Cécile Rottier<sup>1</sup>, Yann  
Guérardel<sup>4</sup>, Christian Nozais<sup>2</sup> and Christine Ferrier-Pagès<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centre Scientifique de Monaco, Av. St-Martin, MC-98000 Monaco

email : ptremblay@centrescientifique.mc

<sup>2</sup>Departement de biologie et centre d'études nordiques, Université du Québec à Rimouski,  
300 allée des Ursulines, Rimouski, QC Canada G5L 3A1

<sup>3</sup>CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Université Pierre et Marie Curie-  
Paris 6, 06230 Villefranche-sur-Mer, France

<sup>4</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche n° 8576 du  
Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Fédératif de Recherche 147,  
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France



## RÉSUMÉ

Les coraux vivent en étroite relation avec des communautés bactériennes, mais la nature exacte de cette association demeure inconnue. Dans cette étude, trois espèces de coraux scléactiniaires *Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* et *Turbinaria reniformis* ont été incubés dans le même aquarium, en milieu fermé. La composition de la communauté bactérienne associée au complexe tissu/mucus et au squelette des coraux ainsi qu'à l'eau de mer a été analysée par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) à partir d'amplicons du gène d'ARNr 16S. Le but de ce travail est de vérifier si la communauté bactérienne est spécifique à l'espèce de coraux et si la quantité et la composition du mucus produit influence la diversité retrouvée dans les tissus coralliens. L'excrétion de mucus est significativement différente pour les trois espèces de coraux avec un taux d'excrétion plus élevé chez *G. fascicularis*. Le mucus de *G. fascicularis* et *P. cactus* contient principalement du galactose et du glucose comparativement au mucus de *T. reniformis* qui contient du glucose et du xylose. Les résultats ont montré que la communauté bactérienne associée aux tissus est spécifique à l'espèce corallienne tandis que celle associée au squelette est plus homogène pour les trois espèces. Le séquençage des bandes de DGGE a montré deux nouveaux genres bactériens (< 90 % de similarité) associés au tissu de *P. cactus*. La plus haute richesse apparente a été retrouvée dans le tissu de *G. fascicularis*, lequel présente également le plus haut taux d'excrétion de mucus. Ceci suggère que les différences observées quant à la quantité et la composition du mucus excrété peuvent partiellement expliquer les différences retrouvées dans la composition des communautés bactériennes entre les tissus des trois espèces coralliennes, même si d'autres facteurs peuvent influencer cette composition.

**Mots-clés : Coraux, bactéries, mucus, ARNr 16S, électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)**

## INTRODUCTION

Since the works of DiSalvo (1971) and Sorokin (1973), it has been recognized that there is a dynamic microbiota associated with corals (Herndl and Velimiroz, 1986; Ritchie and Smith, 1997; Rohwer *et al.*, 2001) especially with their mucus layer, which is an important substrate for bacterial growth (Ferrier-Pagès *et al.*, 2000; Brown and Bythell, 2005). Interest in coral-associated microbes is increasing, because corals are also increasingly threatened by environmental changes and pollution, inducing bacteria-mediated diseases (Harvell *et al.*, 1999).

A lot of studies have therefore examined pathogenic bacteria, in order to identify microbes present at the site of disease which can sometimes also be the causal agents (Frias-Lopez *et al.*, 2002; Pantos *et al.*, 2003; Bourne, 2005). Conversely, marine microbial systems associated with healthy corals have been poorly characterized (Rohwer *et al.*, 2001; 2002; Frias-Lopez *et al.*, 2002; Bourne and Munn, 2005), especially because culture-independent techniques (*e.g.* PCR, DGGE) have not been employed until relatively recently. However, more than 400 bacterial ribotypes, most of them observed only once, were found in 14 coral samples from Bermuda and Panama (Rohwer *et al.*, 2002). From all the existing studies, it has been suggested that bacterial communities were different between coral species and those living in the surrounding seawater or on biofilms associated to rocks. Some coral-bacterial associations were even found to be maintained across distant locations, such as the PA1 *gamma*-proteobacterium detected on *Porites* spp. from Panama and Bermuda (Rohwer *et al.*, 2002). Archaea are also associated with corals

amount of mucus excreted by each coral species were also analyzed to link bacterial diversity and mucus type. The following questions were addressed: (1) Is bacterial and archaeal community composition similar between the tissue/mucus and skeleton compartments of the same coral species? (2) Is bacterial and archaeal community composition similar between corals and seawater? In other words, is bacterial community maintained by its host or does it represent only a settler community? To answer this question, corals were incubated during 72 h in a closed system, in which seawater was not renewed, in order to allow the possible establishment of some equilibrium between seawater and coral microbiota or to allow possible exchange of microbes; (3) Is bacterial and archaeal community composition similar between coral species which have been incubated in the same medium and under the same conditions? (4) Is there a relationship between mucus composition and/or production and bacterial community composition?

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Biological material**

Except for the mucus composition, all experiments were carried out with nubbins (2 cm long and 1 cm large ) prepared from three parent colonies of the following species: *Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*, originating from the Red Sea and maintained in the aquaria of the Centre Scientifique de Monaco. Nine nubbins were prepared for each species (three per parent colony) and were used only when the tissue had regenerated above the skeleton. For this purpose, parent colonies and nubbins were all incubated during 3 weeks in a 32 l tank continuously supplied with unfiltered

subtracting the amount of carbon measured in the control beakers (natural organic carbon content of the seawater) to the total amount of carbon measured in the beakers containing coral colonies. These rates were normalized to protein content. Therefore, proteins were extracted at 90°C in 1N NaOH for 30 minutes and measured using the BC Assay Kit, (Interchim, Montluçon, France) (Smith *et al.*, 1985). The standard curve was established using bovine serum albumin and the absorbance was measured with a multiscan bichromatic spectrophotometer (Labsystem, Helsinki, Finland).

For the analysis of mucus composition, a large amount of mucus was needed. Thus, the three parent colonies of each species were suspended upside down above a beaker. The mucus and seawater mixture obtained was transferred during 24 h in a Spectra/Por 3 dialysis membrane (Spectrum Laboratories, Inc., Breda, The Netherlands) incubated into 5 l distilled seawater to further purify it and clean it from salts. The mucus was then freeze-dried and its composition in monosaccharide was analyzed by gas chromatography after methanolysis as heptafluorobutyrate derivatives (Zanetta *et al.*, 1999).

### **Bacterial community composition**

Six nubbins from each coral species (two nubbins per parent colony) were used to assess the bacterial community composition associated with the tissue and skeleton of the three coral species. The eighteen nubbins in total were incubated in a 32 l tank under the same conditions as described above, except that feeding was avoided and seawater renewal was shut down during three days. At the end of the incubation, all nubbins were treated as

Mastercycler gradient thermocycler by nested PCR using the following procedure. For bacteria, the first PCR round was performed using the 27F bacterial-specific primer (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') and the 1492R universal primer (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (Lane, 1991) as follows: 1 to 2 µl of template, 0.5 µM of each primer, 1X Taq PCR Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France) and adjusted to a final volume of 25 µl with sterile water. The cycles were as follow: 5 min at 94°C, followed by 20 cycles of: 30 sec 94°C, 1 min 56.6°C, 1 min 30 sec 72°C and 7 min at 72°C. Positive and negative controls were also performed. The second PCR round, for bacteria, was carried out according to Schäfer and Muyzer (2001) except that the extension time was reduced to 1 minute using the primers 341F-GC/907R. Products of the first round were diluted for the second round 10 to 1000 fold for tissue and skeleton and up to 10<sup>6</sup> for water in 50 µl PCR reaction. For amplification of the archaeal 16S rRNS gene, the first PCR round was performed using the 21F (5' - TTCCGGTTGATCCYGCCGGA - 3' (Delong, 1992)) archaea-specific primer and the 1492R or 1517R (5'- ACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3' (Vetriani *et al.*, 1999)) universal primers as follows: 5 min at 94°C, 45 cycles of: 30 sec 94°C, 1 min 57°C, 1 min 30 sec 72°C and 7 min at 72°C. The second PCR round, for archaea, was performed according to Schäfer and Muyzer (2001) using the primers 344F-GC/915R. Products from the first PCR round were not diluted for the second round. PCR products were checked on a 1% agarose gel.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was then performed following Schäfer and Muyzer (2001). PCR products were separated into bands by electrophoresis for 18 h at 100 V on 6 % acrylamide gels prepared using a denaturing gradient from 30 to 70%

GenBank was performed using Sequin and the accession numbers generated are EU847587 through EU847611.

### **Statistics**

Statistics were performed using Sas 9.1.3. Mucus excretion rates were tested using a one-way analysis of variance (ANOVA) with triplicate values. The apparent richness was calculated using the number of detectable bands at 3.5 % of intensity and the apparent Shannon diversity ( $H = - \sum p_i \ln p_i$ ) with the band intensities ( $p_i$ ). Results from each species and compartments were expressed as average value and standard error. The apparent Shannon diversity index is an index that is commonly used to characterize species diversity in a community. Significant differences between species and compartments were tested using a factorial ANOVA with six replicate values. Significant difference between species/compartments and water were tested using a one way ANOVA with six replicates for species/compartments and three replicates for water. The ANOVAs were followed by a posthoc test analysis (Tukey's test) when significant. Data were checked for normality using a Shapiro-Wilk's test. When normality was not fulfilled, a data transformation was performed (*e.g.* mucus excretion transformed in  $\ln$ ). Differences between factors were considered significant for a  $p$  value  $< 0.05$ .

A similarity matrix of Bray-Curtis was constructed from percent band intensities for tissue and skeleton. A cluster analysis using an unweighted-pair group average (UPGMA) was used to determine the relationship among samples.

a significant interaction between species and compartments (*i.e.* tissue/mucus and skeleton) (ANOVA, Table 1). The results of posthoc test analyses (Tukey's test) for apparent richness and apparent Shannon index showed in the Table 2. The apparent richness index showed significant differences in the bacterial community composition between the tissue of *P. cactus* and (1) its skeleton; (2) the skeletons of *G. fascicularis* and *T. reniformis*; and (3) the tissue of *G. fascicularis*. This index also showed a significant difference between the tissue of *T. reniformis* and the tissue and skeleton of *G. fascicularis*. The apparent Shannon index mainly showed that the bacterial community composition of the tissue of *P. cactus* was significantly different (1) from its skeleton; (2) from the skeletons of *G. fascicularis* and *T. reniformis*; and (3) from the tissue of *G. fascicularis* and *T. reniformis*. No significant differences were found in the apparent Shannon indices of the skeletons of the three coral species.

A one way ANOVA also showed a significant difference between species and water samples in the apparent richness ( $F_{(0.05; 6, 32)} = 11.02$  and  $p < 0.0001$ ) and apparent Shannon index ( $F_{(0.05; 6, 32)} = 12.35$  and  $p < 0.0001$ ). The apparent richness was different between water and *G. fascicularis* tissue and skeleton, *P. cactus* skeleton and *T. reniformis* skeleton. For the apparent Shannon index, there were differences between water and *G. fascicularis* tissue and skeleton, *P. cactus* skeleton, *T. reniformis* tissue and skeleton (Table 2).

Concerning the tissue samples, the cluster analysis showed two main groups (Fig. 5). The first group was represented by *G. fascicularis* nubbins only. The second group included three sub-groups, the first one represented by nubbins of *P. cactus* only, the

*Gamma*-proteobacteria were detected from all coral and seawater samples except from the tissue of *P. cactus*. Conversely, *T. reniformis* was lacking *alpha*-proteobacteria while *P. cactus* and seawater were lacking *Bacteroidetes*. *Delta*-proteobacteria were observed only in the tissue of *P. cactus*, while archaea, were only found in the incubation water (Table 3).

Fig. 3 represents the main bands sequenced in the tissue of each species and in seawater. Some bacterial species were specific to one coral species: the EU847598 related to mucus bacterium 86 was specific to *G. fascicularis*, the EU847602 related to uncultured proteobacterium JL-WNPG-T23 to *P. cactus* and the EU847605 related to uncultured organism ctg\_CGOF078 to *T. reniformis*. The EU847598 was also found in the skeleton of *G. fascicularis* (EU847590) and EU847605 in skeleton of *T. reniformis* (EU847595) (Table 3).

## DISCUSSION

### **Bacterial community composition**

Simple genetic fingerprinting methods such as DGGE have been frequently used to assess whether bacterial and archaeal communities differ along environmental gradients or with experimental treatments. Analyses of DGGE profiles obtained for the three coral species, *G. fascicularis*, *P. cactus* and *T. reniformis* showed that the bacterial community associated with the tissue was specific to each coral species and different from seawater for two out of the three species. Analyses of the sequences retrieved from the main DGGE



in the tissue and 2.0-2.2 in the skeleton. 'True' diversity in the sense of all (or the majority) phylotypes and their relative abundance cannot be assessed by such a fingerprint. Such measurements are obtained by using pyrosequencing or intense cloning (Curtis *et al.*, 2002; Sogin *et al.*, 2006). However, these methods are labour-intensive. Thus, genetic fingerprints such as DGGE are used as indicators for changes in bacterial community composition when a large number of samples have to be analysed as in our study.

In this study, we did not separate the tissue from the mucus layer. Indeed, the method of using a syringe to remove mucus from the coral surface often results in the sampling of large amounts of surrounding water, and the tissue cannot be completely cleaned from its mucus. Differences in the bacterial community observed for each coral species can therefore originate from differences in the mucus quality or/and quantity, since this mucus contains high concentrations of proteins, polysaccharides and lipids that favour bacterial growth (Ferrier-Pagès *et al.*, 2000; Wild *et al.*, 2004). Few studies have assessed the mucus composition of different coral species (Ducklow and Mitchell, 1979; Meikle *et al.*, 1988). Only three studies have tried to link this composition to the diversity of the bacterial community associated with corals (Richie and Smith, 1997; 2004; Klaus *et al.*, 2007). The first two studies (Richie and Smith, 1997; 2004) showed that bacteria isolated and cultured from different coral species presented a selective utilization of carbon sources. Conversely, Klaus *et al.* (2007) found no correlation between mucus composition and bacterial diversity associated with the tissue of *Montastraea annularis*.

*reniformis*, *G. fascicularis* presented the highest excretion rate of mucus, with high galactose content. It was also the species presenting the highest Shannon index, summarized in the cluster analysis by the highest degree of difference with bacterial communities of the other species or seawater. High apparent richness and high apparent Shannon index values obtained by DGGE can also correspond to a high evenness, *i.e.* that the community is not strongly dominated by a few phylotypes. If this assumption holds, the high mucus production and the specific mucus composition of *G. fascicularis* could result in several important niches and thus, in a high evenness.

### **Sequence analysis of DGGE bands**

Partial identification due to sequencing can be done for detectable phylotypes. In this study, we identified the most intense DGGE bands of the tissue, common in samples of the same coral species and in the seawater. Since genetic fingerprints only detect a small number of phylotypes, conclusions are limited. For example, in classical PCR (without nested) the species present in less than 1 % of the DNA extract are not detected using community fingerprints. Target concentration is one of the major factors influencing PCR and DGGE, genetic fingerprints such as DGGE tend to detect the more abundant phylotypes, even though there are biases possible, *e.g.* due to primers used or multiple operons (Wintzingerode, 1997). Rare phylotypes can play a significant ecological role and we do not know whether they are different between coral compartments and species.

Concerning the archaeal community, some phylotypes were retrieved in the seawater samples only. The EU847697 related at 99 % to uncultured marine crenarchaeote

97 % to *Alteromonas* sp. R2m1, which was considered by Ritchie (2006) as associated to *Acropora palmata* and was showing antibiotic activity against the pathogen *Serratia marcescens*.

*P. cactus* was the coral species containing in its tissue/mucus the two potentially new genera (< 90 %) of proteobacteria (EU847601 and EU847602). This could indicate that the bacteria associated with *P. cactus* are highly specialized for this coral species, which was also the one presenting the lowest apparent richness and diversity index. EU847603 is closely related at 97 % to uncultured CAB-I bacterium, which has been reported as being a unique and ecologically dominant coral-associated bacterium (Klaus *et al.*, 2007). Preliminary studies also indicated that CAB-I is phototrophic and is a deep-rooted offshoot to the clade that now encompasses cyanobacteria and plastids. While the relationship between CAB-I and corals is currently unknown, previous studies have shown that endosymbiotic nitrogen fixing cyanobacteria were associated with the coral *Montastrea cavernosa* (Lesser *et al.*, 2004).

Concerning the last coral species *T. reniformis*, the new bacterial species (EU847605) consistently found in its tissue was most closely related at 95 % with the uncultured organism ctg\_CGOF078, which was also identified in the deep-sea bamboo corals (octocorals, Isididae) at about 600 m on Warwick seamount in the Gulf of Alaska (Penn *et al.*, 2006). In common with seawater samples (EU847609), *T. reniformis* also contained the EU847604 closely related at 99 % to the uncultured marine eubacterium OTU\_F. This bacterium was retrieved in coastal marine bacterioplankton of the North Sea and was also

usually found colonizing the surface of marine samples from coastal waters (Dang and Lovell, 2002). The last interesting bacterial phylotype sequenced from the skeleton of *P. cactus* was EU847591 closely related at 99 % to *alpha*-proteobacterium *Silicibacter*. It has been found associated with healthy tissue of several other coral species (Williams *et al.*, 1987; Shashar *et al.*, 1994; Rohwer *et al.*, 2001) and has been involved in nitrogen fixation. It seems recurrent in many species, even those cultured in aquaria. Therefore this bacterium could be a candidate for forming a symbiotic relationship with corals.

## CONCLUSION

The performed experiments have shown that the bacterial community composition associated with coral tissue can be species-specific, even when coral species are incubated all together in the same closed environment. This specificity seems, in part, to be linked to the quality and quantity of mucus produced. *G. fascicularis* indeed presented the highest production rates, the highest quantity of glucose, and also the highest apparent bacterial diversity (detectable as DGGE bands) measured for those corals. The bacterial community associated to the skeleton is more homogenous than the one found in the tissue. Sequencing of bands indicates potentially 11 new species including two new genera with a sequence similarity of the partial sequence of < 90 % associated with the tissue of *P. cactus*. Some bacterial species were specifically retrieved in all tissue samples of one coral species, such as EU847598 in *G. fascicularis*, EU847602 in *P. cactus* and EU847605 in *T. reniformis*.

**LITERATURE CITED**

- Bourne, D.G., 2005. Microbiological assessment of a disease outbreak on corals from Magnetic Island (Great Barrier Reef, Australia), *Coral Reefs* 24: 304-312.
- Bourne, D.G. and C.B. Munn, 2005. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef, *Environmental Microbiology* 7 (8): 1162-1174.
- Brown, B.E. and J.C. Bythell, 2005. Perspectives on mucus secretion in reefs corals, *Marine Ecology Progress Series* 296: 291-309.
- Curtis, T.P., W.T. Sloan and J.W. Scannell, 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10494-10499.
- Dang, H. and C.R. Lovell, 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine rhodobacter species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 496-504.
- DeLong, E.F., 1992. Archaea in coastal marine environments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12): 5685-5689.
- DiSalvo, L.H., 1971. Regenerative functions and microbial ecology of coral reefs: labelled bacteria in a coral reef microcosm, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 7: 123-136.
- Ducklow, H.W. and R. Mitchell, 1979. Composition of mucus released by coral reef coelenterates, *Limnology and Oceanography* 24 (4): 706-714.
- Ferrier-Pagès, C., N. Leclercq, J. Jaubert and S.P. Pelegri, 2000. Enhancement of pico- and nanoplankton growth by coral exudates. *Aquatic Microbial Ecology* 21 (2): 203-209.
- Frias-Lopez, J., A.L. Zerkle, G.T. Bonheyo and B.W. Fouke, 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5): 2214-2228.
- Harvell, C.D., K. Kim, J.M. Burkholder, R.R. Colwell, P.R. Epstein, D.J. Grimes, E.E. Hofmann, E.K. Lipp, A.D.M.E. Osterhaus, R.M. Overstreet, J.W. Porter, G.W. Smith and G.R. Vasta, 1999. Emerging marine diseases-Climate links and anthropogenic factors, *Science* 285: 1505-1510.

- Ritchie, K.B. and G.W. Smith, 1997. Physiological comparison of bacterial communities from various species of scleractinian corals, *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*: 521-526.
- Ritchie, K.B. and G.W. Smith, 2004. Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers, In: Rosenberg E. and Y. Loya (eds) *Coral health and disease*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 259-264.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam and N. Knowlton, 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral, *Montastrea franksi*, *Coral Reefs* 20: 85-91.
- Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam and N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria, *Marine Ecology Progress Series* 243: 1-10.
- Schäfer, H. and G. Muyzer, 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology, In: Paul J.H. (ed) *Marine microbiology: methods in microbiology*, Vol 30. Academic Press, San Diego, p. 425-468.
- Shashar, N., Y. Cohen, Y. Loya and N. Sar, 1994. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in stony corals: evidence for coral-bacteria interactions, *Marine Ecology Progress Series* 111: 259-264.
- Skoog, A. and R. Benner, 1997. Aldoses in various size fractions of marine organic matter: Implications for carbon cycling, *Limnology and Oceanography* 42 (8): 1803-1813.
- Smith, P.K., R.I. Khrohn, G.T. Hermanson, A.K. Malia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry* 150: 76-85.
- Sogin, M.L., H.G. Morrison, J.A. Huber, D.M. Welch, S.M. Huse, P.R. Neal, J.M. Arrieta and G.J. Herndl, 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32): 12115-12120.
- Sorokin, Y.I., 1973. Trophical role of bacteria in the ecosystem of the coral reef, *Nature* 242: 415-417.
- Stackebrandt, E. and J. Ebers, 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard, *Microbiology today* nov 06: 152-155.
- Vetriani, C., H.W. Jannasch, B.J. MacGregor, D.A. Stahl and A.-L. Reysenbach, 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10): 4375-4384.

## TABLES AND FIGURES

Table 1. Results of the factorial analysis of variance (ANOVA) for apparent richness and apparent Shannon index with two factors (species and compartments) and six replicates.

	Degrees of freedom	<i>p</i>	<i>F</i> value
<i>Apparent richness</i>			
Species	2	< 0.0001	14.69
Compartment	1	0.0044	9.48
Species*Compartment	2	0.0149	4.85
Error	30	-	-
<i>Apparent Shannon index</i>			
Species	2	< 0.0001	14.89
Compartment	1	0.0058	8.82
Species*Compartment	2	0.0100	5.39
Error	30	-	-

Table 3. 16S rDNA sequences of bacteria and archaea isolated from the tissue and skeleton of three coral species (*G. fascicularis*, *P. cactus* and *T. reniformis*) and seawater. Bands were excised from DGGE gels and sequenced.

GenBank No	Group	Most closely related hit in GenBank (Accession)	Identities (%)
<b><i>Galaxea fascicularis</i></b>			
<b>Tissue</b>			
EU847599	$\gamma$	<i>Alteromonas</i> sp. R2m1 (DQ530523)	97
EU847600	$\alpha$	Uncultured $\alpha$ -proteobacterium 4GB-6 (AY348732)	100
EU847598	<i>Bacteroidetes</i>	Mucus bacterium 86 (AY654823)	97
<b>Skeleton</b>			
EU847587	$\gamma$	Uncultured $\gamma$ -proteobacterium JL-ETNP-Y11 (AY726878)	100
EU847588	$\gamma$	Uncultured $\gamma$ -proteobacterium G010 (DQ376145)	99
EU847589	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium CD207F11(DQ200627)	94
EU847590	<i>Bacteroidetes</i>	Mucus bacterium 86 (AY654823)	97
			Mean ( $\pm$ SE) 97.7 $\pm$ 0.8
<b><i>Pavona cactus</i></b>			
<b>Tissue</b>			
EU847601	$\delta$	Uncultured $\delta$ -proteobacterium JT58-30 (AB189349)	83
EU847602	Unknown	Uncultured proteobacterium JL-WNPG-T23 (AY664120)	89
EU847603	Unknown	Uncultured CAB-I bacterium CD205E01 (DQ200535)	99
<b>Skeleton</b>			
EU847593	$\gamma$	Uncultured $\gamma$ -proteobacterium JL-ETNP-Y11 (AY726878)	100
EU847592	$\alpha$	Uncultured <i>Rhodobacter</i> bacterium D059 (AF367386)	99
EU847591	$\alpha$	<i>Silicibacter</i> sp. UST061013-011 (EF587958)	99
			Mean ( $\pm$ SE) 94.8 $\pm$ 2.9
<b><i>Turbinaria reniformis</i></b>			
<b>Tissue</b>			
EU847604	$\gamma$	Uncultured marine eubacterium OTU_F (AF207848)	99
EU847605	$\gamma$	Uncultured organism ctg_CGOF078 (DQ395878)	95
<b>Skeleton</b>			
EU847594	$\gamma$	Uncultured $\gamma$ -proteobacterium SS1_B_02_52 (EU050828)	96
EU847596	$\gamma$	<i>Acinetobacter</i> sp. ICS20401 (AY456205)	99
EU847595	$\gamma$	Uncultured organism ctg_CGOF078 (DQ395878)	95
EU847597	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium CD204E03 (DQ200448)	92
			Mean ( $\pm$ SE) 96.0 $\pm$ 1.1
<b>Seawater</b>			
EU847609	$\gamma$	Uncultured marine eubacterium OTU_F (AF207848)	99
EU847611	$\alpha$	Uncultured $\alpha$ -proteobacterium JL-ETNP-S48 (AY726859)	99
EU847610	Plastid	Uncultured phototrophic eukaryote CD207G12 (DQ200640)	99
EU847606	Archaea	Uncultured archaeon DALK16 (AJ631253)	94
EU847607	Archaea	Uncultured marine crenarchaeote VIDS1-33 (AY380736)	99
EU847608	Archaea	Uncultured <i>Halobacterium</i> sp. K22 (AM159640)	99
			Mean ( $\pm$ SE) 98.2 $\pm$ 0.8



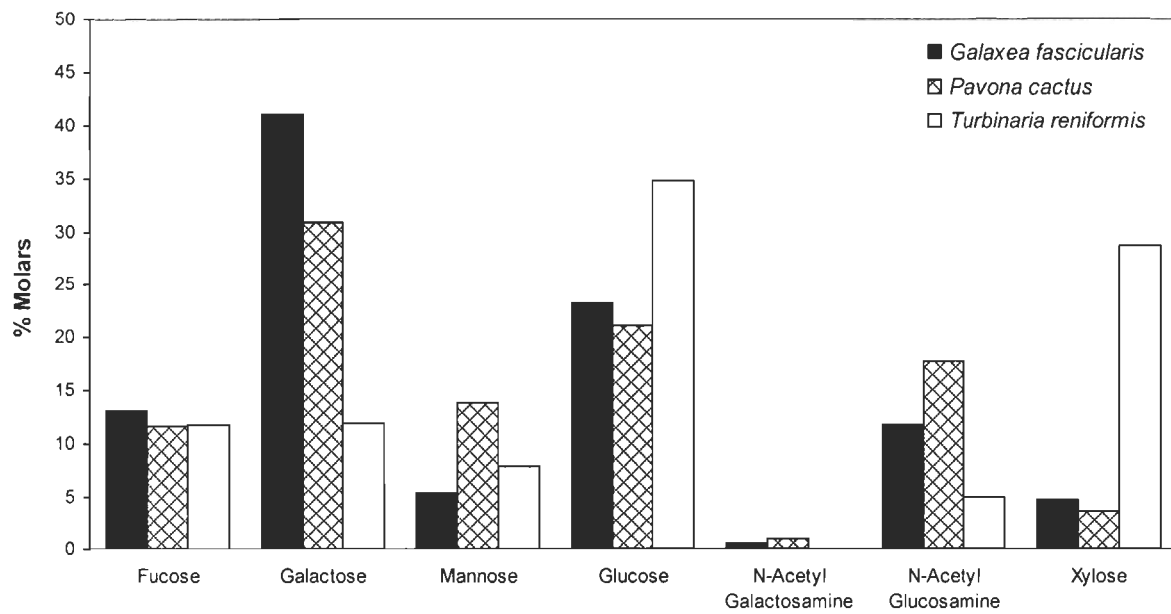


Fig. 2. Monosaccharides produced by the three coral species (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*).

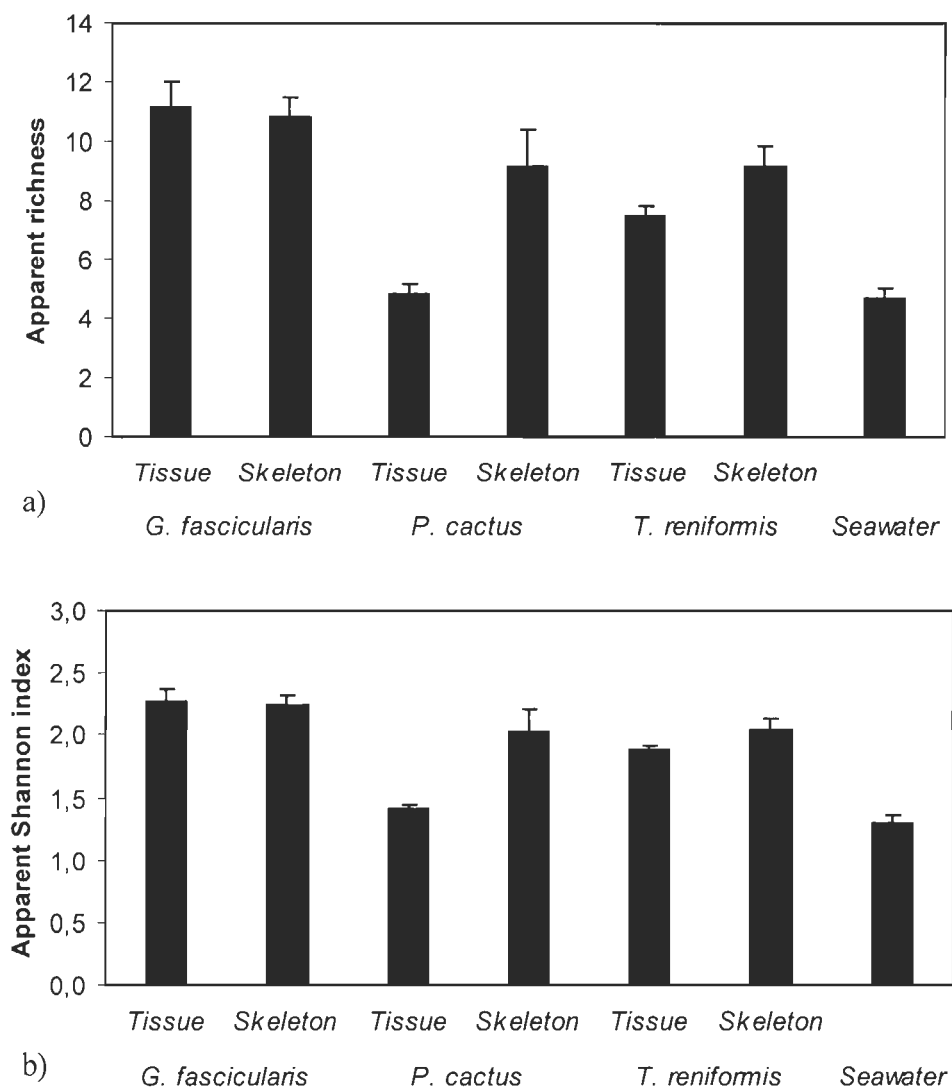


Fig. 4. a) Bacterial apparent richness and b) bacterial apparent Shannon index (mean  $\pm$  standard error) for the three species (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*) and the two compartments (tissue and skeleton) in six replicated coral samples and three replicated water samples.

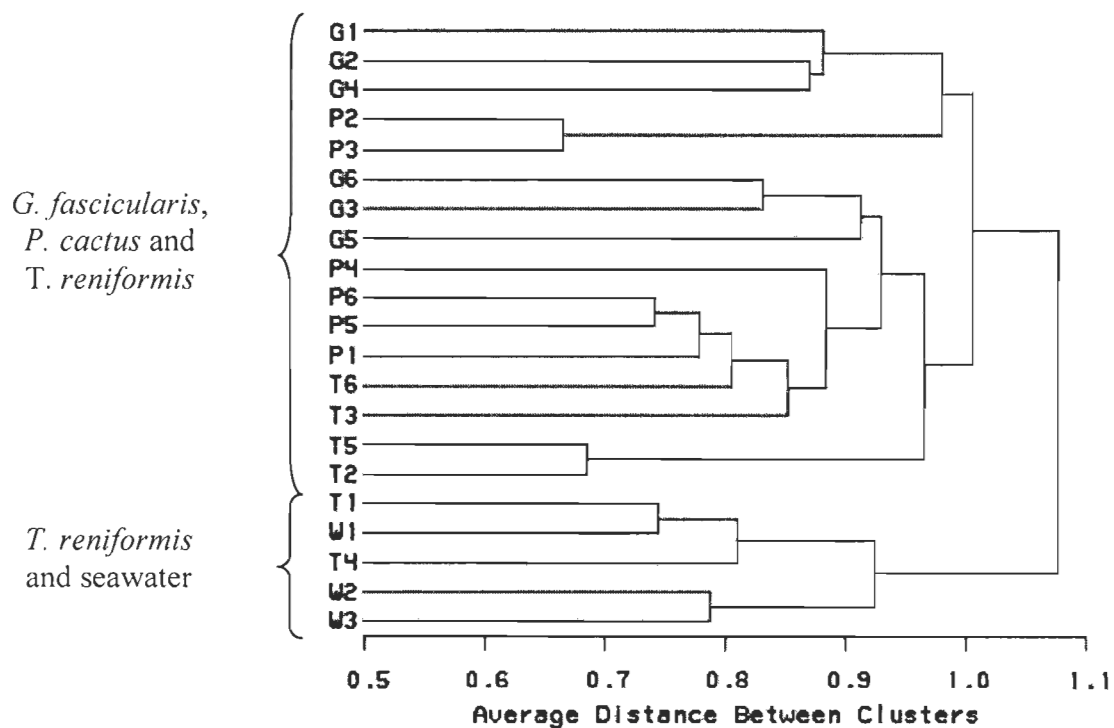


Fig 6. Cluster analysis (UPGMA) for bacteria made with skeleton samples of the three species, *Galaxea fascicularis* (G), *Pavona cactus* (P), *Turbinaria reniformis* (T) and the incubation seawater (W). Six nubbins from three parent colonies were used for each coral species and water samples were considered in triplicate.

### **CHAPITRE III**

## **EFFETS DE L'AQUARIUM ET DE LA PRÉSENCE D'UNE ARRIVÉE D'EAU SUR LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES AUX CORAUX**

## RÉSUMÉ

Les études en laboratoire, en conditions contrôlées, sur les communautés bactériennes associées aux coraux sont rares. Cependant, elles permettent de manipuler le système et de donner une autre image de la relation entre les coraux et les bactéries. Cette étude a consisté à tester, sur les espèces de coraux et sur l'eau de mer, les effets de deux facteurs importants pour la poursuite des expérimentations, soit « l'effet aquarium » et l'effet de la fermeture du circuit. Afin de vérifier « l'effet aquarium », les boutures de deux espèces (*G. fascicularis* et *P. cactus*) ont été incubées dans deux aquariums dans les mêmes conditions de culture, en dehors de tout stress. Pour tester l'effet du circuit, les trois espèces de coraux ont été incubées dans deux aquariums et des échantillons ont été récoltés en circuit ouvert puis après l'arrêt du renouvellement constant en eau (circuit fermé). La composition de la communauté bactérienne associée au complexe tissu/mucus des coraux ainsi qu'à l'eau de mer a été analysée par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant. Les résultats ont montré qu'il n'y a pas d'effet de l'aquarium. Par contre, il y a un effet du circuit sur l'indice de Shannon apparent. *T. reniformis* montre en effet une différence significative de cet indice selon le circuit. Celui-ci est plus élevé en circuit ouvert qu'en circuit fermé. Cela suggère que le renouvellement d'eau (circuit ouvert) est favorable au développement d'un plus grand nombre d'espèces bactériennes chez *T. reniformis*. De plus, les différents aquariums et le circuit (ouvert ou fermé) n'affectent pas la spécificité des communautés bactériennes associées aux coraux.

## INTRODUCTION

Les relations entre les coraux et les bactéries ont surtout été étudiées *in situ* (Rohwer *et al.*, 2001 ; 2002, Frias-Lopez *et al.*, 2002 ; Bourne et Munn, 2005). Les travaux en laboratoire, en conditions contrôlées, sont beaucoup plus rares (Kooperman *et al.*, 2007). Cependant, ils permettent de manipuler le système et de donner une autre image du fonctionnement de l'association coraux-bactéries. Même si les communautés bactériennes associées aux coraux de culture ne représentent pas une image parfaite de la diversité bactérienne associée aux coraux *in situ* (Kooperman *et al.*, 2007), leur étude permet de mieux comprendre les modifications engendrées dans cette communauté par les variations des paramètres environnementaux. De plus, les bactéries associées aux coraux de culture sont de bons indicateurs de la santé des coraux et leur analyse ainsi que la compréhension de leur fonctionnement seront des paramètres utiles en aquaculture ou lors de transplantations.

Les expériences en laboratoire possèdent cependant leur lot de restrictions. Il faut par exemple tester ce que l'on appelle communément « l'effet aquarium », c'est-à-dire tester si la communauté bactérienne associée à une espèce de corail varie d'un aquarium à un autre, à cause d'arrivées d'eau de mer différentes ou de développement d'une microflore différente entre les aquariums. Ainsi, un effet de l'aquarium sur les communautés bactériennes réduirait grandement les possibilités de comparaisons entre différentes conditions expérimentales et contrôles.

communauté bactérienne associée aux tissus. Afin d'assurer une bonne cicatrisation des tissus coralliens après le bouturage, les boutures ont été préalablement incubées pendant trois semaines dans deux aquariums (trois boutures par espèce et par aquarium) de 32 l continuellement approvisionnés en eau de mer Méditerranéenne non-filtrée, pompée à 50 m de profondeur et chauffée à  $26,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ . Les coraux ont été nourris deux fois par semaine avec des nauplii d'*Artemia salina* et ont été maintenus sous une intensité lumineuse d'environ  $140\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  fournie par une lampe « HQI metal halide » de 400 watts avec une photopériode de 12 heures de luminosité et 12 heures d'obscurité. Ensuite, l'arrivée d'eau de mer et le nourrissage ont été interrompus dans les aquariums pendant trois jours. À la fin des trois jours d'incubation, les coraux ainsi que deux échantillons d'un litre d'eau de mer ont été prélevés et congelés à  $-80\text{ °C}$ . Les analyses moléculaires (extraction d'ADN, PCR et DGGE) ont été effectuées comme précédemment décrites dans le chapitre II.

### **Effet du circuit**

Afin de vérifier si la composition de la communauté bactérienne associée aux coraux est comparable en circuit ouvert et fermé, une deuxième expérience a été réalisée. Des boutures des trois espèces de coraux (*G. fascicularis*, *P. cactus* et *T. reniformis*), préalablement cicatrisées ont été incubées dans deux aquariums en circuit ouvert durant six jours dans les conditions décrites précédemment. À la fin des six jours, trois boutures de chaque espèce ainsi que deux échantillons d'un litre d'eau de mer ont été prélevés dans chaque aquarium et congelés à  $-80\text{ °C}$ . Deux jours plus tard, l'arrivée d'eau a été coupée

Tukey pour distinguer les différences sur les facteurs significatifs. Pour celui-ci, les valeurs du  $q$  ont été considérées comme significatives lorsqu'elles sont supérieures au  $q_{0,05(\infty, 3)} = 4,120$ .

Une matrice de similarité de Bray-Curtis a été construite à partir de l'intensité relative des bandes pour chacune des espèces prélevées dans les deux aquariums ou en fonction du circuit. Une analyse de groupement avec liens moyens à poids égaux (UPGMA) a été utilisée afin de déterminer les relations entre les échantillons. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel Sas 9.1.3. Par contre, les valeurs de  $p$  pour le test de Sheirer-Ray-Hare ont été calculées avec la calculatrice NCSS Probability Calculator 6.0.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Effet de l'aquarium

La Fig. 1 montre la richesse bactérienne apparente moyenne (a) et l'indice de Shannon apparent moyen (b) pour chacune des espèces ainsi que pour l'eau de mer. Les ANOVAs sur ces deux paramètres montrent qu'il n'y a pas d'effet de l'aquarium, ni d'interaction entre l'espèce et l'aquarium. Il y a par contre un effet significatif de l'espèce (Tableau 1). *G. fascicularis* possède la plus haute valeur pour la richesse apparente ainsi que pour l'indice de Shannon apparent.

La Fig. 2 montre aussi qu'il n'y a aucun effet de l'aquarium sur la communauté bactérienne associée à chaque espèce corallienne et à l'eau de mer. En effet, l'eau de mer et



est en effet plus élevé en circuit ouvert qu'en circuit fermé (Fig. 3). L'indice de Shannon apparent moyen de *T. reniformis* passe de  $1,48 \pm 0,13$  en circuit fermé à  $1,97 \pm 0,08$  en circuit ouvert. Ceci suggère que la fermeture du système ne favorise pas le développement de toutes les espèces bactériennes. Parmi les espèces coralliennes, seul *T. reniformis* semble influencé par l'ouverture/fermeture du circuit. Ceci peut s'expliquer par le fait que sa communauté bactérienne soit aussi la plus proche de l'eau de mer (même regroupement dans les analyses de groupement, Fig. 4 et 5 ; Fig. 5 du chapitre II et Fig. 7 du chapitre IV). En effet, une augmentation de l'indice de Shannon apparent des échantillons d'eau de mer est également observée, passant de  $1,55 \pm 0,18$  en circuit fermé à  $2,35 \pm 0,04$  en circuit ouvert. On peut aussi observer que *G. fascicularis* a un indice de Shannon apparent différent de celui de *P. cactus* et de *T. reniformis*, indépendamment du circuit considéré. De même, les indices de Shannon apparents de *P. cactus* en circuit ouvert et en circuit fermé sont différents de ceux de *T. reniformis* en circuit ouvert.

La Fig. 4 obtenue en circuit ouvert illustre deux groupes. Le premier groupe est composé de *P. cactus* uniquement. Le second groupe est divisé en deux sous-groupes, le premier étant constitué par les boutures de *G. fascicularis* et le second étant constitué par les boutures de *T. reniformis* et par les échantillons d'eau de mer. Par ailleurs, cette figure confirme les résultats précédents montrant que l'aquarium n'a pas d'effet sur la communauté bactérienne associée aux coraux et à l'eau de mer.

La Fig. 5 est obtenue avec des échantillons prélevés en circuit fermé. Elle montre également deux groupes. Cependant, le premier groupe est composé de *G. fascicularis*

## CONCLUSION

Ces résultats confirment la spécificité des communautés bactériennes associées aux tissus coralliens sans égard à l'aquarium ni au circuit. Le renouvellement constant d'eau de mer (circuit ouvert) est propice au développement d'un plus grand nombre d'espèces bactériennes chez *T. reniformis* uniquement et dans l'eau de mer. L'arrêt de l'arrivée d'eau conduit à la croissance de bactéries plus spécialisées. Le résultat le plus important est qu'il n'y a pas d'effet de l'aquarium sur la communauté bactérienne observée chez les espèces de coraux, ce qui est propice à la suite des études. À présent, il est possible de vérifier l'effet des paramètres environnementaux ou l'effet de la présence/absence des coraux sur la composition des communautés bactériennes de l'eau et des coraux.

Tableau 2. Résultats du test non paramétrique de Sheirer-Ray-Hare sur la richesse apparente et de l'analyse de variance (ANOVA) sur l'indice de Shannon apparent à deux facteurs croisés (espèces et circuits) avec 6 réplicats pour le circuit ouvert et 5 réplicats pour le circuit fermé.

Sources de variation	Degré de liberté	<i>p</i>	Variable auxiliaire ( <i>H</i> ou <i>F</i> )
<i>Richesse apparente (Test de Sheirer-Ray-Hare)</i>			
Espèces	2	< 0,0001	28,41
Circuits	1	0,1573	2,21
Espèces*Circuits	2	0,6065	1,63
Erreur	32	-	-
<i>Indice de Shannon apparent (Analyse de variance)</i>			
Espèces	2	< 0,0001	78,10
Circuits	1	0,0009	13,82
Espèces*Circuits	2	0,0365	3,75
Erreur	32	-	-

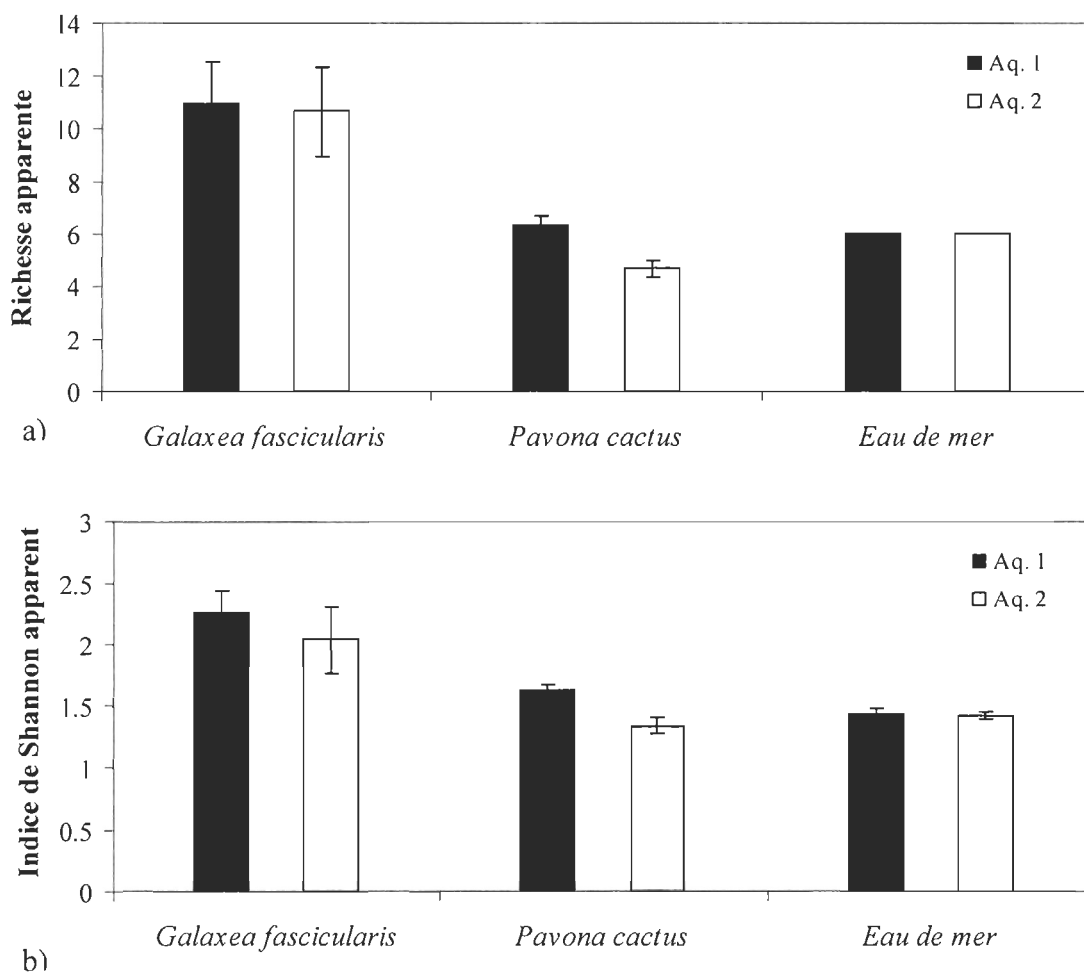


Fig. 1. a) Richesse apparente et b) indice de Shannon apparent (moyenne  $\pm$  erreur-type) pour deux espèces (*Galaxea fascicularis* et *Pavona cactus*) et l'eau de mer dans deux aquariums (1 et 2) en circuit fermé avec trois réplicats pour les échantillons de tissus coralliens et deux réplicats d'eau de mer.

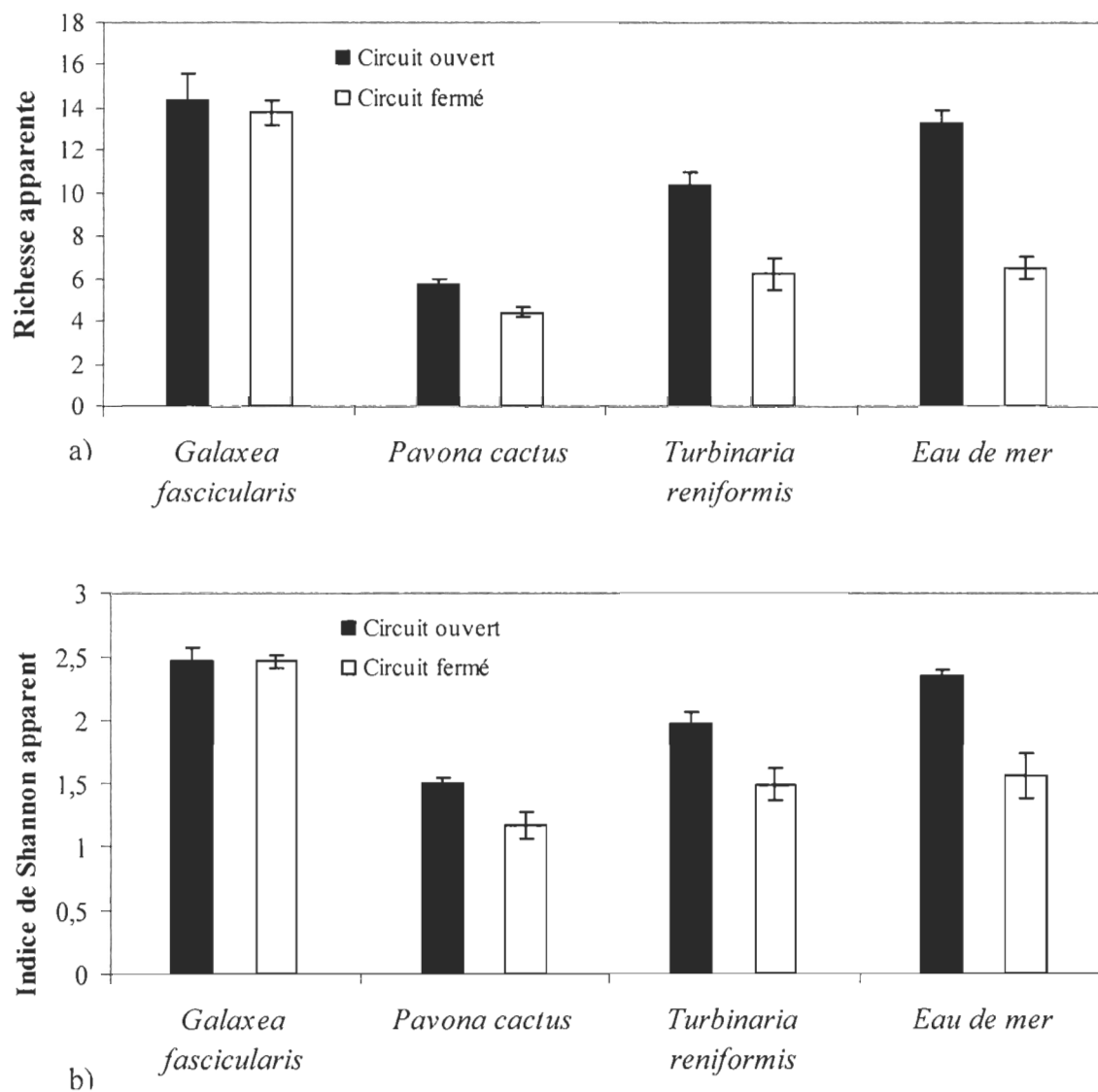


Fig. 3. a) Richesse apparente et b) indice de Shannon apparent (moyenne  $\pm$  erreur-type) pour trois espèces de coraux (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus*, *Turbinaria reniformis*) et l'eau de mer en circuit ouvert ou fermé (circuit ouvert :  $n = 6$  et  $4$  pour les tissus coralliens et l'eau de mer, circuit fermé :  $n = 5$  et  $2$  pour les tissus coralliens et l'eau de mer).

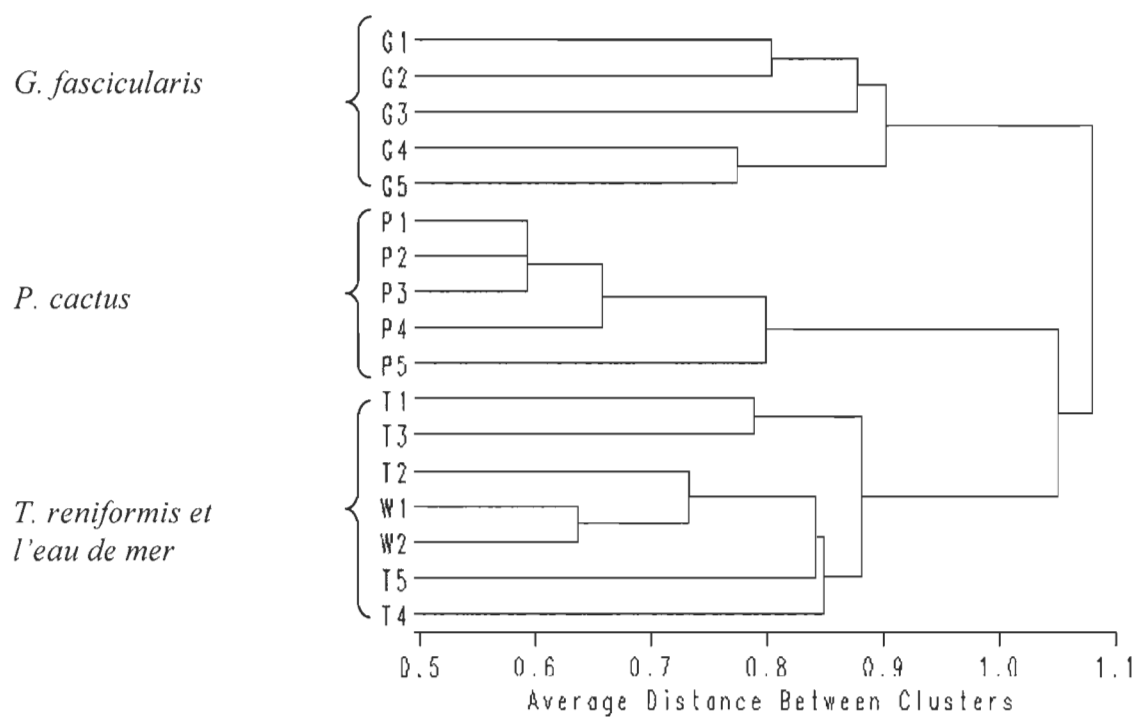


Fig. 5. Analyse de groupement (UPGMA) effectuée sur les échantillons de tissus coralliens de trois espèces, *Galaxea fascicularis* (G), *Pavona cactus* (P), *Turbinaria reniformis* (T) et sur l'eau de mer (W) en circuit fermé. Cinq boutures des deux espèces et quatre échantillons d'eau ont été utilisés.

## **CHAPITRE IV**

### **TEMPERATURE-INDUCED CHANGES IN BACTERIAL COMMUNITY ASSOCIATED WITH SCLERACTINIAN CORALS**

Article en preparation

***TEMPERATURE-INDUCED CHANGES IN BACTERIAL  
COMMUNITY ASSOCIATED WITH THREE SCLERACTINIAN  
CORALS***

**Pascale Tremblay<sup>1,2</sup>, Markus G. Weinbauer<sup>3</sup>, Cécile Rottier<sup>1</sup>, Christian  
Nozais<sup>2</sup> and Christine Ferrier-Pagès<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centre Scientifique de Monaco, Av. St-Martin, MC-98000 Monaco

email : ptremblay@centrescientifique.mc

<sup>2</sup>Departement de biologie et centre d'études nordiques, Université du Québec à Rimouski,

300 allée des Ursulines, Rimouski, QC Canada G5L 3A1

<sup>3</sup>CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Université Pierre et Marie Curie-

Paris 6, 06230 Villefranche-sur-Mer, France



## RÉSUMÉ

Quelques études ont ciblé les effets de la température sur les associations entre les coraux et les bactéries, mais ces effets demeurent incompris. Dans cette étude, trois espèces de coraux scléactiniaires *Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* et *Turbinaria reniformis* ont été incubés à deux températures (26 et 31°C) et la composition de la communauté bactérienne dans l'eau de mer et dans les tissus coralliens a été comparée par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) sur les amplicons du gène d'ARNr 16S. De plus, l'abondance bactérienne dans l'eau de mer a été mesurée par cytométrie en flux afin de vérifier l'effet de la température ainsi que de la présence de coraux dans les bacs. Pour ce faire, des bacs additionnels à 26 ou 31°C sans coraux ont été aménagés. Les résultats obtenus montrent que la plus haute concentration de bactéries dans l'eau de mer a été mesurée dans les aquariums maintenus à 31°C et contenant des coraux. Par le mucus qu'ils excrètent, les coraux enrichissent l'eau de mer en composés carbonés ce qui favorise la croissance bactérienne dans l'eau. Par contre, ces mêmes aquariums présentent la plus faible richesse bactérienne apparente ainsi que l'indice de Shannon apparent le plus faible. Nous pouvons donc conclure que la température et l'excrétion de mucus par les coraux favorisent seulement la croissance de quelques espèces bactériennes, notamment celles adaptées aux fortes températures ou celles capables d'utiliser les polysaccharides complexes du mucus. Cependant, la température n'affecte pas la composition des communautés bactériennes associées aux tissus et au squelette des trois espèces de coraux, lesquelles demeurent spécifiques à leur hôte.

**Mots-clés : Coraux, bactéries, température, ARNr 16S, électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE), cytométrie en flux**

## INTRODUCTION

During the last decades, a dramatic decline in the health of coral reef communities was documented (Green and Bruckner, 2000). This decline was attributed to an increase in sea surface temperature, or to the anthropogenic-induced decrease in coastal seawater quality leading to increased pollution, occurrence of diseases, and ecosystem imbalance. The synergic effects of these multiple stresses constitutes a major ecological problem (Ritchie, 2006), and contribute to the occurrence of new diseases in coral reefs which have reached epidemic proportions in some regions (Ben-Haim and Rosenberg, 2002; Cooney *et al.*, 2002).

Increase in seawater temperature over the normal threshold for corals can favour the development and transmission of pathogens and decrease host resistance (Jones *et al.*, 2004). The antibacterial properties of mucus can also be compromised, because of changes in the bacterial community composition or alteration of its antibiotic activity. Quality and quantity of mucus produced can also decrease due to cell damage. As a consequence, it has been suggested that bacteria which are beneficial to corals decrease in number, and are replaced by *Vibrio spp.* (Ritchie, 2006). Despite an increasing number of studies on the subject, the effect of seawater temperature on bacterial communities associated to corals remains poorly characterized and understood. Indeed, it has been shown, on one hand, that the sensitivity of some corals increases with an increase of seawater temperature (Ben-Haim and Rosenberg, 2002; Jones *et al.*, 2004). On the other hand, no difference in

- (1) Is bacterial community composition of seawater dependent on seawater temperature? (2) Do bacterial abundance in seawater depend on seawater temperature? (3) Are corals induced a variation in the seawater bacterial community composition and abundance? (4) Is bacterial community composition in the tissue and skeleton of corals dependent on seawater temperature?

To answer these questions, the composition of the bacterial community in seawater and associated to corals was characterized by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) on 16S rRNA gene fragments. Variation in bacterial abundance was measured quantitatively using flow cytometry. The microbial communities were analyzed using a combination of statistical procedures, including cluster and variance analyses (or non parametric tests) and post-hoc test analyses.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

Experiments were carried out with nubbins (2 cm long and 1 cm large) prepared from four parent colonies of the following species: *Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*, originating from the Red Sea and maintained in the aquaria of the Centre Scientifique de Monaco. Twenty nubbins were prepared for each species (five per parent colony) and were used only when the tissue had regenerated above the skeleton. For this purpose, parent colonies and nubbins were all incubated during three weeks in a 32 l tank continuously supplied with unfiltered Mediterranean seawater pumped at 50 m depth

particles in the detector) (Marie *et al.*, 1999; Brussaard *et al.*, 2000; Gasol and del Giorgio, 2000). They were then stained for 10 min in the dark with SYBR Green I solution (# S-7585, Molecular Probes; 2X final concentration). Concentrations of bacteria were counted using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, France) equipped with a laser emitting at 488 nm. Samples were run at high speed (ca. 59  $\mu\text{l min}^{-1}$ ) and data were acquired in log mode. The rate of particle passage in the capillary was always maintained below 500 events  $\text{s}^{-1}$ . Fluorescent 1  $\mu\text{m}$  latex beads ( $10^5$  beads  $\text{ml}^{-1}$ ) were added to the bacterial samples as an internal standard (Polyscience, Inc., Europe). Bacteria were detected by their signature in a plot of side scatter (SSC) versus green fluorescence (FL1) as described elsewhere (Gasol and del Giorgio, 2000; Brussaard, 2004). Analysis was performed using the CellQuest-Pro software (Becton Dickinson, France).

### **Bacterial community composition**

Bacterial community composition was assessed both in seawater and in the coral samples. The effect of temperature and coral presence/absence was tested on the bacterial community composition in seawater whereas only the effect of temperature was assessed on the bacterial community composition associated to the tissue and skeleton of corals.

For seawater bacterial composition, two 1 l samples were collected at day 0, 6 and 10 in each aquaria, except for day 0 where only three tanks were considered and for day 10 where only 500 ml were collected. For coral-associated bacteria, at the end of the incubation (day 10), ten nubbins from each coral species were sampled in two aquaria (five

thermocycler by nested PCR using the following procedure. The first PCR round was performed using the 27F bacterial-specific primer (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') and the 1492R universal primer (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (Lane, 1991) as follows: 0.5 to 1  $\mu$ l of template, 0.5  $\mu$ M of each primer, 1X Taq PCR Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France) and adjusted to a final volume of 25  $\mu$ l with sterile water. The cycles were as follow: 5 min at 94°C, followed by 20 cycles of: 30 sec 94°C, 1 min 56.6°C, 1 min 30 sec 72°C and 7 min at 72°C. Positive and negative controls were also performed. The second PCR round was made according to Schäfer and Muyzer (2001) except that the extension time was reduced to 1 minute using the primers 341F-GC/907R. Products of the first round were diluted for the second round 10 to 10 000 fold for tissue and skeleton and  $10^4$  to  $10^6$  times for water in 50  $\mu$ l PCR reaction. PCR products were checked on a 1% agarose gel.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was then performed following Schäfer and Muyzer (2001). PCR products were separated into bands by electrophoresis for 18 h at 100 V on 6 % acrylamide gels prepared using a denaturing gradient from 30 to 70% (urea and formamide) using an INGENYphorU DNA Mutation Detection System (Ingeny International, Goes, The Netherlands). PCR products amounts were evaluated on agarose gels using a comparison with a ladder of molecular mass standards (EasyLadder I; BioLine, London, UK). Then ~ 500 ng of each sample were loaded onto DGGE gels. DGGE gels were stained with 10X SYBR Gold (# S11494; Molecular Probes) and photographed with a gel documentation system GelDoc EQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Analysis of band patterns between lanes of the same gels was performed with quantity One Software (Bio-

because the Tukey's test was not enough powerful. Data were checked for normality using a Shapiro-Wilk's test. When normality was not fulfilled, even if a data transformation was performed, a non parametric test was used. Differences between factors were considered significant for a  $p$  value  $< 0.05$ . For the Dunn's test, differences between factors were considered significant when  $Q$  value is superior to  $Q_{0,05/4} = 2,639$ .

A similarity matrix of Bray-Curtis was constructed from percent band intensities for seawater, tissue and skeleton. A cluster analysis using an unweighted-pair group average (UPGMA) was used to determine the relationship among samples. Statistics were performed using Sas 9.1.3. However, the  $p$  value for the Sheirer-Ray-Hare's test was calculated with the NCSS Probability Calculator 6.0.

## RESULTS

### **Effect of the temperature and coral presence on bacterial abundance in seawater**

Bacterial abundance in seawater is presented on Fig. 2. Bacterial concentrations ranged from 0.2 to  $7.9 \times 10^6$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ . At day 10, coral tanks maintained at  $31^\circ\text{C}$  were those containing the highest bacterial concentration (ca.  $7.5 \times 10^6$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ ) followed by coral tanks maintained at  $26^\circ\text{C}$  (ca.  $3.0 \times 10^6$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ ). Seawater tanks were those containing the lowest bacterial concentration (ca.  $1.5 \times 10^6$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ ), whatever the seawater temperature considered. There was therefore a significant effect of the coral presence on the bacterial concentration (Conover approach). However, there was also a significant effect of temperature on bacterial concentration, as well as an interaction

day 6. The second sub-group was represented by samples taken in seawater tanks (ST) at day 10. Temperature did not have any influence.

### **Effect of the temperature on bacterial diversity associated with the coral tissue and skeleton**

The apparent bacterial richness and apparent Shannon index are represented in Fig. 6. Apparent richness ranged from  $4.4 \pm 0.2$  to  $16.6 \pm 0.7$  bands detected and apparent Shannon index varied between  $1.16 \pm 0.10$  and  $2.58 \pm 0.04$  according to the species, the compartment and temperature considered. *G. fascicularis* maintained at  $26^\circ\text{C}$  was the species that presented the highest number of bands detected and the highest apparent Shannon index in the tissue ( $13.8 \pm 0.6$  and  $2.26 \pm 0.05$ , respectively) and in the skeleton ( $16.6 \pm 0.7$  and  $2.58 \pm 0.04$ ). Temperature has only an effect on the apparent richness for this species (ANOVA, Table 3). *P. cactus* maintained at  $26^\circ\text{C}$  was the species with the lowest number of bands and the lowest apparent Shannon index in the tissue ( $4.4 \pm 0.2$  and  $1.16 \pm 0.10$ ). There was a significant compartment effect (tissue or skeleton) on the apparent richness and apparent Shannon index (Sheirer-Ray-Hare's test, Table 3). *T. reniformis* maintained at  $31^\circ\text{C}$  was the species with the lowest parameters in the skeleton ( $6.0 \pm 1.0$  and  $1.25 \pm 0.21$ ). There was a significant interactive effect of temperature and compartment on apparent richness and apparent Shannon index (ANOVA, Table 3). The apparent Shannon index was significantly different between the tissue and skeleton at  $31^\circ\text{C}$  (multiple comparison by Least Squares Mean,  $p = 0.0135$ ). This test was not enough powerful to detect any difference in the apparent richness.

enhancement by releasing mucus and dissolved organic carbon, and therefore bringing a nutrient source for bacteria (Ferrier-Pagès *et al.*, 2000; Wild *et al.*, 2004; Brown and Bythell, 2005). The viscous character of mucus is directly linked to the presence of mucine, which is a highly heterogeneous glycoprotein consisting of a nucleus of filamentous protein with short polysaccharides side-chains (Brown and Bythell, 2005). Therefore, mucus mostly promotes the growth of bacteria able to break down complex polysaccharides (Rohwer *et al.*, 2002). This explains the lowest apparent richness and apparent Shannon index induced by the presence of corals. However, the lack of temperature effect on the composition of communities associated with seawater suggests that temperature mainly influence the bacterial abundance in seawater. Temperature is generally considered an important factor in regulating microbial growth in marine environments (Shiah and Ducklow, 1994).

### **Effect of the temperature on bacterial diversity associated with the coral tissue and skeleton**

Results showed that temperature had a direct effect only on the apparent bacterial richness of *G. fascicularis* and an indirect effect (interaction with compartments) on the apparent richness and apparent Shannon index of *T. reniformis*. However, analyses of DGGE profiles obtained for the three coral species, *G. fascicularis*, *P. cactus* and *T. reniformis* showed that temperature had no influence on the bacterial community composition of their tissues and skeletons. This result does not confirm the coral probiotic hypothesis (Reshef *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2007). This hypothesis was already



## CONCLUSION

Temperature and coral presence promoted bacterial growth in seawater. Coral presence, via mucus excretion, also indirectly induced in the surrounding seawater a dominance of some species of bacteria. These results have confirmed that the bacterial community composition associated to the coral tissue can be species-specific even at two temperatures. Temperature did not influence the bacterial community associated with the tissue and the skeleton of the three coral species. Additional experiments should be carried out to understand the effect of temperature on the bacterial community associated with corals. Bands were excised from DGGE gels using sterile blades. The sequencing of DNA will allow identifying bacterial groups. The comparison of the 16S rDNA sequences with the NCBI environmental samples in the GenBank database using the basic alignment search tool will provide more information on the changes induced by temperature or release of mucus by corals.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.-E. Kerros for laboratory assistance, D. Zoccola for molecular biology advice, D. Allemand for support and A. Caron for statistical advice. Funding for this project was provided by the Centre Scientifique de Monaco and the Observatoire Océanologique de Villefranche.

- Kooperman, N., E. Ben-Dove, E. Kramarsky-Winter, Z. Barak and A. Kushmaro, 2007. Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments, *FEMS Microbiology Letters* 276 (1): 106-113.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In: Stackebrandt E. and M. Goodfellow (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Wiley, Chichester, UK, p. 115-175.
- Leggat, W., T. Ainsworth, J.C. Bythell, S. Dove, R. Gates, O. Hoegh-Guldberg, R. Iglesias-Prieto and D. Yellowlees, 2007. The hologenome theory disregards the coral holobiont, *Nature Reviews*.
- Marie, D., C.P.D. Brussaard, R. Thyrhaug, G. Bratbak and D. Vaulot, 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1): 45-52.
- Pomeroy, R. and W.J. Wiebe, 2001. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria, *Aquatic Microbial Ecology* 23: 187-204.
- Reshef, L., O. Koren, Y. Loya, I. Zilber-Rosenberg and E. Rosenberg, 2006. The Coral Proiotic Hypothesis, *Environmental Microbiology* 8(12): 2068-2073.
- Ritchie, K.B., 2006. Regulation of microbial population by coral surface mucus and mucus-associated bacteria, *Marine Ecology Progress Series* 322: 1-14.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam and N. Knowlton, 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral, *Montastrea franksi*, *Coral Reefs* 20: 85-91.
- Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam and N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria, *Marine Ecology Progress Series* 243: 1-10.
- Rosenberg, E., O. Koren, L. Reshef, R. Efrony and I. Zilber-Rosenberg, 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution, *Nature Reviews* 5: 355-362.
- Rosenberg, E. and Y. Ben-Haim, 2002. Microbial diseases of corals and global warming, *Environmental Microbiology* 4 (6): 318-326.
- Schäfer, H. and G. Muyzer, 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology, In: Paul J.H. (ed) *Marine microbiology: methods in microbiology*, Vol 30. Academic Press, San Diego, p. 425-468.
- Shiah, F.-K. and H.W. Ducklow, 1994. Temperature regulation of heterotrophic bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in Chesapeake Bay, *Limnology and Oceanography* 39 (6): 1243-1258.

## TABLES AND FIGURES

Table 1. Results of the Conover approach (general rank approach) for bacterial abundance with two factors (coral presence and temperature). Seawater samples were taken in triplicate in seawater tanks and in six replicates in coral tanks.

	Degrees of freedom	<i>p</i>	<i>F</i> value
<i>Bacterial abundance</i>			
Temperature (Temp.)	1	<b>0.0011</b>	16.61
Coral presence (coral)	1	<b>&lt; 0.0001</b>	88.94
Temp.*coral	1	<b>0.0025</b>	13.45
Error	14	-	-

Table 3. Results of the factorial analysis of variance (ANOVA) for *Galaxea fascicularis* and *Turbinaria reniformis* and of the non parametric Sheirer-Ray-Ray's test for *Pavona cactus* on apparent richness and apparent Shannon index with two factors (compartments and temperature) and five replicates.

	Degrees of freedom	<i>Galaxea fascicularis</i> <i>p</i>	<i>F</i> value	<i>Pavona cactus</i> <i>p</i>	<i>H</i> value	<i>Turbinaria reniformis</i> <i>p</i>	<i>F</i> value
<i>Apparent richness</i>							
Compartment (Comp.)	1	0.0781	3.54	< <b>0.0001</b>	16.87	0.9017	0.02
Temperature (Temp.)	1	<b>0.0107</b>	8.33	1.0000	0.31	0.9017	0.02
Comp.*Temp.	1	0.1221	2.66	1.0000	0.56	<b>0.0298</b>	5.69
Erreur	16	-	-	-	-	-	-
<i>Apparent Shannon index</i>							
Compartment (Comp.)	1	0.6881	0.17	< <b>0.0001</b>	17.27	0.1606	2.16
Temperature (Temp.)	1	0.0504	4.48	1.0000	0.00	0.9218	0.01
Comp.*Temp.	1	0.1385	2.43	1.0000	0.24	<b>0.0258</b>	6.04
Erreur	16	-	-	-	-	-	-

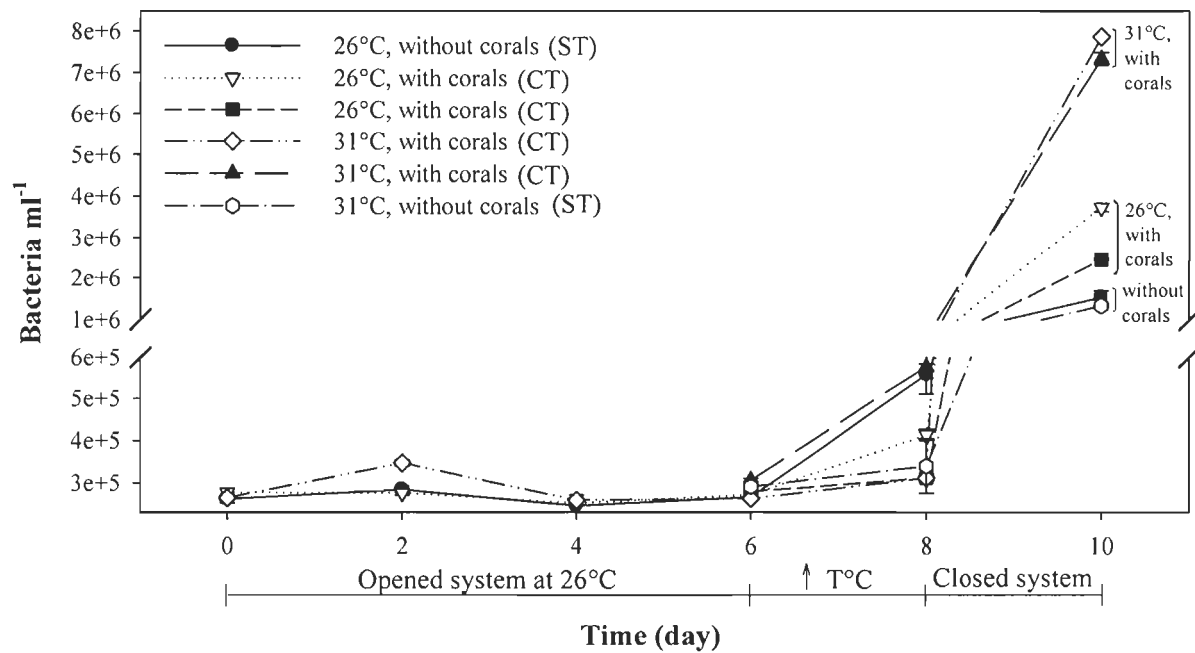


Fig. 2. Bacterial abundance (bacteria  $\text{ml}^{-1}$ , mean  $\pm$  standard error) for seawater samples in coral (CT) and seawater (ST) tanks at two temperatures (26 and 31°C) during a ten day incubation. Three samples per day were used in each of the six aquaria, except for day 0, 2 and 4 where only three tanks were considered.

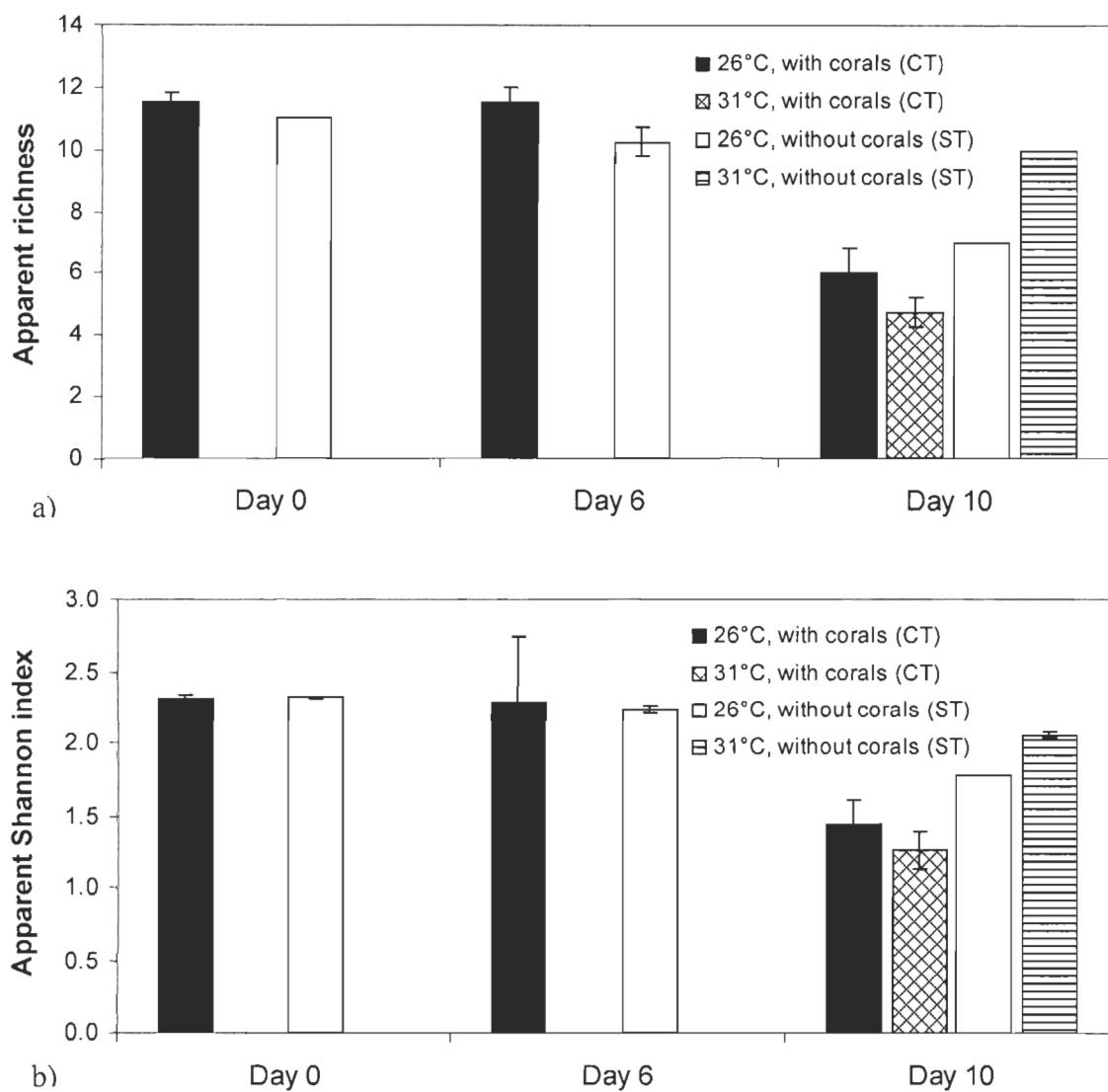


Fig. 4. a) Apparent richness and b) apparent Shannon index (mean  $\pm$  standard error) for seawater samples in coral (CT) and seawater (ST) tanks at two temperatures (26 and 31°C) and at day 0, 6 and 10. Two samples were taken each day in each aquarium, except for day 0 where only three tanks were considered.

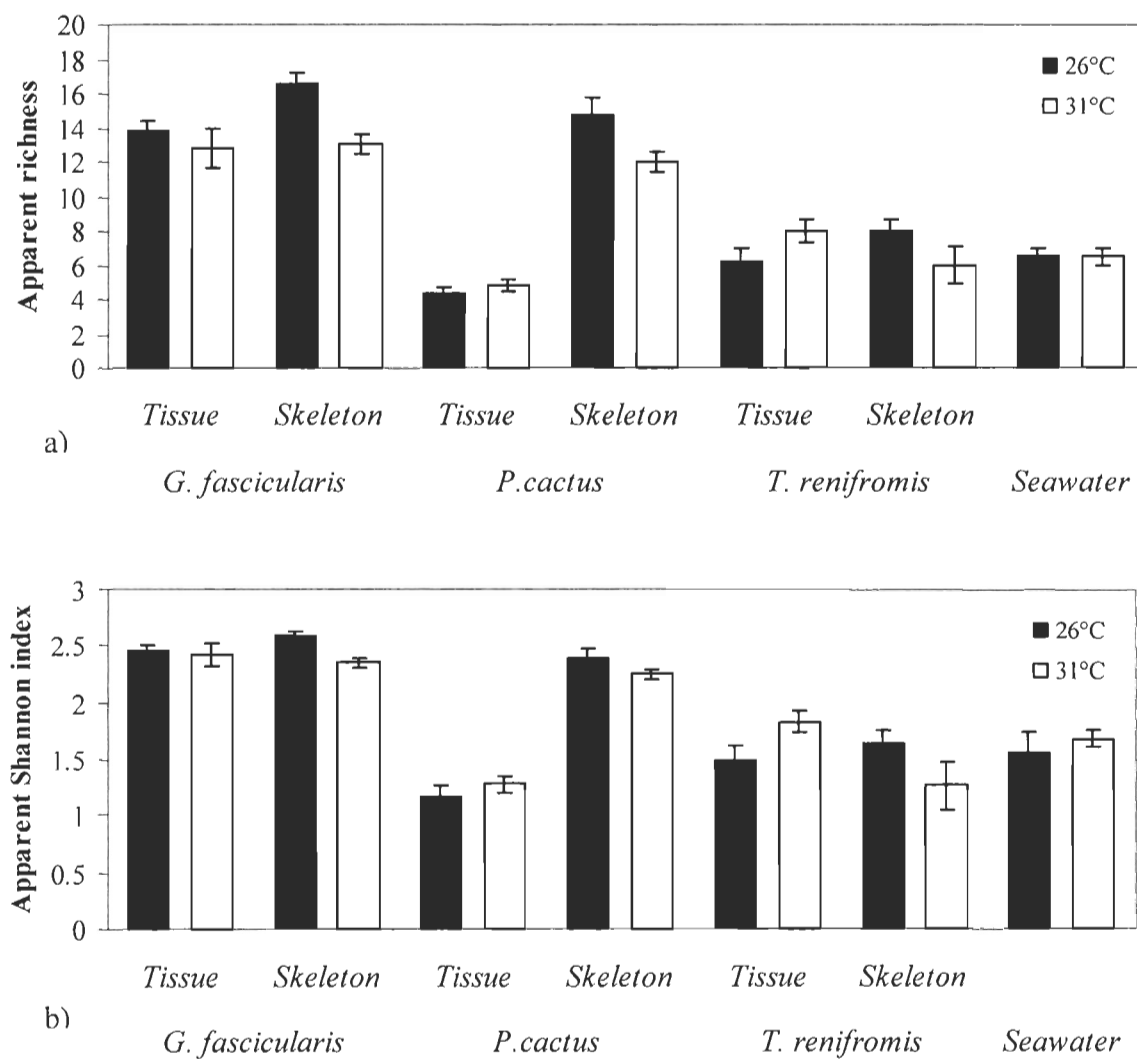


Fig. 6. a) Apparent richness and b) apparent Shannon index (mean  $\pm$  standard error) for the three species (*Galaxea fascicularis*, *Pavona cactus* and *Turbinaria reniformis*), taking into account two compartments (tissue and skeleton) and two temperatures (26 and 31°C) with five replicated coral samples and two replicated water samples.

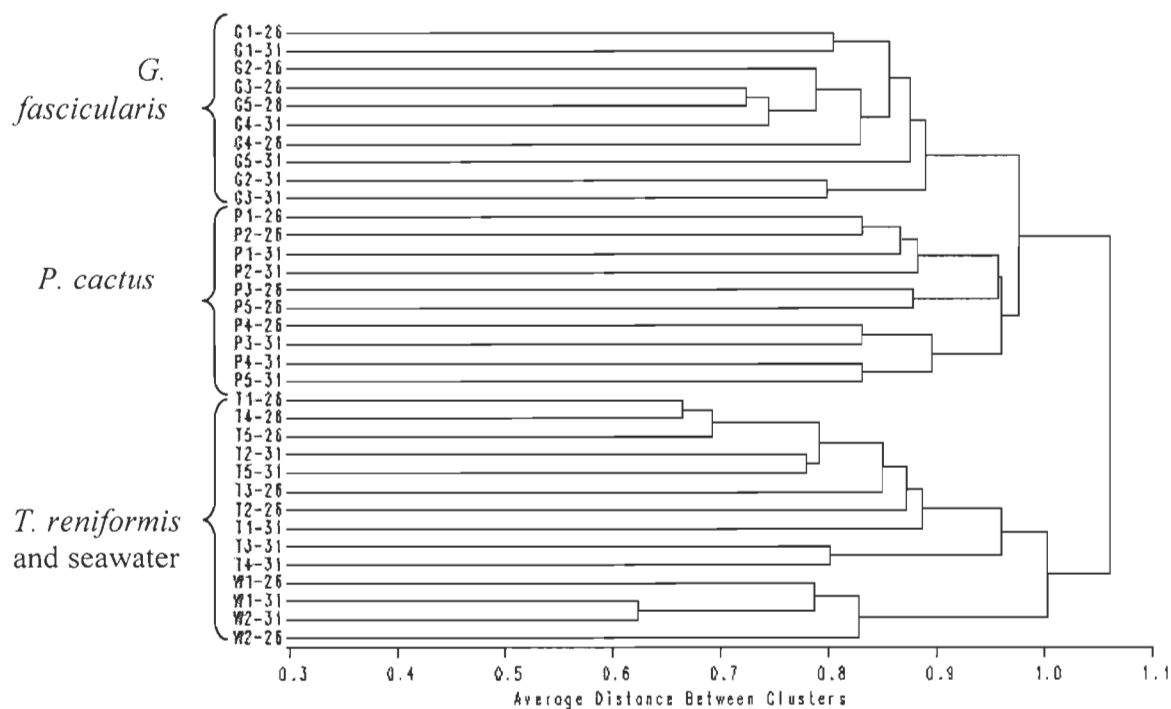


Fig 8. Cluster analysis (UPGMA) made with skeleton samples of the three species, *Galaxea fascicularis* (G), *Pavona cactus* (P), *Turbinaria reniformis* (T) and the seawater (W) at two temperature (26 and 31°C). Five nubbins from three parent colonies were used for each coral species and each temperature and water samples were considered in duplicate.



## **CHAPITRE V**

### **CONCLUSIONS GÉNÉRALES**

Cette étude a permis de dresser un portrait de la diversité bactérienne associée au tissu et au squelette de trois espèces de coraux *G. fascicularis*, *P. cactus* et *T. reniformis* et de déterminer la diversité bactérienne de l'eau de mer associée aux coraux. Ce travail a également permis de décrire l'influence du mucus sur ces communautés bactériennes. Finalement, l'effet de la température, paramètre environnemental majeur pour les coraux, sur les communautés bactériennes de l'eau de mer et des coraux a également été testé.

Les expériences effectuées démontrent que la composition de la communauté bactérienne associée aux tissus des trois espèces de coraux étudiées est spécifique à chaque espèce et différente de celle présente dans l'eau de mer pour deux des trois espèces (*G. fascicularis* et *P. cactus*). Cette spécificité est bien établie, puisqu'elle est maintenue quel que soit le circuit d'eau de mer (ouvert ou fermé) (Chapitres II, III et IV), l'aquarium considéré (Chapitre III) ou même la température d'incubation (Chapitre IV). Cette étude est d'ailleurs la première à montrer expérimentalement que la communauté bactérienne associée aux coraux est distincte de l'eau environnante, même en milieu fermé. Seule la communauté bactérienne présente chez *T. reniformis* est similaire à celle observée dans l'eau de mer. Cette spécificité peut être liée à la quantité et la qualité du mucus produit. Dans toutes les expériences menées dans le cadre de ce travail, la communauté bactérienne associée à *G. fascicularis* obtient toujours la plus haute richesse bactérienne apparente ainsi que l'indice de diversité de Shannon le plus élevé. L'analyse du carbone dissous dans l'eau de mer montre que *G. fascicularis* excrète aussi trois fois plus de mucus que les deux autres espèces, suivi de *P. cactus* et de *T. reniformis*. La caractérisation des saccharides composant le mucus montre que celui de *G. fascicularis* et de *P. cactus* contient

protéobactéries sont tous les deux observés dans le complexe tissu/mucus de *P. cactus*. Cela indique que les bactéries associées à *P. cactus* sont hautement spécialisées pour cette espèce corallienne, laquelle présente la plus faible richesse bactérienne apparente ainsi que le plus faible indice de Shannon apparent. Chez *T. reniformis*, une nouvelle espèce de bactérie est toujours retrouvée dans le tissu et parfois dans le squelette (Chapitre II).

Les expériences en circuit ouvert et fermé ont permis de constater que le renouvellement constant d'eau de mer en circuit ouvert est favorable au développement d'une plus grande diversité d'espèces bactériennes dans l'eau de mer et chez *T. reniformis*. En effet, l'indice de diversité de Shannon apparent est plus élevé en circuit ouvert qu'en circuit fermé. Ceci suggère que la fermeture du système ne favorise pas le développement de toutes les espèces bactériennes, car elle coupe les apports extérieurs en bactéries ainsi qu'en éléments nutritifs ce qui entraîne le développement d'une flore plus spécialisée qui est favorisée par la production de mucus par les coraux. Mais le plus important est qu'il n'y a pas d'effet de l'aquarium sur la communauté bactérienne observée chez les espèces de coraux tant au niveau de la richesse bactérienne apparente que de l'indice de diversité de Shannon apparent. Parmi les espèces coralliennes, seule *T. reniformis* semble influencée par l'ouverture/fermeture du circuit. Ceci peut s'expliquer par le fait que sa communauté bactérienne est aussi la plus proche de celle de l'eau de mer (Chapitre III).

Les expériences sur l'effet de la température (26 ou 31 °C) montrent que la plus haute concentration de bactéries dans l'eau de mer est mesurée dans les aquariums contenant des coraux maintenus à 31 °C. La température et la présence des coraux, de par l'excrétion de

entraîne une diminution de la diversité bactérienne dans l'eau de mer. L'augmentation de température n'affecte pas la spécificité des communautés bactériennes observées dans les coraux, mais elle induit une augmentation de l'abondance bactérienne dans l'eau de mer.

Les bandes d'intérêt prélevées sur les gels de DGGE pour les expériences de température (eau de mer, tissu/mucus et squelette) du chapitre IV ont été excisées. Le séquençage de ces fragments d'ADN permettra d'identifier les principaux groupes bactériens présents dans la communauté et d'apporter des informations quant aux changements induits par la température ou la présence des coraux.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses, à court et long terme. Les maladies et les phénomènes de blanchissement affectent de plus en plus les récifs coralliens du monde entier. Une des hypothèses est que le blanchissement puisse être causé par le développement de microorganismes et il est donc important de vérifier, en conditions contrôlées, cette hypothèse. Par ailleurs, bien que la température soit le paramètre pris en considération dans cette étude, il ne faudrait pas omettre l'influence d'autres facteurs environnementaux sur les communautés bactériennes de l'eau de mer et des coraux, tels que la lumière ou les sels nutritifs. L'effet de ces derniers pourrait induire des changements drastiques dans la composition de la communauté bactérienne associée aux coraux.

Il serait important d'étudier la variation temporelle, et saisonnière de la communauté bactérienne associée aux trois coraux étudiés en conditions de culture, mais cette fois prélevés *in situ*. La comparaison entre coraux de culture et des coraux *in situ* permettrait de valider les résultats obtenus.

analyse offrirait la possibilité d'observer les changements dans la concentration des microorganismes et non seulement dans la composition de la communauté. Ceci apporterait une meilleure compréhension de la dynamique de la boucle microbienne associée aux coraux.

Le sujet de ce travail s'inscrit dans le cadre de thématiques de recherches capitales pour la connaissance et la gestion durable des écosystèmes coralliens et leurs principaux bioconstructeurs, les coraux. Une meilleure connaissance des microorganismes potentiellement « symbiotiques » aux coraux, tels que les bactéries, permettra de mieux comprendre leur rôle dans l'association ainsi que leur rôle au cours des perturbations de l'environnement. La compréhension des relations entre les organismes microbiens et les coraux scléactiniaires est donc primordiale, à la fois pour la connaissance des symbioses coralliennes en générale et dans le contexte plus actuel des changements climatiques et du réchauffement planétaire.

## RÉFÉRENCES DES CHAPITRES I ET III

- Banin, E., Y. Ben-Haim, T. Israely, Y. Loya et E. Rosenberg, 2000. Effect of the environment on the bacterial bleaching of corals. *Water, Air, and Soil Pollution* 123 : 337-352.
- Ben-Haim, Y. et E. Rosenberg, 2002. A novel *Vibrio sp.* pathogen of the *Pocillopora damicornis*, *Marine Biology* 141: 47-55.
- Bourne, D.G. et C.B. Munn, 2005. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef, *Environmental Microbiology* 7 (8): 1162-1174.
- Breitbart, M., R. Bhagooli, S. Griffin, I. Johnson et F. Rohwer, 2005. Microbial communities associated with skeletal tumours on *Porites compressa*, *FEMS Microbiology Letters* 243 : 431-436.
- Brown, B.E. and J.C. Bythell, 2005. Perspectives on mucus secretion in reefs corals, *Marine Ecology Progress Series* 296: 291-309.
- Brussaard, C.P.D., 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1506-1513.
- Cervino, J.M., R.L. Hayes, S.W. Polson, T.J. Goreau, J.R. Martinez et G. Smith, 2004. Relationship of *Vibrio* species infection and elevate temperature to yellow blotch/band disease in Caribbean corals, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11) : 6855-6864.
- Cooney, R.P., O. Pantos, M.D.A. Le Tissier, M.R. Barer, A.G. O'Donnell et J.C. Bythell, 2002. Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques, *Environmental Microbiology* 4 (7) : 401-413.
- Curtis, T.P., W.T. Sloan et J.W. Scannell, 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10494-10499.
- Denner, E.B.M., G.W. Smith, H.-J. Busse, P. Schumann, T. Narzt, S.W. Polson, W. Lubitz et L.L. Richardson, 2003. *Aurantimonas corilicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 : 1115-1122.

- Kuntz, N.M., D.I. Kline, S.A. Sandin et F. Rohwer, 2005. Pathologies and mortality rates caused by organic carbon and nutrient stressors in the three Caribbean coral species, *Marine Ecology Progress Series* 294 : 173-180.
- Lesser, M.P., C.H. Mazel, M.Y. Gorbunov et P.G. Falkowski, 2004. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals, *Science* 305 : 997-1000.
- Pantos, O., R.P. Cooney, M.D.A. Le Tissier, M.B. Barer, A.G. O'Donnell et J.C. Bythell, 2003. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*, *Environmental Microbiology* 5 (5) : 370-382.
- Patterson, K.L., J.W. Porter, K.B. Ritchie, S.W. Polson, E. Mueller, E.C. Peters, D.L. Santavy et G.W. Smith, 2002. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmate*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13) : 8725-8730.
- Richardson, L.L., G.W. Smith, K.B. Ritchie et R.C. Carlton, 2001. Integrating microbiological, microsensor, molecular, and physiologic techniques in the study of coral diseases pathogenesis, *Hydrobiologia* 460 : 71-89.
- Ritchie, K.B., 2006. Regulation of microbial population by coral surface mucus and mucus-associated bacteria, *Marine Ecology Progress Series* 322 : 1-14.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam et N. Knowlton, 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral, *Montastrea franksi*, *Coral Reefs* 20 : 85-91.
- Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam et N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria, *Marine Ecology Progress Series* 243 : 1-10.
- Rosenberg, E. et Y. Ben-Haim, 2002. Microbial diseases of corals and global warming, *Environmental Microbiology* 4 (6) : 318-326.
- Schäfer, H. et G. Muyzer, 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology, In: Paul J.H. (ed) *Marine microbiology: methods in microbiology*, Vol 30. Academic Press, San Diego, p. 425-468.
- Sogin, M.L., H.G. Morrison, J.A. Huber, D.M. Welch, S.M. Huse, P.R. Neal, J.M. Arrieta et G.J. Herndl, 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32) : 12115-12120.
- Sutherland, K.P., J.W. Porter et C. Torres, 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals, *Marine Ecology Progress Series* 266 : 273-302.

