HAL open science

Les communautés bactériennes d'un holobionte méditerranéen, la gorgone rouge Paramuricea clavata : diversité, stabilité et spécificité

Marie La Rivière

▶ To cite this version:

Marie La Rivière. Les communautés bactériennes d'un holobionte méditerranéen, la gorgone rouge Paramuricea clavata : diversité, stabilité et spécificité. Sciences de l'environnement. Aix-Marseille Universite, 2013. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-01365774⟩

HAL Id: tel-01365774

https://hal.science/tel-01365774v1

Submitted on 13 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

Les communautés bactériennes d'un holobionte méditerranéen, la gorgone rouge *Paramuricea clavata* : diversité, stabilité et spécificité

Thèse de doctorat, 2013

Marie La Rivière

Institut PYTHEAS
Observatoire des Sciences de l'Univers
Aix*Marseille Université

Institut Méditerranéen d'Océanologie

Photo de couverture : © T. Vignaud

Photos de pages de chapitrage : © F. Zuberer, O. Bianchimani

Institut PYTHEAS
Observatoire des Sciences de l'Univers
Aix*Marseille Université

Institut Méditerranéen d'Océanologie

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ AIX-MARSEILLE

Institut Méditerranéen d'Océanologie
Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement

présentée par

Marie La Rivière

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Aix-Marseille

Spécialité Océanographie

Les communautés bactériennes d'un holobionte méditerranéen, la gorgone rouge *Paramuricea clavata* : diversité, stabilité et spécificité

Soutenue le 08 octobre 2013 devant le jury composé de :

Maria-Jesús Uriz, Professeur, CEAB-CSIC	Rapporteur
Frédéric Garabetian, Professeur, Université Bordeaux I	Rapporteur
Denis Allemand, Professeur, Centre Scientifique de Monaco	Examinateur
Markus Weinbauer, Chargé de Recherche, CNRS	Examinateur
Marc Bally, Chargé de Recherche, CNRS	Co-directeur de thèse
Joaquim Garrabou, Chargé de Recherche, CNRS	Directeur de thèse

À Christophe,

À Régis,

"Les plaisirs sans fin du contact avec la nature ne sont pas réservés aux scientifiques, mais accessibles à tous ceux qui se placent sous l'influence de la terre, de la mer, du ciel, et de leur existence surprenante."

Rachel Carson

REMERCIEMENTS

Voilà l'heure des remerciements, la partie la plus personnelle, la moins cadrée mais pourtant pas la plus facile à rédiger ! Après près de 6 ans au laboratoire, il y en a des gens qui ont joué un rôle dans l'expérience enrichissante, tant sur le plan professionnel que personnel, qu'a été cette thèse…

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury, Iosuné Uriz, Frédéric Garabétian, Denis Allemand et Markus Weinbauer d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également Florence Jude-Lemeilleur et Philippe Cuny pour leurs conseils et leur participation à mon comité de thèse.

Je remercie Jean-Pierre Féral qui m'a accueillie au sein de l'UMR DIMAR il y a déjà 6 ans de cela. Merci également d'avoir soutenu ma participation à la Summer Course de Friday Harbor. Merci à Richard Sempéré d'avoir pris le relai lors de la création du MIO.

Je remercie Laure Fournier et la Fondation Total pour la biodiversité marine d'avoir soutenu le projet de recherche MAGIC$_3$.

Bien sûr, tout ça ne serait pas arrivé sans Joaquim Garrabou et Marc Bally, mes deux directeurs et guides spirituels scientifiques ! Merci Quim d'avoir accepté de me confier un stage facultatif de M1, de m'avoir intégrée au sein de la joyeuse équipe coralligène-changement climatique, de m'avoir fait confiance pour t'aider dans la partie administrative de la fin de ton projet ANR et enfin de m'avoir présentée à Marc. Tu ne m'auras jamais emmenée plonger à Scandola mais je te pardonne ! (Sache que je suis toujours disponible s'il y a de la place dans une valise). Merci aussi pour ton investissement dans les corrections du papier et du manuscrit malgré la distance entre Barcelone et Marseille, malgré tes ennuis de santé à la fin de la rédaction et malgré les pavés de microbiologie parfois lointains (et laborieux à lire ?!) de ton approche d'écologue. Ce qui m'amène à Marc. Merci Marc d'avoir accepté de t'embarquer dans l'aventure du M2, de m'avoir fait confiance pour monter le projet dont a découlé cette thèse alors que j'étais une microbiologiste novice, et le mot est faible. Merci de m'avoir aidée à mener à bien ce travail, merci de m'avoir permis d'autant voyager et de développer les axes de communication qui m'intéressent tant. Ce serait un euphémisme de dire que j'ai beaucoup appris durant ces 5 années, au gré de multiples discussions portant sur tout et rien et pouvant durer plusieurs heures. Ca a été un plaisir de travailler avec toi pour essayer de valoriser l'importance de ces petites bêtes que personne ne voit mais qui sont si importantes !

Merci également aux autres chercheurs et ingénieurs du laboratoire pour leurs encouragements et leur soutien qu'il ait été scientifique ou moral, Carole, Emma, Anne, Didier, Sacha, Janus, Jo et Mireille à la Station Marine et Gérald, David, Christian, Bruno et Philippe à Luminy.

Je remercie chaleureusement les secrétaires de direction Joëlle Massei et Dominique Poirot, sans qui le laboratoire ne tournerait pas rond. Merci Joëlle de si bien couver tes petits étudiants. Je remercie également Dominique Estival, toujours présente pour régler les problèmes administratifs des thésards.

Il y a aussi beaucoup de personnes à remercier à l'UMS, en particulier Philomène (premier sourire du matin en arrivant au labo), Marie-France, Chantal M. (merci pour ton aide au MEB), Chantal B., Christian et les autres pour leur aide et les sympathiques moments partagés le midi. Merci également aux filles du service bio mol pour les aides techniques et la gestion de tous les équipements et consommables : tout d'abord Caroline, puis Cécile et enfin Marjorie dans l'ordre d'arrivée. Merci à l'équipe plongée, Bernard, Frédéric, Laurent, Greg et Anne d'avoir échantillonné pour moi quand je ne pouvais pas me joindre à la palanquée et d'avoir surveillé les gorgones à l'affût du moindre signe de maladie. Christian, difficile de choisir si je te remercie dans la case

plongeur, dans la case aide technique microscope-vidéo ou dans la case divertissement-soutien à toute heure-distribution de sourire. Merci pour les crampes aux zygomatiques et les larmes de rires que j'ai pu avoir en t'écoutant raconter tes histoires, en particulier lors d'une certaine mission aux Medes.

A propos de missions, merci aux filles espagnoles, Núria, Cristina et Emma pour les échantillonnages à Scandola et aux Medes et pour la bonne humeur H24. Et merci aux copains de l'association Septentrion Environnement, Adrien (merci aussi de m'avoir conseillée pour obtenir le financement de ce projet), Karl, Marc, Marine, Nadège et Seb pour le soutien logistique et la chouette camaraderie. Olivier, je te remercie tout particulièrement de m'avoir présentée à Quim en premier lieu, de m'avoir soutenue dans l'élaboration du projet de la thèse, de m'avoir offert une place importante dans la création de l'association, et de m'avoir appris à plonger (un jour je viderai mon masque de bon cœur).

J'ai eu le plaisir de collaborer avec plusieurs personnes sans qui la partie histologie-FISH de ma thèse n'existerait pas. Je remercie la HP-Team de Christian Tamburini de m'avoir fait une petite place à Luminy pour développer le protocole CARD-FISH. Un énorme merci à Marc Garel pour sa patience et son enthousiasme à essayer de comprendre "pourquoi ça ne marche pas ?!". Merci à Marc Tedetti qui m'a aidée à trouver les meilleurs fluorochromes pour détecter un signal au milieu de toute cette autofluorescence. Je remercie chaleureusement la plateforme microscopie et la plateforme histologie du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy : Mathieu Fallet qui m'a formée à l'utilisation du microscope confocal, Lionel Chasson et Fannie Baudimont qui m'ont permis d'obtenir de belles coupes semi-fines de gorgones. Un grand merci également à JB, exilé en Australie et infiltré dans l'Equipe (avec un grand E) de microbiologie des coraux, de m'avoir conseillée, aiguillée et même d'avoir essayé de détecter mes bactéries sur des coupes subtilement camouflées pour passer la douane.

Many thanks to Esther Peters who helped me with the histological description of *P. clavata* tissues. I also want to thank Carolyn Friedman, Drew Harvell and Steven Roberts, my teachers during the Ecology of Infectious Marine Diseases at Friday Harbor Labs, and all my fellows during this course, particularly Morgan (thanks for all the PDF I couldn't find), Kathy, Sarah, Emma, Carrie and Lisa. I had a wonderful 'merican experience.

Merci à Guillaume Meisterhans, Bastien Mérigot, Yoan Eynaud et James Soda pour leur aide précieuse avec les analyses statistiques.

Viennent ensuite les copains-collègues, compagnons de galère, sans qui le travail aurait été beaucoup moins sympa. Certains ont déjà quitté le navire, mais ont marqué une bonne partie de cette thèse : Bastien, Oriol, Nathaniel, Gwilherm, Pascal, Carolina, Jean-Ba, Karin, Kasia, Rosa, Delphine, Eve et bien sûr Emilie (mes copiiiiines : les pauses thés à refaire le monde –et râler parfois- m'ont manqué depuis que vous m'avez abandonnée) à Endoume, Mehdi, Anne et Yoan (désolée de ne pas t'avoir donné ton 1/2 copain) à Luminy. Vous m'aviez prévenue que ce ne serait pas drôle tout le temps, et vous aviez bien raison, mais vous aviez aussi raison sur le fait que le meilleur moment, c'est quand on arrive à la fin ! Merci également aux stagiaires Jérôme Paperou et Simon Bonato dont les données ont été utilisées dans cette thèse. Pour les moments de détente de la pause déjeuner, les pétages de câble occasionnels et les encouragements, merci aussi à ceux qui sont toujours à bord : Marion (merci aussi pour ta pédagogie lors de l'apprentissage du N2), Ismaël, Quentin, Laura, Alex, Nico, Max S (collègue de promo doctorale légèrement décalée, merci pour le serrage de coudes), Mika, Ben, Séverine (merci de m'avoir accueillie dans le bureau), et Max V (merci pour les débats animés qui permettent toujours d'avoir une perspective différente). A Morgan, qui m'a initiée à l'addiction Apple, merci de m'avoir accompagnée et soutenue aussi bien personnellement que professionnellement. Merci à Chiara, ma coloc' de choc d'avoir si bien pris soin de moi durant la phase de rédaction et d'avoir su me changer les idées ou me laisser dans mon coin quand j'en avais besoin. Merci également à la girly team de choc d'en

bas, Marine, Virginie et Marie (mon ancienne coloc' de bureau dont plusieurs manips ont servi à cette thèse). Et enfin un énorme merci à Pierre-Alexandre, mon formateur Adobe et compagnon de doutes et de route. Je tiens également à remercier les "externes" qui ont toujours eu un mot sympathique d'encouragements : Seb, Marion, Emma, Sarah, Ben, Anaïs, Mathieu, les copines de la danse (Céline, Lauren, Emilie, Elodie et Magalie), Mike et Rose.

Voilà presque 7 ans que je vis à Marseille mais mon cœur n'a jamais vraiment quitté Paris où vivent mes amis et ma famille. Je n'aurais pas pu arriver au bout sans le soutien inconditionnel des parisiens qui m'ont montré que, contrairement à l'adage, loin des yeux ne rime pas avec loin du cœur. Merci à Thierry (je vais avoir plus de temps pour t'appeler maintenant), à Jonathan et à la joyeuse bande des Kbrones, en particulier à Victor pour les messages d'encouragements quotidiens, Jérémie pour les coups de boost dans les moments de doute, Mansour pour son oreille attentive et Walid pour les bêtises sur internet qui aident à décompresser. Et merci à mes amis de très longue date, pour pas dire d'enfance, les bellifontains, plus particulièrement Geo, Nico (et Marine) et Ben. Merci de votre amitié qui n'a jamais été entachée par le fait qu'on ne se voit pas assez. Et les plus importantes pour la fin : Maya et Agathe. Les mots me manquent mais vous savez tout ce que vous représentez pour moi.

Et enfin, je remercie ma famille "de cœur", les Thoraval et les Dupré-Terragno et ma famille "de sang", les Gilbert et les La Rivière-d'Incan, en particulier mes grands-parents, mon petit frère et bien sûr mes parents qui m'ont soutenue, aussi bien moralement que financièrement, depuis que j'ai dit à l'âge de 6 ans que je voulais devenir biologiste marin. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Du fond du cœur, à toutes les personnes qui ont joué un rôle quel qu'il soit dans l'accomplissement de cette thèse : MERCI !

Marie

Table des matières

Remerciements **7**

Chapitre I Introduction générale **15**

1. LE CHANGEMENT CLIMATIQUE EN MILIEU MARIN 17
   1.1. Effets du changement climatique sur les écosystèmes marins côtiers 17
   1.2. Les évènements de mortalités massives : un impact majeur du changement climatique en mer Méditerranée 19
   1.3. La gorgone rouge *Paramuricea clavata*, invertébré modèle du coralligène 23
2. LES BACTÉRIES, CLÉS DE COMPRÉHENSION DES RÉPONSES DES CNIDAIRES FACE AUX PERTURBATIONS 26
   2.1. Implication de bactéries dans les mortalités massives de Méditerranée 26
   2.2. Rôle des communautés bactériennes dans la santé des coraux 27
3. MÉTHODES EMPLOYÉES, OBJECTIFS DE LA THÈSE ET ORGANISATION DU MANUSCRIT 30
   3.1. Méthodes d'étude des communautés bactériennes associées, avantages et limites 30
      3.1.1. L'approche culturale 31
      3.1.2. Les approches moléculaires 31
         3.1.2.1. Méthodes sans *a priori* 32
         3.1.2.2. Méthodes avec *a priori* 35
   3.2. Difficultés d'étude d'un nouvel organisme modèle en microbiologie 38
   3.3. Problématique et objectifs de la thèse 39
   3.4. Organisation du manuscrit 40

Chapitre II Diversité et variabilité spatio-temporelle des communautés bactériennes associées à *P. clavata* **43**

1. INTRODUCTION 45
2. MATERIALS AND METHODS 47
   2.1. Ethics Statement 47
   2.2. Sample collection and processing 47
   2.3. DNA extraction 48
   2.4. DGGE analysis 49
      2.4.1. PCR amplification 49
      2.4.2. Electrophoresis conditions and DGGE band analysis 50
   2.5. T-RFLP analysis 50
      2.5.1. PCR amplification, enzymatic digestion and T-RFLP 50
      2.5.2. Statistical analysis of the spatiotemporal variability 51
   2.6. Bacterial clone library construction 52
   2.7. Phylogenetic analysis 53
   2.8. Nucleotide sequences accession numbers 53
3. RESULTS 54
   3.1. DGGE fingerprinting of *P. clavata*-associated bacterial communities 54
   3.2. T-RFLP analysis of bacterial community variation 55
   3.3. Phylogenetic analysis of 16S rDNA clone libraries 59

4. DISCUSSION 62

Chapitre III Localisation *in situ* des communautés bactériennes associées à *P. clavata* 71

1. INTRODUCTION 73

2. MATERIALS AND METHODS 75

2.1. Sampling, fixation and decalcification 75
2.2. Thin sectioning 75
2.3. Control slides 76
2.4. Permeabilization 76
2.5. Autofluorescence reduction 76
2.6. Hybridization 77
2.7. Amplification 78
2.8. Microscopy and image processing 78

3. RESULTS AND DISCUSSION 79

Chapitre IV Stabilité des communautés bactériennes associées à *P. clavata* en conditions de stress 87

1. INTRODUCTION 89

1.1. Contexte de l'étude 89
1.2. Objectifs du travail 91
1.3. Méthodologie commune à l'étude des stress *in situ* et expérimentaux 92

2. ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES À DES GORGONES SUBISSANT UNE MORTALITÉ *IN SITU* 93

2.1. Matériels et méthodes 93
2.2. Résultats et interprétation 94

3. ÉTUDE DE LA RÉPONSE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES AU STRESS THERMIQUE EN CONDITIONS CONTRÔLÉES 97

3.1. Présentation des expérimentations 97
3.2. Expérience A : Etude de la réponse à une augmentation graduelle de la température 99
3.2.1. Matériels et méthodes 99
3.2.2. Résultats et interprétation 100
3.3. Expérience B : Etude de la réponse à une augmentation rapide de la température 102
3.3.1. Matériels et méthodes 102
3.3.2. Résultats et interprétation 104

4. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA DÉSTABILISATION DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES PAR TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE 107

4.1. Expérience de traitement antibiotique utilisant la ciprofloxacine 107
4.1.1. Matériels et méthodes 107
4.1.2. Résultats et interprétation 110
4.2. Expérience de traitement par un mélange d'antibiotiques (ampicilline, streptomycine, tétracycline) 111
4.2.1. Matériels et méthodes 111
4.2.2. Résultats et interprétation 113

5. DISCUSSION 115

5.1. Synthèse des principaux résultats 115
5.2. Facteurs impliqués dans la stabilité ou la modification des communautés bactériennes associées 116
5.3. Résilience des communautés associées à *P. clavata* 118
5.4. Perspectives 119

Chapitre V Spécificité des associations bactéries-gorgonaires 123

1. INTRODUCTION 125
2. MATERIALS AND METHODS 127
2.1. Sample collection and DNA extraction 127
2.2. T-RFLP analysis 128
2.2.1. PCR amplification, enzymatic digestion and T-RFLP 128
2.2.2. Statistical analysis of the spatiotemporal variability 129
2.3. Bacterial clone library construction 130
2.4. Sequencing and phylogenetic analysis 130
3. RESULTS 131
3.1. Interspecific and seasonal comparison of bacterial communities 131
3.2. Taxonomic affiliation of associated bacteria 134
3.3. Phylogenetic comparison of *Hahellaceae* bacteria from different gorgonian host species 138
4. DISCUSSION 139

Chapitre VI Conclusion générale et Perspectives 145

1. Synthèse des principaux résultats 147
2. Propositions d'alternatives techniques et perspectives 149

Annexes 155

ANNEXE 1 La Rivière M., Roumagnac M., Garrabou J.,Bally M., 2013. Transient shifts in bacterial communities associated with the temperate gorgonian *Paramuricea clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea. *PLoS One*, 8 (2): e57385. 157

ANNEXE 2 Recherche de la présence d'une communauté archéenne associée à *Paramuricea clavata* 173

ANNEXE 3 Recherche de bactéries cultivables associées à *P. clavata* 177

ANNEXE 4 Observation de l'ultrastructure des tissus de *P. clavata* en microscopie électronique à balayage 181

ANNEXE 5 Mise au point d'un protocole de CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridization) pour l'hybridation de cellules bactériennes dans les tissus de la gorgone rouge *P. clavata* 185

1. Mise au point du protocole de coupes transversales fines des tissus 185
2. Difficultés liées à l'autofluorescence des tissus de la gorgone 185
2.1. Choix des fluorochromes 186
2.2. Identification de l'origine de la fluorescence de bruit de fond 187

Glossaire 195

Références 203

Chapitre I

Introduction générale

1. LE CHANGEMENT CLIMATIQUE EN MILIEU MARIN

1.1. Effets du changement climatique sur les écosystèmes marins côtiers

Il est aujourd'hui admis que nous assistons à un changement climatique global de la planète lié à une augmentation sans précédent de la concentration de gaz à effet de serre (tels que le CO_2 ou le méthane) dans l'atmosphère (IPCC, 2007; Gosling *et al.*, 2011). L'étendue des processus physiques, chimiques et biologiques qui sont affectés rend la compréhension et la prédiction des conséquences de ce changement climatique très délicates. Les modifications induites ont différents impacts directs ou indirects sur le milieu marin et sur les organismes qui y vivent (Figure 1) et peuvent conduire à de profonds changements de la biodiversité par la modification de la distribution et de l'abondance des espèces selon leur capacité à tolérer des modifications de leur environnement et à s'y adapter (Harley *et al.*, 2006; Brierley et Kingsford, 2009; Hoegh-Guldberg et Bruno, 2010).

Tout d'abord, l'augmentation de la température planétaire se traduit par une hausse de la température moyenne des océans observée depuis quelques décennies (Levitus *et al.*, 2000). Cette hausse entraîne différentes conséquences sur les cycles hydrologiques et le couplage océan-atmosphère. En effet, le réchauffement global perturbe la circulation atmosphérique et donc les régimes climatiques, ce qui se traduit par (i) une augmentation de la fréquence et de l'intensité d'évènements météorologiques extrêmes (tempêtes, cyclones) impactant principalement les organismes des zones intertidales sensibles à l'hydrodynamisme, et (ii) l'intensification des précipitations qui affectent la salinité des eaux, leur turbidité ainsi que la quantité d'apports en nutriments et polluants telluriques (Harley *et al.*, 2006; IPCC, 2007). Il a également été montré que l'augmentation de la température et des précipitations facilite l'émergence et la persistance d'agents infectieux, ce qui conduit à un accroissement des maladies (Harvell *et al.*, 2002). L'autre conséquence majeure du changement climatique est l'augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique qui induit une baisse du pH des océans, causant des changements sensibles de la composition chimique de l'eau de mer (Doney *et al.*, 2009). L'acidification du milieu qui en résulte impacte particulièrement les organismes calcifiants, tels que les coccolithophoridés (membres du phytoplancton), certains mollusques et échinodermes, des algues corallines et de nombreux coraux (Orr *et al.*, 2005; Kroeker *et al.*, 2010). Ces modifications des conditions environnementales

ont des impacts directs et indirects sur les écosystèmes marins, en induisant par exemple (i) des mortalités d'organismes sessiles benthiques comme les coraux qui ne peuvent migrer pour fuir des températures supérieures à leur seuil de tolérance (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007), (ii) la modification de l'aire de distribution d'espèces thermophiles favorisées par rapport à des espèces tempérées (Perry *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2011), ou (iii) l'expansion d'espèces invasives favorisées par les nouvelles conditions de température et l'absence de compétiteurs endémiques (Occhipinti-Ambrogi, 2007) (Pour revue, voir Brierley et Kingsford, 2009; Reid *et al.*, 2009).

Dans la mesure où les différentes perturbations liées au changement global agissent le plus souvent en synergie, la résistance des organismes - et donc leur survie - peut être considérablement réduite face à de multiples facteurs de stress simultanés. Ces effets peuvent conduire à de profonds changements à l'échelle des populations qui pourront générer des effets en cascade touchant différents niveaux d'organisation biologique, des populations aux écosystèmes. Par exemple, l'augmentation de la mortalité de certains organismes dans un écosystème perturbé en diminue la diversité et l'abondance spécifique, ce qui bouleverse les interactions interspécifiques qui impactent elles-mêmes le fonctionnement global de l'écosystème (Figure 1).

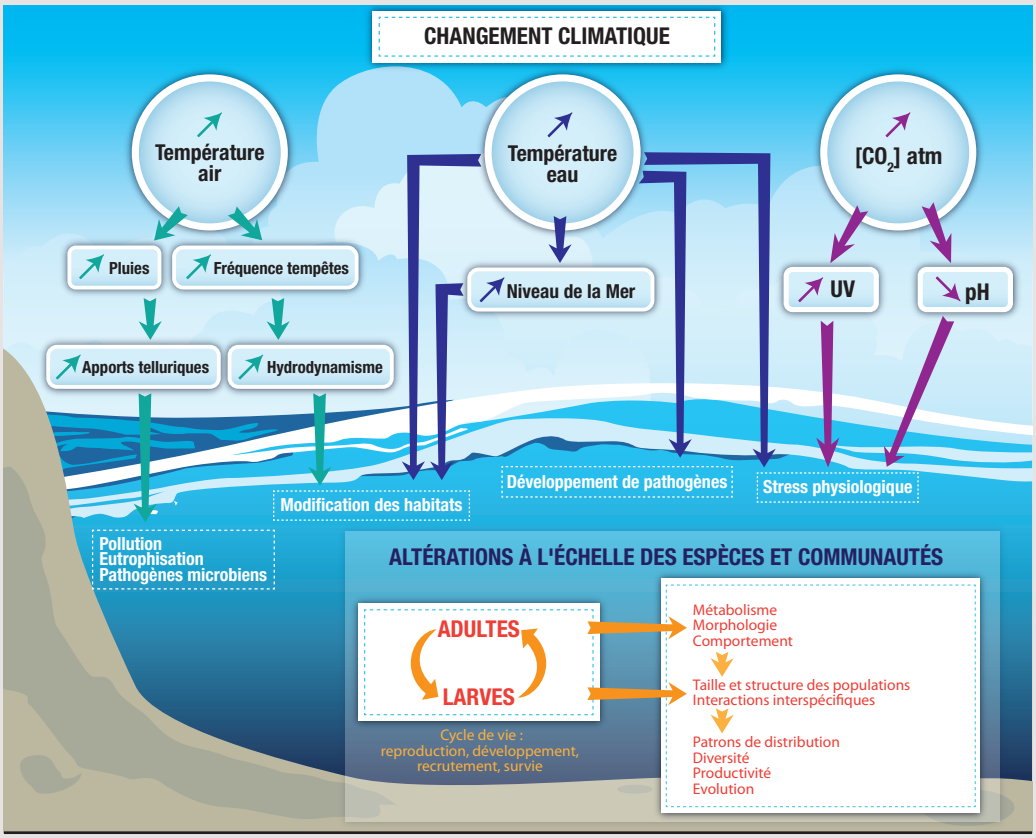


Figure 1 | Les principaux effets du changement climatique sur les écosystèmes côtiers marins.
Principales modifications environnementales liées au changement climatique et leurs impacts à différentes échelles en milieu marin.

1.2. Les évènements de mortalités massives : un impact majeur du changement climatique en mer Méditerranée

Bien que la mer Méditerranée ne représente que 0,82 % de la surface totale des océans, elle abrite environ 6 % des espèces marines mondiales répertoriées, dont de nombreuses espèces endémiques. A ce titre, elle est considérée comme un “hot spot” de biodiversité (Bianchi et Morri, 2000; Coll *et al.*, 2010). Cette riche biodiversité méditerranéenne est cependant menacée par le régime croissant de perturbations d’origine anthropique qui s’exercent en milieu marin. Les plus remarquables sont la pollution, la destruction des habitats, l’accroissement de l’effort de pêche, l’explosion du tourisme plaisancier et sous-marin, l’introduction d’espèces invasives, ainsi que plus récemment le changement climatique global (Coll *et al.*, 2010; Lejeusne *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2011; de Madron *et al.*, 2011). En effet, les impacts du changement climatique semblent prendre de plus en plus d’importance en Méditerranée depuis les dernières décennies (Bethoux *et al.*, 1999; Romano et Lugrezi, 2007; Bensoussan *et al.*, 2010; de Madron *et al.*, 2011). Cet ensemble de perturbations engendre de fortes modifications de la structure et du fonctionnement des écosystèmes, notamment au niveau des biotopes marins côtiers (Lejeusne *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2011; Albouy *et al.*, 2013). C’est pourquoi le maintien des biocénoses remarquables à forte diversité devient très préoccupant dans le contexte actuel de changement global (Mills *et al.*, 1993; Ballesteros, 2006; Boudouresque *et al.*, 2009).

Parmi ces biocénoses se trouvent les communautés coralligènes, assemblages d’organismes benthiques sessiles des fonds rocheux en zone côtière, qui présentent une forte richesse spécifique (environ 2000 espèces) et une grande complexité structurale (concrétionnement et développement d’espèces érigées) (Figure 2). De plus, ces assemblages coralligènes sont emblématiques des fonds sous-marins méditerranéens et présentent à ce titre un intérêt patrimonial et économique important. Cependant, l’écosystème coralligène est très vulnérable face aux différentes perturbations qui menacent le littoral méditerranéen, en particulier parce qu’il est dominé par des espèces longévives, à croissance lente et faible taux de recrutement, ayant des capacités de récupération limitées (Ballesteros, 2006; Calvo *et al.*, 2011). Les communautés coralligènes sont en particulier menacées par l’augmentation significative du nombre d’évènements de mortalités massives (EMM) et de maladies qui affectent principalement des espèces benthiques sessiles (Cerrano *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2001; Garrabou *et al.*, 2003; Garrabou

et al., 2009; Crisci *et al.*, 2011). Plusieurs EMM survenus en Méditerranée nord-occidentale en 1999, 2003, 2006 et 2008 ont notamment affecté plus d'une trentaine d'espèces d'invertébrés du coralligène répartis dans cinq groupes taxonomiques (spongiaires, cnidaires, bivalves, ascidies et bryozoaires) sur plusieurs centaines de kilomètres de linéaire côtier depuis le golfe de Naples et la Sardaigne (Italie) jusqu'aux côtes catalanes et îles Baléares (Espagne) en passant par la Corse et la côte provençale (France) (Cerrano *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Rodolfo-Metalpa *et al.*, 2005; Garrabou *et al.*, 2009; Cebrian *et al.*, 2011; Huete-Stauffer *et al.*, 2011). Parmi les espèces ayant été les plus affectées se trouvent quatre gorgonaires (Cnidaires, Anthozoaires, Octocoralliaires) : *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758), *Eunicella cavolini* (Koch, 1887) et *Eunicella singularis* (Esper, 1791) (Cerrano *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2009; Huete-Stauffer *et al.*, 2011). Ces quatre espèces sont caractérisées par une faible dynamique de population entraînant de faibles capacités de récupération face à l'augmentation des perturbations (Coma *et al.*, 1998; Linares *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2007). D'autre part, ce sont des espèces structurantes considérées comme des espèces clés et emblématiques des habitats coralligènes dans lesquels elles se développent. Leur abondance et leur rôle d'ingénieur de l'écosystème en font des modèles d'études privilégiés pour les recherches sur les impacts biologiques du changement climatique en Méditerranée.

Encadré 1 | Définition d'un "gorgonaire"

Le terme gorgonaire ("gorgonian"ou "gorgonian coral"en anglais) est communément employé pour faire référence à un groupe paraphylétique constitué des octocoraux branchus (colonies de polypes à 8 tentacules) qui contiennent un axe scléro-protéique avec différents degrés de calcification (sous-ordres des Calcaxonia, Holaxonia et Scleraxonia). Ces organismes présentent la caractéristique commune d'une grande longévité et de faibles taux de croissance. Ainsi le corail rouge *Corallium rubrum*, dont le squelette calcaire est très rigide, est usuellement qualifié de gorgonaire au même titre que la gorgone rouge *Paramuricea clavata* ou la gorgone tropicale *Gorgonia ventalina*, dont les colonies sont plus souples.

Les EMM observés en Méditerranée nord-occidentale ont été corrélés avec des anomalies thermiques positives en été (Romano *et al.*, 2000; Coma *et al.*, 2009; Garrabou *et al.*, 2009; Bensoussan *et al.*, 2010; Crisci *et al.*, 2011), ce qui suggère une implication majeure de la température comme facteur déclenchant des maladies, même s'il est fortement probable qu'une synergie entre de multiples facteurs intervienne. Il a en outre été montré que la plupart des mortalités observées sont survenues en fin de période estivale, alors que les gorgones subissent un stress nutritif et énergétique affaiblissant leur résistance face à la combinaison de différents facteurs de stress (Coma et Ribes, 2003; Coma *et al.*, 2009). Néanmoins, plusieurs mécanismes

biologiques doivent également être impliqués dans le déclenchement des EMM. Des expériences visant à recréer le stress thermique subi par les gorgonaires lors des EMM ont en effet montré que la température pouvait induire une réduction de l'activité métabolique mesurée par une baisse concomitante de la consommation en oxygène et de la réactivité des polypes (Previati *et al.*, 2010), ou favoriser l'infection des gorgones par des micro-organismes pathogènes (Bally et Garrabou, 2007). Enfin, des différences génétiques et physiologiques entre individus modulant leur capacité de réponse à ces différents stress (seuils de tolérance, mécanismes de protection) doivent très certainement intervenir car des taux de mortalités variables ont été observés aux niveaux inter- et intra-régionaux ou au sein même des populations (Garrabou *et al.*, 2009; Crisci *et al.*, 2011).

Figure 2 | Assemblage coralligène.
Représentation d'un assemblage coralligène des Iles Medes (Espagne) par M. Zabala et J. Corbera (Ros *et al.*, 1984).

La raréfaction ou la disparition des gorgonaires aurait un impact immédiat sur l'architecture des habitats coralligènes par la réduction de leur complexité spatiale et la diminution de la richesse spécifique associée, entraînant de lourdes conséquences écologiques et économiques (Linares *et al.*, 2005; Matias *et al.*, 2010). C'est pourquoi la connaissance des mécanismes d'altération et de récupération des gorgonaires est cruciale pour la prédiction du changement de la biocénose coralligène et la mise en place de mesures de conservation. En particulier, la compréhension de l'origine des réponses différentielles au stress observées lors des EMM pourrait être une clé essentielle pour l'établissement de plans de protection efficaces des populations de gorgonaires, par exemple en protégeant préférentiellement les populations les plus résistantes et/ou en concevant des actions de restauration à partir de ces mêmes populations.

C'est dans le but de comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans les processus de mortalités et de récupération des espèces affectées qu'un ensemble d'études intégratives et pluridisciplinaires s'appuyant sur les gorgonaires méditerranéens comme espèces modèles est mené dans différents laboratoires depuis l'observation de l'événement de mortalité massive de 1999. Les travaux ont été développés dans le cadre de plusieurs projets de recherche nationaux et internationaux portant principalement sur l'étude de :

- la diversité des assemblages coralligènes et de leur évolution[1] [2] (Teixido *et al.*, 2013),
- les relations entre les conditions de température et leurs impacts sur les populations[3] (Bensoussan *et al.*, 2010; Crisci *et al.*, 2011),
- l'impact des perturbations et la résilience des populations de gorgonaires (incluant un volet de modélisation de la dynamique de populations)[4] (Linares *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2008a; 2008b),
- l'écophysiologie des gorgonaires (Ferrier-Pages *et al.*, 2009; Pey *et al.*, 2011)[4],
- la caractérisation des processus adaptatifs des gorgonaires[5],
- les synergies entre le réchauffement climatique et d'autres facteurs de stress associés au changement global : acidification[6] (Bramanti *et al.*, 2013) et espèces invasives (Cebrian *et al.*, 2012),
- le rôle des communautés bactériennes dans la santé des gorgonaires[7].

1 Projet MedDiversa ; http://meddiversa.medrecover.org
2 Projet Biorock ; http://biorock.medrecover.org
3 Projet Climcares ; http://climcares.medrecover.org
4 Projet Medchange (ANR 2005-2008)
5 Projet ADACNI ; http://adacni.imbe.fr
6 MedSea project ; http://medsea-project.eu
7 Projet MAGIC$_3$; http://www.magic3-project.com

Ce travail de thèse s'est déroulé dans le cadre de ce consortium, en contribuant à évaluer le rôle potentiel des bactéries (organismes unicellulaires procaryotes appartenant au règne des *Bacteria*) dans la santé des gorgonaires auxquels elles sont associées et à étudier la réponse au stress de ces communautés bactériennes.

1.3. La gorgone rouge *Paramuricea clavata*, invertébré modèle du coralligène

La gorgone rouge *Paramuricea clavata* a été choisie comme organisme modèle principal de cette thèse. La détection de micro-organismes pathogènes dans des échantillons de gorgones malades provenant de l'événement de mortalité de 2003 a motivé l'étude des communautés bactériennes naturellement associées à cette espèce (Bally et Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.,* 2010). De plus, cette espèce présente plusieurs avantages pour être utilisée comme modèle biologique. Elle forme des populations de forte densité et elle est particulièrement abondante dans la région de Marseille à partir de 10 mètres de profondeur, ce qui facilite les échantillonnages en plongée en scaphandre autonome. Les gorgones sont des organismes coloniaux pouvant atteindre 1 m de haut qui sont très faiblement impactés par le prélèvement d'échantillons qui cause une blessure très légère guérissant rapidement. Enfin, de nombreux travaux de recherche étudient cette espèce dans le domaine de l'écologie des populations, de l'écophysiologie ou encore de la génétique des populations, ce qui permet une approche intégrative pour une meilleure compréhension de mécanismes biologiques complexes (voir plus haut).

Les EMM, par leur étendue géographique et force d'impact, peuvent être considérés comme une source de perturbation majeure pour les populations de gorgone rouge. Contrairement à nombre de gorgones et coraux, la gorgone rouge *P. clavata* ne vit pas en symbiose avec des dinoflagellés photosynthétiques. Ainsi les mortalités d'individus sont caractérisées par la nécrose des tissus, c'est-à-dire leur mort au niveau cellulaire, et ne sont pas précédées d'épisodes de blanchissement. La nécrose est observable à l'œil nu et se caractérise par un changement de couleur du cœnenchyme qui devient noirâtre puis blanchâtre, et se détache de l'axe en laissant un squelette nu. Ce phénomène débute localement puis il peut se généraliser à l'ensemble de la colonie. La nécrose peut affecter totalement ou partiellement (à différents degrés) les colonies. Le squelette mis à nu est en général rapidement recouvert par une succession d'organismes épibiontes. Le développement de ces organismes peut entraîner la cassure des branches à cause du surpoids et de l'augmentation de la résistance à l'hydrodynamisme, ou provoquer dans les cas extrêmes le

détachement total des colonies (Perez *et al.*, 2000; Linares *et al.*, 2005) (Figure 3).

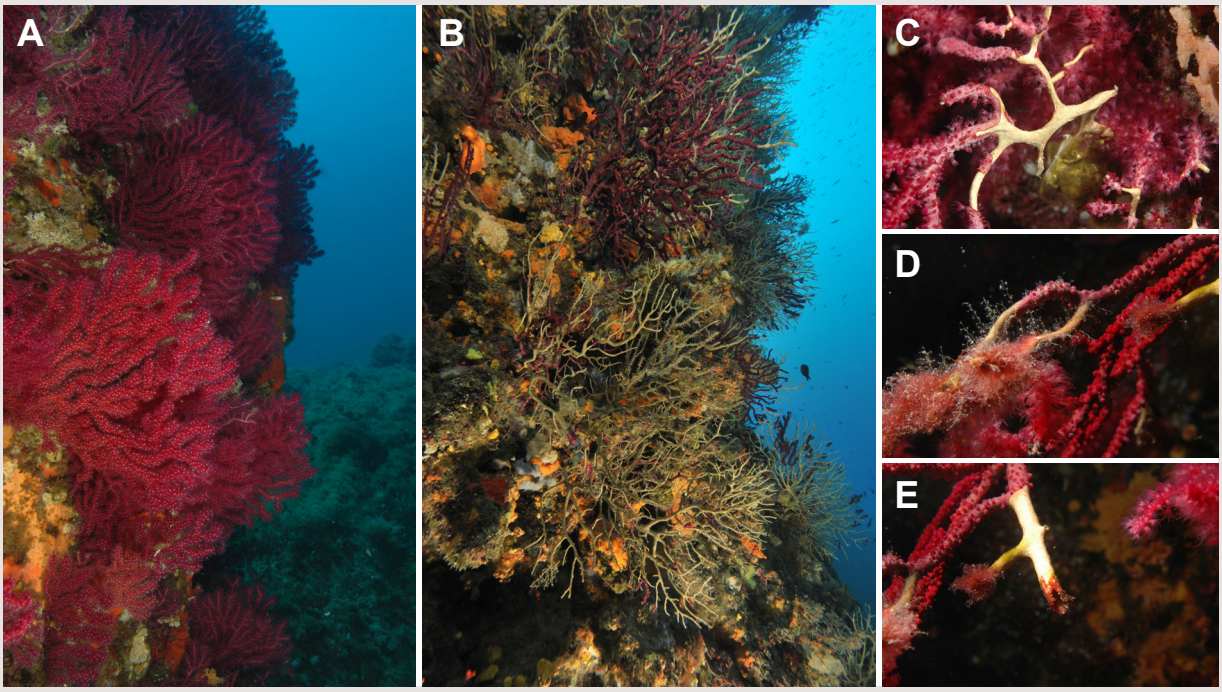


Figure 3 | Mortalités de colonies de *Paramuricea clavata*.
A : Population de gorgone rouge saine (© O. Bianchimani).
B : Population de gorgone rouge atteinte par une mortalité (© O. Bianchimani).
C à E : Succession d'étapes menant à la cassure des colonies ; les tissus nécrosent et se détachent de l'axe (C), l'axe dénudé est recouvert d'épibiontes (D), l'axe casse sous le poids des épibiontes (E) (© A. Haguenauer, F. Zuberer).

En plus des évènements de mortalités reliés aux anomalies thermiques, d'autres facteurs dont les effets observés sont en général restreints à des échelles plus locales peuvent impacter les populations de gorgone, tels que des perturbations d'origine anthropique (par exemple la pollution chimique, la dégradation mécanique par les engins de pêche, les mouillages de bateaux ou les plongeurs sous-marins) (Harmelin et Marinopoulos, 1994; Bavestrello *et al.*, 1997; Coma *et al.*, 2004), des perturbations associées à l'expansion d'espèces invasives (Cebrian *et al.*, 2012) ou encore la prolifération d'algues filamenteuses (Mistri et Ceccherelli, 1996; Giuliani *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2012).

Dans le contexte actuel de réchauffement des eaux de la Méditerranée, il est fort probable que la fréquence des anomalies thermiques positives augmente dans les années futures, ce qui pourrait avoir des impacts considérables sur les populations de gorgones. Dans ce contexte, il apparaît primordial de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le déclenchement des mortalités menaçant ces populations. Plus particulièrement, cette thèse

se concentre sur l'amélioration des connaissances des facteurs conditionnant la stabilité et la résilience des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge, ayant potentiellement un rôle dans la santé de leur hôte face aux perturbations.

Encadré 2 | Traits d'histoire de vie de *Paramuricea clavata*.

Paramuricea clavata est un invertébré sessile qui présente une couleur rouge violacée caractéristique lui valant son nom vernaculaire de gorgone rouge ou gorgone pourpre. Certains individus exhibent un dégradé de couleurs allant du carmin au jaune, ce caractère ayant longtemps semé la confusion dans la taxonomie avec la désignation *Paramuricea chamaeleon* (Gorgone caméléon, Koch 1887). La dénomination unique de *Paramuricea clavata* fut adoptée pour l'ensemble de ses morphotypes en 1963 par Carpine.

La gorgone rouge forme des colonies arborescentes qui peuvent atteindre 50 à 100 cm et en font l'un des plus grands invertébrés fixés de Méditerranée. C'est un organisme colonial constitué d'un squelette interne composé de spicules et d'un axe central organique. Son squelette est recouvert d'un tissu, le cœnenchyme, et de polypes à 8 tentacules pennés. Le polype est l'unité fonctionnelle de la colonie qui assure les activités de nutrition, respiration et reproduction.

Les colonies sont regroupées en populations denses qui constituent l'un des paysages les plus attractifs et appréciés des fonds méditerranéens. La distribution des populations isolées les unes des autres par plusieurs centaines de mètres au sein de l'écosystème coralligène est influencée par de nombreux facteurs tels que le type de substrat, la luminosité, la température et l'hydrodynamisme (Weinberg, 1975; 1980; Zabala et Ballesteros, 1989; Ballesteros, 2006). On les rencontre majoritairement sur des parois, mais aussi sur les fonds de blocs à fort concrétionnement, exposées à un fort courant dans la zone circalittorale (15 à 80 m). Cette espèce sciaphile est communément présente en mer Méditerranée occidentale et Adriatique (Carpine et Grasshoff, 1975), plus localement en mer Egée (Öztürk *et al.*, 2004) et sur les côtes orientales de l'Atlantique proches du détroit de Gibraltar (Weinberg, 1994).

La gorgone rouge est une espèce longévive dont les individus peuvent atteindre un âge de 50 à 100 ans (Linares *et al.*, 2007). Elle présente une vitesse de croissance en hauteur particulièrement lente estimée à 8 $mm.an^{-1}$ en moyenne (Coma *et al.*, 1998; Linares *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2007). Sa croissance s'effectue principalement au printemps quand la disponibilité en aliments est maximale et les colonies investissent peu d'énergie dans la reproduction (Coma *et al.*, 1998). Les individus ayant atteint la maturité sexuelle mesurent environ 10 cm de hauteur et sont âgés en moyenne de 13 ans (Coma *et al.*, 1995). La reproduction s'effectue par mode sexué et fécondation externe. *P. clavata* est une espèce gonochorique et itéropare qui ne présente pas de dimorphisme sexuel. Entre les mois de juin et juillet, la gorgone rouge connaît deux ou trois épisodes reproductifs durant lesquels les gamètes sont expulsés (Coma *et al.*, 1995). Bien que les épisodes de libération des gamètes soient synchrones entre les individus d'une même population, des décalages temporels ont pu être observés entre des populations distantes. Il semblerait que ces évènements reproductifs soient dépendants de l'augmentation de la température de l'eau et coordonnés au cycle lunaire (Coma *et al.*, 1995; Gori *et al.*, 2007). Les œufs restent attachés à la surface des colonies mères par un mucus créant un chapelet d'œufs. Les larves planula se développent deux à trois jours après la fécondation à la surface de la colonie mère (Linares *et al.*, 2008a). Une fois libérées dans le milieu, les larves tombent sur le fond à proximité du pied maternel et se métamorphosent en polype primaire à 8 tentacules après fixation au substrat. Un comportement similaire a été observé lors d'expérimentations en aquariums où les larves présentent une phototaxie négative, une courte période de nage puis se fixent sur le fond (Linares *et al.*, 2008a). Les embryons et larves de *P. clavata* présentent une forte sensibilité au stress thermique qui affecte leur viabilité et leur développement (Kipson *et al.*, 2012). La gorgone rouge présente de faibles capacités de dispersion et les évènements de fécondation ont le plus souvent lieu à courte distance (Mokhtar-Jamai *et al.*, 2011).

P. clavata est un suspensivore passif dont le régime alimentaire est hétérogène. Outre la matière organique détritique particulaire, elle consomme diverses proies qui s'étendent sur une large classe de taille allant de nanoeucaryotes mesurant moins de 4 µm jusqu'aux copépodes mesurant 700 µm, en passant par des ciliés, dinoflagellés, diatomées ou encore des œufs et larves d'invertébrés variés (Coma *et al.*, 1994; Ribes *et al.*, 1999).

Des expériences de thermotolérance ont pu mettre en évidence qu'une température de 25°C représente un seuil critique pour la survie des colonies de gorgone rouge (Crisci, 2011). Des études sur les processus d'adaptation et/ou d'acclimatation pouvant expliquer les réponses différentielles des colonies de gorgone rouge au stress thermique sont actuellement en cours dans plusieurs laboratoires.

2. LES BACTÉRIES, CLÉS DE COMPRÉHENSION DES RÉPONSES DES CNIDAIRES FACE AUX PERTURBATIONS

2.1. Implication de bactéries dans les mortalités massives de Méditerranée

Différents travaux portant sur l'étude des facteurs microbiens potentiellement impliqués dans le déclenchement des maladies affectant *P. clavata* ont permis l'isolement de différentes bactéries à partir de tissus nécrosés, dont des souches pathogènes appartenant au genre *Vibrio* (Martin *et al.*, 2002; Bally et Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010; Huete-Stauffer *et al.*, 2011). Ces isolats étaient apparentés à *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* et *Vibrio coralliilyticus*, trois espèces bactériennes ayant montré un potentiel pathogène chez d'autres organismes marins (Ben-Haim *et al.*, 2003a; Gomez-Gil *et al.*, 2004; Austin *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2010; Croquer *et al.*, 2013). En particulier, *V. coralliilyticus* a été précédemment décrit comme pathogène thermo-dépendant chez le corail tropical *Pocillopora damicornis* en mer Rouge et océan Indien (Ben-Haim et Rosenberg, 2002).

Des infections expérimentales en aquariums à des températures contrôlées, visant à recréer les conditions de températures enregistrées *in situ* lors des EMM, ont conduit à associer l'étiologie des nécroses à la présence de *V. coralliilyticus* (Bally et Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010). En effet, les isolats de *V. coralliilyticus* inoculés à des colonies saines ont permis de vérifier les postulats de Koch et entraînent l'apparition de symptômes de nécrose identiques à ceux observés sur le terrain durant les EMM. Ces expériences en aquariums ont également mis en évidence le caractère thermo-dépendant de la pathogénicité de ces bactéries en montrant un déclenchement rapide des symptômes au-delà d'une température de 25°C.

De nombreuses publications ont relaté l'implication de *V. coralliilyticus* dans des maladies de cnidaires hexa- et octocoralliaires, suscitant un fort intérêt pour la compréhension des mécanismes de virulence du pathogène et de défense des organismes affectés (par exemple Pollock *et al.*, 2010a; 2010b; Vizcaino *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011; Vidal-Dupiol *et al.*, 2011; Kimes *et al.*, 2012). Il a en outre été suggéré que ce pathogène pouvait faire partie de la communauté bactérienne naturelle associée aux coraux sains, et être opportuniste en profitant d'un hôte affaibli et d'une température favorable pour se multiplier et coloniser les tissus (Bourne et Munn, 2005; Huete-Stauffer *et al.*, 2011).

2.2. Rôle des communautés bactériennes dans la santé des coraux

Dans le contexte d'augmentation des perturbations et des maladies qui affectent gravement les récifs coralliens, la nécessité de comprendre les mécanismes impliqués dans la santé des coraux a conduit à l'émergence du domaine de la "microbiologie des coraux" (Sutherland *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2007b). Le développement des techniques moléculaires d'étude des procaryotes a en outre permis de montrer que plusieurs dizaines, voire centaines de micro-organismes différents (bactéries, archées, fungi, virus et protistes, formant un microbiote) vivent en symbiose avec les coraux, comme avec tout autre organisme eucaryote terrestre ou marin, animal ou végétal (Zilber-Rosenberg et Rosenberg, 2008). Le terme "holobionte" a d'ailleurs été proposé comme terme générique pour regrouper l'hôte (corail) et le microbiote symbiotique qui lui est associé (Rohwer *et al.*, 2002) (Figure 4).

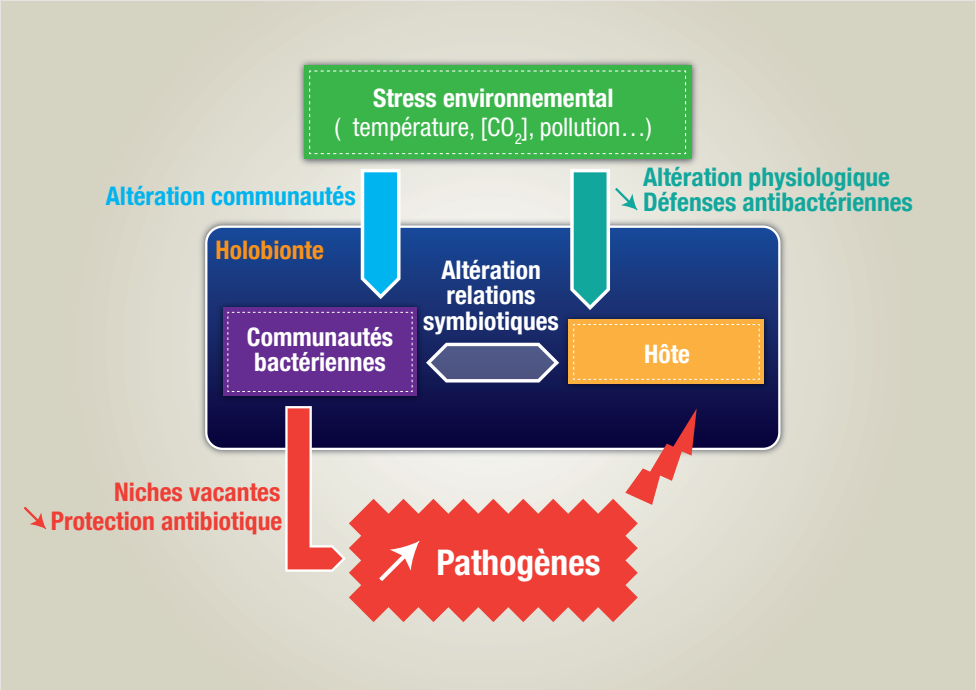


Figure 4 | Mécanismes de déstabilisation de l'holobionte par un stress environnemental.
Différents modes d'altération des associations entre hôte et communautés bactériennes au sein d'un holobionte et pouvant mener à l'installation de pathogènes.

Reshef *et al.* (2006) ont alors formulé *L'hypothèse probiotique des coraux* (*The coral probiotic hypothesis*), selon laquelle il existe au sein de l'holobionte des relations dynamiques qui permettent de sélectionner les partenaires les plus avantageux pour maximiser la "fitness" (capacités d'adaptation, survie et reproduction) de l'holobionte, en modifiant la composition de

la communauté microbienne en réponse à un changement des conditions environnementales. Une généralisation de ce concept a ensuite été proposée sous le nom *Théorie de l'hologénome* (*The Hologenome theory*), selon laquelle l'hologénome est défini comme la somme de l'information génétique de l'hôte et de son microbiote et doit être considéré comme une unité de sélection évolutive (Rosenberg *et al.*, 2007b; Zilber-Rosenberg et Rosenberg, 2008; Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2011). Cette théorie se base sur 4 postulats : (i) tous les animaux et plantes vivent en symbiose avec divers micro-organismes, (ii) les associations hôtes-symbiotes affectent la fitness de l'holobionte, (iii) les variations de l'hologénome peuvent être indifféremment dues à des changements génétiques de l'hôte et/ou des partenaires microbiens, et (iv) ces variations génétiques, ainsi que la composition du microbiote, peuvent être transmises d'une génération à l'autre avec fidélité, et donc influencer l'évolution de l'holobionte (Zilber-Rosenberg et Rosenberg, 2008; Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2011). Ces théories, initialement proposées pour le modèle de l'holobionte corail, ont été généralisées à d'autres organismes.

Les études visant à caractériser la composante bactérienne de l'holobionte corail ont notamment permis de montrer que les compositions des communautés bactériennes associées aux coraux (notées CBAC) sont (i) très diverses (Rohwer *et al.*, 2002), (ii) différentes de celles retrouvées dans l'eau de mer et le sédiment environnants (Frias-Lopez *et al.*, 2002; Bourne et Munn, 2005; Reis *et al.*, 2009; Sunagawa *et al.*, 2010; Schottner *et al.*, 2012), (iii) variables entre les compartiments physiques (tissus, mucus, squelette) d'une même colonie de corail (Sweet *et al.*, 2011), et (iv) parfois conservées entre différentes colonies d'une espèce de corail, même séparées géographiquement (Rohwer *et al.*, 2001; Rohwer *et al.*, 2002; Kvennefors *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012 ; Littman *et al.*, 2009). Ces observations supportent l'hypothèse que des associations spécifiques corail-bactéries joueraient un rôle clé dans le fonctionnement de l'holobionte en étant sélectionnées de manière à favoriser le maintien de l'homéostasie (Rohwer *et al.*, 2002; Reshef *et al.*, 2006).

Bien que la nature de ces interactions soit encore mal connue, les bactéries semblent avoir un rôle important dans la physiologie de l'hôte et dans ses capacités de résistance aux pathogènes. En effet, les symbiotes bactériens peuvent fournir à leur hôte des composés azotés, soufrés, carbonés et protéiques (Shashar *et al.*, 1994; Lesser *et al.*, 2007; Wegley *et al.*, 2007; Raina *et al.*, 2009). Il a également été observé que certaines bactéries associées produisent des composés antibiotiques

capables d'inhiber l'invasion par des pathogènes et contribueraient ainsi à la résistance de l'hôte face aux maladies (Koh, 1997; Ritchie, 2006; Nissimov *et al.*, 2009; Nithyanand et Pandian, 2009; Shnit-Orland et Kushmaro, 2009; Rypien *et al.*, 2010; Kvennefors *et al.*, 2011). La sélection de certaines espèces bactériennes en fonction des conditions environnementales permettrait une adaptation aux changements du milieu plus réactive que par des processus d'évolution génétique de l'hôte par mutation.

L'hypothèse probiotique des coraux a notamment été étayée par l'observation de plusieurs cas de changement (ou " shift ") de composition des CBAC en réponse à un stress, comme l'augmentation de la température (Ainsworth et Hoegh-Guldberg, 2009; Vega Thurber *et al.*, 2009), l'enrichissement en matière organique du milieu (Garren *et al.*, 2009; Vega Thurber *et al.*, 2009), ou le déclenchement d'une maladie (Sunagawa *et al.*, 2009; Cardenas *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012; Croquer *et al.*, 2013). Un cas de changement de composition des assemblages bactériens a même été observé avant l'apparition des symptômes visuels de blanchissement chez l'hôte (Bourne *et al.*, 2008).

Dans le cadre de cette hypothèse, les variations de composition des communautés bactériennes associées à *P. clavata* pourraient constituer un indicateur biologique précoce de la santé des populations et de leur prédisposition à la maladie, avant l'apparition des symptômes de nécrose qui sont la manifestation finale et irréversible du dépassement du seuil de tolérance des organismes.

Encadré 3 | Qu'est-ce que la symbiose ?

La symbiose est définie comme une association physique durable de deux organismes, qui peuvent en tirer un bénéfice mutuel dans le cas de la symbiose mutualiste. Dans ce type d'association, on nomme communément le plus grand partenaire comme "l'hôte" et les partenaires de plus petite taille comme "symbiotes" (ou "symbiontes"). Les associations symbiotiques entraînent souvent une innovation évolutive lorsque l'un des partenaires acquiert un ou plusieurs traits de l'autre (Margulis et Fester, 1991). La plus grande innovation évolutive liée à la symbiose, ou du moins la plus connue, est probablement la cellule eucaryote, telle que définie aujourd'hui avec un noyau et des organelles qui résulteraient de l'association symbiotique entre des eucaryotes ancestraux et des bactéries aérobies (devenues les mitochondries cellulaires) et des cyanobactéries (devenues les chloroplastes) (Gray, 1989). La création d'organismes chimériques, combinant les capacités des différents partenaires, permet aux eucaryotes d'accéder à la virtuosité métabolique, physiologique et chimique des procaryotes, et favorise une augmentation considérable de la diversité des organismes ainsi mieux adaptés à leur environnement particulier. Il a notamment été montré que la synthèse de nombreux métabolites bioactifs jusqu'alors attribuée aux organismes eucaryotes, provenait en réalité des bactéries qui leur sont associées (Piel, 2004; 2009), en particulier chez les invertébrés marins (Konig *et al.*, 2006; Uria et Piel, 2009; Blunt *et al.*, 2011), notamment les éponges (Taylor *et al.*, 2007; Siegl *et al.*, 2008; Thacker et Freeman, 2012), les bryozoaires (Haygood *et al.*, 1999) et les coraux (Piel, 2009; Uria et Piel, 2009; Blunt *et al.*, 2011).

3. MÉTHODES EMPLOYÉES, OBJECTIFS DE LA THÈSE ET ORGANISATION DU MANUSCRIT

3.1. Méthodes d'étude des communautés bactériennes associées, avantages et limites

"The bacteria await biologists as the black hole of taxonomy. Few scientists have tried to dream of how all that diversity can be assayed and used".

Edward O. Wilson , *The Diversity of Life*

L'étude des associations coraux-bactéries, de leur diversité (voir définition dans l'Encadré 4), de leurs variations et des facteurs capables d'influencer leur dynamique nécessite d'une part l'utilisation de techniques utilisées en microbiologie qui se sont considérablement développées durant les dernières décennies, et d'autre part l'adaptation au modèle biologique choisi. Afin d'appréhender les avantages et limites des différentes approches moléculaires employées dans les études de microbiologie marine, nous détaillons ici les techniques utilisées dans ce travail de thèse.

Encadré 4 | Notions de biodiversité et d'espèce en microbiologie.

"No one definition has satisfied all naturalists; yet every naturalist knows vaguely what he means when he speaks of a species."

Charles Darwin (1859)

Les écologistes définissent la biodiversité spécifique (diversité biologique des espèces) selon trois mesures alpha, beta et gamma : La diversité alpha est la diversité locale, c'est-à-dire la diversité taxonomique observée à l'intérieur d'un site ou d'un échantillon. La diversité beta fait référence à la différence de composition entre différents sites ou échantillons, alors que la diversité gamma fait référence à la diversité existante entre tous les sites combinés, intégrant la diversité des habitats composant l'écosystème considéré (Forney *et al.*, 2004; Magurran, 2004). La diversité alpha est elle-même définie selon trois paramètres: la richesse taxonomique (le nombre de taxons présents), l'équitabilité (l'abondance relative des taxons présents), et la composition taxonomique (l'identification des taxons présents) (Magurran, 2004).

Le concept d'espèce en microbiologie est une notion difficile à appréhender. La définition d'espèce telle que développée pour les organismes eucaryotes d'après le concept d'espèce biologique (Mayr, 1963), selon laquelle deux individus interféconds et dont les descendants sont fertiles appartiennent à la même espèce, n'est pas applicable aux organismes dépourvus de reproduction sexuée tels que les procaryotes. Le concept d'espèces chez les procaryotes s'est alors basé sur la différenciation morphologique, mais s'est rapidement trouvé limité par leur faible variabilité morphologique, et inadapté pour la description de souches non cultivables qui constituent pourtant la majorité du règne procaryote (Gordon, 1978; Colwell *et al.*, 1995). Or, la définition d'une espèce doit être universelle et applicable à tous les organismes. Rossello-Mora et Amann (2001) ont ensuite proposé la définition de "l'espèce phylo-phénétique", couplant différents aspects de caractérisation (l'aspect phénotypique, l'aspect phylogénétique et l'aspect génétique) qui énonce "une espèce phylo-phénétique est un ensemble, monophylétique et cohérent d'un point de vue génomique, d'organismes présentant un fort degré de similarité en respectant plusieurs caractéristiques indépendantes, et qui est identifiable grâce à une propriété phénotypique discriminante". Aujourd'hui, l'ouvrage "The Prokaryotes" fait référence pour la description d'une nouvelle espèce bactérienne (Dworkin *et al.*, 2006). Elle doit regrouper des individus qui se distinguent phénotypiquement des individus appartenant à une autre espèce et dont les génomes ou les séquences ADN ribosomal 16S s'hybrident à 70 % ou 97 % minimum respectivement. Cependant, il n'est souvent pas aisé de définir toutes les espèces en présence par cette approche.

Une alternative est d'évaluer la diversité à l'aide d'autres unités que l'espèce. Les individus doivent alors être regroupés en classes non chevauchantes selon un critère de classification cohérent (Kolasa et Biesiadka, 1984). L'Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) est un descripteur de la diversité communément utilisé en microbiologie moléculaire, basé sur la différenciation des groupes d'individus définis selon un critère arbitraire tel qu'un pourcentage de similarité de séquences ADNr 16S ou des classes de taille de longueurs de fragments ADN. Il est cependant important de garder à l'esprit que la définition d'OTU ne permet pas de définir des groupes monophylétiques parfaits car une espèce phylo-phénétique peut posséder plusieurs OTUs, et inversement, un OTU peut correspondre à plusieurs espèces phylo-phénétiques (Ramette, 2009; Kovacs *et al.*, 2010). La répartition en OTUs doit donc servir à l'étude de la diversité procaryote sans avoir la prétention de la décrire et la définir de manière exhaustive.

3.1.1. L'approche culturale

La culture bactérienne est la méthode souveraine pour l'identification et la caractérisation des souches présentes dans un échantillon (Palleroni, 1997). Cette technique *in vitro* permet le développement contrôlé de bactéries en mimant les conditions environnementales propices au développement microbien et conduit à l'obtention d'une population clonale génétiquement identique à la souche initiale. Malheureusement, son utilisation pour la caractérisation de communautés complexes se heurte au fait que moins de 1 % des espèces bactériennes sont cultivables (Rappé et Giovannoni, 2003), voire moins de 0,1 % des espèces dans le cas d'échantillons en provenance du milieu marin (Schleifer, 2004). La diversité bactérienne cultivable est donc très inférieure à la diversité réelle en présence. Cette limitation tient principalement au fait que les milieux artificiels ne reproduisent pas assez bien les conditions environnementales et ne permettent pas de restituer les réactions métaboliques interspécifiques rencontrées dans des environnements naturels complexes, nécessaires à la croissance des souches bactériennes.

3.1.2. Les approches moléculaires

Face aux limites de caractérisation de communautés complexes par culture et à la nécessité de comparer de multiples échantillons, le développement de méthodes dites "culture-indépendantes" basées sur l'étude des acides nucléiques (ADN ou ARN) s'est avéré salutaire pour les microbiologistes (Caron, 2005; Nocker *et al.*, 2007). Ces techniques permettent non seulement d'accéder à l'information taxonomique, mais également d'évaluer la diversité génétique, voire même la diversité fonctionnelle des communautés. On distingue deux types d'approches moléculaires : (i) les approches dites "sans *a priori*" permettant de caractériser la composition et/ou la structure des communautés en présence, et (ii) les approches dites "*a priori* " permettant la recherche de taxons d'intérêt (Figure 5). Ces approches moléculaires présentent bien sûr également des limites, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser différentes techniques complémentaires pour

inférer la diversité réelle en présence (Caron, 2005). Les limites des techniques utilisées dans ce travail sont décrites dans l'Encadré 5.

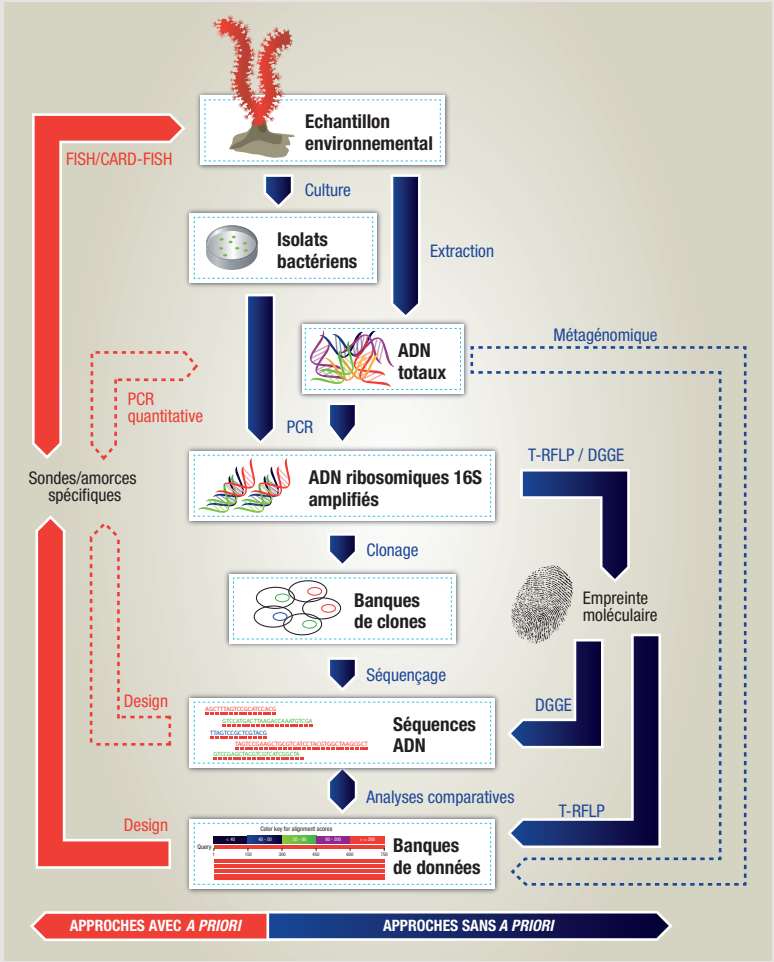


Figure 5 | Approches moléculaires en microbiologie environnementale.
Principales étapes utilisées dans certaines approches moléculaires, basées sur l'étude des ADN ribosomiques 16S, pour caractériser les communautés bactériennes d'un échantillon environnemental. Les approches avec ou sans *a priori* sont distinguées en rouge et en bleu respectivement. Les méthodes employées dans ce travail sont indiquées par des flèches pleines, les autres par des flèches pointillées (schéma adapté d'après Amann *et al.*, 1995).

3.1.2.1. Méthodes sans *a priori*

Les approches sans *a priori* rassemblent les techniques d'identification taxonomique et les techniques d'empreintes moléculaires.

L'identité taxonomique et le positionnement phylogénétique des souches présentes dans un échantillon peuvent être obtenus par clonage-séquençage, permettant d'obtenir une vue globale mais non exhaustive de la diversité en présence (Pedros-Alio, 2006b), ou par séquençage parallèle de masse, permettant d'explorer la diversité de la "biosphère rare" (Pedros-Alio, 2006a; 2006b).

Le séquençage de masse nécessite un traitement bioinformatique des données conséquent et difficile (Pedros-Alio, 2006a), et il présente un risque de surestimation de la diversité (Kunin *et al.*, 2010). Malgré la limite d'exploration de la diversité et le coût en temps et argent pour l'analyse comparative de multiples échantillons par l'approche de clonage-séquençage, cette méthode reste la plus commune pour les études des communautés bactériennes associées aux coraux (par exemple Sato *et al.*, 2010; Ceh *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2012), et a été utilisée dans ce travail (Figure 6). Pour pallier à ces limitations, le clonage-séquençage est souvent couplé à des techniques d'empreintes moléculaires permettant la comparaison des communautés bactériennes de multiples échantillons.

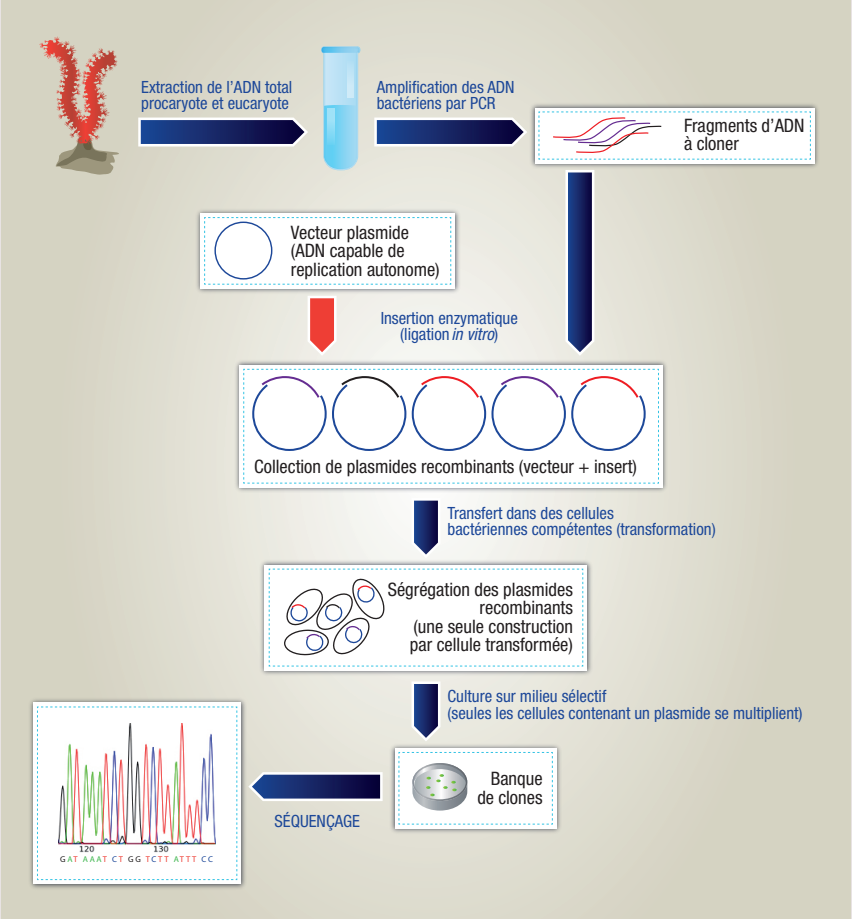


Figure 6 | Construction d'une banque de clones ADNr 16S. Etapes du clonage des ADN ribosomiques 16S bactériens à partir d'un échantillon de gorgone.

Il est en effet important de pouvoir analyser et comparer simultanément plusieurs échantillons de manière robuste, reproductible et statistique pour la compréhension des variations spatio-temporelles de la structure des communautés, de la biogéographie des organismes ou encore de

la réponse des communautés aux perturbations. Les techniques d'empreintes moléculaires basées sur le polymorphisme de taille ou de séquence d'un marqueur génétique choisi (généralement l'ADNr 16S - gène codant pour l'ARN ribosomal 16S - dans le cas des communautés bactériennes) offrent le meilleur compromis entre le nombre d'échantillons analysés et l'information obtenue. Différentes méthodes sont utilisées en microbiologie des coraux, telles que l'ARISA (Schottner *et al.*, 2012), la SSCP (Littman *et al.*, 2010), la DGGE (Kvennefors *et al.*, 2010; Tremblay *et al.*, 2011; Morrow *et al.*, 2012) ou la T-RFLP (Klaus *et al.*, 2005; Neulinger *et al.*, 2008; Littman *et al.*, 2009). Ces méthodes ne permettent pas de révéler la diversité bactérienne *per se*, à moins qu'elle ne soit très faible, car elles sont PCR-dépendantes. Cependant, elles permettent de déterminer l'abondance relative des espèces bactériennes majoritaires dans l'échantillon en se soustrayant des contraintes de cultures *in vitro*. Les techniques d'empreintes moléculaires semi-automatisées par électrophorèse en capillaires (comme la T-RFLP ou l'ARISA) sont considérées comme plus sensibles, plus reproductibles et plus rapides que les autres méthodes utilisant une électrophorèse sur gel, telles que la DGGE ou la SSCP (Marsh, 1999), particulièrement pour leur capacité à détecter des taxons peu abondants dans les assemblages bactériens.

La DGGE a été utilisée comme méthode d'analyse préliminaire à ce travail de thèse, puis abandonnée en raison des difficultés à comparer un grand nombre d'échantillons entre différents gels par manque de marqueur de migration précis. La suite de l'évaluation de la diversité des communautés bactériennes et de ses variations a donc été réalisée par l'analyse T-RFLP (Figure 7) qui présente un plus haut pouvoir résolutif et une meilleure reproductibilité, utiles pour une comparaison rapide et sensible des assemblages bactériens (Moeseneder *et al.*, 1999). La T-RFLP a été préférée à l'ARISA car elle offre théoriquement la possibilité de comparer les résultats aux bases de données des séquences d'ADNr 16S et d'accéder à l'identification taxonomique des espèces présentes (Osborn *et al.*, 2000) alors que les banques d'ITS sont peu fournies.

Il faut noter que les techniques sans *a priori* sont basées sur une étape d'amplification de l'ADN par PCR ce qui occasionne des biais techniques (Egert et Friedrich, 2003; Frey *et al.*, 2006) et des limites à l'étude de taxons minoritaires.

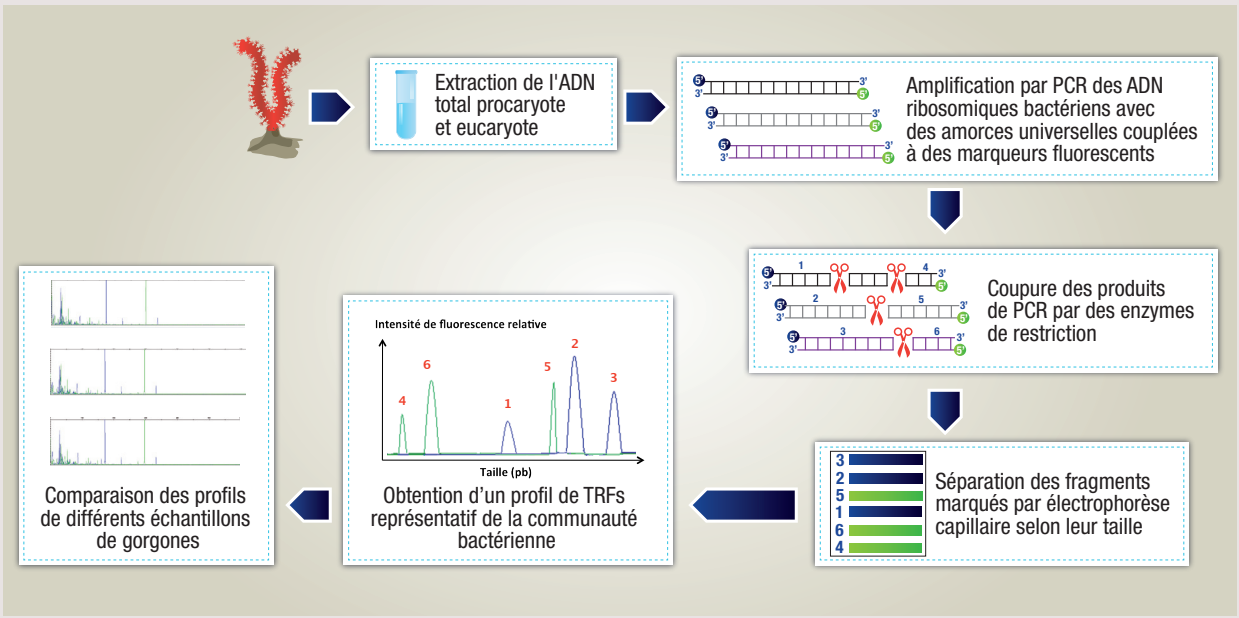


Figure 7 | T-RFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism.
Etapes de l'analyse des communautés bactériennes présentes dans un échantillon de gorgone par T-RFLP utilisant des marqueurs fluorescents couplés aux deux extrémités du fragment d'ADNr 16S amplifié par PCR.

3.1.2.2. Méthodes avec *a priori*

A la différence des approches sans *a priori* décrites précédemment qui ont vocation à décrire ou comparer les communautés bactériennes de manière objective, sans préjuger de leur composition et/ou de leur diversité, les approches *a priori* cherchent à quantifier ou mettre en évidence un ou plusieurs taxons (ou OTUs) définis (voir définition en Encadré 4).

En particulier, la quantité relative ou absolue des différents OTUs présents dans un échantillon ne peut être estimée par les approches sans *a priori* car elles sont basées sur l'analyse d'amplicons obtenus par PCR dont la quantité n'est pas proportionnelle à la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon. La PCR quantitative (qPCR, ou PCR en temps réel) a été développée pour déterminer l'abondance de séquences spécifiques dans un échantillon complexe. Cette approche à haute sensibilité permet d'accéder à deux niveaux de description d'une communauté bactérienne en fonction des amorces utilisées : (i) sa diversité taxonomique par l'utilisation d'amorces spécifiques d'un taxon bactérien d'intérêt permettant de calculer son abondance précise (Pollock *et al.*, 2010a; Bourne *et al.*, 2011), ou (ii) sa diversité fonctionnelle par l'amplification des ARN rétrotranscrits, permettant ainsi d'estimer le niveau d'expression de gènes fonctionnels d'intérêt. L'utilisation de cette technique requiert la disponibilité d'une

gamme étalon appropriée permettant de connaître la quantité d'ADN initiale pour quantifier l'efficacité d'amplification. Des travaux de mise au point de cette approche ont été entrepris en parallèle de ce travail de thèse, mais restent encore insuffisants pour permettre de quantifier l'abondance de ribotypes bactériens dominants de la gorgone rouge (données non montrées dans la suite du manuscrit).

Les approches basées sur l'extraction de l'ADN total nécessitent la destruction physique de l'échantillon le contenant. Il est donc impossible d'observer l'arrangement spatial des bactéries au sein de l'échantillon étudié. L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) couplée à l'observation en microscopie en épifluorescence ou confocale permet l'identification, la localisation et la visualisation directe des cellules bactériennes dans des échantillons de coraux (Bythell *et al.*, 2002; Ainsworth *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2012). Une méthode alternative, le CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-FISH), permet d'amplifier le signal fluorescent afin d'améliorer la détection des cellules hybridées. Cette technique présente un certain nombre de limites en plus de sa difficulté de mise au point, mais elle est la seule permettant d'appréhender la localisation des bactéries d'intérêt et a été utilisée dans ce travail pour investiguer la distribution des bactéries dans les tissus de *P. clavata* (Figure 8).

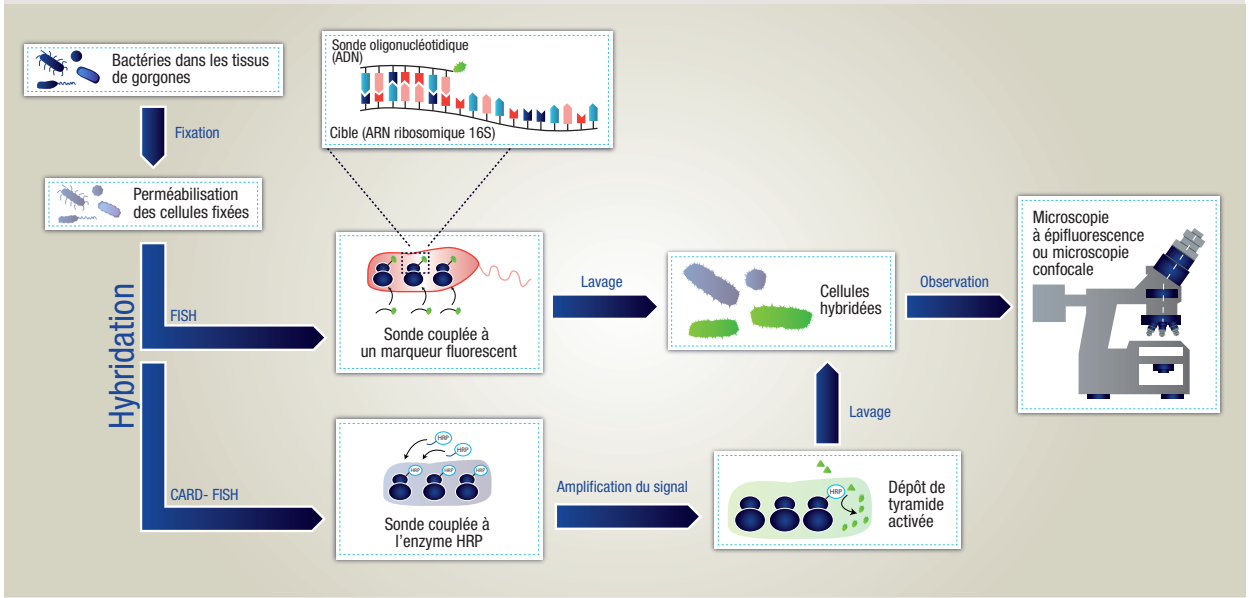


Figure 8 | FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) et CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition-FISH).
Etapes de la visualisation de bactéries d'intérêt dans des coupes de tissus de gorgone par deux techniques d'hybridation *in situ* (adapté d'après Amann et Fuchs, 2008).

Encadré 5 | Limites des approches moléculaires utilisées.

PCR

Toutes les techniques PCR-dépendantes présentent des limites (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Outre les contaminations potentielles inhérentes aux conditions de manipulation, les amorces universelles, créées pour amplifier théoriquement "toutes" les séquences bactériennes, hybrident principalement les taxons dominants dans l'échantillon. Certaines études estiment que des taxons représentant au moins 1 % du nombre de cellules total pourront être détectés par des techniques PCR-dépendantes, alors que des taxons correspondant à 0,1 % de la communauté ciblée auront des difficultés à être amplifiés (Muyzer *et al.*, 1993). En se basant sur ces considérations, Pedros-Alio (2006b) a proposé que les taxons identifiés par des méthodes initiées par une étape de PCR soient considérés comme reflet de la diversité d'une communauté (telle que définie dans l'Encadré 4) sans avoir la prétention de la décrire de manière exhaustive.

DGGE

La limite principale de la DGGE réside dans le fait qu'il n'existe pas de standard de taille précis et que la technique présente une faible reproductibilité rendant des comparaisons inter-gels difficiles et limitant donc le nombre d'échantillons de communautés bactériennes pouvant être comparés.

La technique reposant sur la visualisation de bandes sur gel, la distinction de bandes de faible intensité ou la différenciation entre un signal et un fort bruit de fond peuvent être laborieuses, ce qui induit une faible sensibilité de la technique et peut impliquer une sous-estimation de la diversité. De plus, l'évaluation de l'intensité de signal des bandes par des logiciels d'imagerie est peu précise.

L'utilisation de cette technique pour identifier les OTUs présents dans l'échantillon par séquençage des bandes d'intérêt peut être rapidement limitée par la faible taille des séquences générées (300-400 pb), compliquant l'identification taxonomique précise.

T-RFLP

L'identification des organismes correspondant à un TRF particulier est théoriquement possible par comparaison de la taille des pics déterminée par T-RFLP avec les tailles de TRFs prédits *in silico* à partir des séquences ADNr 16S issues des bases de données (Marsh *et al.*, 2000; Kent *et al.*, 2003; Fernandez-Guerra *et al.*, 2010). Cependant cette comparaison n'est pas aisée car la détermination de la taille exacte des TRFs d'après leur analyse sur séquenceur est imprécise (Kaplan et Kitts, 2003; Bukovska *et al.*, 2010). Une alternative est alors de construire pour l'échantillon d'intérêt une banque de clones qui seront analysés individuellement par T-RFLP puis séquencés pour permettre l'identification taxonomique des TRFs correspondants (Kitts, 2001; Widmer *et al.*, 2006).

De plus, la T-RFLP se base sur l'hypothèse qu'un seul fragment de restriction terminal (TRF) correspond à une seule espèce et qu'une seule espèce produit un seul pic. Or, ceci s'est avéré erroné dans plusieurs cas (Dunbar *et al.*, 2001; Avis *et al.*, 2006) car (i) plusieurs espèces différentes peuvent avoir le même site de restriction terminal et ainsi générer des TRFs de tailles identiques (Clement *et al.*, 1998; Osborne *et al.*, 2006), (ii) les sites de restriction terminaux de certaines espèces peuvent générer des TRFs dont la taille est inférieure au seuil de détection (et par conséquent considérés comme du bruit de fond) ou supérieure à la limite de détermination par le séquenceur, et (iii) une seule espèce peut générer plusieurs tailles de TRFs ("pseudo-TRFs") notamment dans le cas de digestions partielles (Egert et Friedrich, 2003; Avis *et al.*, 2006). Ces trois cas peuvent conduire à une estimation erronée (sous-estimation dans les deux premiers cas, surestimation dans le dernier) de la diversité bactérienne présente dans l'échantillon analysé et compliquer l'identification taxonomique des TRFs détectés (Osborn *et al.*, 2000). Il est alors intéressant de coupler l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction afin d'optimiser le nombre de TRFs observés.

FISH

La première limite du FISH est l'emploi de sondes nucléotidiques qui doivent être spécifiques et universelles pour le taxon ciblé. Il est en effet difficile de garantir qu'une sonde hybridera toutes les séquences du taxon d'intérêt présentes dans l'échantillon, et uniquement celles-ci, en particulier car les bases de données de séquences bactériennes disponibles pour tester l'universalité ou la spécificité d'une sonde ne sont pas exhaustives (Amann et Fuchs, 2008).

L'autofluorescence de nombreuses structures, liée à des composés chimiques souvent retrouvés dans les échantillons environnementaux (chitine, silice, cellulose, etc.), peut rendre la détection d'un signal de fluorescence difficile voire impossible parmi le bruit de fond.

Une autre limite est due au fait que les sondes hybrident des séquences d'ARN ribosomiques dont l'abondance varie selon l'activité métabolique de la cellule et l'accessibilité dépend de la position de la cellule cible dans l'échantillon. Les bactéries présentes dans des échantillons environnementaux étant faiblement actives (Morita, 1997), il est d'autant plus difficile de détecter un signal de fluorescence sur ce type d'échantillon, ce qui pourrait être interprété à tort comme l'absence de marquage.

3.2. Difficultés d'étude d'un nouvel organisme modèle en microbiologie

La gorgone rouge *P. clavata* n'avait jamais fait l'objet d'études microbiologiques hormis les travaux concernant les *Vibrio* isolés à partir de colonies malades. A notre connaissance, ce travail est donc le premier apport à l'étude des communautés bactériennes naturelles associées à un gorgonaire tempéré. Le caractère pionnier de cette thèse nous a confronté à plusieurs difficultés inhérentes à la nécessaire mise au point de techniques qui n'avaient jamais été utilisées sur cette espèce auparavant, auxquelles se rajoutent les limites intrinsèques des méthodes mises en oeuvre.

Tout d'abord, la mise au point d'un protocole d'extraction permettant l'isolation des ADNr 16S bactériens en quantité et qualité suffisantes pour l'amplification par PCR a été critique. En effet, les ADN de l'hôte et des micro-organismes associés sont nécessairement co-extraits, rendant impossible le dosage spécifique des ADN bactériens et la standardisation des quantités pour les approches PCR-dépendantes.

De plus, les tissus de la gorgone rouge contiennent une très grande quantité de pigments qui tendent à inhiber les réactions PCR. Ces pigments sont également responsables d'une très forte autofluorescence des tissus en microscopie à épifluorescence ou en microscopie confocale, mais aucune description des molécules impliquées n'était disponible pour nous permettre de nous soustraire de ce bruit de fond. De même, la mise au point d'un protocole de fixation, la réalisation de coupes fines et l'identification des structures tissulaires de *P. clavata* ont été nécessaires avant de pouvoir étudier les bactéries associées.

Enfin, la mise au point de protocoles expérimentaux pour évaluer l'effet de stress contrôlés a dû être entreprise. La difficulté principale rencontrée a été l'observation de réponses différentielles au stress de fragments clonaux issus de la même colonie. Des protocoles de maintien des échantillons en conditions stériles et de traitements antibiotiques ont également dû être mis au point pour tenter de déstabiliser les communautés bactériennes.

Ces mises au point techniques chronophages sont peu valorisantes en terme de quantité de résultats acquis, mais serviront assurément les études à venir sur ce nouveau modèle biologique en microbiologie.

3.3. Problématique et objectifs de la thèse

Parmi les multiples facteurs potentiels impliqués dans le déclenchement des mortalités massives affectant *P. clavata*, la piste bactérienne a rapidement suscité un intérêt particulier par (i) la similitude des symptômes et leur extension rapide dans les populations rappelant une épidémie infectieuse, et (ii) l'identification de bactéries pathogènes apparentées à celles observées dans des cas de maladies de coraux tropicaux. Ces rapprochements ont éveillé la curiosité des microbiologistes marins pour rechercher l'existence de relations entre gorgones méditerranéennes et bactéries, et fournir les bases permettant d'étudier les mécanismes microbiens impliqués dans les maladies et mortalités chez ces organismes. Dans la ligne des travaux réalisés sur les coraux tropicaux, la caractérisation de l'architecture globale des communautés bactériennes associées naturellement à la gorgone rouge est alors apparue indispensable pour savoir si *P. clavata* pouvait être considérée comme un organisme holobionte et évaluer une possible contribution des bactéries au maintien de son état biologique. C'est dans ce contexte que s'est inscrite cette thèse.

Cette thèse présente donc la première étude des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge de Méditerranée *P. clavata,* avec comme objectif général de contribuer à une meilleure compréhension des interactions existant entre la gorgone et le compartiment bactérien de son microbiote associé. Cet objectif peut être décliné en trois questions :

- Quelles sont les caractéristiques des communautés bactériennes associées à *P. clavata* en terme de diversité et d'abondance, quelle est leur variabilité spatiale et temporelle et comment sont-elles associées aux tissus ?

- Les communautés bactériennes associées à *P. clavata* sont-elles sensibles aux stress environnementaux et jouent-elles un rôle dans la santé et/ou la résilience des individus face aux perturbations ?

- Les associations bactéries-gorgone sont-elles généralistes ou spécifiques de l'espèce hôte ?

Cette description d'un nouveau modèle de cnidaire holobionte du coralligène permet d'établir des comparaisons entre un organisme tempéré et les modèles tropicaux sur lesquels de nombreux concepts et techniques de microbiologie sont développés, et ainsi de mettre en parallèle la réponse d'organismes provenant de milieux très contrastés face à des perturbations et menaces communes.

3.4. Organisation du manuscrit

Les travaux rapportés sont organisés en quatre chapitres (dont trois présentés sous forme de publications scientifiques en anglais) suivis d'une conclusion générale et de la proposition de plusieurs perspectives de recherche.

Le premier chapitre porte sur la description des communautés bactériennes associées à des colonies de gorgone rouge apparemment saines, échantillonnées bi-annuellement en trois sites de Méditerranée nord-occidentale durant 4 ans. La caractérisation de la composition des assemblages bactériens et de leur variabilité spatio-temporelle a été entreprise par comparaison de l'empreinte moléculaire des différentes communautés par T-RFLP, couplée au séquençage de banques de clones d'ADN ribosomique 16S. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le journal PLoS ONE parue en 2013 (Annexe 1). Des travaux préliminaires de recherche de communautés archéennes et de communautés cultivables associées à *P. clavata* sont décrits en Annexes 2 et 3.

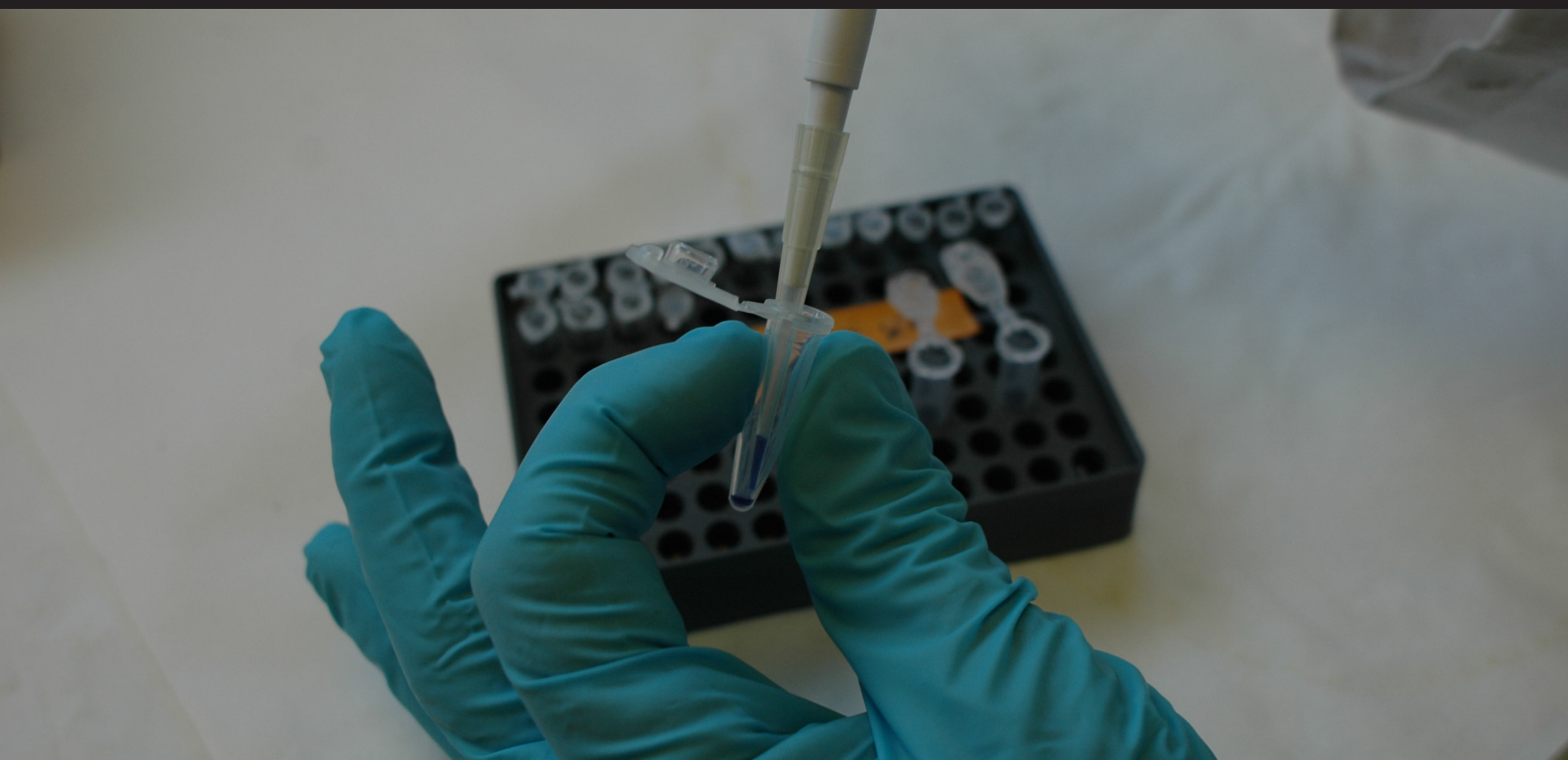
Le deuxième chapitre présente la description histologique de la gorgone rouge sur coupes semi-fines, suivie de la recherche de la localisation des bactéries dans les tissus de *P. clavata* par CARD-FISH. Les étapes de la mise au point du protocole d'hybridation, notamment de la réduction de l'autofluorescence des tissus de la gorgone, sont énoncées en Annexe 4. Les travaux préliminaires de caractérisation de l'ultrastructure des tissus de *P. clavata* par microscopie électronique à balayage (MEB) sont décrits en Annexe 5.

Le troisième chapitre présente l'étude préliminaire de la réponse des communautés bactériennes de *P. clavata* à différents types de stress : stress naturel lors d'une mortalité naturelle de gorgones, stress thermique en conditions contrôlées et traitements antibiotiques.

Le quatrième et dernier chapitre rapporte une analyse comparative des communautés bactériennes associées à trois autres espèces de gorgonaires (le corail rouge *Corallium rubrum*, la gorgone jaune *Eunicella cavolini* et la gorgone blanche *Eunicella singularis*) sympatriques de *P. clavata* au site échantillonné. La variation saisonnière entre été et hiver a été étudiée par T-RFLP, l'identification des ribotypes a été effectuée par séquençage de banques de clones ADNr 16S et une analyse phylogénétique a été réalisée pour comparer les ribotypes majoritaires identifiés chez cinq espèces de gorgonaires (quatre méditerranéenes et une tropicale).

Chapitre II

Diversité et variabilité spatio-temporelle des communautés bactériennes associées à *P. clavata*



1. INTRODUCTION

The interactions between microbial communities and sessile marine invertebrates such as sponges or corals are increasingly recognized as a critical component of the overall biology of these organisms. Recent research on the microbiology of scleractinian corals has demonstrated close relationships between the hexacoral animal and numerous prokaryotic organisms, and studies on coral reef ecosystems should consider the coral host with its associated microbiota as a unique evolutionary unit termed the "holobiont" (Rohwer *et al.*, 2002; Reshef *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2007b). Corals harbor highly diverse bacterial communities, and several reports have highlighted the existence of specific coral-bacteria associations that are mostly maintained among colonies from the same locality or even across distinct geographical locations (Rohwer *et al.*, 2001; Frias-Lopez *et al.*, 2002; Rohwer *et al.*, 2002; Bourne and Munn, 2005; Lampert *et al.*, 2008). These bacterial assemblages may play important roles in the host's physiology, mainly through their functions in nutrient cycling and health status (Sharp and Ritchie, 2012). In particular, there is increasing evidence for a relationship between coral-associated bacteria and disease resistance, which is likely the result of antibiotics produced by the resident microbiota and/or niche competition with potential pathogens (Reshef *et al.*, 2006; Ritchie, 2006; Rypien *et al.*, 2010).

In contrast to scleractinian reef-forming corals, information on the microbial diversity associated with gorgonians (octocorals) is limited. A few studies have investigated bacterial associations with tropical or cold-water species (Bruck *et al.*, 2007; Sunagawa *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011), but to our knowledge, the bacterial diversity of shallow temperate octocorals has not yet been explored. In the Northwestern (NW) Mediterranean Sea, gorgonians play an important ecological role in highly diverse coralligenous outcrops (Ballesteros, 2006). During the last few decades, coralligenous benthic invertebrates have suffered from large-scale disease and mortality (Cerrano *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2001; Rodolfo-Metalpa *et al.*, 2005; Huete-Stauffer *et al.*, 2011). These events are linked to unusual positive anomalies of seawater temperature in the summer and have affected a wide range of macro-benthic species over hundreds of kilometers, from the Italian to Spanish coasts (Crisci *et al.*, 2011). Gorgonians populations have undergone extensive damage, although differences in the degree of impact have been observed in various geographic areas.

One of the most affected species is the red gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), a long-lived, aposymbiotic colonial octocoral that is considered a key species within coralligenous assemblages (Carpine and Grasshoff, 1975). During the summer mortality outbreaks, *P. clavata* colonies exhibited symptoms of necrosis that may have been caused by multiple factors acting in synergy with thermal stress, including food limitation, metabolic constraints and microbial virulence (Cerrano *et al.*, 2000; Coma *et al.*, 2009). Colonies that were affected during mass mortality events in 2003 and 2008 harbored culturable isolates of *Vibrio coralliilyticus*, a pathogenic bacterium that can induce host tissue damage at elevated temperatures (Bally and Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010). Members of this *Vibrio* clade were previously identified as the etiologic agents of bleaching in the Indo-Pacific coral *Pocillopora damicornis* and White Syndrome disease in other coral species, thus satisfying Koch's postulate (Ben-Haim *et al.*, 2003b; Sussman *et al.*, 2008). This finding suggests that at least some mechanisms underlying the disease process in *P. clavata* are comparable to the mechanisms involved in tropical coral outbreaks. Several studies have concluded that coral pathogens take advantage of changes in the bacterial community structure during stressful conditions to proliferate and cause tissue damage (Bourne and Munn, 2005; Littman *et al.*, 2009; Littman *et al.*, 2010). In support of this hypothesis, compositional shifts in bacterial assemblages have been observed in diseased coral colonies (Bourne *et al.*, 2008; Kvennefors *et al.*, 2010). Similarly, the recurrent disease and mortality of *P. clavata* may be promoted by a disturbance of the resident microbiota in response to anomalous high-temperature conditions during the summer.

To evaluate the contribution of microbial communities to temperate gorgonian health and disease, a detailed knowledge of the structure of the bacterial assemblages in healthy colonies is required. The objective of the present study was to provide a baseline of the bacterial communities associated with *P. clavata* populations in the NW Mediterranean basin. Given the predicted increase in extreme climatic events in this region, new mortality outbreaks are expected (Fischer and Schär, 2009; Bensoussan *et al.*, 2010). Thus, tracking potential modifications of this baseline during future high-temperature stress could greatly aid our understanding of the role of bacterial associations in maintaining gorgonian health.

In this work, we conducted a seasonal sampling over 4 years (2007-2010) in 3 distinct geographical locations separated by hundreds of kilometers (Provence, Corsican and Catalan

coasts), which allowed us to characterize the bacterial communities associated with *P. clavata* and the spatiotemporal variability of their structure. Three different molecular culture-independent approaches (denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and 16S RNA gene clones library construction) were used to determine which bacteria might be conserved across geographically remote *P. clavata* populations. Our findings reveal the presence of host-specific bacterial associations in the gorgonian holobiont, although transient and reversible variations in microbiota composition were also recorded during our seasonal survey.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethics Statement

The sampling in the Mediterranean Sea was performed in accordance with French professional diving rules and did not involve endangered or protected species. Annual sampling permits for the site located in Riou (France) were delivered by the *Préfet de la region Provence-Alpes-Côte d'Azur*. Specific permits delivered by the *DIRM Méditerranée*, advised by the *Conseil Scientifique de la Réserve Naturelle de Scandola* and the *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya*, were obtained to sample gorgonian tissues in the marine protected areas of Scandola (Corsica) and Medes Islands (Spain). Gorgonian sampling entailed the collection of only a few centimeters of the apical part of the branches. Because gorgonians are colonial organisms, the sampling caused unnoticeable injuries that healed rapidly after the collection.

2.2. Sample collection and processing

Samples of *P. clavata* were collected from 3 sites in the NW Mediterranean Sea, Riou Island (France) (43°10.345' N, 05°23.319' E), Scandola (France) (42º22.793' N, 8º33.000' E) and Medes Island (Spain) (42º2.882' N, 3º13.579' E) (Figure 1), at an approximately 20 m depth in winter (January to March) and summer (June to September) from 2007 to 2010. Apical branch fragments (2 cm length) of randomly chosen, apparently healthy colonies (i.e., with no visible signs of necrosis) (n=3) were collected using shears and placed in plastic bags underwater. Three

liters of surrounding seawater were also collected in plastic bottles. The collected samples were then transferred to the Mediterranean Institute of Oceanography within 2 h (Riou site) or frozen on dry ice for subsequent transportation to the laboratory (Scandola and Medes sites).

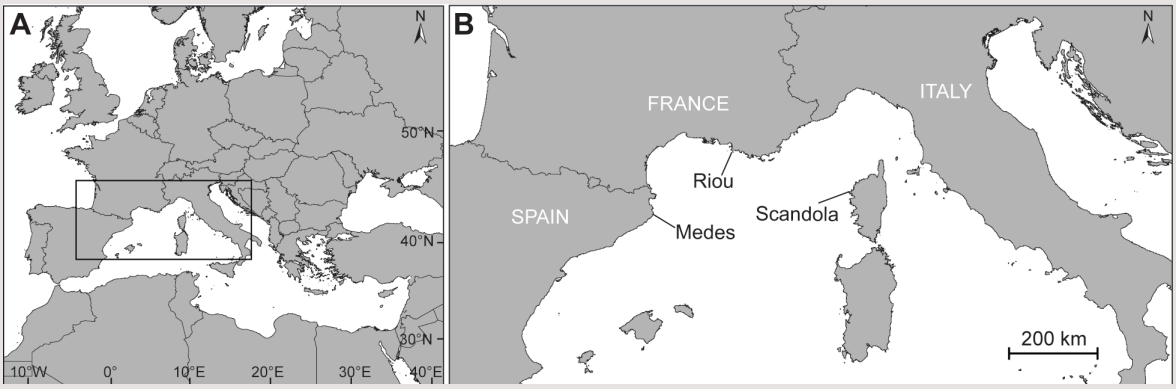


Figure 1 | Sampling sites.
Map of the Northwestern Mediterranean basin (A) and an enlargement showing the location of the study sites (B).

The *P. clavata* samples were rinsed 3 times with sterile 0.22-µm-filtered seawater to remove loosely associated bacteria. Tissues were detached from the central axis and gently crushed using sterile forceps and a scalpel blade in 3 ml of sterile seawater. The tissue slurry was homogenized and aliquoted into 3 microtubes. Samples were then spun at 13,000 g, and the supernatant was removed before storing the tissue pellets at -80°C. The surrounding seawater samples were immediately filtered through 0.22 µm Sterivex® filter units (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). The filters were stored at -80°C for subsequent DNA extraction.

2.3. DNA extraction

Bacterial DNA in gorgonian tissue samples was extracted following the protocol of Bourne *et al.* (2008). Briefly, tissue slurries were resuspended in 0.5 ml extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA, 0.75 M sucrose) with 1 µg of salmon sperm DNA and incubated for 5 min at room temperature. Next, a lysozyme solution (75 µl of 100 mg · ml^{-1}) was added. The samples were incubated for 1 h at 37°C with slow agitation and submitted to 3 freeze-thaw cycles (ranging from -80°C to 70°C); these steps were followed by the addition of 100 µl 25 % sodium dodecyl sulfate (SDS) and a further incubation of 10 min at 70°C. The samples were digested by proteinase K (20 µl of 20 mg · ml^{-1}) for 1 h at 37°C with slow agitation. The tissue lysates

were again submitted to 3 freeze-thaw cycles and extracted by standard phenol-chloroform DNA extraction procedures. After precipitation with 50 µl 3 M sodium acetate and an equal volume of isopropanol, the DNA was pelleted by centrifugation (16,000 g for 30 min at 4°C), washed with cold 70 % ethanol and suspended in 30 µl sterile ultra-pure water. The DNA concentration was estimated by spectrophotometry using a biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany), and the DNA samples were stored at -20°C until further processing.

To isolate DNA from seawater samples, Sterivex® filter units were filled with 500 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 % SDS) and 12.5 µl proteinase K (20 mg · ml^{-1}). After an overnight incubation at 55°C, the cell lysate was recovered from the filter unit, and total DNA was extracted by standard phenol-chloroform extraction procedures. The DNA in the liquid phase was then precipitated with ethanol and concentrated by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4°C. The DNA pellets were washed with 70 % cold ethanol, resuspended in 100 µl sterile ultra-pure water and stored at -20°C until analysis.

2.4. DGGE analysis

2.4.1. PCR amplification

Bacterial 16S rDNA were amplified from genomic DNA extracted from *P. clavata* colonies and seawater using 4 different pairs of universal bacterial primers targetting various hypervariable regions (V) of 16S rRNA gene: 27F/536R (V1-V3) (Dahllof *et al.*, 2000), EUB f933/EUB r1387 (V6-V7) (Ji *et al.*, 2004), 341F/907R (V3-V5) (Muyzer *et al.*, 2004) and 341F/907RA (V3-V5) (Schafer *et al.*, 2001). A 40-bp GC-rich sequence (GC-clamp) was attached to the 5' end of the forward primers to enhance separation in DGGE (Muyzer *et al.*, 2004).

PCR (35 cycles) was performed on a Mastercycler® thermocycler (Eppendorf) in a total volume of 50 µl containing 1 X Taq® Flexi Buffer (Promega, Fitchburg, WI, USA), along with 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1 µM forward and reverse primer, 0.3-3 µl (approximately 100-300 ng) of bacterial DNA template, 1 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), and sterile ultra-pure water. After an initial denaturation of 1 min at 96°C, a touchdown PCR protocol was performed in which the primer annealing temperature was initially set at 53°C (27F/536R), 62°C (EUB f933/EUB r1387) or 58°C (341F/907R and

341F/907RA) and was decreased by 0.5°C with each cycle of the next 20 cycles. The final annealing temperature was then maintained for the remaining 15 cycles of the reaction. For each cycle, denaturation was performed at 94°C for 1 min, followed by annealing for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The PCR products were evaluated by electrophoresis on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide.

2.4.2. Electrophoresis conditions and DGGE band analysis

DGGE of the PCR products was performed using the DCode® system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on a 6 % (wt/vol) polyacrylamide gel with a linear denaturing gradient of 35 % to 60 % in 1 X Tris-acetate-EDTA buffer (TAE). Electrophoresis was performed for 17 h at 60°C at a constant voltage of 80 V. The gels were stained with GelStar® (Cambrex BioScience, East Rutherford, NJ, USA) in 1 X TAE and visualized under UV light with a Gel Doc 2000® image system (Bio-Rad).

To identify the 16S rDNA bacterial sequences, selected DGGE bands were excised from the gels and eluted overnight at 4°C in 50 µl sterile ultra-pure water. PCR re-amplification was performed with the corresponding primer set. The PCR products were purified with Wizard® PCR Clean-Up minicolumns (Promega), and the recovered 16S rDNA gene fragments were sequenced (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

2.5. T-RFLP analysis

2.5.1. PCR amplification, enzymatic digestion and T-RFLP

For T-RFLP analysis, the bacterial 16S rRNA genes were amplified by PCR with the extracted DNA using the universal primers 63F (Osborn *et al.*, 2000) and 786R-Eub (a reverse-complement version of 768F-Eub; Schütte *et al.*, 2008). This primer pair targets the V1-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. The forward primer was labeled at the 5' end with phosphoramidite fluorochrome 6-carboxyfluorescein (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). PCR amplifications were performed in a total volume of 25 µl containing 1 X Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (Fermentas, Burlington, Canada), 200 µM each dNTP, 1 µM forward and reverse primer, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$ bovine serum albumin (BSA), 0.3-3 µl (approximately 100-

300 ng) bacterial DNA template, 1 U native Taq DNA Polymerase (Fermentas) and sterile ultra-pure water. After an initial denaturation step (5 min at 94°C), 35 amplification cycles (94°C for 1 min, 48°C for 1 min, 72°C for 1 min) were performed on a Mastercycler® thermocycler (Eppendorf). Amplification was confirmed by migration on a 1 % agarose gel in TAE and ethidium bromide staining. The labeled PCR products were purified using the Wizard® PCR Clean-Up System (Promega) following the manufacturer's instructions and eluted in 30 µl of DNase-free distilled water (Promega).

The restriction reactions were performed for 16 h at 37°C using a digestion mixture containing 6 µl of the purified PCR products, 1 X reaction buffer (Promega), 0.1 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$ BSA and 20 U *Cfo*I or *Msp*I (Promega) in a final volume of 20 µl. Each digested sample (3 µl) was mixed with 0.3 µl GeneScan 600-LIZ® (Applied Biosystems) size standard and 10 µl Hi-Di® Formamide (Applied Biosystems) in a 96-well plate and denatured at 90°C for 3 min. The labeled terminal restriction fragments (TRFs) were then separated on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with default fragment analysis parameters. Each sample was run twice as replicates to account for migration discrepancies. All T-RFLP electropherograms were visually inspected for possible artifacts and incorrect peak determination and were tabulated in GeneMapper® version 4.0 software (Applied Biosystems) using the Local Southern method as the size-calling algorithm (Southern, 1979). Only fragments longer than 80 bp and smaller than 600 bp were considered.

2.5.2. Statistical analysis of the spatiotemporal variability

The raw data sets (peak sizes in base pairs and peak areas in fluorescence units) for the 2 restriction enzymes were exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). To produce a single composite profile for each sample, the average area and size for each peak were calculated between duplicates (TRFs with sizes within 0.5 bp of each other were considered identical, while TRFs that were present in only one of the duplicates were removed). Because the amount of DNA template loaded for T-RFLP analysis could not be controlled accurately, T-RFLP profiles were normalized by applying the variable percentage threshold, as described by Osborne *et al.* (2006). To eliminate background fluorescence, only peaks contributing to more than 1.2 % of total fluorescence (according to the variable percentage threshold result) were considered. Data were binned using the interactive and automatic binning algorithms (Ramette, 2009) implemented

in the free R programming language (R Development Core Team, 2011), applying custom R binning scripts (WS 1; Sh 0.1) to account for size calling imprecision. Based on the "best binned frame" identified by the algorithm, the data were transformed for further graphical and statistical representations. The relative abundances in the different analyzed samples were calculated for each TRF. The data were transformed to a binary matrix (presence/absence), and the distance matrix between samples was computed from the Dice similarity index using R (R package *ade4*; Dray and Dufour, 2007). Patterns of bacterial community similarities were represented on a 2-D scatter plot using multidimensional scaling (MDS) ordination. The K-means clustering method was then performed to determine the center coordinates of the clusters (R package *fpc*; Hennig, 2012). Confidence ellipses were superimposed on the MDS ordination plot for each previously determined cluster, with 2 confidence levels of 50 % and 95 % (R package *car*; Fox and Weisberg, 2011).

2.6. Bacterial clone library construction

The universal bacterial primers 63F and 1389R (Osborn *et al.*, 2000) were used to amplify nearly full-length 16S rRNA genes from the gorgonian tissue samples. The PCR mixtures contained 1 X of Taq® Flexi Buffer (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM each dNTP, 1 µM each primer, 1 U GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega) and 0.3-3 µl (approximately 100-300 ng) DNA template in a total volume of 25 µl. PCR was performed with an initial 5 min denaturation step at 94°C, followed by 35 amplification cycles consisting of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min. The final elongation step was performed at 72°C for 10 min. For each library, the DNA extracted from 3 *P. clavata* colonies was PCR-amplified in 3 separate reactions, each performed in triplicate. The amplified products were pooled and purified with Wizard® PCR Clean-Up minicolumns (Promega), followed by cloning into the pGEM®-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. After transformation into *E. coli* JM109 competent cells, the orientation of the inserted 16S rRNA gene of each resulting clone was determined by PCR re-amplification using 63F and M13 reverse primers. Clones producing a PCR product of the expected size (approximately 1,500 bp) were sequenced with a plasmid forward primer (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany). A total of 700 partial 16S rRNA gene sequences were obtained. For the Riou site, 3 libraries were constructed from samples collected

in winter 2007 (93 clones), summer 2007 (176 clones), and winter 2008 (84 clones). One library per site was constructed from samples collected in summer 2007 for Medes (171 clones) and Scandola (176 clones).

2.7. Phylogenetic analysis

All bacterial 16S rDNA clone sequences were trimmed to 750 bp starting at the 5' end of the 63F primer, and the production of chimeras during PCR was evaluated with the Pintail program (Ashelford *et al.*, 2005). The resulting libraries were dereplicated using FastGroupII (Yu *et al.*, 2006; http://biome.sdsu.edu/fastgroup/index.htm) with a similarity cutoff value of 97 % for sequence group definition. The unique sequence groups were classified taxonomically at the family level by the SeqMatch tool of the Ribosomal Database Project (RDP; http://rdp.cme.msu.edu). Within the dominant family-level groups, the sequence affiliations and closest relatives were identified by comparison with the GenBank database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). To describe the compositional differences between the 3 summer 2007 libraries, the Shannon-Weaver index for diversity (Shannon and Weaver, 1949) and the Chao1 richness index (Chao, 1984) were calculated using the RDP Pipeline tools, with sequence groups defined with 97 % similarity.

The consistency between the identified ribotypes in the libraries and the major TRFs in each community's peak profiles was confirmed by T-RFLP analysis of representative 16S rDNA clones of dominant ribotypes. Partial sequence reads obtained from the excised DGGE bands were taxonomically assigned by BLAST analysis against the GenBank database.

2.8. Nucleotide sequences accession numbers

The nucleotide sequence data for the partial 16S rRNA genes reported in this paper were deposited in GenBank under the accession numbers JX874190-JX874360 (Medes; summer 2007 library), JX874361-JX874536 (Riou; summer 2007 library), JX874537-JX874629 (Riou; winter 2007 library), JX874630-JX874713 (Riou; winter 2008 library) and JX874714-JX874889 (Scandola; summer 2007 library).

3. RESULTS

3.1. DGGE fingerprinting of *P. clavata*-associated bacterial communities

To estimate the intra- and inter-colonial variability of bacterial community composition, apical branches from *P. clavata* colonies sampled in Riou in winter 2007 were analyzed by 16S rDNA-DGGE fingerprinting. PCR amplification with 27F-GC/536R universal primers followed by denaturing electrophoresis yielded repeatable banding patterns for all 3 fragments sampled from each colony (Figure 2, lanes 1-9). The consistency of the banding patterns from different *P. clavata* colonies was clearly apparent, indicating the presence of similar bacterial diversity. By contrast, the DGGE profile of seawater collected in close vicinity of the colonies (Figure 2, lane 10) was markedly different and did not share detectable bands with the *P. clavata* tissue samples. The dominant 16S rDNA band in the fingerprint of *P. clavata* was excised from the gel and sequenced for identification of the corresponding ribotype. This band was related to 16S rDNA sequences from marine bacteria belonging to the order *Oceanospirillales*. The closest cultivated relative was *Spongiobacter nickelotolerans* (GenBank accession number AB205011), with 94 % similarity along the 479 bp sequence length.

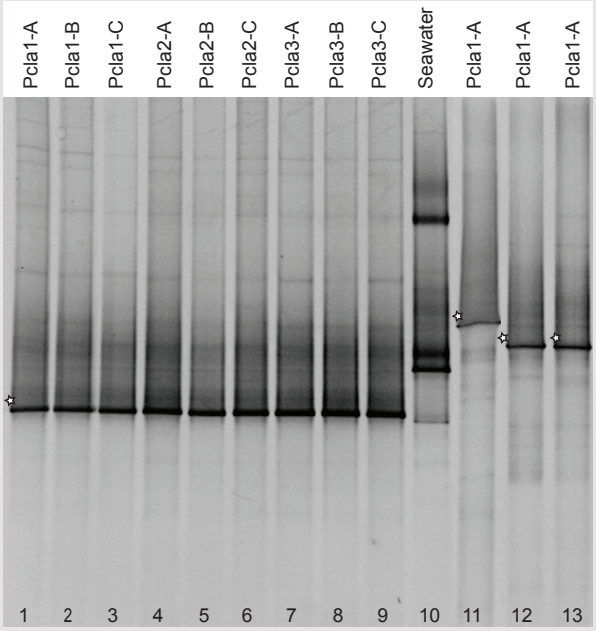


Figure 2 | Representative denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of the bacterial community composition.
DGGE analysis of bacterial communities associated with triplicate samples (A, B and C) of 3 *P. clavata* colonies (Pcla1 to Pcla3) and the surrounding seawater sampled in Riou in winter 2007. 16S rDNA was amplified with different sets of primers: 27F-GC/536R (lanes 1 to 10), EUB f933-GC/EUB r1387 (lane 11), 341F-GC/907RA (lane 12) and 341F-GC/907R (lane 13). The sequenced DGGE bands are indicated with a star.

The dominant DGGE bands obtained with 3 other universal bacterial primer pairs were also sequenced. The band obtained with the EUB f933/EUB r1387 primer pair (Figure 2, lane 11) was related to *Spongiobacter nickelotolerans* 16S rDNA (94 % similarity among 417 bp). The sequences recovered from the 341F-GC/907RA and 341F-GC/907R amplifications (Figure 2, lanes 12-13) shared 91 to 92 % similarity with the 16S rDNA of *Endozoicomonas elysicola* (AB196667), a close relative of *Spongiobacter* spp. This similarity indicated that the predominance of single bands observed in all the *P. clavata* DGGE profiles was not caused by amplification biases but likely resulted from an abundant population of ribotypes belonging to the *Oceanospirillales* order.

3.2. T-RFLP analysis of bacterial community variation

Temporal and spatial changes in bacterial diversity associated with *P. clavata* were investigated by T-RFLP analysis. A total of 186 profiles, including run duplicates (96 and 90 profiles for *Cfo*I and *Msp*I digestion, respectively), were obtained from tissues of 48 *P. clavata* colonies that were seasonally sampled between March 2007 and September 2010 at the Riou, Medes and Scandola sites (3 colonies per site for each sampling). The profiles generated by run duplicates were consistent. The diversity and abundance of the detected TRFs are shown in Figures 3 and 4 for each restriction enzyme. In total, 57 different TRFs were observed upon *Cfo*I digestion (Figure 3), and 50 TRFs were observed for *Msp*I digests (Figure 4). None of the TRFs were shared by all samples, independent of the endonuclease. The T-RFLP profiles obtained for replicate colonies of each sampling were consistent, although variations in peak intensity were observed, likely due to the non-quantitative PCR amplification step. However, the dominant TRFs between replicates from the same seasonal sampling were broadly conserved between the *Cfo*I and *Msp*I data sets.

Two dominant TRFs were consistently recovered throughout most of the survey, indicating the presence of conserved ribotypes. The *Cfo*I profiles were dominated by TRF-171.4, with the exception of 9 samples from summer 2007 (Figure 3). When present, this TRF accounted for 37.3 to 91.1 % of the total area of the TRF peaks in the fluorescence profiles. Profiles from *P. clavata* colonies sampled in summer 2007 did not contain TRF-171.4 but were dominated by TRF-193.4 (up to 87.0 % of the profile's total fluorescence). These 2 TRFs were simultaneously detected in 15 of the *Cfo*I profiles of the survey, although TRF-171.4 was dominant in each case. The same

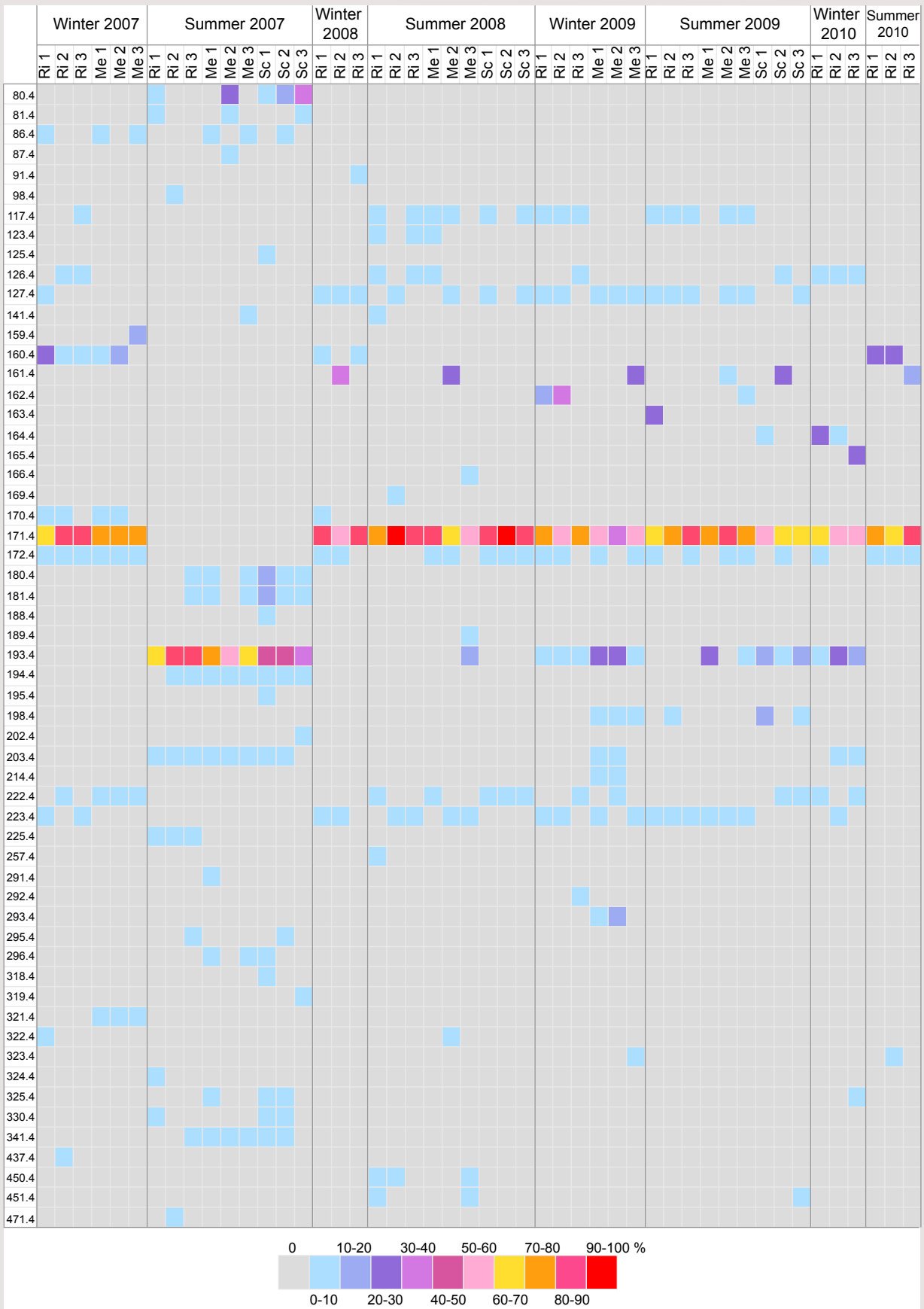


Figure 3 | Relative abundances of *Cfo*I TRFs in *P. clavata* samples analyzed by T-RFLP. Each row represents a TRF generated by *Cfo*I digestion of PCR amplicons from samples that were collected from the different sites (Riou (Ri), Medes (Me) and Scandola (Sc)) during the seasons indicated in columns. TRFs were designated by their size (in bp) after binning. The filling colors represent the relative fluorescence of the TRFs according to the range presented in the color key.

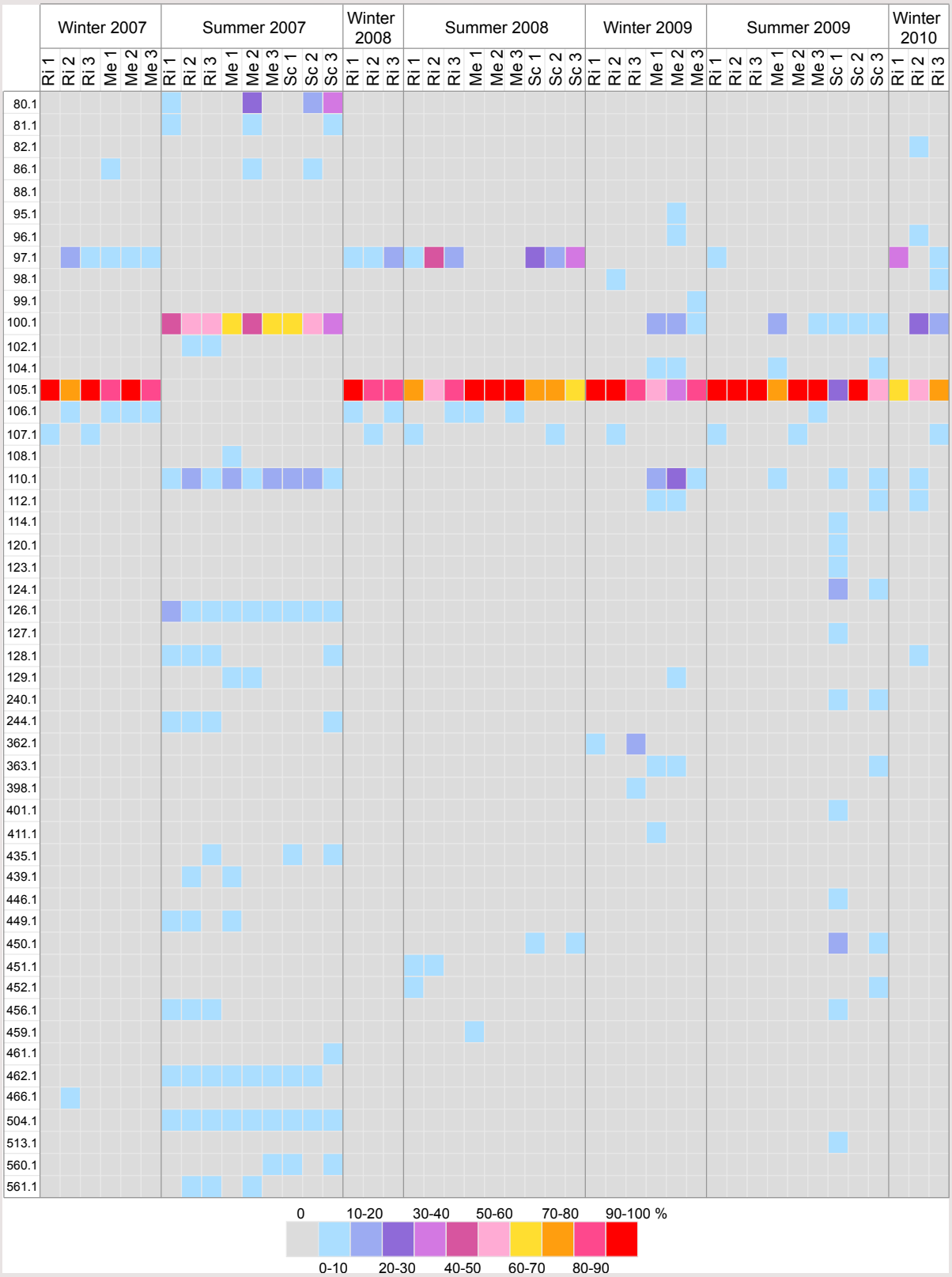


Figure 4 | Relative abundances of *Msp*I TRFs in *P. clavata* samples analyzed by T-RFLP. As described in Figure 3, with the restriction enzyme *Msp*I.

trend was observed for the *Msp*I profiles (Figure 4). All but 9 profiles were dominated by TRF-105.1 (25.7 to 100 % of the profile's total fluorescence). The 9 other profiles corresponded to colonies from summer 2007 and were dominated by another restriction fragment (TRF-100.1), with a relative fluorescence of 36.8 to 68.9 %. In addition to TRF-100.1, 3 other notable TRFs common to the 9 *Msp*I profiles of summer 2007 were observed: TRF-110.1, TRF-126.1 and TRF-504.1. The last 2 TRFs seemed to be specifically associated with the summer 2007 samples, as they were not observed in any other profile. By contrast, the *Msp*I TRF-100.1 was detected in 10 other profiles from the 2009 and 2010 samples, among which 7 also contained TRF-110.1.

Overall, peak diversity was significantly higher in the summer 2007 profiles, with an average of 8.9 ± 2.5 *Cfo*I TRFs versus 5.9 ± 1.6 for other profiles and 9.3 ± 2.2 *MspI* TRFs versus 3.8 ± 2.8 for other profiles ($p<0.001$). The T-RFLP profiles of the bacterial communities in the surrounding seawater were compared with the profiles of colonies sampled on 3 occasions in Riou (winter 2007 and 2008 and summer 2007). None of the detected TRF peaks were common to the seawater and gorgonian tissue profiles (data not shown).

The ordination of *P. clavata*-associated community profiles by MDS did not demonstrate visible clustering by sampling site (Figure 5) but revealed that most of the *Cfo*I (Figure 5A) and *Msp*I (Figure 5B) profiles grouped regardless of geographic origin. We observed that 32 (67 %) of the *Msp*I profiles and 39 (81 %) of the *Cfo*I profiles of the 48 *P. clavata* colonies sampled between March 2007 and September 2010 grouped together, thus suggesting the presence of similar bacterial assemblages at most sampling times. However, a tight and distinct clustering of the 9 *Cfo*I bacterial profiles from summer 2007 for the 3 sites was observed (Figure 5A).

For the *Msp*I analysis (Figure 5B), the 9 samples from summer 2007 grouped with 7 other samples from Medes in summer and winter 2009, Riou in winter 2010 and Scandola in summer 2009. This difference in ordination of the *Cfo*I and *Msp*I bacterial profiles may have resulted from the common presence of 2 *Msp*I TRFs (TRF-100.1 and TRF-110.1) in these 7 latter samples and all summer 2007 samples, while a single *Cfo*I TRF (TRF-193.4) was shared between all summer 2007 samples.

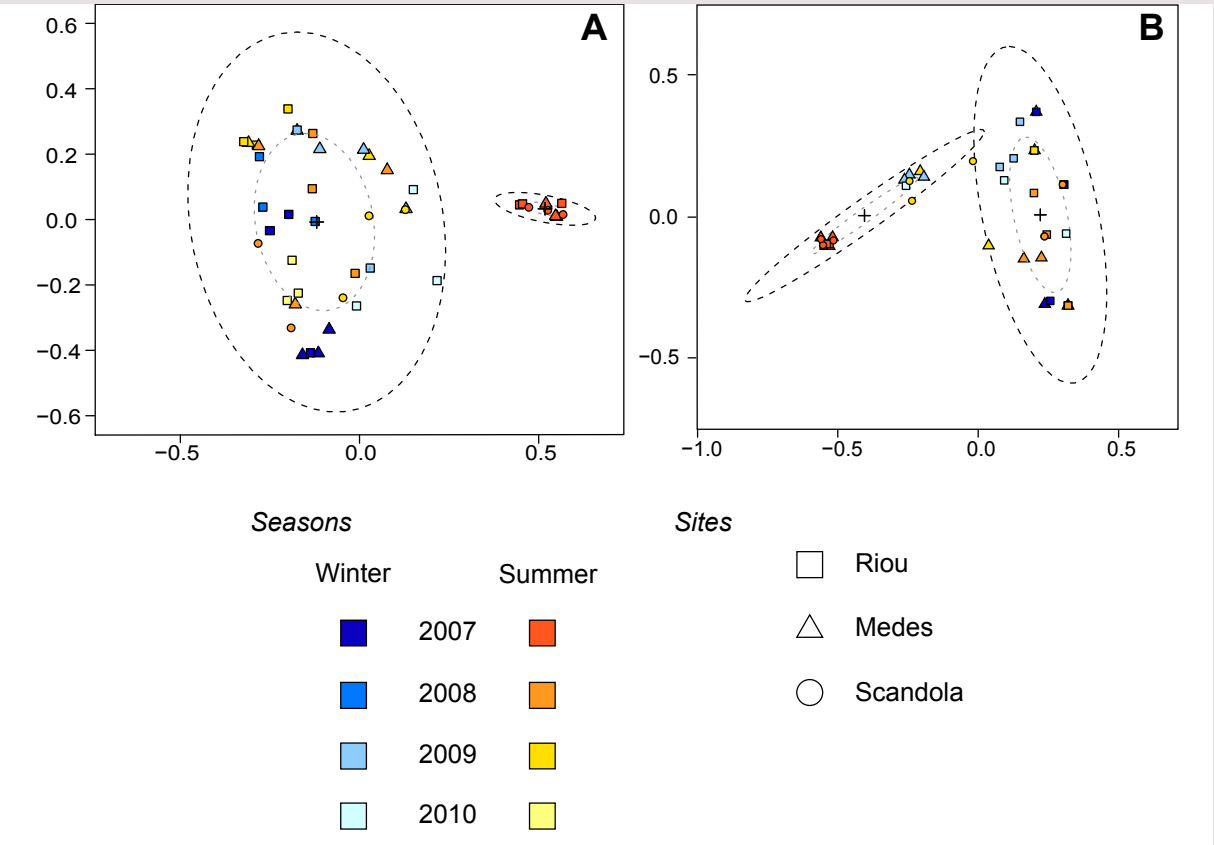


Figure 5 | MDS ordination plot of *P. clavata* bacterial communities.
2-D scatter plots of T-RFLP profiles from *P. clavata* colonies sampled at 3 sites in winter and summer from 2007 to 2010 are based on the Dice similarity matrix for the T-RFLP data retrieved from the amplified bacterial 16S rDNA digested with *Cfo*I (A) and *Msp*I (B). Each symbol represents the bacterial community of an individual sample from Riou (square), Medes (triangle) or Scandola (circle), and the colors correspond to different sampling seasons. Sample clusters are based on coordinates determined with the k-means method. Dotted ellipses contain 50 % (grey dots) or 95 % (dark dots) of the points that contribute to the cluster. The centers of the confidence ellipses are identified with a cross.

3.3. Phylogenetic analysis of 16S rDNA clone libraries

To determine if the variations in the dominant peaks observed by T-RFLP were associated with changes in the phylogenetic composition of the bacterial communities, bacterial 16S rDNA clone libraries were constructed from the *P. clavata* colonies sampled in Riou during winter 2007 and 2008 and in Riou, Medes and Scandola during summer 2007.

The library constructed from colonies sampled in winter 2007 in Riou was largely dominated by a single ribotype that accounted for 98.9 % of the sequenced clones (Figure 6A). The winter 2008 library was exclusively composed of the same ribotype. This uncommon dominance is unlikely to be the consequence of a contamination bias because bacterial DNA extractions were performed separately, in March 2007 and February 2008, for the construction of the corresponding 16S

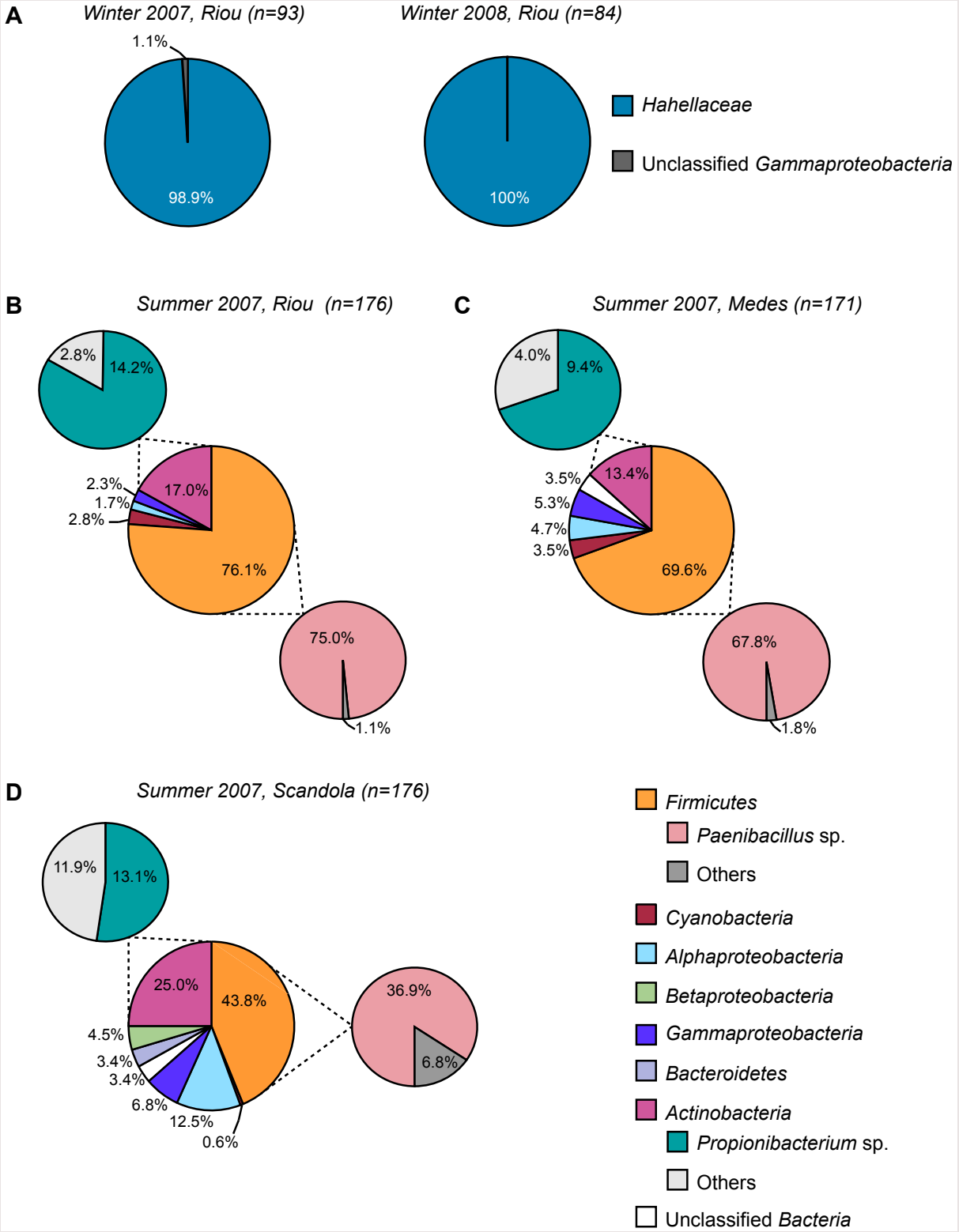


Figure 6 | Bacterial diversity of clone libraries derived from *P. clavata* colonies.
Pie charts illustrating the composition of bacterial communities in the winter 2007 and winter 2008 samples from Riou (A) and the summer 2007 samples from Riou (B), Medes (C) and Scandola (D). The large pies represent the clone library composition at the family level (A) and at the phyla or class levels (B-D). The smaller pies in B-D represent the affiliations of *Actinobacteria* and *Firmicutes* sequences at the genus level. The relative abundances of the bacterial groups retrieved from the libraries are indicated as percentages.

rDNA libraries. The sequence divergence was very low (<1 %) between clones belonging to this dominant ribotype in the 2 winter libraries, suggesting that it may represent microheterogeneity of 16S rRNA gene copies within a unique bacterial species. According to pairwise comparisons, this ribotype is related to members of the *Hahellaceae* family within the *Oceanospirillales* order (class *Gammaproteobacteria*). The closest cultivated strains were *Endozoicomonas elysicola* (AB196667), *Endozoicomonas montiporae* CL-33 (FJ347758) and *Spongiobacter nickelotolerans* (AB205011), with 92-93 % 16S rDNA sequence similarity (see supplementary Figure S1 for a 16S rDNA-based phylogenetic tree). Although the *Hahellaceae*-related ribotype is undoubtedly a highly abundant component in the *P. clavata*-associated assemblage, a better description of diversity within these libraries would certainly require the analysis of a larger number of clones.

By contrast, the 16S rDNA sequences obtained from the summer 2007 clone libraries exhibited greater diversity and were distributed among 5 bacterial phyla, namely *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Cyanobacteria* (Figure 6B-D). *Firmicutes* was dominant in each of the libraries, constituting 76.1 % of the sequences from Riou, 69.6 % from Medes and 43.8 % from Scandola. The second most abundant phylum was *Actinobacteria*, which comprised 13.4 % of the cloned sequences in the Medes library and 25.0 % in the Scandola library. The *Gammaproteobacteria* were represented to a lesser degree in the bacterial community in each of the 3 summer 2007 libraries (2.3 % to 6.8 %), and none of these ribotypes were related to the *Hahellaceae* family. Analysis at lower taxonomic levels revealed the presence of a high proportion of almost identical sequences affiliated with the genus *Paenibacillus,* accounting for 84 % to 98 % of the *Firmicutes* species (37 % to 75 % of the clone libraries). According to BLAST and SeqMatch searches, the closest relative is *Paenibacillus validus* (AB073203), which shares >98 % sequence similarity with this ribotype. A second dominant ribotype was identified within *Actinobacteria*, which represented 52 % to 83 % of this phylum in each of the libraries (9 % to 14 % of the total number of clones). The nearest relative of this group of sequences is *Propionibacterium acnes* (AE017283; >98 % similarity for 16S rDNA). While *Paenibacillus*- and *Propionibacterium*-related sequences were predominant in the 3 libraries from summer 2007, the communities exhibited differing diversities. The Chao1 and Shannon-Weaver indices were highest in the Scandola library, although there is considerable overlap of the estimated total number of ribotypes at the 95 % confidence interval within these 3 libraries (Table 1).

Table 1 |
Observed and estimated richness of the 16S rDNA clone libraries from the *P. clavata* samples in summer 2007.

Summer 2007 clone library	No. of clones analyzed	No. of ribotypes observed	Chao1 richness index	Shannon-Weaver diversity index
Riou	176	14	32 (18-95)	0.98
Medes	171	19	28 (21-59)	1.41
Scandola	176	38	49 (41-73)	2.67

Values were determined using a 97 % sequence similarity threshold for ribotype groups. Chao1 values given in parentheses are 95 % confidence intervals.

To identify the TRFs of the dominant ribotypes, the T-RFLP profiles of representative clones that were recovered from the 5 libraries were analyzed. The observed TRFs of the winter libraries clones carrying the *Hahellaceae* 16S rDNA sequences matched *Cfo*I TRF-171.4 and *Msp*I TRF-105.1, which correspond to the dominant peaks in all the *P. clavata* community profiles, with the exception of the summer 2007 samples (Figures 3 and 4). Clones corresponding to the *Paenibacillus* sequences in the summer 2007 libraries generated *Cfo*I and *Msp*I TRFs (TRF-193.4 and TRF-100.1, respectively) that matched the dominant peaks in the corresponding T-RFLP summer profiles. *Propionibacterium* 16S rDNA cloned sequences only generated an *Msp*I peak (TRF-126.1), and no signal was detected following *Cfo*I hydrolysis. *In silico* digestions of these *Propionibacterium*-related sequences showed that the size (636 bp) of the predicted *Cfo*I TRF was beyond our detection range.

4. DISCUSSION

This study provides the first description of the spatial and temporal patterns of the structure of the microbial communities associated with a temperate gorgonian in the Mediterranean Sea. The analysis of the DGGE fingerprint data indicated that the bacterial diversity hosted by *P. clavata* is broadly similar within and between individual colonies from a population and differs from the community composition within the surrounding water. In addition, the MDS ordination of the T-RFLP diversity profiles revealed a lack of clustering by location for the gorgonian populations sampled among our 3 study sites, which are separated by hundreds of kilometers. These results clearly suggest that the structure of bacterial communities that inhabit *P. clavata* does not rely on local environmental drivers or discrete gorgonian populations. Most of the

T-RFLP profiles from the 48 colonies sampled between March 2007 and September 2010 grouped together, thus supporting the notion of specific bacterial-host associations. Taken together, data from the T-RFLP analysis and 16S rRNA gene clone libraries indicate that *P. clavata* colonies are associated with an almost permanent microbial population that is highly dominated by a unique gammaproteobacterial ribotype. However, we detected a transient compositional shift between this relatively stable bacterial assemblage that was observed throughout 7 of the 8 investigated seasons, with a strikingly different diversity pattern in summer 2007.

The dominant identified ribotype is affiliated with the family *Hahellaceae* within the order *Oceanospirillales* and is related to *Endozoicomonas* and *Spongiobacter* spp. Interestingly, a meta-analysis of coral-associated bacterial assemblages revealed that *Oceanospirillales*-affiliated sequences were among the most frequent ribotypes found in healthy hexacorals (Mouchka *et al.*, 2010), and several recent reports indicated that *Hahellaceae* members may represent a common group of coral-associated *Oceanospirillales*. *Spongiobacter* sequences have been retrieved from the hexacoral *Acropora millepora,* in which they represent the largest proportion of bacterial clone libraries (Bourne *et al.*, 2008; Raina *et al.*, 2009). In 2 other hard coral species, *Acropora hyacinthus* and *Stylophora pistillata*, Kvennefors *et al.* (2010) identified a cluster of ribotypes that are closely related to the genus *Endozoicomonas*. This so-named "Type A Associates" cluster includes several ribotypes that were previously observed in different tropical coral species or specifically associated with benthic marine invertebrates. *Spongiobacter*-related 16S ribosomal sequences were also detected in the cold-water coral *Madrepora oculata* and dominated the DGGE banding pattern of the associated bacterial community in this species (Hansson *et al.*, 2009). Very recently, Morrow *et al.* (2012) found that *Endozoicomonas* represented the most abundant bacterial genus in communities of the reef-building coral *Porites astreoides*, representing up to 99 % of the 16S rRNA sequences recovered from colonies in one of the studied sites. The presence of *Hahellaceae* as a major component of the bacterial communities in both hexacorals and gorgonians (octocorals) suggests that these associates have differentiated to form a stable symbiotic complex specific to a cnidarian taxon. Further research focusing on the patterns of diversity of this bacterial group will certainly help to understand the evolutionary forces that may drive host-associated community composition in divergent phylogenetic lineages of cnidarians.

In contrast to the unique *Hahellaceae* ribotype revealed by our study in *P. clavata*, several

distinct *Endozoicomonas-Spongiobacter* sequences coexist in hexacoral species. This difference suggests that distinct hexa- and octocoral hosts may exert different selective controls on their microbial partners, resulting in various diversity patterns of *Hahellaceae* associates. Consistent with this hypothesis of host-driven control on associated *Hahellaceae* bacteria, the ribotype identified in *P. clavata* did not closely match the *Spongiobacter-Endozoicomonas* sequences found in hexacorals (<93 % similar) but was more closely related (>96 % similar) to bacterial sequences retrieved from the tropical gorgonian *Gorgonia ventalina* (GenBank accession number GU118518; Sunagawa *et al.*, 2010), suggesting that the species associated with *P. clavata* may belong to a new *Hahellaceae* genus that is adapted to gorgonian hosts.

To date, very little is known about the potential contribution of *Hahellaceae* bacteria to the functioning of the holobiont. One study has shown that *Spongiobacter*-related organisms isolated from *A. millepora* tissues possess the ability to metabolize the organosulfur compound dimethylsulfoniopropionate (DMSP), suggesting a role in sulfur cycling in scleractinian corals (Raina *et al.*, 2009). However, because DMSP production in corals is believed to rely on the presence of endosymbiotic zooxanthellae (Raina *et al.*, 2009), a similar hypothesis for *Hahellaceae*-affiliated bacteria in *P. clavata* seems unlikely because this gorgonian species is devoid of photosynthetic symbionts (Carpine and Grasshoff, 1975). Despite multiple trials, we failed to isolate culturable *Hahellaceae* bacteria from *P. clavata* tissues; consequently, their metabolic potential could not be investigated. Another interesting property of the members of the *Oceanospirillales* clade is the production of extracellular hydrolytic enzymes that are involved in the degradation of various complex organic substrates, providing a potential nutritional integration between bacterial associates and their host, as suggested for the endosymbiotic *Oceanospirillales* found in the deep-sea worm *Osedax* (Goffredi *et al.*, 2007). In the case of coral-associated bacteria, one might speculate that heterotrophic *Hahellaceae* help supply the host with macromolecular nutrients that are not directly assimilated under a complex form. The previous identification of *Gammaproteobacteria* aggregates within the gastrodermis tissue layer in the digestive cavity of several reef-building corals suggests that these bacteria may play such a role in the coral diet (Ainsworth and Hoegh-Guldberg, 2009). However, the available data on the 16S rRNA gene sequences of these intracellular bacteria are restricted to the *Gammaproteobacteria* FISH probe regions, thus precluding phylogenetic affiliation at the genus or family levels and hindering

comparisons with *Hahellaceae* sequences. Further investigations, including *in situ* localization of bacteria in *P. clavata,* are clearly required to provide information on their possible role in the functioning of the holobiont. Hopefully, the 16S rRNA gene sequence retrieved from the dominant *Hahellaceae* ribotype in our study will allow us to design oligonucleotide probes for their specific detection in gorgonian tissues.

While our T-RFLP and clone libraries analysis indicated the existence of a relatively stable *Hahellaceae*-dominated microbiota in *P. clavata* populations across a large geographic range and throughout the 4-year survey, we identified a simultaneous and deep compositional shift of communities in summer 2007 at a regional scale. During this summer, the *Hahellaceae* sequences were not detected by either technique and were transiently replaced by more diverse assemblages with prominent *Paenibacillus*- and *Propionibacterium*-related sequences, 2 bacterial genera that respectively belong to *Firmicutes* and *Actinobacteria*. Members of *Firmicutes* and *Actinobacteria* have previously been detected in cold-water and tropical scleractinian corals (Bourne and Munn, 2005; Klaus *et al.*, 2007; Neulinger *et al.*, 2008; Kvennefors *et al.*, 2010), where they are generally found in low abundance in healthy and/or bleached colonies (Mouchka *et al.*, 2010) although representatives of *Paenibacillus* and *Propionibacterium* spp. were among the most commonly recovered bacteria from a Brazilian coral species (de Castro *et al.*, 2010). Because we did not observe a similar transition in any of the other summers that were analyzed, we suggest that an abnormal and transient disruption of the host-*Hahellaceae* association occurred in summer 2007. However, ordination of the T-RFLP *Msp*I data set revealed that the profiles of all summer 2007 samples grouped with profiles from several colonies sampled in other seasons (Figure 5B). Significantly, the *Paenibacillus* TRF (TRF-100.1) was observed together with the dominant *Hahellaceae* TRF (TRF-105.1) in the latter profiles (Figure 4). These observations indicate a possible overlap between the 2 communities and suggest that bacteria related to *Paenibacillus* could be normal but infrequently detected associates, except during periods of anomalous abundance. Therefore, the shift in dominant ribotypes from *Hahellaceae* to *Paenibacillus* may result from a transient imbalance of endogenous bacterial populations that naturally reside in the holobiont rather than opportunistic colonization by *Paenibacillus* from the surrounding water concomitant with a decrease in the *Hahellaceae* community. The subsequent shift back toward the initial *Hahellaceae*-dominated community further supports the hypothesis that the holobiont

strongly regulates its microbial diversity and indicates that *Hahellaceae* most likely represent host-specific bacterial associates of *P. clavata*.

The causes of the transition in *P. clavata* bacterial diversity from *Hahellaceae*- to *Paenibacillus*-dominant ribotypes during summer 2007 are not clear. As mentioned above, the shift occurred at the 3 studied areas in an almost synchronous manner, suggesting the involvement of environmental and/or biological factors acting on a large geographical scale. Several previous studies have identified shifts in coral-associated bacterial communities during bleaching and disease outbreaks or under conditions of environmental stress, such as increased temperature and organic matter enrichment (Ainsworth and Hoegh-Guldberg, 2009; Garren *et al.*, 2009; Vega Thurber *et al.*, 2009). For instance, changes in microbial associates were observed in the stony coral *A. millepora* during a mass bleaching event, and occurred prior to visual signs of bleaching on the sampled colonies (Bourne *et al.*, 2008). Major shifts in bacterial communities were also observed in diseased colonies of 2 coral species that were affected by White Syndrome disease (Kvennefors *et al.*, 2010). Interestingly, the *Hahellaceae*-related bacteria found in healthy colonies were replaced by other bacterial groups in bleached or diseased individuals. Whether the shift in bacterial assemblages is the cause or the effect of the disease is unclear, but these observations indicate that changes in *Hahellaceae*-host associations are related to an altered physiological state of the holobiont during stress conditions.

Regarding the potential causes of stress within the gorgonian populations in summer 2007, the available temperature time series data recorded at the study areas during the survey period (T-MedNet network; http://t-mednet.org) did not reveal any temperature anomaly. In addition, surveys of *P. clavata* populations conducted during and after summer 2007 in the 3 study areas did not reveal any symptoms of disease (J. Garrabou *et al.*, unpublished data). Notably, we did not detect the presence of *Vibrio coralliilyticus* 16S rDNA in the *Paenibacillus*-dominated summer 2007 clone libraries, although this *Vibrio* has been implicated in recent disease outbreaks in *P. clavata* populations during climatic anomalies (Bally and Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010). Several other *Vibrio* species were also involved in *P. clavata* tissue necrosis in Mediterranean (Martin *et al.*, 2002; Huete-Stauffer *et al.*, 2011), or recovered from healthy and diseased cold-water gorgonians (Hall-Spencer *et al.*, 2007). Altogether, this suggested that unhealthy conditions of the host are allowing colonization by potentially pathogenic *Vibrio* strains that can also be a

natural component of the holobiont and may exploit the disturbance of the normal microbiota (Alves *et al.*, 2010). By contrast, we detected only 2 *Vibrionaceae* sequences among the 523 clones that were analyzed from the summer 2007 libraries (data not shown). This result suggests a very moderate abundance of *Vibrio* and indicates that the shift observed in *P. clavata* was likely not related to the onset of a disease. However we cannot rule out that other bacterial groups among the taxon diversity in summer 2007 may represent potential pathogens or detrimental associates that overcome the *Hahellaceae*-dominated natural assemblage. For instance, although *Paenibacillus* and *Propionibacterium* spp. are not considered as coral pathogens and can be normal components of the associated microbiota, their overwhelming dominance in summer 2007 might have resulted in transiently compromised holobiont homeostasis without expression of disease symptoms.

Besides climate-related stresses and disease, regional oceanographic perturbations including land run-off and anthropogenic disturbance have also been shown to cause changes in microbial communities associated with corals (Klaus *et al.*, 2007; Dinsdale *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2012). Degraded ecological conditions may facilitate the existence of alternate states of microbial community structure and overgrowth of opportunistic bacteria (Vega Thurber *et al.*, 2009). However, an exposure of *P. clavata* colonies to a pollutant or effluent in summer 2007 is very unlikely considering the large geographical area in which this bacterial shift was observed. In addition, our studies sites are variably impacted by anthropogenic effects as the 3 regions are subjected to different levels of protection. Riou site was located in a non-protected region, a few kilometers away from Marseille, the second major French city. Medes and Scandola sites are both located in marine protected areas, Scandola being a no-take area submitted to very limited human pressure. Therefore, local anthropogenic impacts do not seem to be the cause for the bacterial shifts simultaneously observed in the 3 sites in summer 2007, although a monitoring of environmental parameters and microbial community structure in the water column would be required to better evaluate differences between the sites. Finally, the factors that could have directly or indirectly caused a transient change in the natural bacterial community remain unclear and several other hypotheses cannot be ruled out, such as a bacteriophage infection targeting *Hahellaceae* and causing microbial mortality (Hewson *et al.*, 2012), or the occurence of subtle alterations in gorgonian physiology in summer (Coma and Ribes, 2003) that would disrupt the host-bacteria relationship without macroscopic disease signs.

In conclusion, the present work provides a reliable evaluation of the structure of and variations in gorgonian-associated bacterial communities. To our knowledge, this is the first spatiotemporal study demonstrating that transient but dramatic shifts in the natural baseline of these assemblages can arise in apparently healthy octocorals. In light of our results, it is important to encourage multi-year monitoring to avoid erroneous or incomplete descriptions of the bacterial assemblages, as we might have drawn by investigating the *P. clavata* microbiota during the phase shift. Although this shift was only observed once in the 4-year survey and thus presumably corresponds to an abnormal or stressful event, it indicates that transient bacterial populations may replace the natural *Hahellaceae*-dominated community without visible evidence of deleterious effects. Further studies are now required to address the question of whether the phase shift in the microbial community may represent a potential monitoring tool for determining the health state of gorgonians and the ecological condition of their environment. This research may aid in understanding the causes of recurrent mass mortalities and designing effective management strategies to preserve one of the most emblematic Mediterranean species.

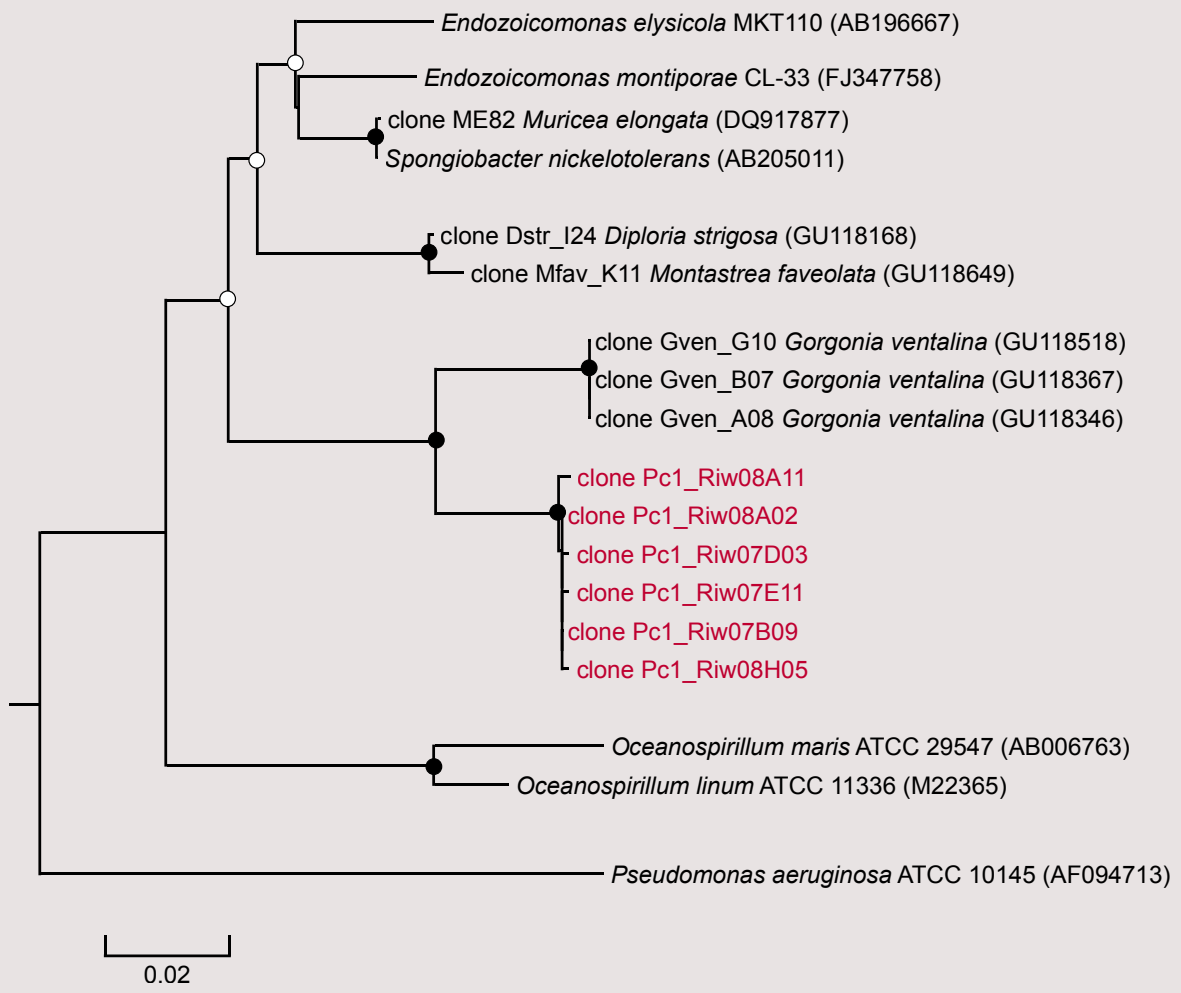
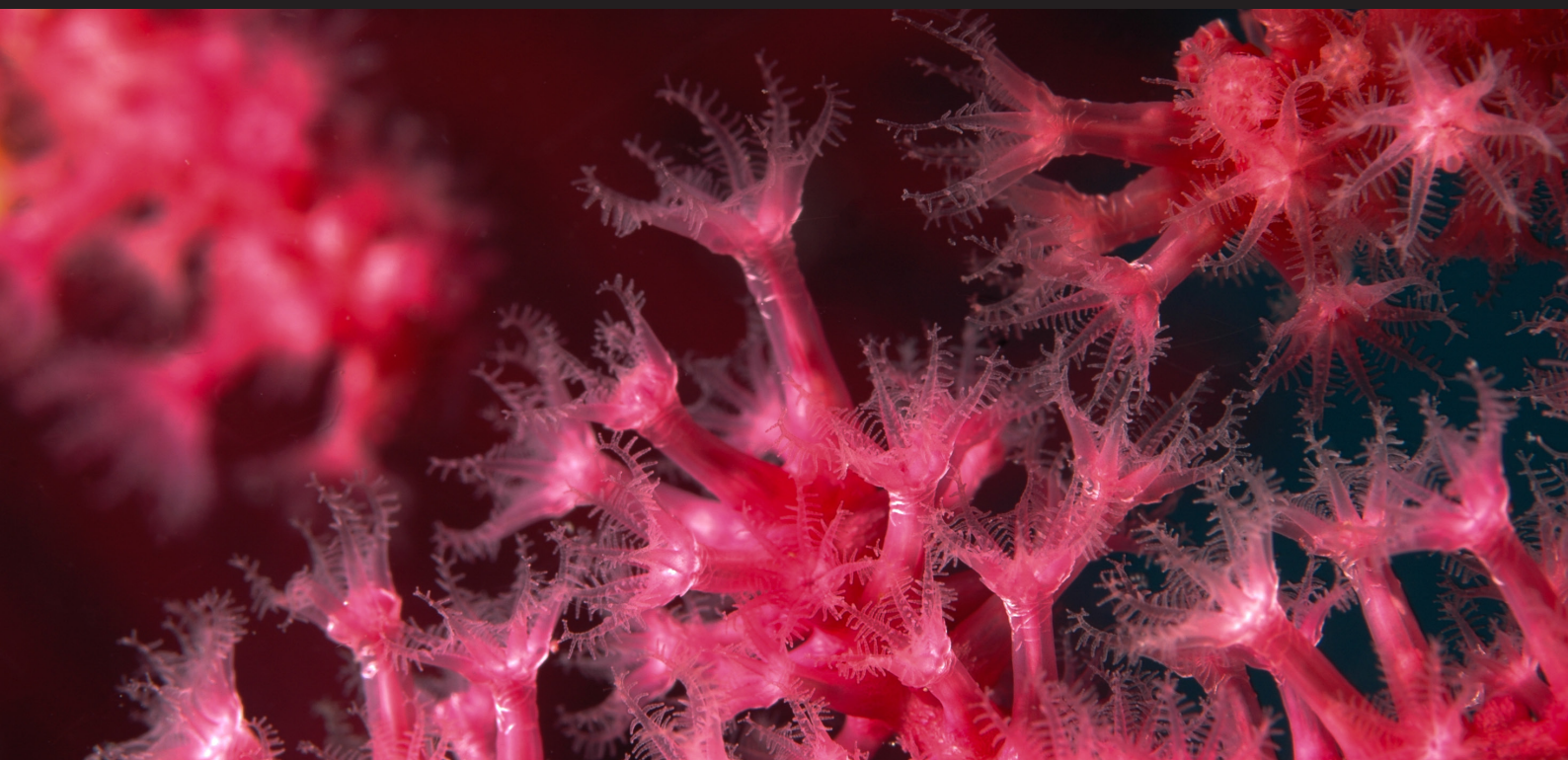


Figure S1 | Phylogenetic relationships between the dominant *P. clavata*-associated ribotype and its closest relatives.
Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences filtered to ~720 aligned nucleotide positions. Representative clones retrieved from *P. clavata* libraries in winter 2007 and winter 2008 are marked in red, and the GenBank accession numbers of reference strains are shown in parentheses. Branch points supported by boostrap values >50 % or >95 % (based on 1000 resamplings) are indicated by open and filled circles, respectively. The *Gammaproteobacteria Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was used as an outgroup. Scale bar represents 0.02 changes per nucleotide.

Chapitre III

Localisation *in situ* des communautés bactériennes associées à *P. clavata*



1. INTRODUCTION

Corals harbor diverse microbial assemblages of eukaryotes (fungi and protists) and prokaryotes (bacteria, archaea, virus), thereby forming a multi-partite functional unit referred to as the coral holobiont (Rohwer *et al.*, 2002; Knowlton and Rohwer, 2003; Stat *et al.*, 2012). This complex community of microorganisms is hypothesized to help maintain healthy functioning of individual coral colonies, and to shape adaptive abilities of their host (Rosenberg *et al.*, 2007b; Bourne *et al.*, 2009). Despite mounting evidences of the implication of bacterial communities in coral physiology, little is known about the nature of interactions occurring between the microbiota and the host in stable, natural conditions. Notably, most of the studies on tropical corals microbiology are focused on the description of the associated bacterial diversity and its changes during disease or disturbed conditions, but the *in situ* localization of bacteria and the spatial architecture of their association have been rarely investigated. This lack of knowledge regarding the holobiont organization and functioning is even greater in coral species from temperate ecosystems because not much work has been devoted to the characterization of their associated microbial assemblages.

In the Mediterranean Sea, gorgonian species (Cnidarian, Octocorallia) are considered to play key structural roles in coralligenous outcrops, one of the most diverse coastal ecosystems (Ballesteros, 2006). Among the emblematic long-lived species typically found in the coralligenous assemblage is the red gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), a temperate shallow colonial octocoral that form dense population in dim-light habitats and can measure up to 1 m high (Figure 1). Recently, the composition and dynamics of bacterial communities associated with *P. clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea were characterized by culture-independent 16S rDNA-based techniques (La Rivière *et al.*, 2013). This study provided a first insight into the microbiology of a temperate octocoral and revealed the existence of host-specific bacterial associates that are conserved throughout seasons and between different geographic locations. These assemblages differ from those of the surrounding seawater and are dominated by a specific *Hahellaceae*-related ribotype (*Gammaproteobacteria*) suspected to play a role in gorgonian host health and/or nutrition (La Rivière *et al.*, 2013). Determining the localization of bacteria in the tissues of *P. clavata* would provide the framework for examining taxon-specific microbial interactions within the holobiont and may help to understand the physiological role of different members of the bacterial community.

Molecular, culture-independent studies generally rely on homogenized crushed coral samples, thus precluding the determination of a specific distribution of associated microorganisms within the coral body structures. Further investigations that may combine classical histology with molecular biology become necessary to clarify the relationships between the bacteria and their host. FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) allows for a direct observation and identification of single bacterial cells in complex natural samples at the species, genus or higher taxon level without prior cultivation (Amann *et al.*, 1990b; Amann and Fuchs, 2008). This technique is commonly applied to suspensions of bacteria, bacterial aggregates and biofilms. Recently, it has been shown to be a powerful technique to detect bacteria associated with different marine organisms, such as algae (Tujula *et al.*, 2010), bivalves (Jensen *et al.*, 2010), crustaceans (Meziti *et al.*, 2010), fish (McCarthy *et al.*, 2008), sponges (Webster *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2006; Negandhi *et al.*, 2010; Radax *et al.*, 2012) or corals (Bruck *et al.*, 2007; Ainsworth and Hoegh-Guldberg, 2009; Apprill *et al.*, 2009; Neulinger *et al.*, 2009). To date, only a few studies have reported the localization of individual microbial cells within the coral holobiont using FISH techniques, which underlined technical difficulties to detect bacterial hybridization signals in the highly autofluorescent background of coral tissues (Ainsworth *et al.*, 2006). Autofluorescence caused by endogenous fluorophores is a major disturbing factor in fluorescence molecular imaging as it causes non-specific background that interferes with the detection of target signals. Different sources of autofluorescence have been described, such as the presence of fluorescent pigments or metabolites in tissues of marine organisms (Mosiman *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 2001; Tujula *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2008), or the influence of fixative or embedding reagent used to process the samples (Baschong *et al.*, 2001; Viegas *et al.*, 2007; Heaney *et al.*, 2011). Thus, several methodological improvements aimed to reduce autofluorescence or to distinguish between signal and noise (Kiernan, 2002; Neumann and Gabel, 2002; Xue *et al.*, 2011). Finally, the catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH technique provides a useful labeling alternative to classical FISH protocols that increases fluorescence intensity and allows more sensitive detection of hybridized bacteria (Bobrow *et al.*, 1989; Pernthaler *et al.*, 2002).

In this study, CARD-FISH was used to characterize *P. clavata*-bacterial associations in their natural spatial arrangement. To properly identify the gorgonian tissue structures harboring fluorescent-labeled bacteria, a histological analysis of stained sections was also performed, which

provided a first description of *P. clavata* tissue organization. This knowledge will contribute to help our understanding of the functional interactions that bacterial communities might establish with gorgonians and their potential role in holobiont physiology.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling, fixation and decalcification

Apical fragments (2 cm in length) of *P. clavata* were sampled at the Riou site (France) (43°10.3459 N, 05°23.3199 E) in may 2012 as described previously (La Rivière *et al.*, 2013), and transported to the laboratory within less than 2 hours. Samples were individually soaked in 3 washes of sterile-filtered seawater in 50 ml Falcon tubes to remove loosely attached bacteria, and left in the final bath for 4 h at 15°C to allow for polyp extension. Menthol crystals were then added to anesthetize the polyps during a further incubation of 2 h at 4 °C (Lonkar *et al.*, 2011). The samples were fixed in a sterile-filtered solution of 4 % formalin overnight and rinsed in PBS 1X (pH 7.4). Gorgonian fragments were decalcified in a 20 % (vol/vol) solution of EDTA (0.5 M, pH 8.0) in PBS for 48 h at 4 °C, with three EDTA solution changes over 2 days. Samples were subsequently transferred into 50 % (vol/vol) ethanol-PBS (pH 7.4) solution and stored at -20°C until use.

2.2. Thin sectioning

Fixed tissues were processed sequentially through 70 %, 80 % and 95 % ethanol-water solution (vol/vol) followed by three 100 % ethanol and three 100 % xylene washes at room temperature for 1 h, prior to paraffin embedding at 60°C for 10 min. Two cross-sections (5-10 µm) of the embedded fragments were collected onto warm SuperFrost Plus Gold slides (Menzel Glaser). Gorgonian thin sections were deparaffinated by washing in 2 baths of Neo-Clear® (Merck) for 15 min each. Tissues were rehydrated in a graded ethanol-water series (twice in 100 % ethanol, once in 95 %, 90 % and 80 % [vol/vol]; twice in sterile ultra-pure water) at room temperature for 5 min each step and then air-dried. To avoid merging liquids on the slide, thin sections were framed with a hydrophobic border by using a Dakopen.

For light microscopy observations, sections were stained using a standard haematoxylin and

eosin protocol (Sigma-Aldrich) and examined using a Nikon Eclipse microscope. For fluorescence *in situ* hybridization, slides were processed as described below.

2.3. Control slides

For evaluation of the CARD-FISH protocol efficiency, the *Escherichia coli* JM109 strain was used as a positive control. This strain was cultured in liquid medium for 5 h at 37°C with slow agitation. Bacterial cells were pelleted by centrifugation (5,000 rpm for 5 min), washed with PBS (pH 7.4), pelleted again by centrifugation (5,000 rpm for 5 min) and fixed in 4 % (vol/vol) formalin in PBS (pH 7.4) for 1 h. After centrifugation (5,000 rpm for 5 min), cells were washed in PBS (pH 7.4) and then stored in a 50 % (vol/vol) ethanol-PBS (pH 7.4) solution at -20°C until further processing.

Aliquots (60 µl) of the bacterial solution were spread onto SuperFrost Plus Gold slides, framed with a Dakopen and dried at 40°C in an oven. Slides were then processed as the gorgonian thin sections in CARD-FISH (see below).

2.4. Permeabilization

Bacterial cells walls were permeabilized by incubation in 80 µl of lysozyme solution ($1,355.10^6$ U of lysozyme [Sigma-Aldrich] ml^{-1}, 500mM EDTA [pH 8.0], 300 mM Tris-HCl [pH 8.0]) at 37°C for 2 h in a humid chamber. After being washed with sterile ultra-pure H_20 at room temperature for three times during 1 min, samples were additionally permeabilized with 80 µl of achromopeptidase buffer (60 U of achromopeptidase [Sigma-Aldrich].ml^{-1}, 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]) at 37°C for 1 h in a humid chamber. Subsequently, slides were washed three times with sterile ultra-pure H_20 at room temperature for 1 min each time and air dried. Endogenous peroxidases were inactivated by incubating thin sections in 80 µl of 10 mM HCl solution at room temperature for 30 min, followed by three (1 min each) washes with sterile H_20 at room temperature. Complete inactivation of endogenous peroxidase is of crucial importance to avoid non-specific degradation of the fluorescent tyramide.

2.5. Autofluorescence reduction

The effect of a treatment for autofluorescence reduction was investigated. Permeabilized slides were buffered in PBS (pH 7.4) for 3 min at room temperature, followed by 3 min at room

temperature in 70 % ethanol (vol/vol). Thin sections were then covered with Autofluorescence Eliminator Reagent (Chemicon-Millipore) and placed overnight in a humid chamber to avoid evaporation of the reagent. After incubation, slides were washed three times in 70 % ethanol (vol/vol) to ensure complete elimination of the dark reagent. Slides were air-dried and stored at -20°C before hybridization.

2.6. Hybridization

Lyophilized horseradish peroxidase (HRP)-labeled oligonucleotide probes were rehydrated in sterile filtered H_20 to 55 ng.µl^{-1} (probe stock solution). Five HRP-conjugated probes were used (Table 1): the "universal" eubacterial probes Eub338, Eub338-II, Eub338-III in an equimolar mix; the "nonsense probe" non-Eub338 which is complementary to Eub338, used to determine non-specific binding of probes (Wallner *et al.*, 1993); the "universal" gammaproteobacterial probe Gam42a, which was used in equimolar concentration with the unlabeled "universal" betaproteobacterial probe Bet42a, used as a competitor to block non-target probe binding sites (Manz *et al.*, 1992).

Table 1 |
Oligonucleotide probes used in CARD-FISH for identification of bacterial populations[a]

Probe name	Target group	Target rRNA	Target site[c]	Sequence (5' - 3')	Source
Eub338 I	Most *Bacteria*	16S	338-355	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann *et al.*, 1990a
Eub338 II	*Planctomycetes*	16S	338-355	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Daims *et al.*, 1999
Eub338 III	*Verrucomicrobia*	16S	338-355	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Daims *et al.*, 1999
Gam42a	*Gammaproteobacteria*	23S	1027-1043	GCCTTCCCACATCGTTT	Manz *et al.*, 1992
Bet42a[b]	*Betaproteobacteria*	23S	1027-1043	GCCTTCCCACTTCGTTT	Manz *et al.*, 1992
Non338	None (control)	16S		ACTCCTACGGGAGGCAGC	Wallner *et al.*, 1993

[a] Probe names, targeted taxa, targeted rRNA molecules and sites, sequences of the probes are presented

[b] Used as unlabelled competitor with the probe Gam42a

[c] *E. coli* numbering (Brosius *et al.*, 1981)

Drops (80 µl) of a 1:55 (vol/vol) mixture of probe stock solution and hybridization buffer were spread onto the thin sections. The hybridization buffer consisted of 55 % (vol/vol) formamide, 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.05 % Triton X100 (Sigma-Aldrich), 10 % (wt/vol) dextran sulfate (Sigma-Aldrich) and 10 % (vol/vol) blocking solution. The blocking solution (pH 7.5) was made of 10 % blocking reagent (Boehringer Mannheim), 100 mM maleic acid (Sigma-Aldrich) and 150 mM NaCl. The hybridization was performed at 35°C for 4 h in a humid

chamber. Thereafter, the sections were transferred into 50 ml of prewarmed washing buffer (13 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0) and 0.01 % (wt/vol) sodium dodecyl sulfate) at 37°C for 15 min. Slides were soaked for few seconds in cold sterile ultra-pure water and quickly air-dried.

2.7. Amplification

Thin sections were equilibrated with PBS triton (pH 7.4) at room temperature for 15 min in the dark. After removal of excess buffer, tissues were immediately covered with drops (80 µl) of a 1:100 (vol/vol) mixture of tyramide-Alexa488 and amplification buffer (10 % dextran sulfate (Sigma-Aldrich), 2 M NaCl, 10 % blocking solution, 0.0015 % (vol/vol) H_20_2 and PBS (pH 7.4)) and incubated at 46°C for 30 min in a dark humid chamber. Optimal concentration of tyramide-Alexa488 was assessed to get the brighter fluorescent signal with the lower background fluorescence. After amplification, slides were washed in PBS (pH 7.4) at room temperature for 20 min, and three times in sterile ultra-pure water at room temperature in the dark for 1 min each time. Sections were air-dried and covered with a DAPI-mix mountant that allowed for cells counterstaining (77 % [vol/vol] Citifluor AF1, 14 % [vol/vol] Vectashield mounting medium (Vector Laboratories], 1 µg.ml^{-1} of DAPI [4', 6'-diamidino-2-phenylindole]). Slides were stored at -20°C in dark boxes until microscopic analysis.

2.8. Microscopy and image processing

Hybridized thin sections were viewed on a Zeiss LSM 780 confocal microscope, equipped with Plan-apochromat 10X (NA=0.45), 20X (NA=0.8), 40X (NA=1.4, oil) and 63X (NA=1.4, oil) objectives. The fluorescence was excited sequentially with the lasers 405 and 488 and the emission detection was chosen in the range 415-469 nm for DAPI and 497-552 nm for Alexa488 respectively. Image stacks (steps of 0.5 to 1 µm) were acquired with GaAsP photons multiplicator tubes (PMT) detectors. The 32 channels GaAsP PMT detectors allow spectral detection in parallel mode in the range 412-692 nm. Composite and overlay images were produced from these stacks with the software ImageJ v1.46 (http://imagej.nih.gov/ij). Gorgonian tissue sections without treatment, or treated with the FISH protocol without the application of probe, were used for spectral profiling of autofluorescence fluorescence.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Before determining the localization of bacteria associated with *P. clavata*, the general description of gorgonian tissues organization was required. The hematoxylin-eosin staining of *P. clavata* sections enabled the comparison with the previously described anatomy of a gorgonian polyp (Galloway *et al.*, 2007) to provide the first histological identification of *P. clavata* tissues (Figure 1). This allowed the observation of the anthocodia (the distal part of the polyp) with its actinopharynx (a tubular gullet leading from the mouth to the coelenteron, the body cavity) and mesenteries (endoderm infoldings increasing the surface area for nutrition and digestion), surrounded by the coenenchyme (the colonial tissue between polyps) (Figure 1).

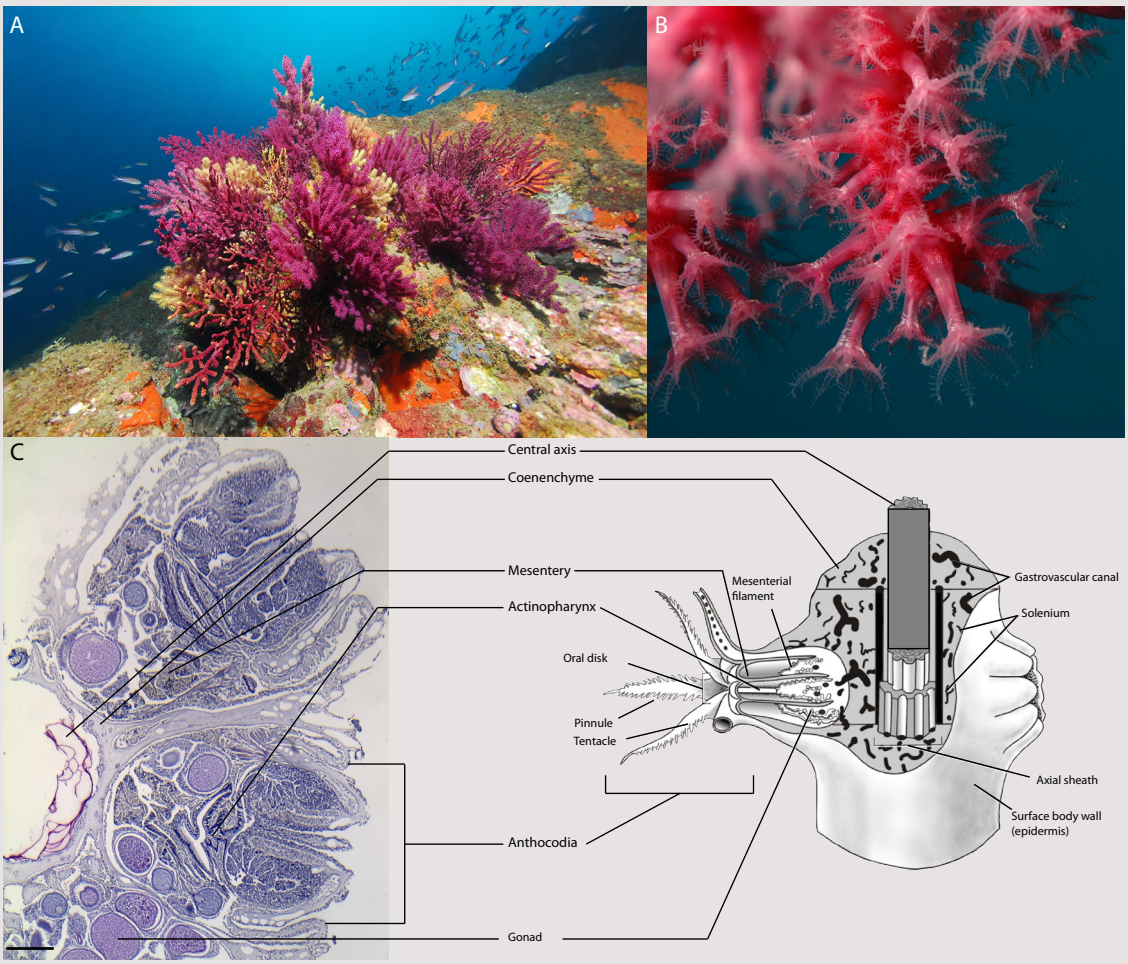


Figure 1 | The red gorgonian *Paramuricea clavata*.
A: *P. clavata* colonies with red and yellow-red morphotypes in a Mediterranean coralligenous reef (Massador, Cap de Creus , France – 20 m depth) (© F. Zuberer).
B: Macro-photograph of expanded *P. clavata* polyps (© O. Bianchimani).
C: Tissue organization of a *P. clavata* histological cross-section stained with hematoxylin-eosin compared with the gross anatomy of a gorgonian polyp (schema modified from Galloway *et al.*, 2007). Scale bar: 300 µm.

Because *P. clavata* tissues exhibited strong autofluorescence, and despite the use of the CARD-FISH technique, *in situ* identification of bacteria and discrimination from the background signal was not possible using standard epifluorescence microscopy analysis. In addition, autofluorescence intensity was not uniform within tissue sections, precluding a computer-based approach for subtraction of the background noise (Figure 2). By optimizing several steps of the protocol, including the addition of a blocking step to reduce autofluorescence emission, we obtained a clear decrease in background intensity, although a residual tissue autofluorescence was still observed that might exceed the low intensity of some bacterial signals.

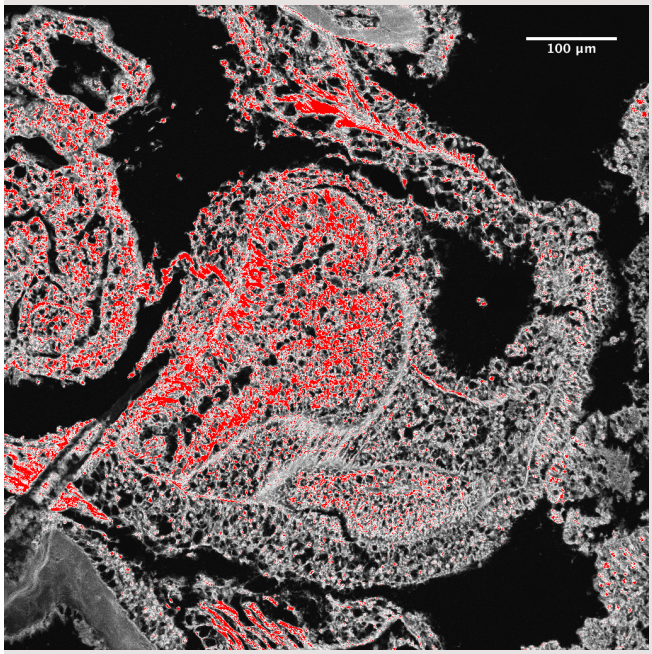


Figure 2 | *P. clavata* tissues autofluorescence.
Spectral imaging of *P. clavata* tissues processed through CARD-FISH protocol without probes and without any autofluorescence reduction treatment. Artificial colors show different levels of autofluorescence (black: background, no autofluorescence; gray: lower autofluorescence; red: higher autofluorescence).

P. clavata tissue sections were hybridized with a combination of probes EUB338 I to III targeting the majority of all known bacteria (Daims *et al.*, 1999). No bacterial signal could be observed on the gorgonian tissue surface, suggesting that the associated microbial community is mostly or exclusively constituted by endobacteria (not shown). The nematocysts walls showed a very bright fluorescence signal in Eub388 probe-treated samples (Figure 3). These structures could clearly be distinguished from potential bacterial cells by their size and shape, and the lack of a conspicuous DAPI signal. This indicated a possible non-specific binding of the probe to these structures. Nematocysts represent a subcategory of cnidocysts, the defining organelle of cnidarians, used for prey capture and defense. It is a cylindrical capsule body made of collagenous polymer, to which a long tubule armed with spines is attached (Fautin, 2009; Ozbek *et al.*, 2009;

Ozbek, 2011). In agreement with our observations, fluorescence of nematocysts was also observed in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Neulinger *et al.*, 2009).

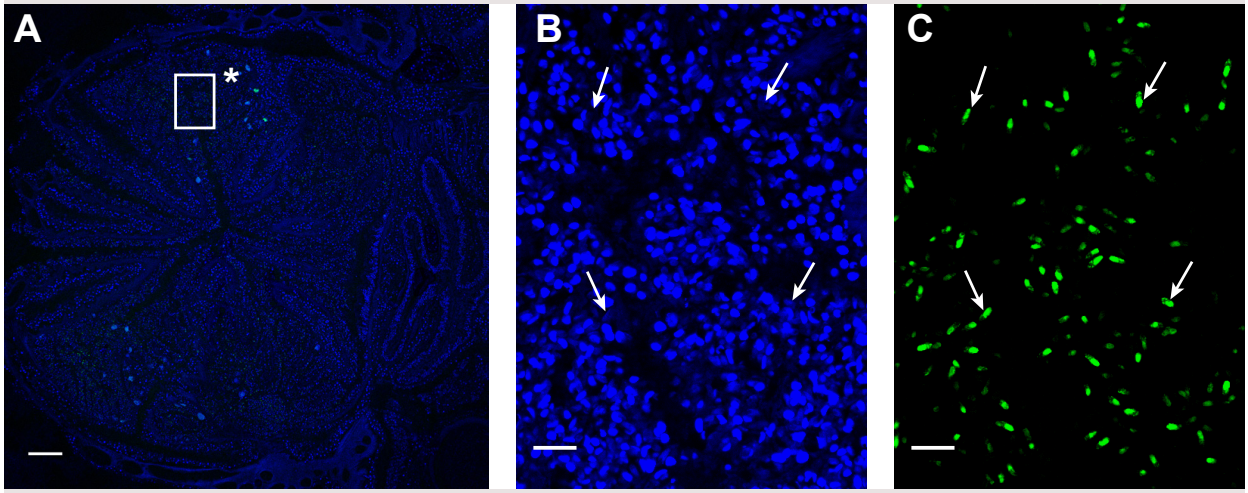


Figure 3 | Nematocysts fluorescence in *P. clavata* section.
Confocal photographs of *P. clavata* tissues hybridized with the probe mix Eub338 (overlay of stack images). A: Overview of a cross-sectioned polyp. The image is an overlay of DAPI signals of cells nuclei (blue) and hybridization signals of Alexa488 (green). Scale bar: 100 µm.
B and C: Photographs showing the detail of DAPI (B) and Alexa488 (C) signals in the frame of panel A labeled by an asterisk. Arrows denote corresponding DAPI and Alexa488 signals of nematocysts. Scale bars: 20 µm.

Beside the non-specific fluorescence of cnidocysts, bright signals were also obtained with Eub388 hybridization from ovoid inclusions (~10 µm large) within the anthocodia of the gorgonian polyp (Figure 4, panels A-C). Those aggregates resemble hematoxylin-eosin-stained masses that could be distinguished from the gorgonian cells in light microscopy, based on their larger size and dark coloration (Figure 4, panels D and E). Unfortunately, individual cells forming those aggregates could not be visualized. The fact that these structures contained DNA was confirmed by DAPI counterstaining (Figure 4, panels B and C), and the absence of a fluorescent signal with the non-Eub338 probe confirmed their specific hybridization with Eub338 (data not shown). Several descriptions of ovoid bacterial aggregates were previously reported in tropical coral species (Peters, 1984; Ainsworth *et al.*, 2007a; 2007b; Ainsworth and Hoegh-Guldberg, 2009). Surprisingly, no other particular structures that could be identified as bacteria were observed besides these aggregates in *P. clavata* tissues, either by CARD-FISH coupled with confocal microscopy or by light microscopy.

There was no evidence of bacteria-like structures in oocytes observed in the *P. clavata*

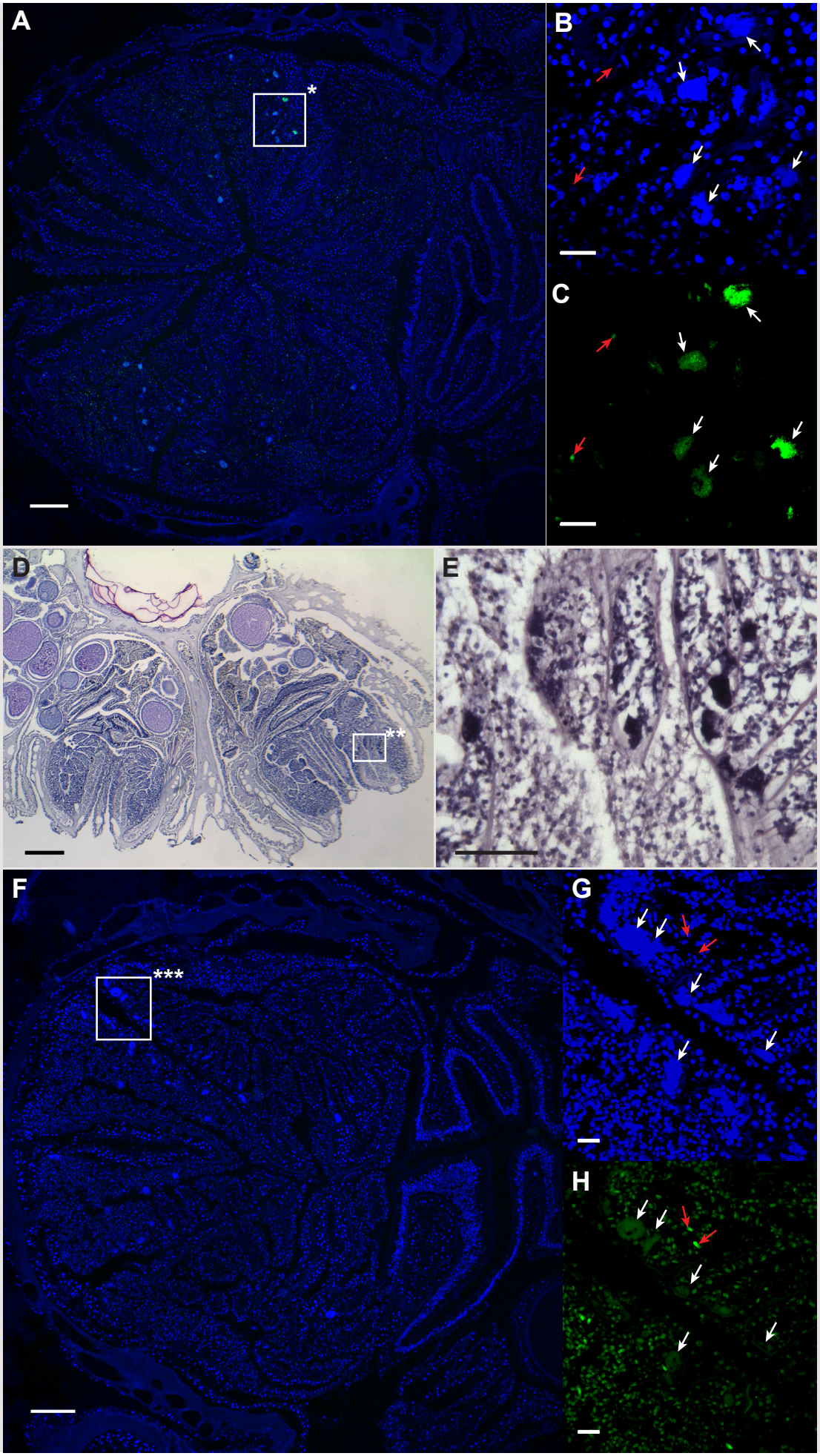

A
*
B
C
D
**
E
F
***
G
H

Figure 4 | *Bacteria* in *P. clavata* tissues.
A-C: Confocal photographs of *P. clavata* tissues hybridized with the probe mix Eub338 (overlay of stack images).
A: Overview of a cross-sectioned polyp. The image is an overlay of DAPI signals of cells nuclei (blue) and hybridization signals of Alexa488 (green).
B and C: Photographs showing the detail of DAPI (B) and Alexa488 (C) signals within the anthocodia tissues.
D and E: Light microscopy photograph of *P. clavata* tissues stained with hematoxylin-eosin showing an overview of a cross-sectioned polyp (D) and a detail of ovoid aggregates within the anthocodia (E).
F-H: Confocal photographs of *P. clavata* tissues hybridized with the probe Gam42a (overlay of stack images).
F: Overview of a cross-sectioned fragment. The image is an overlay of DAPI signals of cells nuclei (blue) and hybridization signals of Alexa488 (green).
G and H: Photographs showing the detail of DAPI (G) and Alexa488 (H) signals within the anthocodia tissues.
White arrows denote corresponding DAPI and Alexa488 signals of bacterial aggregates. Red arrows denote corresponding DAPI and Alexa488 signals of nematocysts.
*, frame of photograph details in panels B and C; **, frame of photograph detail in panel E; ***, frame of photograph details in panels G and H.
Scale bars: 100 µm (A, F), 300 µm (D), 50 µm (E) and 20 µm (B, C, G and H).

sections (Figure 5). This result suggests that the bacteria are not vertically transmitted from the mother colony to the larvae through the eggs, at least during the early stages of the gametogenesis observed here. *P. clavata*'s eggs are fertilized externally after spawning and embryos develop into planula larvae that undergo metamorphosis into juvenile polyps once they have settled onto a suitable substratum. Although it is possible that the onset of the *P. clavata*-bacteria associations occurs through a vertical transmission via the male sperm, an acquisition of specific microorganisms through horizontal uptake after spawning is more likely, as it has been observed in tropical coral species (Apprill *et al.*, 2009; Sharp *et al.*, 2010). It would be of great interest to monitor the bacterial distribution pattern through the early life stages of the host, to assess if the symbionts acquisition is limited to specific tissues, or if an ontogenetic shift in symbiont distribution occurs from widespread colonization of all epithelia to spatially restricted colonization of specific tissues, as it has been recently described in a deep-sea mussel species (Wentrup *et al.*, 2013). This knowledge could provide important insight into the nature of gorgonian-microbial relationships by revealing mechanisms by which bacterial colonization and proliferation within host tissue are regulated.

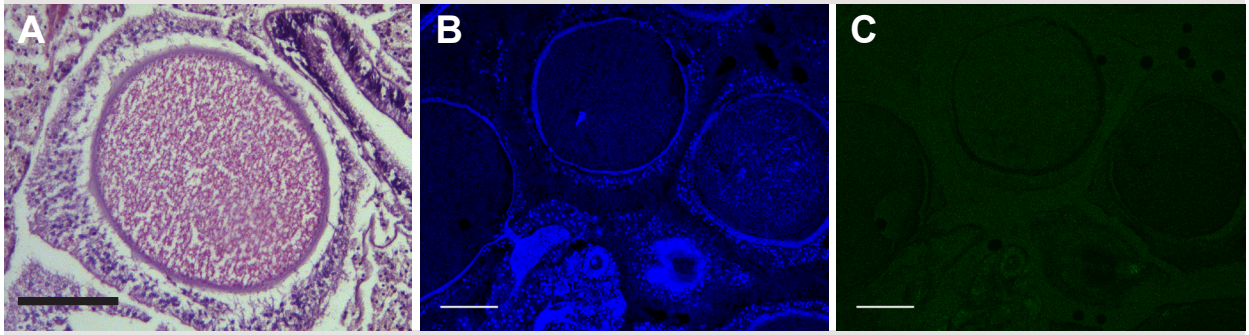


Figure 5 | Oocytes in *P. clavata* tissues.
A-C: Confocal photographs of *P. clavata* tissues hybridized with the probe mix Eub338 (overlay of stack
A: Light microscopy photographs of *P. clavata* oocytes stained with hematoxylin-eosin. Scale bar: 100 µm.
B and C: Confocal photographs of *P. clavata* oocytes hybridized with the probe mix Eub338 showing DAPI (C) and Alexa488 (D) signals. Scale bars: 100 µm.

The recent description of *P. clavata* bacterial assemblages highlighted that the community is dominated by ribotypes belonging to a specific clade within the *Hahellaceae* family of *Gammaproteobacteria* (La Rivière *et al.*, 2013). Bacteria affiliated to *Hahellaceae* were also identified as the prevailing associates in several hexa- and octocoral species (Bayer, 1981; Hansson *et al.*, 2009; Morrow *et al.*, 2012). This suggested that those dominant bacteria might form the aggregates observed in *P. clavata* tissues. Furthermore, similar bacterial aggregates were previously observed within the gastrodermis of the tropical corals *Acropora aspera* and *Stylophora pistillata*, and were composed of rod-shaped *Gammaproteobacteria* (Ainsworth and Hoegh-Guldberg, 2009). Aggregated bacterial structures dominated by species related to *Endozoicomonas elysicola*, a member of the *Hahellaceae* family, were also observed in the tentacles of another cnidarian, the sea anemone *Metridum senile* (Schuett *et al.*, 2007). The detection of similar bacterial aggregates in different cnidarian species suggests that these structures could correspond to the widespread *Hahellaceae*-related bacterial associates. However, we were unable to obtain further evidence to allow the taxonomic identification of bacteria within the observed aggregates as these structures did not exhibit any fluorescence upon hybridization with the Gam42a probe targeting *Gammaproteobacteria* (Figure 4, panels F-H). Nonetheless, technical limitations inherent to the CARD-FISH method could explain the failure to detect *Hahellaceae* bacteria. First, the remaining tissue autofluorescence may have masked low-intensity bacterial signals. It must be kept in mind that symbiotic bacteria are expected to exhibit low fluorescent signals when hybridized, because they are generally small, slow growing and starving (Morita, 1997) and thus

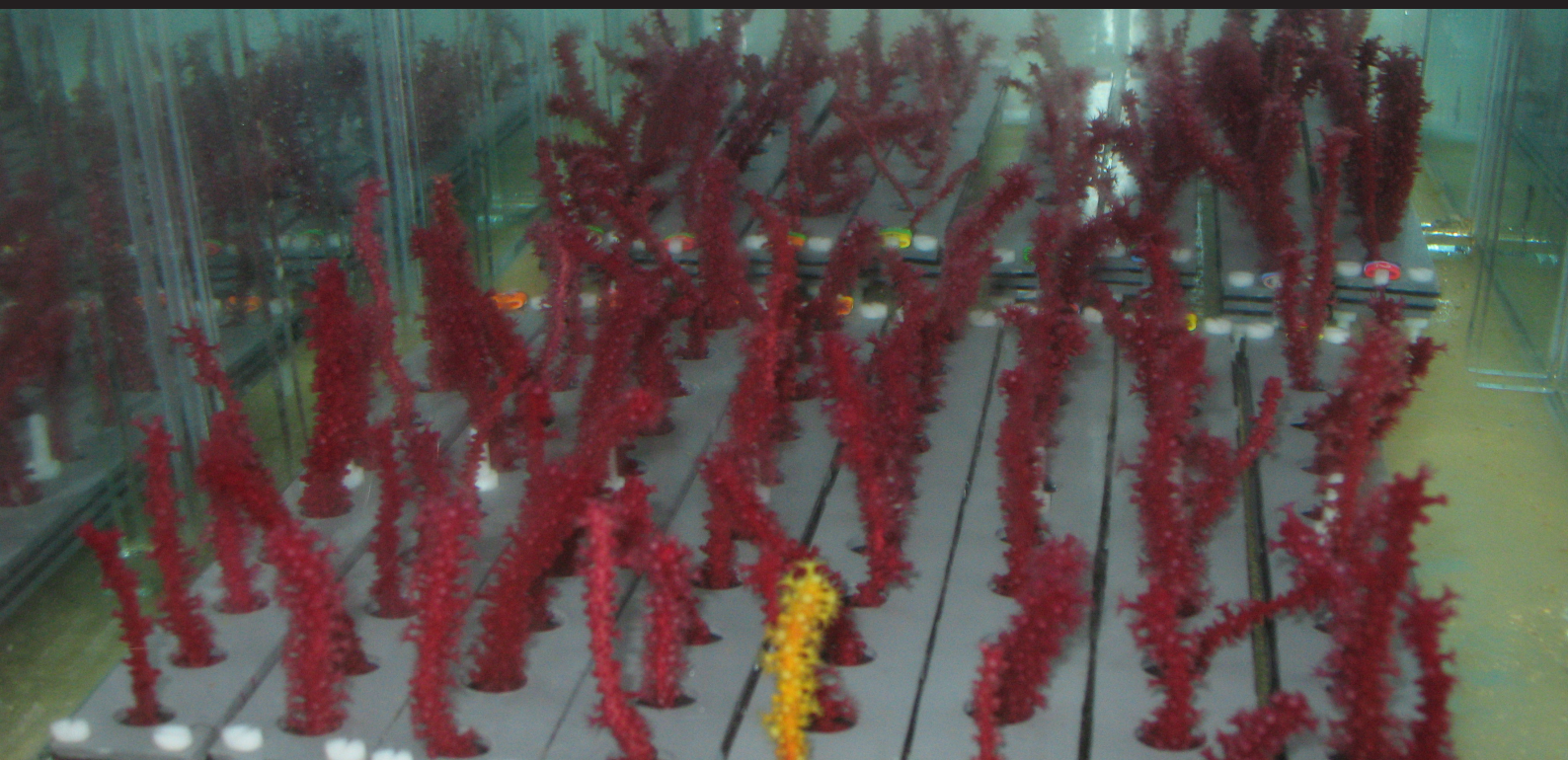
have a low cellular ribosome content resulting in a reduced number of hybridized probes (DeLong *et al.*, 1989). Furthermore, cell-detection efficiency might be hindered by slow diffusion of the large enzyme-labeled probe in dense cell aggregates (Schonhuber *et al.*, 1997). Second, a possible lack of probe-specificity is also to be considered. Indeed, it has been shown that while the probe Gam42a is supposed to be universal for *Gammaproteobacteria* (Manz *et al.*, 1992), it does not identify some members of this group (Manz *et al.*, 1992; Yeates *et al.*, 2003; Siyambalapitiya and Blackall, 2005). Unfortunately, we could not check for proper hybridization on the rRNA target sequence of *P. clavata*-associated *Hahellaceae* because it was retrieved from a 16S rDNA clone library (La Rivière *et al.*, 2013), while the Gam42a probe targets 23S rRNA. The design of a *Hahellaceae*-specific probe would likely be the future way to ensure the taxonomic identification of the bacterial aggregates highlighted with the Eub338 probe. Because this strain failed to be cultivated on classic culture media, the use of the Clone-FISH method might be an interesting alternative to achieve this goal (Schramm *et al.*, 2002).

Several protocol improvements could be tested in the future to help *Hahellaceae* detection. Cell wall permeabilization conditions could be improved, as the penetration of the labeled probes is influenced by the bacterial cell wall composition that may vary between different bacterial species (Amann and Fuchs, 2008). The use of a modified FISH technique with a smaller label, such as DOPE-FISH, might also be an alternative to improve signal intensity without increasing the size of the probes (Stoecker *et al.*, 2010). Finally, stringency conditions could be adapted to improve probe-target hybridization, as sequence-specific properties of the *Hahellaceae* ribosomal RNA might hinder the accessibility of the probe-binding site (Fuchs *et al.*, 1998).

In conclusion, this work reports the first histological characterization and *in situ* imaging of tissue-associated bacteria of the temperate gorgonian *P. clavata*. Our results provide preliminary evidence of potential bacterial endosymbionts that may play a role in the physiology and/or ecology of their host. Future studies based on improvements of the hybridization protocols described here will be focused on the identification of these bacteria at a more refined taxonomic resolution, in order to better document the bacterial-host associations in the gorgonian holobiont.

Chapitre IV

Stabilité des communautés bactériennes associées à *P. clavata* en conditions de stress



1. INTRODUCTION

1.1. Contexte de l'étude

Les deux évènements majeurs de mortalités massives de gorgonaires observés en Méditerranée nord-occidentale en été 1999 et été 2003 ont été corrélés à des anomalies thermiques positives au sein de la colonne d'eau (Perez *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2009; Crisci *et al.*, 2011). Deux types d'anomalies thermiques positives pouvant déclencher ces mortalités ont pu être identifiés : le premier caractérisé par une température de l'eau atteignant 27°C pendant de courtes périodes (2-5 jours), le deuxième caractérisé par une longue période (30-40 jours) à 24°C (Crisci *et al.*, 2011). Bien que ces anomalies aient été observées tout le long des côtes de Méditerranée nord-occidentale, soumettant ainsi les différentes populations de gorgonaires à des niveaux de stress thermique comparables, une forte hétérogénéité de réponse des populations a été observée, tant à l'échelle régionale qu'à des échelles plus locales (Garrabou *et al.*, 2009). La réponse différentielle inter-populationnelle observée peut en partie être expliquée par les différences de régimes thermiques et hydrodynamiques entre les zones et sites atteints (Bensoussan *et al.*, 2010; Crisci *et al.*, 2011). Cependant ces différences sont probablement dues à l'action (avec des effets synergiques potentiels) de différents facteurs et mécanismes biologiques et physiologiques (i.e., contraintes énergétiques, stress physiologique, variabilité génétique) qui affectent la résistance des populations au stress. En particulier, l'hypothèse de l'implication de facteurs microbiologiques dans le déclenchement des mortalités a été avancée à la suite de l'isolement de bactéries à potentiel pathogène à partir de tissus nécrosés de la gorgone rouge *Paramuricea clavata* lors de différents évènements de mortalités massives (Martin *et al.*, 2002; Bally et Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010; Huete-Stauffer *et al.*, 2011). Une souche apparentée à l'espèce bactérienne *Vibrio coralliilyticus*, précédemment identifiée comme pathogène chez une espèce de corail tropical (Ben-Haim et Rosenberg, 2002), a notamment montré une pathogénicité thermo-dépendante particulièrement importante vis-à-vis de *P. clavata* et sa présence a pu être associée à l'étiologie des nécroses par la validation des postulats de Koch (Bally et Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010). D'autre part, il est possible que l'élévation de la température lors des anomalies thermiques entraîne des modifications (changement de l'abondance ou de la diversité des espèces) des communautés bactériennes associées aux gorgones qui pourraient influer sur leur niveau de résistance au stress. En effet, il est admis que la tolérance des coraux –cnidaires proches des gorgones- face à un stress peut

résulter de leurs capacités d'acclimatation, définie comme une adaptation de l'animal grâce à sa plasticité physiologique et/ou métabolique, mais peut également être due à une adaptation des organismes symbiotiques qui lui sont associés. Selon l'*hypothèse probiotique des coraux* (*The coral probiotic hypothesis*), les coraux vivent en association étroite avec des communautés bactériennes qui peuvent être modifiées en cas d'altération des conditions environnementales de manière à maximiser la fitness de l'holobionte plus rapidement que par adaptation ou évolution de l'hôte lui-même (Reshef *et al.*, 2006).

Des changements importants de la composition et de l'activité métabolique de la communauté bactérienne résidente de plusieurs espèces de coraux tropicaux ont été observés à la suite de stress thermiques (Bourne *et al.*, 2008; Ainsworth et Hoegh-Guldberg, 2009; Vega Thurber *et al.*, 2009; Littman *et al.*, 2010; Rypien *et al.*, 2010), bien que ces changements ne semblent pas systématiques (Bellantuono *et al.*, 2011; Salerno *et al.*, 2011). Une étude combinant stress thermique et déstabilisation artificielle de la communauté bactérienne résidente à l'aide d'antibiotiques a en outre suggéré que les bactéries sont indirectement impliquées dans la tolérance au stress de l'holobionte et peuvent améliorer ses capacités de récupération (Gilbert *et al.*, 2012). Il reste cependant très difficile de déterminer avec certitude si un changement de composition de la communauté bactérienne est une réponse "bénéfique" au stress pouvant contribuer à la résistance de l'holobionte, ou s'il s'agit au contraire de la conséquence d'une déstabilisation de l'association symbiotique par l'affaiblissement d'un hôte compromis.

L'étude de ces interactions *in situ* est complexe car elle requiert l'analyse des effets de différents facteurs biotiques et abiotiques interdépendants. De plus, le suivi de la réponse au stress des individus nécessite des échantillonnages fréquents et réguliers sur le terrain, ce qui est matériellement très difficile. C'est pourquoi les recherches portant sur l'étude de la réponse d'holobiontes aux perturbations environnementales se basent en général dans un premier temps sur l'analyse d'échantillons ayant subi des stress *in situ* –le plus souvent un épisode de maladies- puis sont complétées par des expérimentations en aquariums qui permettent de soumettre les échantillons vivants à différents stress en conditions contrôlées. Cependant, aucune étude n'a encore entrepris l'étude du compartiment microbien d'un holobionte gorgonaire tempéré soumis à un stress expérimental. Les données obtenues chez les coraux tropicaux ont pu mettre en évidence une grande variabilité de réponse des communautés bactériennes en fonction du stress appliqué,

et parfois même une variabilité de réponse d'une étude à l'autre pour une même espèce soumise à des stress similaires (voir par exemple Salerno *et al.*, 2011 vs Vega Thurber *et al.*, 2009). De plus, plusieurs de ces travaux ont mis en évidence que la manipulation des échantillons et/ou la mise en aquarium pouvaient induire un "effet aquarium" sur les communautés bactériennes de l'holobionte qui pourrait biaiser l'interprétation d'éventuels changements de composition post-traitement s'il n'était pas détecté par l'analyse d'échantillons contrôles (Ainsworth et Hoegh-Guldberg, 2009; Vega Thurber *et al.*, 2009; Salerno *et al.*, 2011). Ceci souligne les difficultés qui peuvent être rencontrées dans l'évaluation de réponses complexes à des stress mimant des conditions extrêmes observées en milieu naturel sans pour autant les reproduire parfaitement en milieu contrôlé.

Face aux prédictions d'augmentation de la température et de la fréquence d'évènements climatiques extrêmes, il apparaît primordial de mieux connaître les interactions existantes entre les partenaires hôte et bactéries de l'holobionte pour anticiper les trajectoires futures des populations de gorgonaires. Plus particulièrement, il semble urgent de déterminer l'adaptabilité et la résilience des communautés bactériennes face au stress thermique.

1.2. Objectifs du travail

Le but du travail décrit dans ce chapitre a été d'initier l'étude des variations des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge *P. clavata* en conditions de stress, sur le terrain et en laboratoire. Nous avons tout d'abord analysé des échantillons provenant d'une mortalité de gorgonaires observée en milieu naturel en 2011, afin d'évaluer si les communautés bactériennes associées à des gorgones malades différent des communautés associées à des colonies apparemment saines. Nous avons ensuite cherché à évaluer, par des expérimentations en aquariums, si une modification de composition des assemblages bactériens pouvait être causée par un stress thermique, ce qui pourrait indiquer une adaptation possible de l'holobionte à ce type de perturbation par une modulation des interactions entre partenaires bactériens et hôte. Enfin, l'effet de traitements antibiotiques a été testé pour tenter d'étudier les capacités de résilience des communautés bactériennes après perturbation de leur composition. L'analyse des critères distinctifs entre associations bactériennes normales, stables et perturbées donnera une base sur laquelle des hypothèses pourront être formulées quant à leur rôle dans la physiologie de l'holobionte.

En raison de la diversité des approches utilisées et pour faciliter la clarté de présentation des résultats, nous avons choisi d'organiser ce chapitre selon trois parties correspondant aux trois types de stress étudiés : (1) stress naturel lors d'une mortalité massive de gorgones, (2) stress thermique en conditions contrôlées, (3) stress par traitement antibiotique. D'abord nous présentons une section correspondant aux méthodologies communes, puis chaque partie contenant les sections "Matériels et méthodes" et "Résultats et interprétation", et enfin nous discutons l'ensemble des résultats dans une synthèse générale.

1.3. Méthodologie commune à l'étude des stress *in situ* et expérimentaux

Avant d'aborder la présentation des protocoles spécifiques à chaque étude, les étapes communes aux analyses par T-RFLP des effets de stress naturels et contrôlés (paragraphes 2 et 3) sont détaillées ci-après. Après décongélation des échantillons, tous les fragments dont une portion de tissu était nécrosée ont été coupés de manière à ne conserver qu'un fragment de tissu apparemment sain jouxtant les tissus nécrosés. Les morceaux de gorgones ont ensuite été lavés en eau de mer stérile et filtrée, puis traités selon les protocoles d'extraction, d'amplification de l'ADNr 16S bactérien (amorces PCR : 63F-FAM/786R-Eub) et d'analyse par T-RFLP détaillés dans le Chapitre 2 (La Rivière *et al.*, 2013). Après normalisation et binning des données issues de l'analyse T-RFLP selon le protocole décrit précédemment (La Rivière *et al.*, 2013) (paramètres utilisés précisés ultérieurement pour chaque analyse), une représentation graphique de l'abondance relative des fragments de restriction terminaux (TRFs) a été réalisée pour chaque enzyme de restriction utilisée. Chaque TRF est identifié par sa taille en paires de bases dans la suite de ce chapitre (par exemple : TRF-104 est le fragment de 104 pb). La diversité des TRFs des communautés analysées a été comparée avec celle des profils obtenus pour les communautés "naturelles" associées à *P. clavata* décrites dans le Chapitre 2, et chaque TRF présent à la fois dans les communautés "naturelles" et dans les communautés analysées dans cette étude a été identifié. Afin de comparer statistiquement les structures des communautés bactériennes, des représentations graphiques en MDS (Multidimensional scaling) ont été réalisées à partir de la matrice de distance (indice de Bray-Curtis), les clusters d'échantillons ont été déterminés par la méthode des k-means et des ellipses de confiance à 50 % et 95 % ont été tracées sur les graphiques à l'aide du langage de programmation R.

2. ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES À DES GORGONES SUBISSANT UNE MORTALITÉ *IN SITU*

2.1. Matériels et méthodes

Nous avons évalué la sévérité et l'étendue d'une mortalité anormale de gorgonaires survenue fin septembre 2011 sur un site proche du Cap d'Antibes ainsi que sur 2 sites voisins (Figure 1). Pour ce faire, nous avons recensé les colonies visiblement atteintes (plus de 10 % des tissus touchés par des nécroses récentes) et les colonies visiblement non-atteintes (0 à 10 % des tissus nécrosés) en effectuant des transects horizontaux à une profondeur fixe, environ 2 mètres en dessous de la limite supérieure de répartition de la population (Garrabou *et al.*, 2009). La nécrose récente était définie par l'observation de portions de tissus en cours de nécroses (tissus noirâtres ou blanchâtres) ou d'axes squelettiques nouvellement dénudés n'ayant pas encore été recouverts par des organismes épibiontes. Sur le site de Cap Gros, 70 % des colonies de *P. clavata* étaient atteintes de nécroses à plus de 10 % à 25 mètres de profondeur (n=142). Sur le site de Fourmigue, 30 % des colonies étaient atteintes à 27 mètres (n=100) et 54 % à 30 mètres (n=98). Enfin, sur le site de Rascoui, 7 % des colonies étaient atteintes à 31 mètres (n=108).

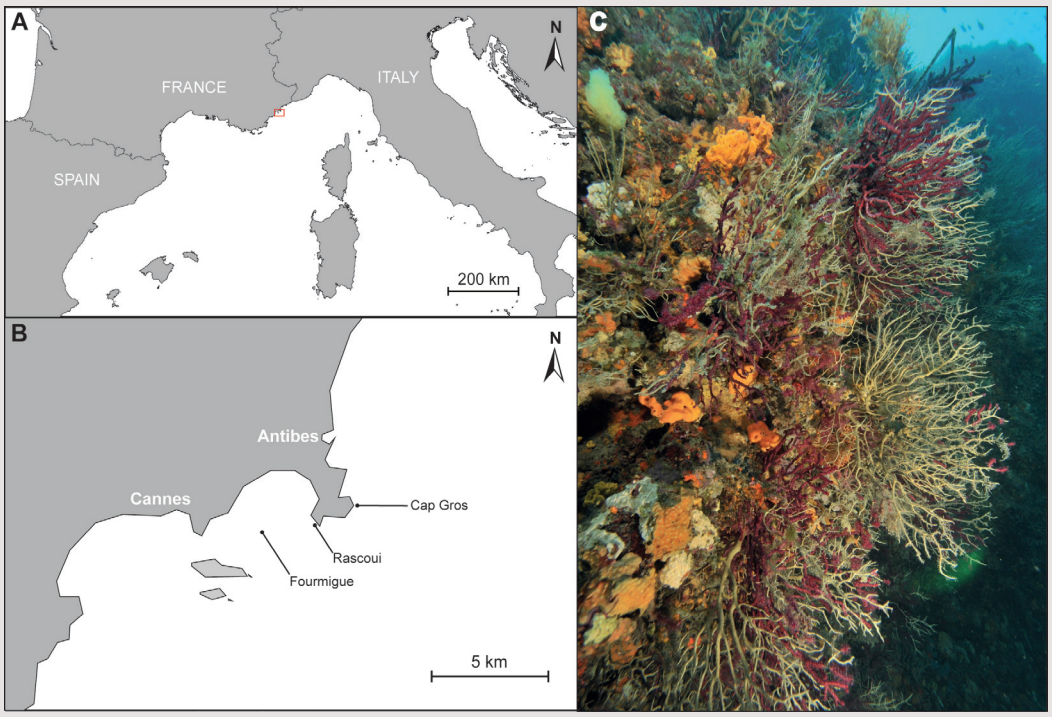


Figure 1 | Mortalité massive de gorgones à Antibes en 2011.
Carte du bassin nord-occidental de la mer Méditerranée (A) et agrandissement montrant la localisation des sites étudiés lors de la mortalité massive de gorgones en octobre 2011 (B). Photographie de colonies de *P. clavata* atteintes de mortalités sur le site du Cap Gros (C) (© O. Bianchimani).

Des prélèvements ont été effectués sur le site le plus atteint de Cap Gros. Trois colonies d'apparence saine (aucun signe de nécrose visible à l'œil nu) ainsi que trois colonies atteintes de nécroses ont été échantillonnées. Pour les colonies non-atteintes, un fragment apical de 4 cm de longueur a été prélevé (échantillons NA1, NA2 et NA3). Pour les colonies atteintes, un fragment apparemment sain de 4 cm jouxtant une portion de tissu nécrosé a été prélevé (échantillons A1, A2 et A3). Les échantillons ont été placés dans des tubes individuels sous l'eau puis transportés dans une glacière au laboratoire. Les fragments ont ensuite été lavés dans 3 bains d'eau de mer stérile et filtrée à 0,2 µm. Chaque fragment sain ou atteint a ensuite été congelé à -80°C pour extraction ultérieure des ADN.

Les communautés bactériennes totales ont été analysées par T-RFLP afin d'évaluer si une variation de composition des assemblages pouvait être observée entre les colonies saines et atteintes de nécroses. Les ADN des fragments de gorgone congelés lors des prélèvements ont été extraits, amplifiés puis analysés par T-RFLP selon le protocole décrit dans le Chapitre 2 (enzymes de restriction : *Cfo*I et *Msp*I ; seuil : 2 % de l'intensité de fluorescence totale ; binning : WS 1, Sh 1).

2.2. Résultats et interprétation

Les communautés bactériennes des échantillons issus de cet échantillonnage présentaient en moyenne très peu de ribotypes différents (*Cfo*I : 4,3 ± 1,6 TRFs ; *Msp*I : 1,5 ± 0,55 TRFs) et très peu étaient redondants dans plus de 2 échantillons (*Cfo*I : 4 TRFs sur 8 partagés entre plus de 2 échantillons ; *Msp*I : 1 seul TRF sur 4 partagé entre tous les échantillons) (Figure 2).

Il est difficile de savoir avec certitude si une diversité de TRFs aussi faible est due à un problème de rendement d'extraction et/ou d'amplification des ADN bactériens, ou bien si elle est le reflet d'une communauté réellement peu diversifiée. C'est pourquoi il est prudent de considérer ces résultats comme une vue partielle de la composition des assemblages bactériens. Ces données nous permettent néanmoins d'observer que les communautés bactériennes associées aux 6 échantillons sains et nécrosés contenaient toutes le TRF correspondant au ribotype *Hahellaceae* identifié dans le Chapitre 2 (TRF-171 pour la digestion par *Cfo*I, TRF-105 pour la digestion par *Msp*I ; Figure 2). Pour la digestion par l'enzyme *Cfo*I, un seul autre TRF était partagé par tous les échantillons (TRF-223, Figure 2A). Deux fragments de colonies atteintes de nécroses (A2 et A3) étaient dominés par un même TRF (TRF-168), qui n'avait jamais été observé chez

P. clavata. Le profil de l'échantillon NA1 issu d'une colonie non-atteinte était quant à lui dominé par un autre TRF (TRF-169) non identifié, également présent dans l'échantillon NA3 (Figure 2A). Les communautés révélées par la digestion enzymatique par *Msp*I étaient toutes dominées, voire exclusivement constituées –dans le cas des échantillons présentant des nécroses- par le TRF *Hahellaceae* (TRF-105) (Figure 2B). Il est vraisemblable que les bactéries correspondant aux autres TRFs révélés par l'enzyme *Cfo*I soient en dehors des limites de détection pour la digestion par *Msp*I et que la diversité des communautés analysées par cette enzyme apparaisse ainsi sous-estimée.

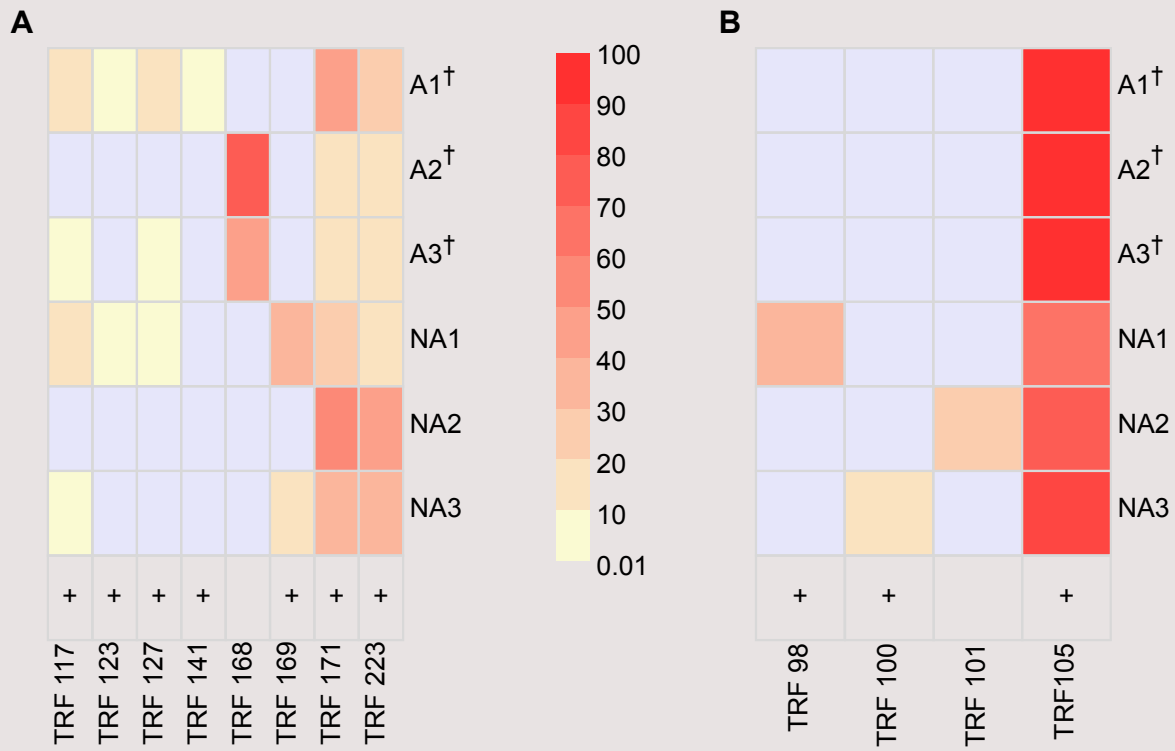


Figure 2 | Abondances relatives des TRFs dans les échantillons de gorgones issus du Cap Gros. Les lignes représentent les profils T-RFLP de la communauté bactérienne associée aux échantillons de *P. clavata* atteints de nécroses (A1, A2, A3) et aux échantillons non atteints (NA1, NA2, NA3) générés par la digestion par *Cfo*I (A) ou *Msp*I (B). Les échantillons issus de fragments de gorgone qui présentaient des nécroses des tissus sont indiqués par une croix (†). Les TRFs précédemment observés dans les profils de *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013) sont indiqués par un signe plus (+) sur la dernière ligne. Les TRFs sont désignés par leur taille (en paires de bases) après binning. Les couleurs représentent l'intensité de fluorescence relative (en %) des TRFs d'après l'échelle de couleurs indiquée.

La représentation graphique des distances entre échantillons basées sur leur similarité de composition bactérienne en MDS nous permet également de confirmer l'impossibilité de différencier

statistiquement les échantillons apparemment sains de ceux nécrosés pour les deux enzymes de restriction (Figure 3). Il est possible que les colonies apparemment saines échantillonnées dans la population de gorgone atteinte de mortalité aient déjà subi des modifications de composition de leurs communautés bactériennes bien qu'aucun signe de nécrose des tissus ne soit visible, ou bien que le changement ait été en cours mais encore indétectable au moment du prélèvement. Cependant, ces hypothèses n'ont pas pu être vérifiées en raison de l'impossibilité d'effectuer un suivi d'échantillonnage régulier sur le terrain.

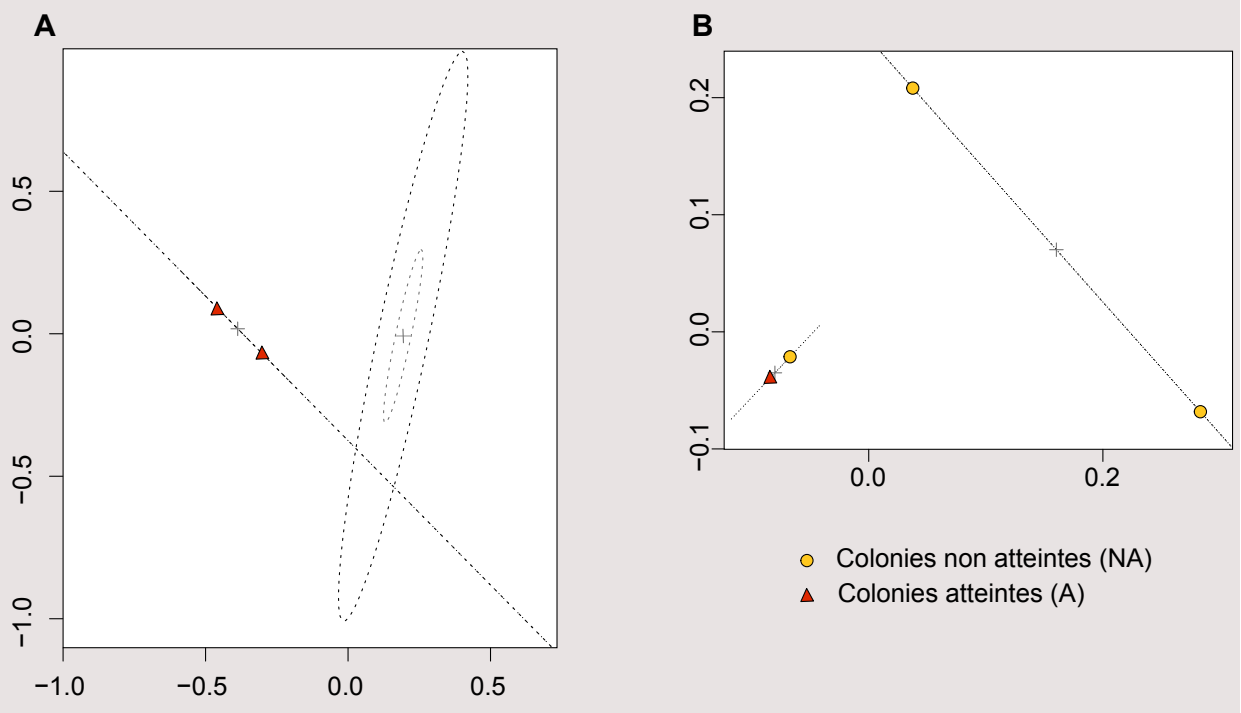


Figure 3 | Représentation graphique MDS des communautés bactériennes des échantillons issus du Cap Gros.
Les graphiques en nuage de points sont basés sur une matrice de similarité de Bray-Curtis des données T-RFLP générées après digestion par l'enzyme *Cfo*I (A) ou *Msp*I (B). Chaque point représente la communauté bactérienne d'un échantillon d'une colonie de *P. clavata* atteinte de nécroses (triangle) ou visiblement non-atteinte (rond). Les groupes d'échantillons sont indiqués par les ellipses de confiance en pointillés dont les coordonnées ont été déterminées par la méthode des k-means. Les ellipses contiennent 50 % (pointillés gris) ou 95 % (pointillés noirs) des points qui contribuent au groupe. Le centre des ellipses de confiance est identifié par une croix grise.

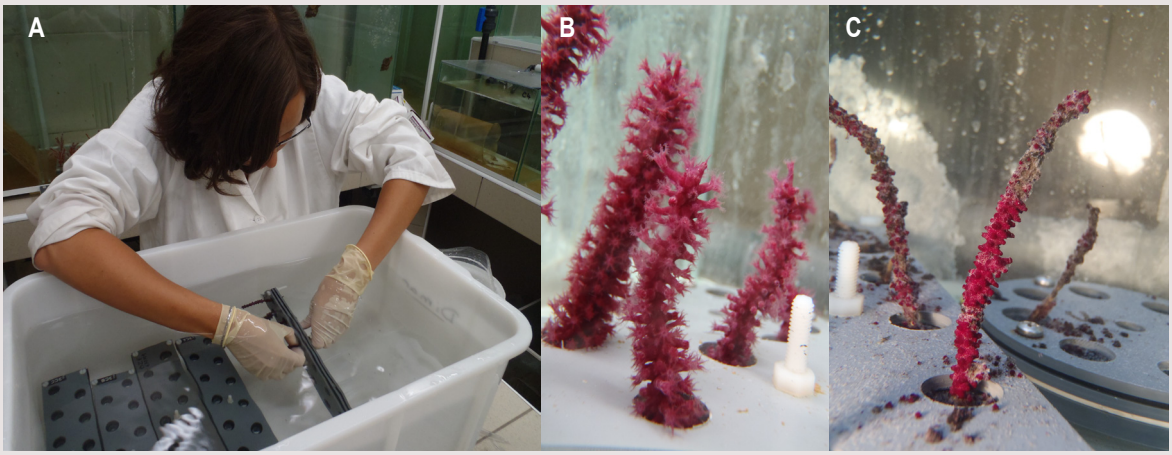
Bien que l'analyse par T-RFLP ne nous permette pas de comparer de manière quantitative les communautés bactériennes présentes dans les échantillons prélevés lors de la mortalité, et que très peu de TRFs soient détectés, elle nous a permis d'observer que le ribotype *Hahellaceae* est présent quel que soit l'état de santé apparent de la gorgone. Cela confirme l'existence d'une

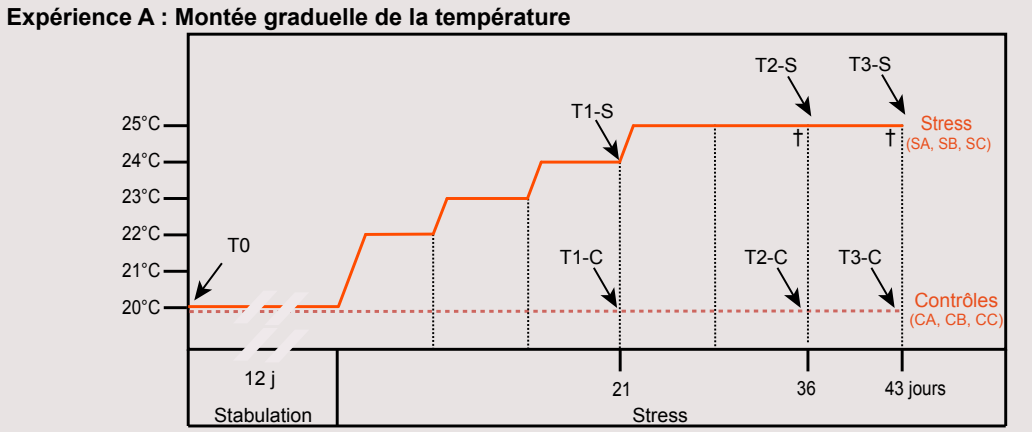
association stable entre *P. clavata* et cette bactérie, persistant dans des conditions où la survie de l'holobionte est compromise. Cependant la variation d'abondance de ce ribotype et l'apparition d'au moins un nouveau ribotype chez les colonies atteintes devraient être caractérisés à l'aide d'analyses moléculaires quantitatives afin de préciser si un remplacement d'espèces peut se produire au sein des communautés bactériennes d'un hôte en phase de maladie déclarée.

3. ÉTUDE DE LA RÉPONSE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES AU STRESS THERMIQUE EN CONDITIONS CONTRÔLÉES

3.1. Présentation des expérimentations

Deux expérimentations ont été réalisées en conditions contrôlées de température en eau de mer naturelle dans les installations de la Station Marine d'Endoume à Marseille. Des travaux antérieurs ont déterminé que les premiers symptômes de nécroses des tissus apparaissent après quelques jours d'exposition à une température de 25°C chez la gorgone rouge (Crisci, 2011). Dans les deux expérimentations qui suivent, cette température a été considérée comme le seuil critique de thermotolérance de cette espèce. Pour chaque expérimentation, des fragments apicaux de *P. clavata* ont été prélevés en plongée en scaphandre autonome à environ 20 mètres de profondeur sur le site de Riou (Marseille, France) selon le protocole d'échantillonnage décrit dans le Chapitre 2. De retour au laboratoire, les fragments ont été placés dans différents groupes d'aquariums (plusieurs aquariums en réplicats dans chaque groupe), en fonction des traitements infligés, en circuit d'eau de mer ouvert. Avant chaque protocole de stress, les fragments de gorgone ont subi une période de stabulation à la température enregistrée sur le terrain au moment du prélèvement, afin de minimiser les effets du stress dû à la manipulation et au transfert des échantillons en aquarium (Figure 4). Chaque protocole de montée en température de l'eau ainsi que les prélèvements effectués sont précisés dans la Figure 4 et les Tableaux 1 et 2. Après chaque prélèvement, les fragments ont été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.





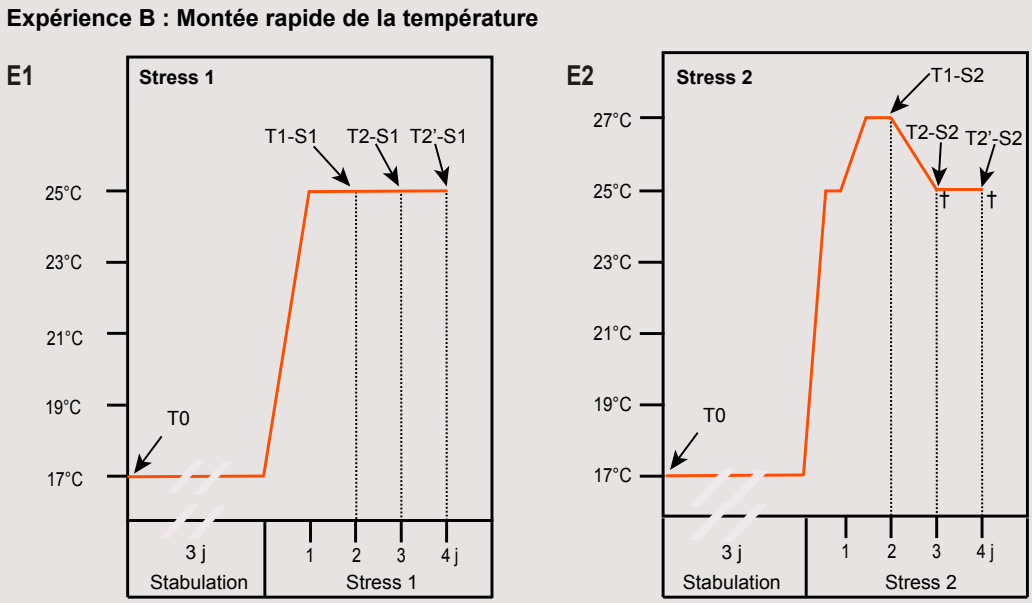


Figure 4 | Expérimentations de stress thermiques contrôlés en aquariums.
Photographie de la mise en place des fragments de gorgones rouges dans les portoirs utilisés dans les aquariums (A - © M. Bally) et photographies de fragments avant stress thermique (B) et en cours de nécrose après stress thermique (C) (© M. La Rivière).
Protocoles de montée en température appliqués dans les 2 expériences de stress thermique : l'expérience de montée graduelle de la température (D) et l'expérience de montée rapide de la température avec les deux types de stress appliqués (E1 et E2). Les prélèvements sont figurés par des flèches noires. L'apparition des premiers symptômes de nécroses est indiquée par une croix (†).

3.2. Expérience A : Etude de la réponse à une augmentation graduelle de la température

3.2.1. Matériels et méthodes

Pour cette expérience, vingt-deux fragments issus de colonies de gorgone rouge différentes ont été prélevés en septembre 2009. De retour au laboratoire, 4 fragments ont été immédiatement congelés sans passage en aquarium (prélèvement T0). Les autres échantillons ont été répartis dans deux groupes de trois aquariums, à raison de 3 fragments par aquarium (aquariums contrôle CA, CB et CC ; aquariums stress SA, SB et SC). Après une stabulation de 12 jours à 20°C, les fragments de gorgone rouge ont été soumis à un stress thermique par augmentation graduelle de la température selon un pas hebdomadaire jusqu'au seuil de 25°C (Figure 4D). Un fragment issu de chaque aquarium (trois par condition de traitement) a été prélevé à différentes dates (Figure 4D, Tableau 1) :

- T1, après 21 jours de stress (33 jours en aquarium), T°=24°C,
- T2, après 36 jours de stress (48 jours en aquarium), T°=25°C,
- T3, après 43 jours de stress (55 jours en aquarium), T°=25°C.

Les communautés bactériennes de chaque prélèvement de colonies stressées ont ensuite été analysées par T-RFLP (enzyme de restriction : *Cfo*I ; limites de taille : 80 à 600 pb ; seuil : 2 % de l'intensité de fluorescence totale ; binning : WS 1, Sh 0.5) puis comparées aux colonies contrôles n'ayant subi aucun stress thermique et prélevées en même temps.

Tableau 1 | Récapitulatif des prélèvements effectués lors de l'expérience de stress thermique A.

Prélèvement	Echantillons	Contrôle/ Stress	Température	Nombre de jours de stress (après 12 jours de stabulation)
T0	1, 2, 3, 4	-	-	-
T1	CA, CB, CC	contrôle	20°C	21 jours
T1	SA, SB, SC	stress	24°C	21 jours
T2	CA, CB, CC	contrôle	20°C	36 jours
T2	SA†, SB†, SC	stress	25°C	36 jours
T3	CA, CB, CC	contrôle	20°C	43 jours
T3	SA, SB†, SC	stress	25°C	43 jours

† Echantillons présentant des symptômes de nécroses au moment du prélèvement

3.2.2. Résultats et interprétation

La diversité de pics observée pour l'ensemble des colonies (stress/contrôles) était assez faible en moyenne (4,9 ± 1,7 TRFs) (Figure 5A). Le TRF précédemment identifié comme celui du ribotype *Hahellaceae* majoritaire des communautés naturelles associées à *P. clavata* (TRF-171) a été observé dans tous les échantillons, qu'ils soient issus des traitements contrôle ou stress (Figure 5A). Cependant, ce TRF n'était pas majoritaire dans les communautés de quatre échantillons issus du contrôle (T2-CB et CC) et du traitement de stress thermique (T2-SB et T3-SA). Le fait que ce ribotype ne soit pas dominant dans certains échantillons est plus vraisemblablement dû à une variabilité interindividuelle initiale qu'à un réel changement de composition des communautés au cours de l'expérience car la faible abondance de ce ribotype n'a pas été observée dans tous les échantillons du même prélèvement. Il est intéressant de noter que tous les échantillons issus du prélèvement T2 (après 36 jours de traitement) présentaient également le TRF correspondant au ribotype *Paenibacellaceae* (TRF-193) observé lors du shift transitoire des communautés bactériennes de la gorgone décrit dans le Chapitre 2. Ce TRF était même dominant dans trois de ces échantillons. L'observation du TRF-193 dans des échantillons issus du contrôle et du traitement stress écarte la possibilité d'un effet du stress thermique causant l'apparition de ce ribotype (Figure 5A).

Aucun groupement particulier des échantillons lié au type de traitement ou au temps de prélèvement n'a pu être observé statistiquement par MDS (Figure 5B). Il est intéressant de noter qu'aucun groupement particulier différenciant les communautés bactériennes des échantillons prélevés à T0, avant toute manipulation, de celles des échantillons ayant séjourné en aquarium n'a pu être observé (Figure 5B). Nous pouvons ainsi conclure que les communautés bactériennes analysées n'ont pas subi "d'effet aquarium", défini comme une modification de leur structure due à la manipulation et au séjour des échantillons en aquariums.

Enfin, aucun changement de composition des communautés bactériennes ne semble associé à l'apparition de symptômes de nécrose des tissus (échantillons T2-SA, T2-SB, T3-SB), et aucun pic correspondant à la souche du pathogène *Vibrio coralliilyticus* isolée chez *P. clavata* (Bally et Garrabou, 2007) n'a pu être détecté.

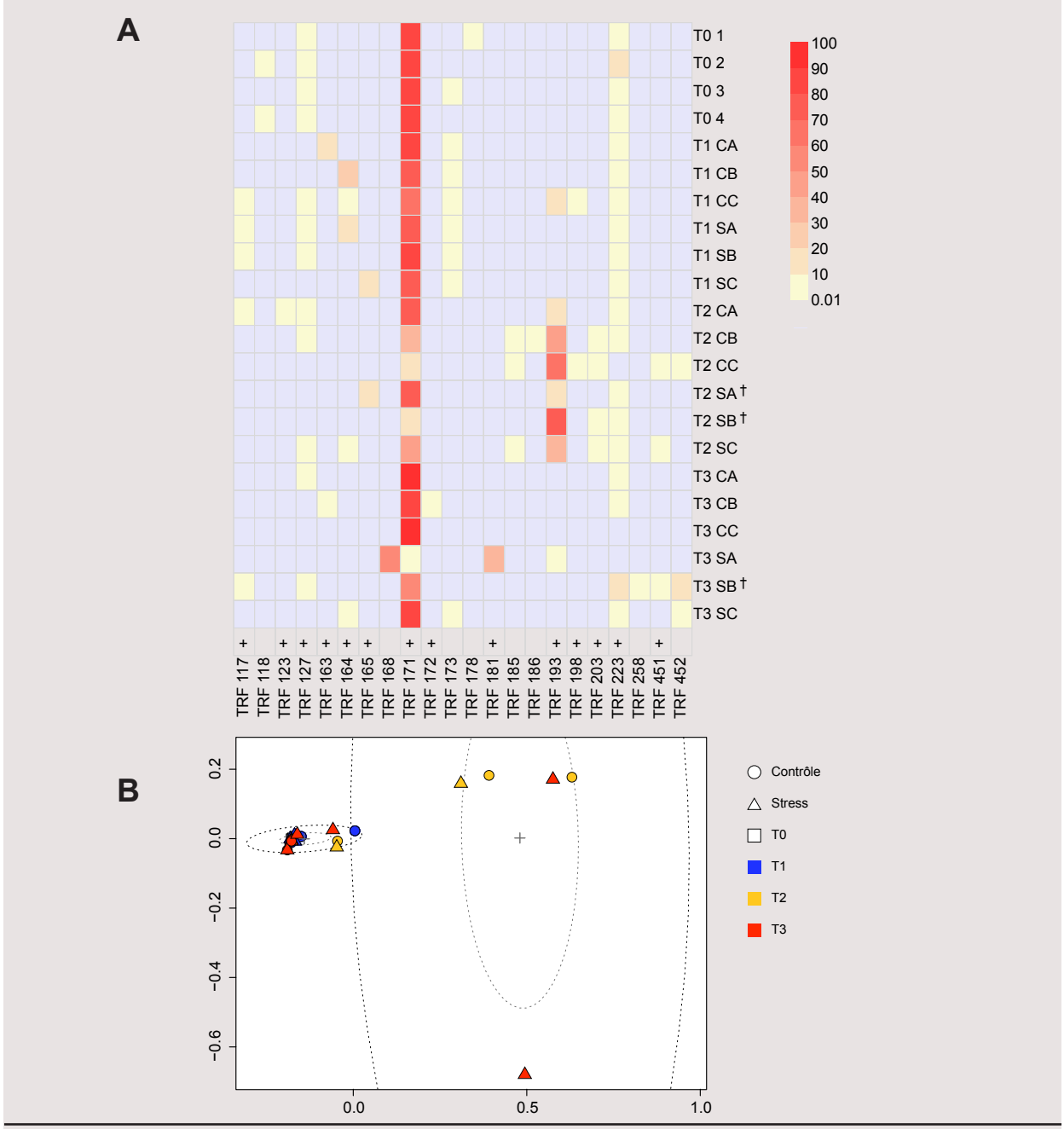


Figure 5 | Représentations graphiques des abondances relatives des TRFs et des distances entre les communautés bactériennes des échantillons issus de l'expérience de stress thermique A.
A : Abondances relatives des TRFs pour chaque profil T-RFLP généré par la digestion par *Cfo*I des communautés bactériennes associées aux échantillons de *P. clavata* issus de l'expérience de stress thermique A. Les échantillons issus de fragments de gorgone qui présentaient des nécroses des tissus sont indiqués par une croix (†). Les TRFs précédemment observés dans les profils de *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013) sont indiqués par un signe plus (+) sur la dernière ligne. Les TRFs sont désignés par leur taille (en paires de bases) après binning. L'intensité de fluorescence relative (en %) des TRFs est représentée d'après l'échelle de couleurs indiquée à droite.
B : Graphique en nuage de points MDS basé sur une matrice de similarité de Bray-Curtis des données T-RFLP générées après digestion par l'enzyme *Cfo*I. Chaque point représente la communauté bactérienne d'un échantillon de *P. clavata* avant traitement (carré), après le traitement contrôle (rond) ou le traitement stress (triangle). Les différents temps de prélèvements sont figurés par des couleurs. Les groupes d'échantillons sont indiqués par les ellipses de confiance en pointillés dont les coordonnées ont été déterminées par la méthode des k-means. Les ellipses contiennent 50 % (points gris) ou 95 % (points noirs) des points qui contribuent au groupe. Le centre des ellipses de confiance est identifié par une croix grise.

3.3. Expérience B : Etude de la réponse à une augmentation rapide de la température

3.3.1. Matériels et méthodes

Afin de limiter la variabilité interindividuelle, trois colonies de gorgone rouge ont été échantillonnées de manière clonale (10 fragments par colonie) en juin 2011. De retour au laboratoire, deux fragments de chaque colonie ont été congelés immédiatement (T0). Pour chaque colonie, les réplicats clonaux ont été analysés en parallèle pour chacune des conditions afin de déterminer la part de variabilité de réponse intra-individuelle. Les échantillons clonaux ont ainsi été répartis dans deux aquariums à raison de 12 fragments dans chaque bac (4 fragments de chaque colonie). Cette expérimentation devant servir d'approche préliminaire pour observer une éventuelle déstabilisation des assemblages bactériens par un stress thermique drastique, et face à l'apparente stabilité des communautés bactériennes observée dans l'expérience précédente, aucun aquarium contrôle à température constante n'a été utilisé. Après une stabulation de 3 jours en aquarium à la température enregistrée sur le terrain au moment des prélèvements (17°C), les deux aquariums ont été soumis à deux variantes du protocole d'élévation de la température : une montée rapide de la température (en 1 jour) au seuil de 25°C, suivie d'un maintien au seuil (stress 1, Figure 4-E1), ou une montée à 25°C en 1 jour, suivie d'un bref passage à 27°C (montée rapide et maintien 1 jour) puis un retour à 25°C en 1 jour et maintien à ce seuil (stress 2, Figure 4-E2). Chaque prélèvement a été effectué de manière synchrone entre les deux traitements. Les premiers symptômes de nécroses ont été observés dès le troisième jour de stress sur les fragments ayant été soumis à une température de 27°C (stress 2). Dès l'apparition de nécroses sur une colonie, l'ensemble des échantillons clonaux provenant de cette même colonie a été prélevé pour les deux aquariums correspondant aux deux types de stress afin d'analyser en parallèle les communautés bactériennes d'un échantillon présentant des nécroses et d'un échantillon apparemment sain ayant subi la même durée de traitement et provenant du même individu initial. Les prélèvements ont été effectués (Tableau 2) :

- après 2 jours de stress -prélèvements T1-S1 (stress 1 ; 2 jours à 25°C) et T1-S2 (stress 2 ; 1 jour à 25°C, 1 jour à 27°C)- pour les trois colonies A, B et C (2 fragments par colonie par traitement),

- après 3 jours de stress -prélèvements T2-S1 et T2-S2- pour les colonies A et B présentant des premiers symptômes de nécrose (2 fragments par colonie par traitement),
- après 4 jours de stress –prélèvements T2'-S1 et T2'-S2- pour la colonie C présentant à son tour des symptômes de nécrose (2 fragments par traitement).

Tableau 2 | Récapitulatif des prélèvements effectués lors de l'expérience de stress thermique B

Prélèvement	Type de stress thermique	Nombre de jours de stress (après 3 jours de stabulation)	Colonie	Fragment clonal	Nom de l'échantillon
T0	-	-	A	1	**T0-A1**
				2	**T0-A2**
			B	1	T0-B1
				2	T0-B2
			C	1	**T0-C1**
				2	**T0-C2**
T1	Stress 1-25°C	2 jours	A	3	**T1-S1-A3**
				4	**T1-S1-A4**
			B	3	T1-S1-B3
				4	T1-S1-B4
			C	3	**T1-S1-C3**
				4	**T1-S1-C4**
T1	Stress 2-27°C	2 jours	A	5	**T1-S2-A5**
				6	**T1-S2-A6**
			B	5	T1-S2-B5
				6	T1-S2-B6
			C	5	**T1-S2-C5**
				6	**T1-S2-C6**
T2	Stress 1-25°C	3 jours	A	7	T2-S1-A7
				8	T2-S1-A8
			B	7	T2-S1-B7
				8	T2-S1-B8
T2	Stress 2-27°C	3 jours	A	9	**T2-S2-A9†**
				10	**T2-S2-A10†**
			B	9	T2-S2-B9†
				10	T2-S2-B10†
T2'	Stress 1-25°C	4 jours	C	7	T3-S1-C7
				8	T3-S1-C8
T2'	Stress 2-27°C	4 jours	C	9	**T3-S2-C9†**
				10	**T3-S2-C10†**

En gras : échantillons analysés en T-RFLP (signaux suffisants après amplification par PCR)

† Echantillons présentant des symptômes de nécroses au moment du prélèvement (ensemble des échantillons clonaux prélevé en même temps)

Les communautés bactériennes de chaque prélèvement ont ensuite été analysées par T-RFLP (enzymes de restriction : *Cfo*I et *Msp*I ; limites de taille : 80 à 600 pb ; seuil : 3 % de l'intensité de fluorescence totale ; binning : WS 1, Sh 0.5) et des comparaisons entre les communautés bactériennes initiales et celles présentes à l'issue des deux type de stress ont été réalisées.

3.3.2. Résultats et interprétation

L'objectif initial de cette expérimentation était d'évaluer la différence de réponse des communautés bactériennes associées à des fragments de gorgone rouge soumis à un stress thermique au seuil de 25°C précédemment décrit comme le seuil de thermotolérance de *P. clavata* (Crisci, 2011) (stress 1) ou à un stress thermique supérieur à ce seuil (stress 2). Malheureusement, l'amplification par PCR des communautés bactériennes associées aux fragments des colonies A et C prélevés à T0, T1-S1, T1-S2, T2-S2 et T2'-S2 seulement a donné des signaux sur gel suffisants pour l'analyse en T-RFLP (Tableau 2). Les échantillons prélevés à T2-S1 et T2'-S1 (prélèvement des fragments soumis au stress 1 synchrone avec le prélèvement des fragments soumis au stress 2 et présentant des nécroses) n'ont malheureusement pas pu être analysés, faute d'amplification par PCR suffisante. Néanmoins, nous avons pu analyser les communautés bactériennes des échantillons soumis au stress 2, le plus drastique, pour l'ensemble des prélèvements des deux colonies A et C.

De manière générale, la diversité de pics observée pour l'ensemble des profils était faible (en moyenne 3,3±1,8 TRFs et 2,7±1,3 TRFs pour les enzymes *Cfo*I et *Msp*I respectivement) (Figure 6). Une nette différence de composition des communautés bactériennes associées aux échantillons issus de fragments présentant des nécroses a pu être observée par les deux enzymes de restriction utilisées. En effet, la représentation par MDS illustre que tous les échantillons prélevés à T0 et T1, avant l'apparition de nécroses, présentaient des communautés bactériennes très similaires entre elles, qui se distinguent des communautés des échantillons présentant des nécroses (prélèvements T2 et T2') (Figure 7). Alors que tous les profils des échantillons issus du prélèvement du début de l'expérimentation (T0) ou du prélèvement intermédiaire (T1) étaient dominés par les TRFs correspondant au ribotype *Hahellaceae* majoritaire des communautés naturelles de *P. clavata* (TRF-171 par *Cfo*I et TRF-105 par *Msp*I), les communautés des échantillons issus de fragments nécrosés présentaient une composition différente (Figures 6 et 7). Le ribotype *Hahellaceae* n'était pas majoritaire –voire même absent- de ces échantillons, et de nouveaux ribotypes dominaient

les communautés (TRF-335 et TRF-344 par *Cfo*I, TRF-465 par *Msp*I) (Figure 6). Ces ribotypes n'avaient jamais été observés chez *P. clavata*, ni dans l'expérience précédente, ni dans les communautés naturellement associées à la gorgone décrites dans le Chapitre 2. Un tel changement de composition, caractérisé par un changement de dominance de la communauté du ribotype *Hahellaceae* vers d'autres ribotypes, n'avait jamais été observé sauf dans les communautés naturellement associées aux échantillons d'été 2007 décrites dans le Chapitre 2. Cependant, ce changement drastique de composition ne conduit pas au même changement de diversité bactérienne car le TRF correspondant au ribotype *Paenibacellaceae* (TRF-193 après digestion par *Cfo*I -La Rivière *et al.*, 2013), dominant dans les assemblages bactériens en été 2007, n'a été observé que dans un seul échantillon à T0 (T0-A1), et était absent du deuxième échantillon clonal de la même colonie (T0-A2) prélevé au même moment (Figure 6A). Contrairement à l'analyse par *Cfo*I, le TRF *Paenibacillaceae* n'a pas été détecté dans l'analyse par *Msp*I. Ce ribotype était vraisemblablement présent dans la communauté mais son intensité de fluorescence trop faible pour être visible par analyse T-RFLP selon les paramètres de détection utilisés. Comme dans l'expérience précédente, aucun pic correspondant à la souche du pathogène *Vibrio coralliilyticus* n'a pu être détecté dans aucun des échantillons, quelle que soit l'enzyme de restriction utilisée. Enfin, les communautés microbiennes n'ont pas subi "d'effet aquarium" durant l'expérience car les assemblages présents avant toute manipulation (T0) sont similaires à ceux prélevés après 3 jours de stabulation et 2 jours de stress en aquariums (T1) (Figure 7). Nous ne sommes pas en mesure d'affirmer avec certitude si le changement de composition de la communauté bactérienne observé est impliqué dans l'apparition des nécroses ou si, au contraire, c'est une conséquence de la dégradation d'une portion des tissus de la gorgone et d'une colonisation par des bactéries opportunistes qui induirait une changement de la communauté bactérienne globale de toute la colonie. Il serait intéressant d'identifier taxonomiquement les ribotypes correspondant aux nouveaux TRFs associés aux échantillons nécrosés afin de mieux appréhender leur éventuel rôle dans les nécroses en fonction des données disponibles dans la littérature. Cette expérience aura permis de montrer qu'une déstabilisation des assemblages bactériens de *P. clavata* est possible dans des conditions de stress sévères (température supérieure au seuil de tolérance de l'organisme) et qu'une modification concomitante de l'abondance relative du ribotype *Hahellaceae* peut se produire, alors qu'une forte persistance de son association avait pu être mise en évidence dans l'expérience A.

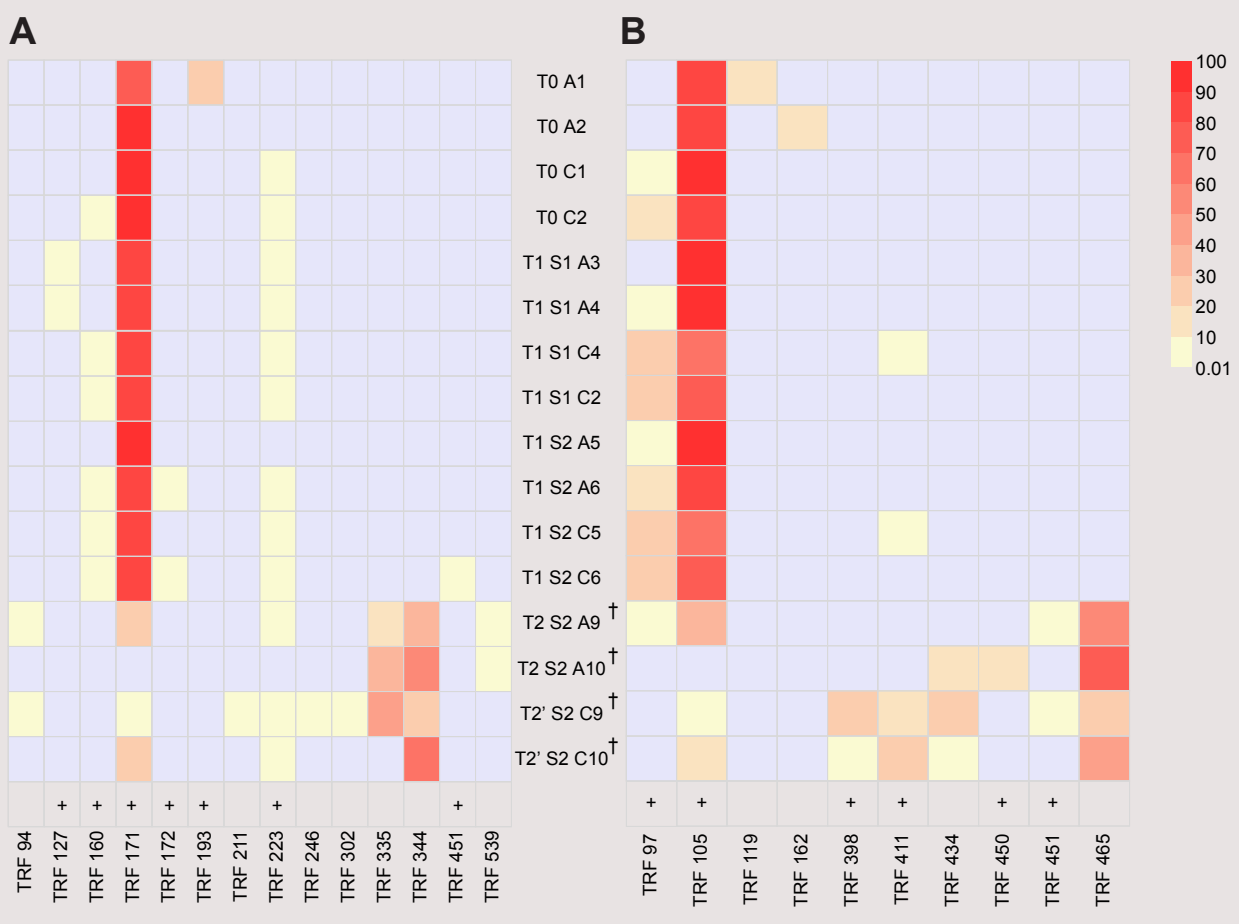


Figure 6 | Abondances relatives des TRFs dans les échantillons issus de l'expérience de stress thermique B.

Les lignes représentent les profils T-RFLP de la communauté bactérienne associée aux échantillons de *P. clavata* issus de l'expérience B générés par la digestion par *Cfo*I (A) ou *Msp*I (B). Les échantillons de gorgones qui présentaient des nécroses des tissus sont indiqués par une croix (†). Les TRFs précédemment observés dans les profils de *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013) sont indiqués par un signe plus (+) sur la dernière ligne. Les TRFs sont désignés par leur taille (en paires de bases) après binning. Les couleurs représentent l'intensité de fluorescence relative (en %) des TRFs d'après l'échelle à droite.

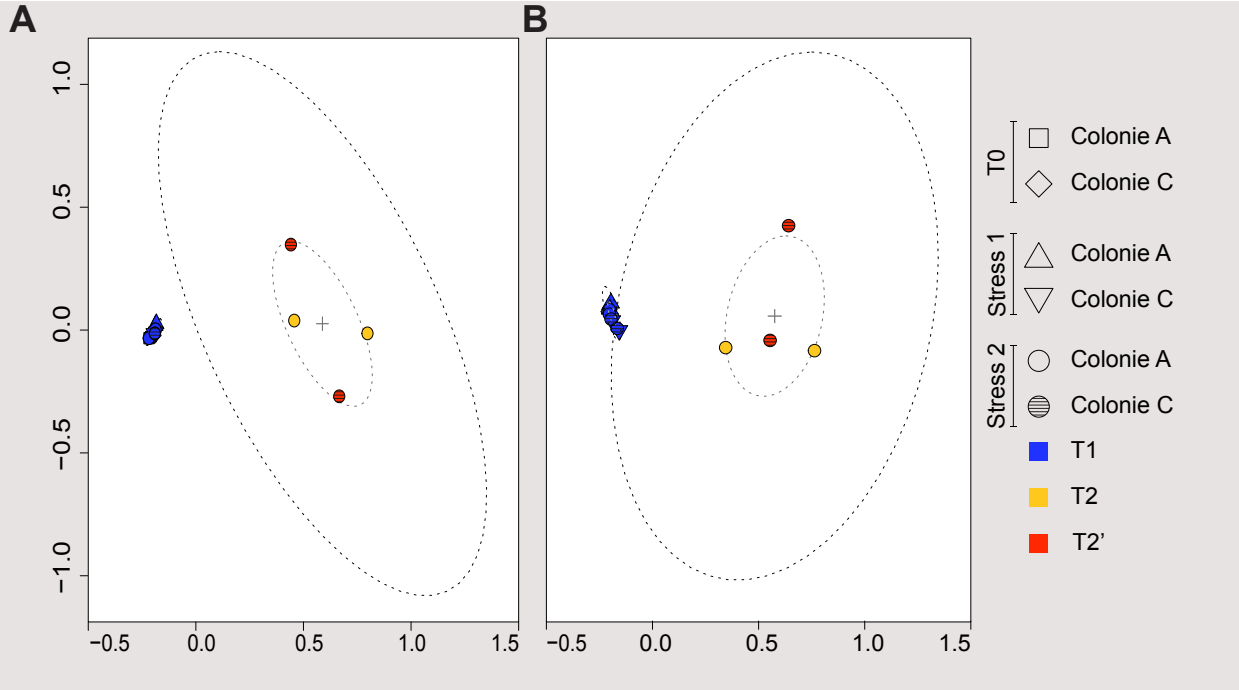


Figure 7 | Représentation graphique MDS des communautés bactériennes des échantillons issus de l'expérience de stress thermique B.
Les graphiques en nuage de points sont basés sur une matrice de similarité de Bray-Curtis des données T-RFLP générées après digestion par l'enzyme *Cfo*I (A) ou *Msp*I (B). Chaque point représente la communauté bactérienne d'un échantillon de *P. clavata* n'ayant subi aucun traitement (carré, losange), ayant subi le protocole de stress 1 (triangles) ou le protocole de stress 2 (ronds). Les différents temps de prélèvements sont figurés par des couleurs. Les groupes d'échantillons sont indiqués par les ellipses de confiance en pointillés dont les coordonnées ont été déterminées par la méthode des k-means. Les ellipses contiennent 50 % (points gris) ou 95 % (points noirs) des points qui contribuent au groupe. Le centre des ellipses de confiance est identifié par une croix grise.

4. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA DÉSTABILISATION DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES PAR TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE

Deux expérimentations ont été réalisées pour tenter de déstabiliser les communautés associées à la gorgone rouge par traitement antibiotique et en observer la résilience. Ces expériences sont inspirées de deux études basées sur l'exposition des communautés bactériennes à un traitement antibiotique menées sur des coraux tropicaux. La première a permis d'observer la modification de sensibilité de l'holobionte à un stress thermique en cas d'élimination des bactéries associées et a montré qu'une perturbation artificielle du consortium bactérien diminue les capacités de résistance et de résilience de l'hôte (Gilbert *et al.*, 2012). La deuxième étude a cherché à observer la résilience d'une communauté bactérienne en milieu naturel après modification en aquarium par des antibiotiques (Sweet *et al.*, 2011a). Les expériences de traitement antibiotique sur la gorgone rouge ont été réalisées dans des aquariums en circuit fermé de la Station Marine d'Endoume (Marseille) en eau de mer stérile et filtrée à 0,2 µm, avec du matériel stérilisé par autoclave ou par nettoyage minutieux à l'alcool absolu.

4.1. Expérience de traitement antibiotique utilisant la ciprofloxacine

4.1.1. Matériels et méthodes

Trois colonies de *P. clavata* ont été échantillonnées fin août 2012 de manière clonale (7 fragments apicaux par colonie) sur le site de Riou (Marseille) en scaphandre autonome à environ 20 m de profondeur. De retour au laboratoire, un fragment de chaque colonie a été lavé en eau de mer stérile et filtrée à 0,2 µm puis congelé à -80°C, pour être utilisé comme contrôle avant toute manipulation (prélèvement T0). Les autres échantillons ont ensuite été répartis sur des

portoirs placés dans des aquariums contenant 3 l d'eau de mer stérile et filtrée, avec un système de pompe à air stérile permettant de garantir un courant et une aération du milieu suffisante (Figure 8). Ils y ont été laissés en stabulation pendant 3 jours à 16°C, température enregistrée sur le terrain au moment des prélèvements, pour permettre leur acclimatation. Un autre fragment de chaque colonie a été prélevé puis congelé à -80°C à l'issue de la période d'acclimatation pour permettre la détection d'un éventuel changement de communauté bactérienne lié à la stabulation des échantillons en eau de mer stérile (prélèvement T1).

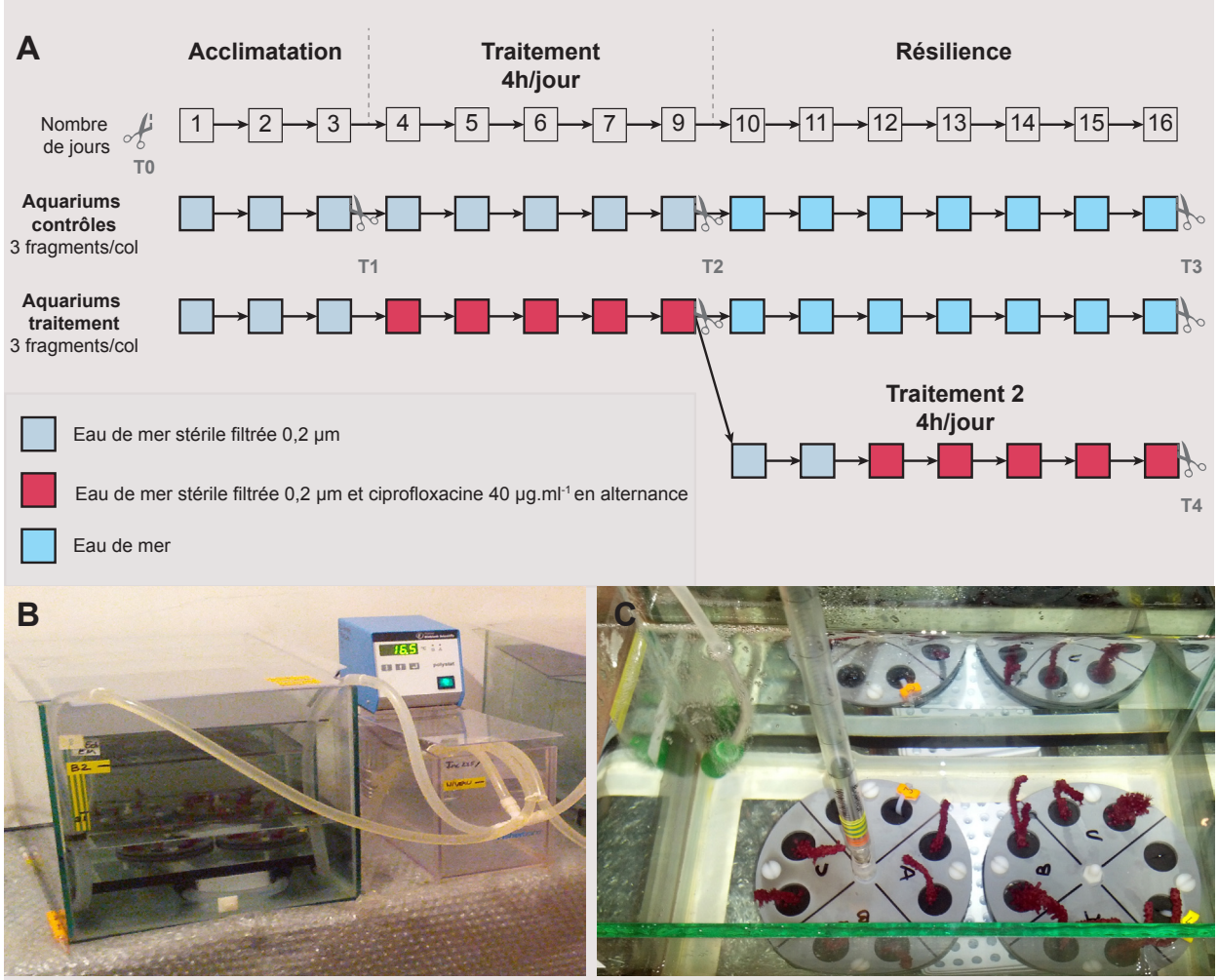


Figure 8 | Expérience de traitement antibiotique à la ciprofloxacine.
Schéma expérimental de l'expérience. A : Chaque jour d'expérience est représenté par un carré dont la couleur indique la composition de l'eau des aquariums. Les différents prélèvements effectués sont figurés par des ciseaux.
B et C : Photographies du montage expérimental en conditions stériles (© M. Roumagnac).

Les fragments soumis au traitement antibiotique (3 fragments par colonie) ont été placés 4 h par jour pendant 5 jours dans un aquarium de traitement contenant de la ciprofloxacine à 40 µg.ml^{-1}. Cette concentration est suffisante pour affecter une large proportion de la diversité

bactérienne (Forrest *et al.*, 1993; Sweet *et al.*, 2011a). La ciprofloxacine est un antibiotique bactéricide à large spectre appartenant au groupe des fluoroquinolones. Son mode d'action consiste au blocage de la réplication de l'ADN bactérien en se couplant à l'enzyme ADN gyrase. Il inhibe alors le déroulement de l'ADN chromosomique bactérien pendant et après la réplication, et donc la multiplication cellulaire des bactéries. Cet antibiotique devrait donc cibler un grand nombre de bactéries associées à la gorgone et ne devrait pas avoir d'effet toxique pour l'hôte. Entre les périodes de traitement, les échantillons ont été maintenus dans un aquarium en eau de mer stérile filtrée et aérée par pompe stérile.

Deux aquariums contenant uniquement de l'eau de mer stérile filtrée ont été utilisés pour les échantillons contrôles. Ces contrôles ont été transférés de l'un à l'autre de ces 2 aquariums en même temps que les échantillons soumis au traitement antibiotique pour vérifier que la manipulation des fragments n'induisait pas de changement de communauté bactérienne.

L'eau de chaque aquarium a été renouvelée après stabulation des échantillons, puis 2 fois durant les 5 jours de traitement. Après 5 jours, un fragment de chaque colonie soumise aux traitements antibiotique et contrôle a été prélevé puis congelé à -80°C (prélèvement T2). Un fragment de chaque colonie issu de chaque traitement a ensuite été transféré dans un aquarium d'eau de mer en circuit ouvert pendant 7 jours afin d'observer la résilience des communautés bactériennes (prélèvement T3). En parallèle, le dernier échantillon du traitement antibiotique a été placé en eau de mer stérile filtrée pendant 2 jours puis soumis à un nouveau cycle de 5 jours de traitement antibiotique. A l'issue de ce traitement, chaque fragment a été prélevé puis congelé à -80°C (prélèvement T4) (voir schéma expérimental, Figure 8).

Aucun changement de couleur ou symptôme de nécrose des tissus de gorgone n'a été observé durant l'expérience. Les polypes étaient rétractés durant les traitements antibiotiques et étaient déployés en eau de mer stérile pure. Les ADN des échantillons prélevés au cours de l'expérience ont été extraits puis les ADN bactériens ribosomiques 16S amplifiés par PCR avec les amorces 63F/786R-Eub selon le protocole décrit dans le Chapitre 2 (La Rivière *et al.*, 2013). Les produits PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1 % en TAE afin de rechercher une diminution ou une absence de signal en réponse au traitement antibiotique.

4.1.2. Résultats et interprétation

Aucune variation d'intensité des signaux PCR flagrante n'a pu être corrélée au traitement antibiotique. Seule une diminution d'intensité dans les échantillons prélevés à T2 en comparaison aux échantillons T1 a pu être observée (Figure 9). Cependant, cette diminution était plus vraisemblablement due à un rendement d'extraction et/ou d'amplification ADN plus faible, car l'intensité du signal diminuait de manière similaire entre les échantillons traités et les échantillons contrôles. De même, les échantillons T3 incubés en eau de mer non stérile pour analyser une potentielle résilience des communautés bactériennes présentaient une intensité de signal comparable aux échantillons ayant subi un deuxième traitement antibiotique (prélèvement T4) (Figure 9).

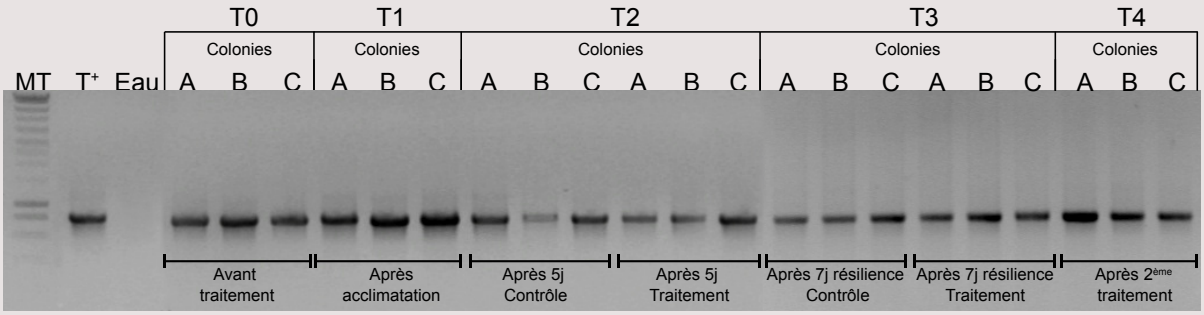


Figure 9 | Analyse PCR des ADNr 16S des communautés bactériennes traitées à la ciprofloxacine. Gel d'agarose de visualisation des ADN ribosomiques 16S bactériens amplifiés par PCR pour les fragments de gorgone (3 colonies A, B et C) échantillonnés avant traitement (T0), après acclimatation (T1), après 5 jours de traitement avec sous sans ajout d'antibiotique (T2), après 7 jours de résilience en eau de mer (T3) et après un deuxième traitement antibiotique (T4). T^+ : témoin positif (ADN contrôle), Eau : témoin négatif (sans ADN), MT : marqueur de taille.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence d'effet clair sur le signal ADNr 16S amplifié : (i) les bactéries présentes sont résistantes à la ciprofloxacine ou la durée du traitement et/ou la concentration d'antibiotique utilisées ne sont pas suffisantes pour atteindre les bactéries ; (ii) les bactéries ont été affectées efficacement par le traitement antibiotique mais leurs ADN restent en concentration suffisamment importante pour être amplifiés par PCR et visualisables sur gel ; (iii) l'effet du traitement antibiotique sur la modification de la communauté bactérienne est trop faible pour pouvoir être détecté par PCR non quantitative.

Afin de tenter de déstabiliser les communautés bactériennes associées de manière plus brutale et potentiellement mieuxt visualisable par PCR, une deuxième expérience de traitement antibiotique a été mise en place avec d'autres molécules ainsi que des concentrations d'antibiotiques et durées d'incubation différentes.

4.2. Expérience de traitement par un mélange d'antibiotiques (ampicilline, streptomycine, tétracycline)

4.2.1. Matériels et méthodes

Trois colonies de *P. clavata* ont été échantillonnées de manière clonale (6 fragments apicaux de 6 cm de long par colonie ; colonies A, B et C) en octobre 2012 au site de Riou (Marseille) en scaphandre autonome à une profondeur d'environ 20 m. De retour au laboratoire, un fragment de chaque colonie a été lavé en eau de mer stérile filtrée à 0,2 µm puis congelé à -80°C, pour être utilisé comme contrôle avant toute manipulation (échantillons T0). Les autres échantillons ont ensuite été répartis sur des portoirs (1 fragment de chaque colonie par portoir) placés dans 5 aquariums contenant 3 l d'eau de mer stérile filtrée à 0,2 µm et aérée par une pompe stérilisée, et laissés ainsi 3 jours sans traitement pour permettre leur acclimatation (voir schéma expérimental, Figure 10). La température de l'eau a été maintenue à 16°C durant toute la durée de l'expérimentation. Le premier aquarium n'a contenu que de l'eau de mer stérile filtrée durant toute l'expérience et les échantillons correspondants ont été utilisés comme contrôles (échantillons T-). L'eau de mer de deux aquariums a été additionnée d'un mélange contenant les antibiotiques ampicilline, streptomycine et tétracycline. L'ampicilline est un antibiotique à large spectre, capable d'inhiber l'enzyme transpeptidase requise lors de la dernière étape de la synthèse de la paroi cellulaire et conduisant à la lyse bactérienne. La streptomycine est également un antibiotique à large spectre dont le mode d'action consiste en l'inhibition de la synthèse protéique bactérienne par fixation sur l'ARN 16S de la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien, ce qui conduit à la production de protéines non fonctionnelles et à la mort des bactéries. La tétracycline est aussi un antibiotique à large spectre qui agit également comme inhibiteur de la synthèse protéique. La molécule se fixe sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien et inhibe la fixation de l'aminoacyl-ARNt au site A du ribosome, ce qui empêche l'addition de nouveaux acides aminés à la chaîne peptidique en cours de synthèse.

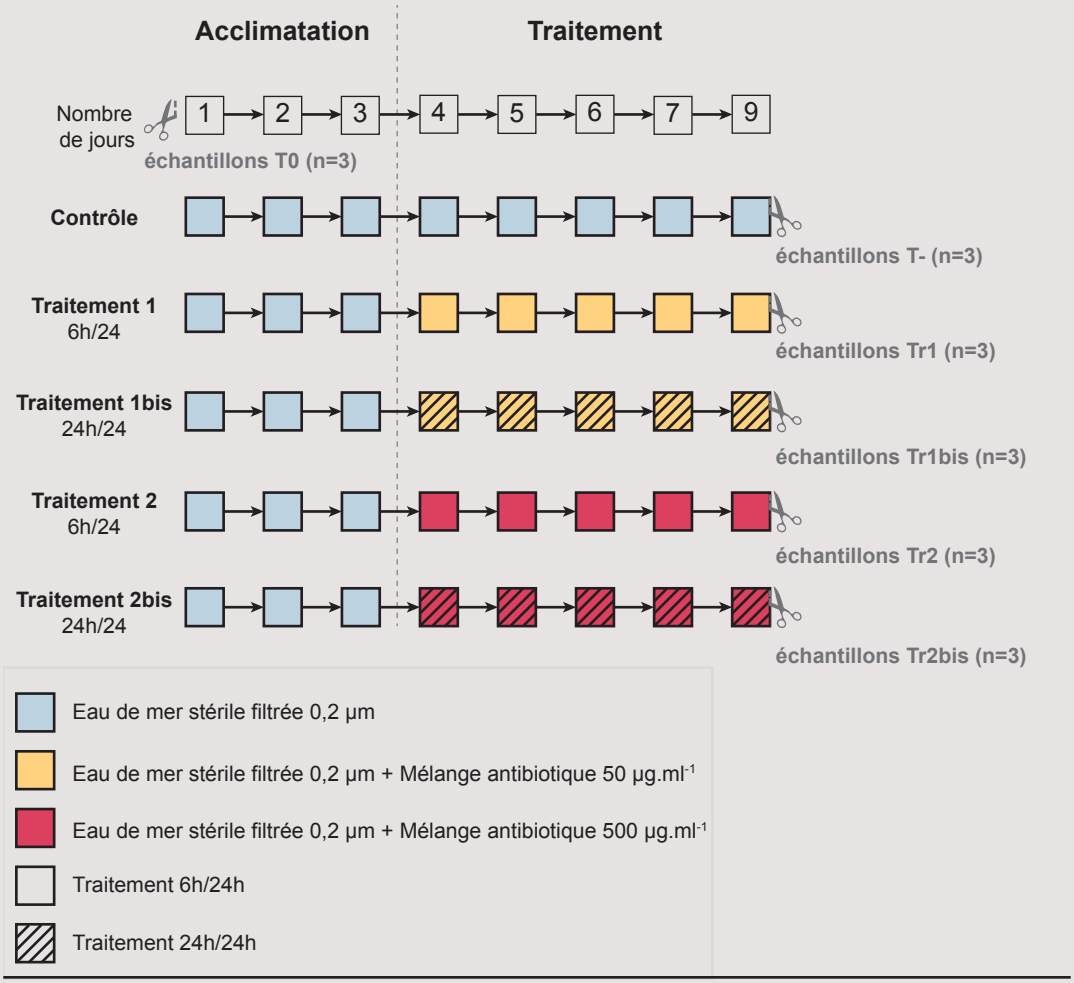


Figure 10 | Expérience de traitement par un mélange de trois antibiotiques. Chaque jour d'expérience est représenté par un carré dont la couleur indique la composition de l'eau des aquariums et la durée d'incubation avec les antibiotiques. Les différents prélèvements effectués sont figurés par des ciseaux.

Deux traitements combinant les trois antibiotiques à des concentrations différentes ont été réalisés : Traitement 1, antibiotiques en concentration finale de 50 µg.ml^{-1} chacun et Traitement 2, antibiotiques en concentration finale de 500 µg.ml^{-1} chacun. Pour chaque concentration d'antibiotique, les échantillons d'un aquarium ont été soumis à un traitement de 6 h par jour pendant 5 jours et étaient replacés en eau de mer stérile filtrée le reste du temps (échantillons Tr1 et Tr2 pour les concentrations d'antibiotiques 50 µg.ml^{-1} et 500 µg.ml^{-1} respectivement), tandis que les échantillons de l'autre aquarium ont été soumis au traitement antibiotique sans interruption durant les 5 jours d'expérimentation (échantillons Tr1bis et Tr2bis). Aucun changement de couleur ou apparition de symptôme de nécrose des tissus de gorgone n'a pu être observé durant l'expérience, cependant les polypes étaient rétractés durant les traitements antibiotiques et étaient déployés en eau de mer stérile pure. Les échantillons de chaque condition expérimentale (1 contrôle

et 4 traitements antibiotiques) ont été prélevés à l'issue des 5 jours d'expérimentation, coupés en fragments de 2 cm de long, puis congelés à -80°C jusqu'à extraction des ADN.

Un fragment de 2 cm de chaque échantillon a été lavé dans 3 bains successifs d'eau de mer stérile filtrée, puis les tissus ont été grattés à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Pour chaque échantillon, 100 mg de tissus ont été utilisés pour l'extraction des ADN selon le protocole publié par La Rivière *et al.* (2013). Les ADN bactériens ont ensuite été amplifiés par PCR avec les amorces 63F/786R-Eub selon les conditions décrites dans la même publication. Les produits PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1 % en TAE afin d'observer un éventuel changement d'intensité du signal pouvant traduire un effet du traitement antibiotique sur l'abondance bactérienne.

Afin de vérifier si les ADN amplifiés par PCR sont le reflet de bactéries vivantes ou des ADN résiduels, nous avons procédé à l'analyse des ARN 16S bactériens permettant d'observer les bactéries présumées actives. Pour ce faire, un fragment de chaque échantillon a été décongelé lentement sur la glace afin de préserver la qualité des ARN puis lavé dans 3 bains successifs d'eau de mer stérile filtrée avant grattage des tissus. L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir de 100 mg de tissus grâce au kit QIAzol® (Qiagen), puis les ARN ont été purifiés sur colonne RNAeasy® Plus Mini (Qiagen), selon le protocole du fournisseur. Une fois les ARN totaux extraits, une rétrotranscription associée à une amplification par PCR (RT-PCR) des ARN bactériens a été effectuée à l'aide du kit QIAGEN® OneStep RT-PCR (Qiagen). Le volume réactionnel de 25 µl contenait 1 µl d'ARN, 1 µl de QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 5 µl de tampon 5X, 0,6 µM de chaque amorce (63F/786R-Eub), 400 µM de chaque dNTP et de l'eau purifiée sans RNAse. La réaction de RT-PCR a été réalisée dans un thermocycleur selon les étapes suivantes : rétrotranscription (30 min à 50°C), étape initiale d'activation de la PCR (15 min à 95°C), 35 cycles de dénaturation (30 sec à 95°C)-hybridation (30 sec à 48°C)-extension (30 sec à 72°C), puis extension finale (10 min à 72°C).

4.2.2. Résultats et interprétation

Les variations de l'intensité des signaux PCR sur gel étaient surprenantes (Figure 11). Par exemple, le signal de l'échantillon B-Traitement 1 après traitement antibiotique était plus fort que celui de l'échantillon B-Contrôle (B-T-) n'ayant subi aucun traitement, alors qu'une augmentation de l'abondance bactérienne en conditions stériles et présence d'antibiotiques est

peu vraisemblable. De même, l'intensité de signal des échantillons soumis au Traitement 1bis était supérieure à celle des échantillons du Traitement 1 soumis à un traitement antibiotique moins long. Ainsi, l'augmentation –ou la diminution- du signal ne semble pas liée au traitement antibiotique mais plutôt à une différence de rendement d'extraction et/ou d'amplification ADN entre les échantillons. Quoi qu'il en soit, la présence de signaux PCR de forte intensité dans les échantillons soumis au traitement antibiotique le plus long dans la plus forte concentration indique soit que le traitement n'est pas efficace pour diminuer l'abondance bactérienne, soit que les ADN résiduels des bactéries tuées par les antibiotiques restent amplifiables et biaisent l'interprétation des données.

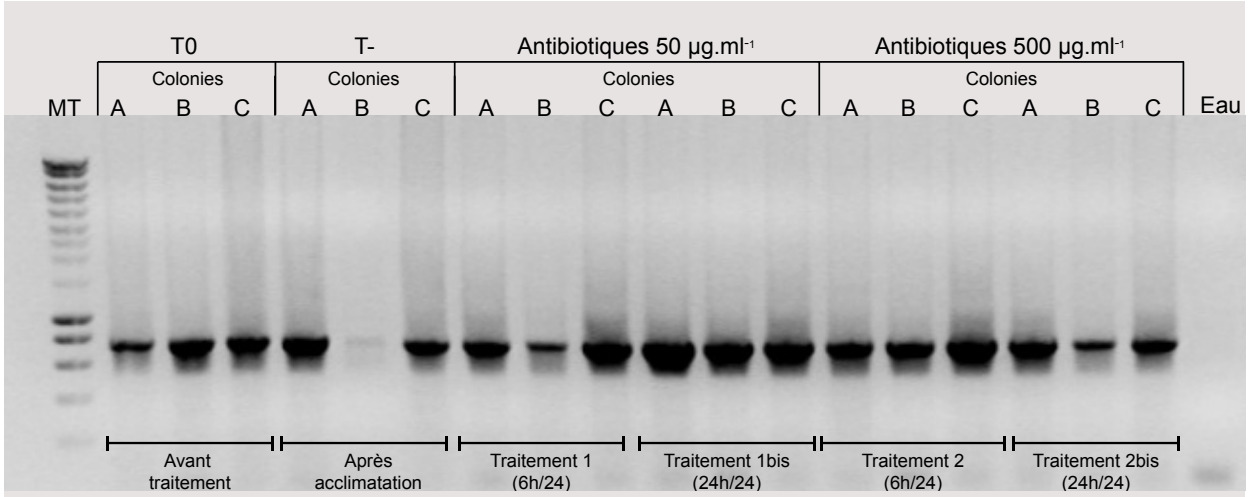


Figure 11 | Analyse PCR des ADNr 16S des communautés bactériennes traitées avec un mélange d'antibiotiques.
Gel d'agarose de visualisation des ADN ribosomiques 16S bactériens amplifiés par PCR pour les fragments de gorgone (3 colonies A, B et C) échantillonnés avant traitement (T0), après acclimatation (T1), après le traitement par une concentration de 50 µg.ml^{-1} d'antibiotiques, et après le traitement par une concentration de 500 µg.ml^{-1} d'antibiotiques. Eau : témoin négatif (sans ADN), MT : marqueur de taille.

Le signal d'amplification des ARN 16S bactériens rétrotranscrits semble diminuer pour l'ensemble des échantillons traités aux antibiotiques par rapport aux deux types d'échantillons contrôles (T0 et T-), mais aucune variation de signal remarquable n'a pu être détectée entre les différents traitements antibiotiques (Figure 12). Ceci suggèrerait que la quantité d'ARN exprimés et donc de bactéries actives diminuerait légèrement sous l'effet du traitement antibiotique. Il est cependant important de noter que l'intensité du signal d'amplification des échantillons soumis au traitement antibiotique reste relativement forte, suggérant que ce protocole ne permet pas d'éliminer ou inactiver toutes les bactéries présentes. Nous nous sommes assurés que le signal

observé était bien dû à l'amplification d'ARN rétrotrancrits et non à une contamination par de l'ADN génomique, en réalisant une PCR classique à partir des ARN totaux qui a montré une absence de signal (données non montrées).

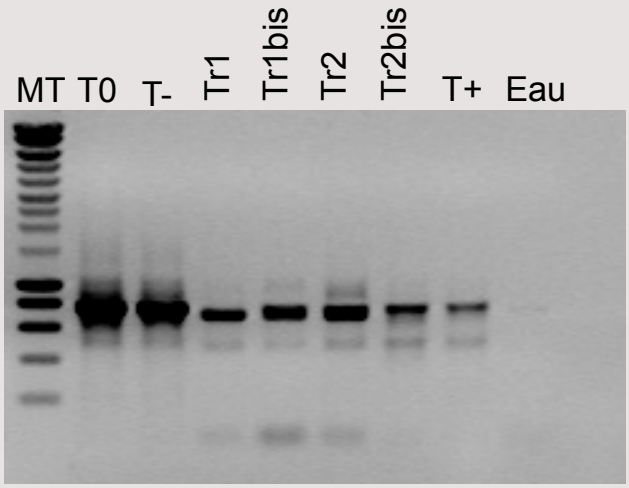


Figure 12 | Analyse RT-PCR des ARNr 16S des communautés bactériennes traitées avec un mélange d'antibiotiques.
Gel d'agarose de visualisation des ARN ribosomiques 16S bactériens rétroamplifiés par RT-PCR pour les fragments de gorgones de la colonie C échantillonnés avant traitement (T0), après le traitement par une concentration de 50 µg.ml^{-1} d'antibiotiques (Tr1 et Tr1bis), et après le traitement par une concentration de 500 µg.ml^{-1} d'antibiotiques (Tr2 et Tr2 bis). T- : témoin ADN (RT-PCR à partir d'un ADN contrôle), T+ : témoin positif (ARN contrôle), Eau : témoin négatif (sans ARN), MT : marqueur de taille.

Le recours à des méthodes d'analyse quantitative serait nécessaire pour pouvoir conclure de manière ferme. Néanmoins, les protocoles de traitement couplant 3 antibiotiques différents dans les concentrations et les durées d'incubation testées ici ne semblent pas permettre de déstabiliser de manière probante les associations gorgone-bactéries et ne permettent pas d'obtenir un hôte axénique, partiellement ou totalement dépourvus de bactéries pour observer la dynamique de résilience des assemblages bactériens.

5. DISCUSSION

5.1. Synthèse des principaux résultats

Les résultats de ce travail ont permis de mettre en évidence une grande stabilité du ribotype *Hahellaceae* dominant des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge, en conditions

de stress thermique et pendant un événement de mortalité naturelle. Seul un changement net de composition, associé à l'apparition de nouveaux ribotypes dominants, pour les échantillons issus de colonies présentant des nécroses a pu être observé lors d'une des expériences de stress thermique contrôlé (expérience B). Par ailleurs, un nouveau ribotype non identifié a été observé comme dominant à la place du ribotype *Hahellaceae* dans des fragments issus de colonies présentant des portions de tissus nécrosés échantillonnées sur le terrain lors d'une mortalité naturelle. Malheureusement, un possible lien de cause à effet entre une modification du microbiote et l'apparition de nécroses n'a pas pu être révélé par les analyses entreprises. En particulier, aucune modification reproductible des communautés en condition de stress contrôlé n'a été apparente avant apparition des signes de nécrose. De plus, certains échantillons ont également présenté des symptômes de nécroses dans la première expérience de stress thermique, sans qu'aucun changement de composition bactérienne concomitant n'ait pu être détecté (expérience A). Enfin, aucun changement d'abondance des communautés bactériennes après traitement antibiotique n'a pu être détecté de façon concluante par les techniques d'analyses employées.

5.2. Facteurs impliqués dans la stabilité ou la modification des communautés bactériennes associées

Bien que les méthodes d'analyse employées dans cette étude ne nous permettent pas de décrire de manière quantitative les communautés bactériennes présentes, nous avons cependant pu observer la variation de proportion relative des ribotypes majoritaires. Nous avons ainsi pu remarquer que le TRF correspondant au ribotype *Hahellaceae* est présent dans les communautés associées à *P. clavata* malgré des niveaux de stress élevés, ce qui confirme l'association stable et spécifique entre cette bactérie et la gorgone mise en évidence dans le suivi spatio-temporel décrit dans le Chapitre 2 (La Rivière *et al.*, 2013). Ainsi la rupture de l'association gorgone-*Hahellaceae* observée dans certains échantillons présentant des nécroses révèle un important stress physiologique et/ou métabolique de l'holobionte conduisant à déstabiliser la symbiose. En effet, selon *l'hypothèse probiotique des coraux (Coral Probiotic Hypothesis)* (Reshef *et al.*, 2006), l'holobionte sélectionnerait ses symbiotes bactériens de manière à maximiser sa survie dans un environnement changeant. De plus, une expérience de traitement antibiotique sur le corail tropical *Pocillopora damicornis* a montré qu'une déstabilisation artificielle du consortium microbien diminue la résistance de l'hôte face à un stress thermique, suggérant un rôle des bactéries dans la

réponse au stress de l'holobionte (Gilbert *et al.*, 2012). L'observation récurrente de la dominance des *Hahellaceae*, leur apparente stabilité dans des conditions de stress et leur remplacement par d'autres ribotypes associé à des symptômes de maladies supportent cette hypothèse dans le cas de l'holobionte *P. clavata* et suggèrent que ce groupe bactérien particulier pourrait jouer un rôle important dans la santé de la gorgone. De nouvelles expérimentations couplant différents niveaux de stress -incluant par exemple des traitement subléthaux longs- et de multiples réplicats clonaux seraient nécessaires pour vérifier que les changements de composition des communautés bactériennes ne sont pas dus à l'atteinte du seuil de thermotolérance des micro-organismes lors des expériences, sans lien étroit avec l'état physiologique de la gorgone.

Il est important de noter que les stress thermiques expérimentaux appliqués dans ce travail ou les conditions environnementales reliées à la mortalité observée à Antibes ne sont certainement pas identiques aux facteurs à l'origine des évènements de mortalités massives (EMM) de gorgonaires observées en Méditerranée nord-occidentale durant les deux dernières décennies. Par conséquent, les réponses des communautés bactériennes observées dans ce travail ne reflètent peut-être pas des changements ayant pu avoir lieu lors de ces EMM. En effet, l'origine du déclenchement de la mortalité du Cap Gros reste inconnue, ses effets ont été très localisés et elle n'a pas ou peu affecté des sites distants de quelques kilomètres seulement, contrairement aux EMM ayant affecté plusieurs centaines de kilomètres de côtes. Malgré l'absence de relevés de températures de cette zone, il est peu vraisemblable qu'une température élevée de l'eau à Antibes ait agi comme seul facteur déclenchant des nécroses, car tous les sites de la région subissant le même régime thermique auraient alors dû être affectés. La température a cependant pu jouer un rôle favorisant, et il est probable que la mortalité du site Cap Gros soit principalement due à une pollution chimique ou une contamination biologique locale dont les deux autres sites explorés (Fourmigue et Rascoui) auraient été protégés par leur localisation dans la baie, mais cette hypothèse difficile à vérifier n'a malheureusement pas pu être testée *a posteriori*. De même, les expériences de stress thermique mises en place ne reproduisent qu'un seul facteur de perturbation alors que les gorgones ont probablement été soumises *in situ* à un ensemble complexe de facteurs de stress agissant en synergie lors des EMM (Coma *et al.*, 2009; Garrabou *et al.*, 2009).

Il est probable que les nouveaux ribotypes observés lors de cette étude dans certains échantillons de gorgone présentant des nécroses soient opportunistes et profitent de l'altération

de l'intégrité tissulaire de l'hôte et de la déstabilisation des communautés bactériennes résidentes pour s'installer, comme il a été observé dans plusieurs cas de maladies de coraux tropicaux (Bourne, 2005; Bourne *et al.*, 2008; Sunagawa *et al.*, 2009; Miller et Richardson, 2011). Quoiqu'il en soit, le fait qu'aucun nouveau ribotype remplaçant le ribotype *Hahellaceae* n'ait pu être détecté en commun dans tous les échantillons présentant des nécroses dans l'expérience de stress thermique A suggère que le changement de composition du microbiote observé dans les autres cas de stress est plus vraisemblablement une conséquence de l'apparition des nécroses qu'une cause. Il est possible que l'échantillonnage des fragments nécrosés de l'expérience A ait eu lieu trop tôt pour permettre l'installation de ribotypes opportunistes détectables. Contrairement à ce qui a pu être observé chez le corail tropical *Acropora millepora*, pour lequel un changement de composition du microbiote précède l'apparition des symptômes de maladies (Bourne *et al.*, 2008), les variations des communautés bactériennes de *P. clavata* ne semblent donc pas pouvoir être utilisées comme bio-indicateur de l'état de santé de l'hôte. Il est important de noter qu'aucun TRF correspondant à la souche *Vibrio coralliilyticus* isolée à partir de colonies de *P. clavata* malades (Bally et Garrabou, 2007) n'a pu être observé dans les échantillons présentant des nécroses, ce qui indique que ce pathogène n'est pas seul responsable de l'apparition de ces symptômes de maladies et que son installation au sein du microbiote de la gorgone résulte plus vraisemblablement d'un comportement opportuniste, comme suggéré dans des études précédentes (Bally et Garrabou, 2007; Vezzulli *et al.*, 2010; Huete-Stauffer *et al.*, 2011).

La colonisation par des bactéries opportunistes a également été mise en évidence à la suite d'une expérience de traitement antibiotique sur le corail *Acropora muricata*, avant que les échantillons ont été replacés dans leur environnement naturel (Sweet *et al.*, 2011a). Ces opportunistes d'*A. muricata* ont été remplacés par la communauté bactérienne naturelle après 96 h, ce qui suggère d'importantes capacités de résilience du partenaire bactérien, ainsi que des mécanismes robustes pour sa sélection.

5.3. Résilience des communautés associées à *P. clavata*

Des phénomènes de résilience du microbiote associé à *P. clavata* ont déjà pu être observés après un changement drastique de composition des assemblages bactériens en été 2007, dont la cause reste inconnue (La Rivière *et al.*, 2013). La recherche de processus similaires après les changements de composition bactérienne associés à l'apparition des nécroses –tels que ceux

observés dans le cas de la mortalité naturelle ou du stress thermique- permettrait de mieux appréhender les capacités de récupération de l'holobionte et les mécanismes de sélection des partenaires mis en jeu.

L'étude de la résilience des communautés bactériennes après un changement dû au stress semble fondamentale pour l'étude des interactions hôte-bactéries. En effet, la mise en évidence de phénomènes de résilience confirmerait l'existence de mécanismes de sélection des partenaires symbiotiques par l'holobionte qu'il apparaît essentiel de documenter afin de mieux comprendre la relation fonctionnelle liant bactéries et hôte. Ceci peut être facilement entrepris en laissant les gorgones "récupérer" dans des aquariums en circuit ouvert d'eau de mer après des expériences de stress.

5.4. Perspectives

Différentes perspectives ont pu émerger de ces travaux. Premièrement, nous avons pu mettre en évidence que le microbiote de *P. clavata* ne semble pas influencé par la manipulation et le passage en aquarium ce qui permettra de poursuivre l'étude microbiologique d'échantillons de gorgone rouge par des expérimentations en aquariums. Pour chaque expérience, une attention particulière doit néanmoins être portée à l'analyse d'échantillons contrôles prélevés avant toute manipulation puis après acclimatation des individus en aquarium, afin de détecter un éventuel "effet aquarium" qui biaiserait les données acquises ultérieurement.

Afin de mieux refléter la complexité des facteurs de stress agissant en synergie en milieu naturel, il serait intéressant de mettre en place des approches multifactorielles combinant par exemple stress thermique, nutritif, antibiotique et/ou pathogène. Il a en effet été observé chez des holobiontes tropicaux qu'une combinaison de facteurs pouvait induire des réponses différentielles des communautés bactériennes en comparaison à un stress isolé (Simister *et al.*, 2012b; Higuchi *et al.*, 2013). Il serait par exemple intéressant d'observer la réponse des communautés bactériennes à des expériences couplées de stress thermique et d'infection par le pathogène *Vibrio coralliilyticus.* Ceci pourrait permettre d'évaluer la stabilité des symbiotes face à une infection bactérienne chez un holobionte affaibli par la température et permettrait d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors de l'installation du pathogène. La mise en œuvre de ce type d'approche est complexe car de multiples contrôles sont nécessaires, mais les résultats permettraient d'appréhender les effets

synergiques de plusieurs facteurs de stress plus représentatifs des perturbations qui affectent les gorgones lors des mortalités massives en milieu naturel.

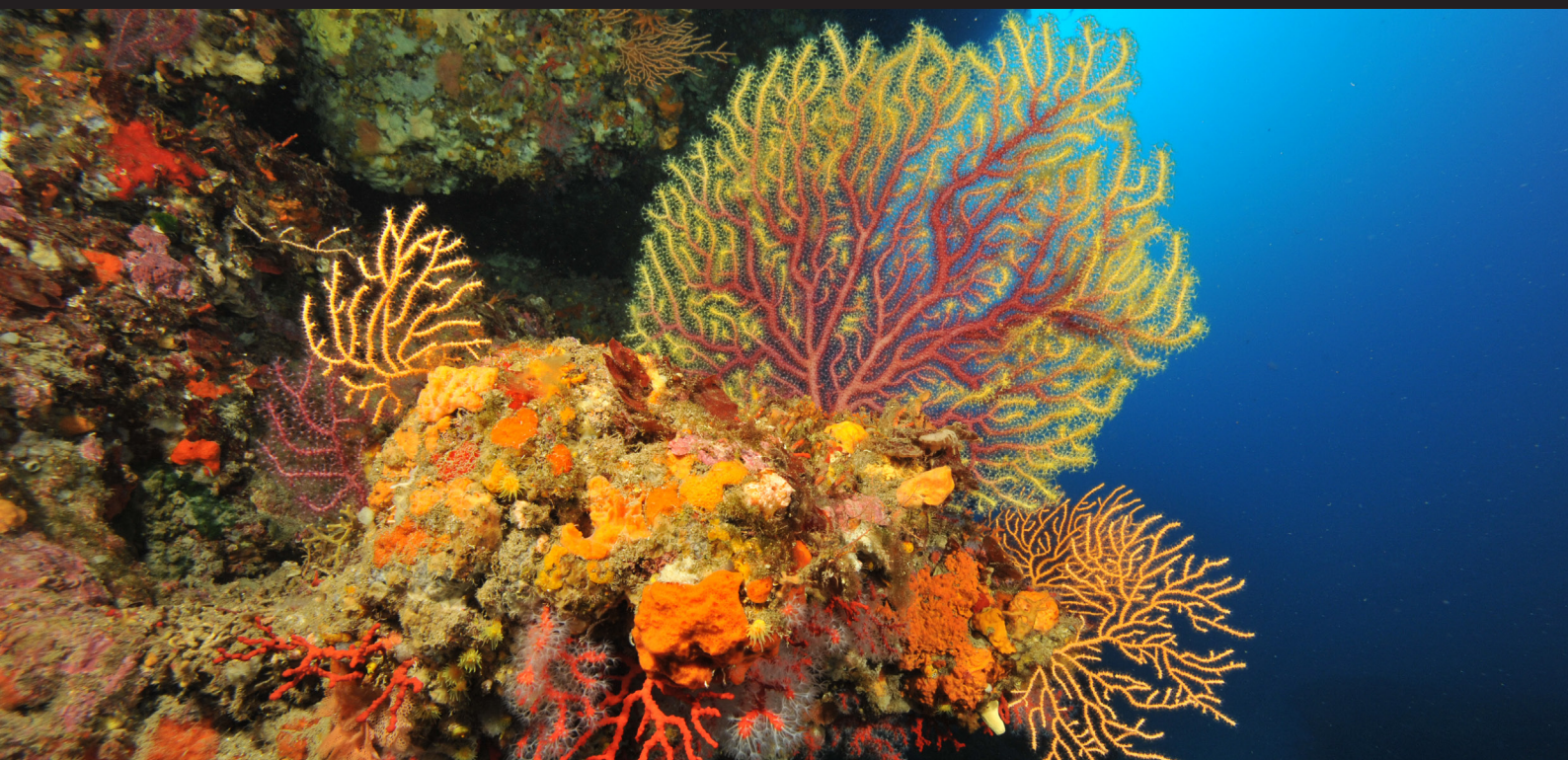
Enfin, le recours à des techniques quantitatives basées sur la PCR en temps réel (qPCR) et l'analyse métagénomique serait souhaitable pour déceler d'éventuelles variations d'abondance et de diversité au sein des groupes bactériens minoritaires présents dans les échantillons, ou des variations d'abondance au sein d'un même groupe, qui n'auraient pu être détectées par les analyses mises en œuvres dans ce travail limitées à une interprétation qualitative. De plus, l'utilisation de techniques moléculaires dépendantes d'une étape de PCR peut potentiellement conduire à sous-estimer la diversité bactérienne lorsque certains ribotypes sont très dominants. L'utilisation de la RT-qPCR (PCR quantitative après rétrotranscription) serait également bénéfique afin de s'assurer que les traitements antibiotiques ont un effet sur les bactéries associées à la gorgone. Néanmoins, ces techniques nécessitent un travail de mise au point conséquent afin de pouvoir standardiser la quantité d'acides nucléiques analysée ou normaliser les données à l'aide d'un gène de ménage (dont l'expression ne dépend d'aucun mécanisme de régulation) ou à l'aide d'un isolat cultivable des bactéries d'intérêt (telle que l'*Hahellaceae* associée à *P. clavata*). Par ailleurs, des analyses de métagénomique et métatranscriptomique pourraient permettre d'évaluer des variations potentielles de la diversité fonctionnelle au sein des communautés et renseigner sur les mécanismes métaboliques mis en jeu au sein de l'holobionte en conditions de stress. En effet, l'absence de changement de diversité taxonomique de la communauté bactérienne dominante en réponse à un stress n'exclut pas une modification métabolique au sein du microbiote. Un changement de diversité fonctionnelle pourrait avoir lieu en favorisant l'expression de gènes d'intérêts par les bactéries naturellement présentes au sein de l'holobionte sans que la diversité bactérienne, en terme de diversité d'espèces présentes, soit modifiée. Une étude chez l'éponge *Rhopaloeides odorabile* a en effet montré que le stress thermique induit un changement d'expression génétique chez l'hôte et ses symbiotes bactériens, en particulier une perte des fonctions de symbioses, puis qu'un changement de composition des communautés associées à l'holobionte intervient secondairement, laissant la place à des espèces opportunistes (Fan *et al.*, 2013).

Les travaux expérimentaux décrits dans ce chapitre ont donc permis d'une part d'observer la stabilité des associations gorgone-*Hahellaceae* en conditions de stress et de suggérer la colonisation par des espèces bactériennes opportunistes lors de la déstabilisation de ces assemblages, et d'autre

part d'établir un cadre qui sera utile pour définir de futures expérimentations adaptées à l'étude du compartiment bactérien de l'holobionte *P. clavata*.

Chapitre V

Spécificité des associations bactéries-gorgonaires



1. INTRODUCTION

Coral holobionts host a wide diversity of microbes that are believed to play an active role in maintaining their host health and resilience (Rosenberg *et al.*, 2007b; Bourne *et al.*, 2009; Krediet *et al.*, 2013). Accumulating evidences show that coral-associated bacterial assemblages are distinct from the microbial communities in surrounding seawater (Frias-Lopez *et al.*, 2002; Klaus *et al.*, 2007; Sunagawa *et al.*, 2010) but the mechanisms underlying the specificity of the established association are poorly understood and multiple factors seem to be involved in shaping the coral microbiota. Actually, it remains unclear whether the associated bacteria are generalists that might interact with a broad range of coral species, or specialists that selectively associate with their specific host (Hong *et al.*, 2009; Mouchka *et al.*, 2010). The study by Rohwer *et al.* (2001) was the first to suggest that corals may harbor species-specific bacterial communities that are consistent between geographically distinct sites. Several further studies provided evidence of the presence of distinct bacterial assemblages among unrelated coral species living in close proximity to each other (Rohwer *et al.*, 2002; Schottner *et al.*, 2012), and found similar communities among related corals from remote locations (Rohwer *et al.*, 2002; Littman *et al.*, 2009; Morrow *et al.*, 2012). However, closer investigations of the composition of the microbial assemblages revealed that some bacterial taxa might be common to phylogenetically divergent coral hosts. For example, bacteria closely related to the *Oceanospirillales* order (*Gammaproteobacteria*) were shown to be widely distributed across different hexa- and octocoral species in diverse tropical, temperate and cold-water environments (Hansson *et al.*, 2009; Kvennefors *et al.*, 2010; Mouchka *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Morrow *et al.*, 2012; Speck and Donachie, 2012; Bayer *et al.*, 2013).

Overall, it is widely accepted that specific coral-associated assemblages are maintained in the coral holobiont. Nevertheless, their stability may be directly or indirectly influenced by a variety of environmental parameters. For instance, the composition of the bacterial communities has been found to change when corals are exposed to different stressors or diseases (Bourne *et al.*, 2008; Vega Thurber *et al.*, 2009; Croquer *et al.*, 2013). It has been suggested that such variations could provide a mechanism to rapidly adapt the holobiont to changing environmental conditions by altering its associated microbes (Reshef *et al.*, 2006), but the factors involved in the modification of the initial range of host-bacterial specificity are still unknown. In addition, there are increasing examples showing that coral-associated bacterial communities may also be

affected by geographic differences (Hong *et al.*, 2009, Gray *et al.*, 2011), seasons (Ceh *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011), water quality (Klaus *et al.*, 2005), depth (Klaus *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012), nutrient status (Garren *et al.*, 2009) or proximity of other sessile organisms (Barott *et al.*, 2012). Interestingly, it has recently been shown that biotic and abiotic factors can differentially influence the community structures and the abundance of microbial associates, with bacteria related to *Endozoicomonas* spp. (*Oceanospirillales*) being more sensitive to the coral species than other associated bacterial groups like *Vibrio* that are mostly affected by water salinity and depth (Lee *et al.*, 2012). Furthermore, additional selection factors determining the community structures could be intimately linked to the microbial assemblages themselves. For example, antagonistic interactions between bacterial strains may strongly influence the community diversity (Ritchie, 2006; Kvennefors *et al.*, 2011). Antibiotic production by associated bacteria could also help in securing coral-specific niches by exclusion of competing or pathogenic microorganisms (Rypien *et al.*, 2010).

These findings suggest that a complex combination of host factors, environmental parameters and microbial interactions plays an important role in shaping the diversity of coral-bacterial assemblages, and highlight the growing need of a more comprehensive survey including holobionts from different taxonomic lineages and geographic locations to better evaluate the specificity of such associations. Since we recently demonstrated that the red gorgonian *P. clavata* was associated with specific symbionts (La Rivière *et al.*, 2013), we decided to investigate the associated microbiota of three other gorgonian species from the Northwestern Mediterranean Sea, the white gorgonian *Eunicella singularis,* the yellow gorgonian *Eunicella cavolini*, and the red coral *Corallium rubrum.* Populations of these sympatric species are found in the emblematic Mediterranean coralligenous habitats. We proceeded to comparisons of bacterial community composition among these three gorgonians to assess the species-specificity of their associates. The evidences presented here from T-RFLP profiling, clone-libraries analysis and molecular phylogeny show that the different gorgonian species harbor distinct communities dominated by related bacteria that might be host-adapted.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sample collection and DNA extraction

Samples of the three species of gorgonian corals *E. singularis*, *E. cavolini* and *C. rubrum* were collected at the Riou Island site (France) (43°10.345' N, 05°23.319' E), in summer (September 2008) and winter (March 2009) (Figure 1). The *C. rubrum* population was found on an overhang at approximately 20 m depth nearby a dense population of *P. clavata* living on a vertical wall. This latter population was mixed with a population of *E. cavolini*. The *E. singularis* population was found at the bottom of the wall at approximately 25-30 m depth. At each sampling time apical branch fragments (2 cm length) of randomly chosen, apparently healthy colonies (i.e., with no visible signs of necrosis) (n=3) were collected using shears and placed in plastic bags underwater. The collected samples were then transferred to the laboratory within 2 h.

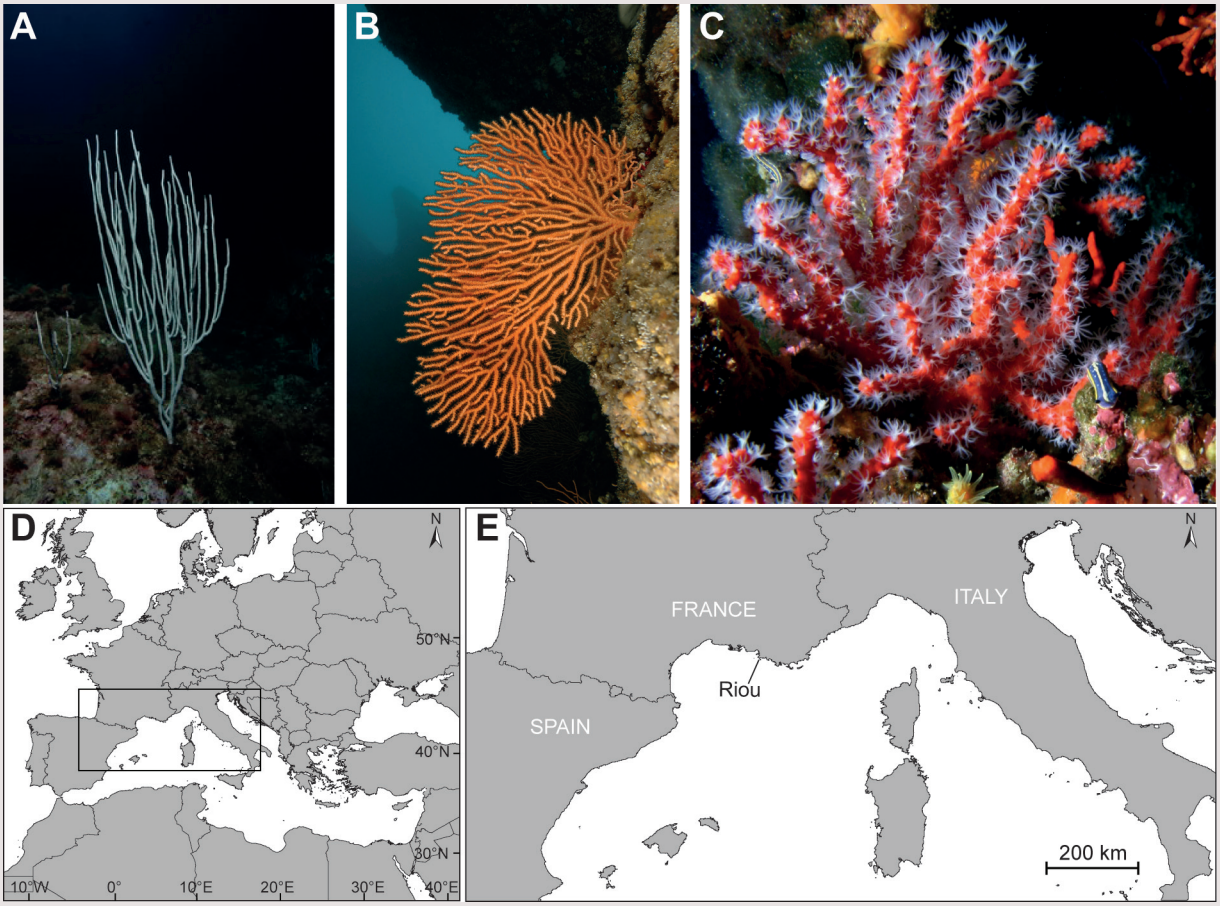


Figure 1 | *In situ* photographs of the studied gorgonian species and sampling site.
Colonies of the white gorgonian *Eunicella singularis* (A), the yellow gorgonian *Eunicella cavolini* (B) and the red coral *Corallium rubrum* (C) and a map of the Northwestern Mediterranean basin (D) with an enlargement showing the location of the study site (E) are shown (© F. Zuberer and T. Vignaud).

The gorgonian samples were processed according to the protocol described by La Rivière *et al.* (2013) for the study of *P. clavata*-associated bacterial communities. Samples were rinsed 3 times with sterile 0.22-µm-filtered seawater. Tissues were then detached from the central axis, homogenized in 3 ml of sterile seawater using a scalpel blade and aliquoted into 3 microtubes. Tissue slurries were pelleted by quick centrifugation and stored at -80°C before subsequent DNA extraction.

Bacterial DNA in gorgonian tissue samples was extracted following the protocol described in La Rivière *et al.* (2013), adapted from Bourne *et al.* (2008). Briefly, tissue slurries were incubated for 5 min at room temperature in 0.5 ml of extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA, 0.75 M sucrose) along with 1 µg of salmon sperm DNA. The samples were then incubated for 1 h at 37°C with slow agitation in lysozyme solution (75 µl of 100 $mg \cdot ml^{-1}$). After 3 freeze-thaw cycles, 100 µl 25 % sodium dodecyl sulfate (SDS) were added and samples were incubated for 10 min at 70°C. The samples were digested by proteinase K (20 µl of 20 $mg \cdot ml^{-1}$) for 1 h at 37°C with slow agitation and again submitted to 3 freeze-thaw cycles. Tissue lysates were then submitted to standard phenol-chloroform DNA extraction procedures, followed by the addition of 50 µl 3 M sodium acetate and an equal volume of isopropanol to allow for DNA precipitation. Extracted total DNA was pelleted by centrifugation (16,000 g for 30 min at 4°C), washed with cold 70 % ethanol and suspended in 30 µl sterile ultra-pure water. The DNA concentration was estimated by spectrophotometry using a biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany), and the DNA samples were stored at -20°C until further processing.

2.2. T-RFLP analysis

2.2.1. PCR amplification, enzymatic digestion and T-RFLP

Samples were processed through T-RFLP analysis according to the protocol improved for *P. clavata* bacterial communities (La Rivière *et al.*, 2013). Briefly universal primers 63F labeled at the 5' end with phosphoramidite fluorochrome 6-carboxyfluorescein (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), and 1389R (Osborn *et al.*, 2000) were used to amplify the bacterial 16S rDNA genes. PCR mixtures contained 1 X Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (Fermentas, Burlington, Canada), 200 µM each dNTP, 1 µM forward and reverse primer, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$ bovine serum albumin (BSA), 0.3-3 µl (approximately 100-300 ng) bacterial DNA template, 1 U

native Taq DNA Polymerase (Fermentas) and sterile ultra-pure water in a total volume of 25 µl. PCR reactions were performed with an initial 5 min denaturation step at 94°C, followed by 35 amplification cycles (94°C for 1 min, 48°C for 1 min, 72°C for 1 min). The labeled PCR products were purified using the Wizard® PCR Clean-Up System (Promega) following the manufacturer's instructions and eluted in 30 µl of DNase-free distilled water (Promega).

The enzymatic digestions were performed for 16 h at 37°C using a reaction mixture of 20 µl containing 6 µl of the purified PCR products, 1 X reaction buffer (Promega), 0.1 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$ BSA and 20 U *Cfo*I or *Msp*I (Promega). Each digested sample (3 µl) was mixed with 0.3 µl GeneScan 600-LIZ® (Applied Biosystems) size standard and 10 µl Hi-Di® Formamide (Applied Biosystems) and denatured at 90°C for 3 min, before separation of the terminal restriction fragments (TRFs) on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with default fragment analysis parameters. Each sample was run twice as replicates. After wisual inspection, all T-RFLP electropherograms were tabulated in GeneMapper® version 4.0 software (Applied Biosystems) using the Local Southern method as the size-calling algorithm (Southern, 1979). Only fragments longer than 80 bp and smaller than 600 bp were considered.

2.2.2. Statistical analysis of the spatiotemporal variability

Raw data sets were processed for normalization and statistical analysis as described by La Rivière *et al.* (2013). The average area and size of each peak were calculated between run duplicates of a same sample (TRFs with sizes within 0.5 bp of each other were considered identical, while TRFs that were present in only one of the duplicates were removed). T-RFLP data were then normalized by applying a variable percentage threshold to eliminate background fluorescence (Osborne *et al.*, 2006). Data were binned using the interactive and automatic binning algorithms (Ramette, 2009) implemented in the free R programming language (R Development Core Team, 2012), applying custom R binning scripts (threshold : 3 %; WS 1; Sh 0.1) to account for size calling imprecision. Relative abundances of each TRF and cluster analysis based on the Bray-Curtis dissimilarity index (sensitive to abundant species) using the single linkage method were displayed on a clustered heatmap (R packages vegan and pheatmap) (Kolde, 2012; Oksanen *et al.*, 2012).

2.3. Bacterial clone library construction

The construction of a bacterial clone library for each gorgonian species sampled in summer 2008 was performed according to the protocol described by La Rivière *et al.* (2013). Amplification of the bacterial 16S rRNA genes was performed by PCR on extracted DNA using the universal primers 63F and 1389R (Osborn *et al.*, 2000). PCR amplifications were performed in a total volume of 25 µl containing 1 X of Taq® Flexi Buffer (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM each dNTP, 1 µM each primer, 1 U GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega) and 0.3-3 µl (approximately 100-300 ng) DNA template. After an initial denaturation step (5 min at 94°C), 35 cycles of amplification (94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min) were performed, followed by a final elongation step at 72°C for 10 min. For each library, the DNA extracted from 3 colonies of each gorgonian species was PCR-amplified in 3 separate reactions, each performed in triplicate. The amplified products were pooled and purified with Wizard® PCR Clean-Up minicolumns (Promega), followed by cloning into the pGEM®-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. After transformation into *E. coli* JM109 competent cells, PCR re-amplification using 63F and M13 reverse primers determined the orientation of the inserted 16S rRNA gene of each resulting clone. Clones producing a PCR product of the expected size (approximately 1,500 bp) were sequenced with a plasmid forward primer (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany).

2.4. Sequencing and phylogenetic analysis

Sequence data were checked for chimeras using the Pintail software (Ashelford *et al.*, 2005) and trimmed to 750 bp in length. The cloned 16S rDNA sequences of each library (*E. singularis*: 168 clones; *E. cavolini*: 126 clones; *C. rubrum*: 114 clones) were assigned to the lower possible taxonomic rank by using the Classifier and SeqMatch tools at the Ribosomal Database Project website (RDP Release 10; http://rdp.cme.msu.edu). Representative sequences from each taxonomic group were aligned to the closest relative by comparison with the GenBank database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Library rarefaction curves and the Shannon-Weaver diversity index were determined using the FastGroupII program with a 97 % similarity threshold for sequence grouping (Yu *et al.*, 2006; http://fastgroup.sdsu.edu).

Sequences were aligned using Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007) available at the EBI website (http://www.ebi.ac.uk) using default parameters. Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) available on the ATGC bioinformatics platform (http://www.atgc-montpellier.fr), with a GTR substitution model. The consistency of the tree topology was evaluated by the approximate likelihood-ratio test (aLRT; Anisimova and Gascuel, 2006).

3. RESULTS

3.1. Interspecific and seasonal comparison of bacterial communities

Bacterial community patterns of the three gorgonian species, *E. singularis*, *E. cavolini* and *C. rubrum*, were investigated by T-RFLP analysis of individual colonies sampled in summer and winter. In spite of minor variations in peak intensity between T-RFLP replicate profiles, likely due to the lack of quantification of DNA template loaded for T-RFLP analysis, the relative fluorescence values of dominant TRFs were broadly conserved for the *Cfo*I and *Msp*I replicates data sets (data not shown). In total, 19 different TRFs were observed upon *Cfo*I digestion (Figure 2) and 24 TRFs were observed for *Msp*I digests (Figure 3), but none of the TRFs were shared by all samples for each restriction enzyme.

Clustered heat maps of TRFs abundances were constructed to compare the similarities between the bacterial communities of the 18 gorgonian colonies. Hierarchical clustering of *Cfo*I and *Msp*I profiles clearly showed that the microbial communities associated with *C. rubrum* and the bacterial assemblages of the *Eunicella* species were separated into two clusters (Figures 2 and 3). Within the *Eunicella* cluster, all but one of the *E. singularis* samples clustered together in both *Cfo*I and *Msp*I analysis. The other *E. singularis* sample profiles (Es-S1 and Es-S2 in *Cfo*I and *Msp*I restriction analysis, respectively) grouped with the *E. cavolini* profiles. No seasonal pattern between summer and winter could be observed, although the bacterial communities from *E. cavolini* sampled in winter and summer clustered separately after *Msp*I digestion (Figure 3) but this clustering was not supported upon *Cfo*I digestion.

One single TRF (TRF-171) was retrieved in all the *Eunicella* samples digested by *Cfo*I, which was dominant in 11 of the 12 corresponding communities and represented 39.3 to 100 %

of the profile's total fluorescence (Figure 2). The same trend was observed upon *Msp*I digestion, with a single TRF (TRF-105) detected in the 12 *Eunicella* samples and being dominant in 10 of them by accounting for 38.1 to 100 % of the profile's total fluorescence (Figure 3). Only these two TRFs were shared between the *Eunicella* spp. and *C. rubrum* clusters. However, the *Cfo*I TRF-171 was only retrieved in two *C. rubrum* summer samples (Cr-S1 and Cr-S3) and the *Msp*I TRF-105 was only detected in one of these samples (Cr-S1). Two other notable TRFs were observed in the profiles from *E. singularis* bacterial communities: the *Cfo*I TRF-125 common to all the *E. singularis* samples and the *Msp*I TRF-126 retrieved in all but one of these profiles.

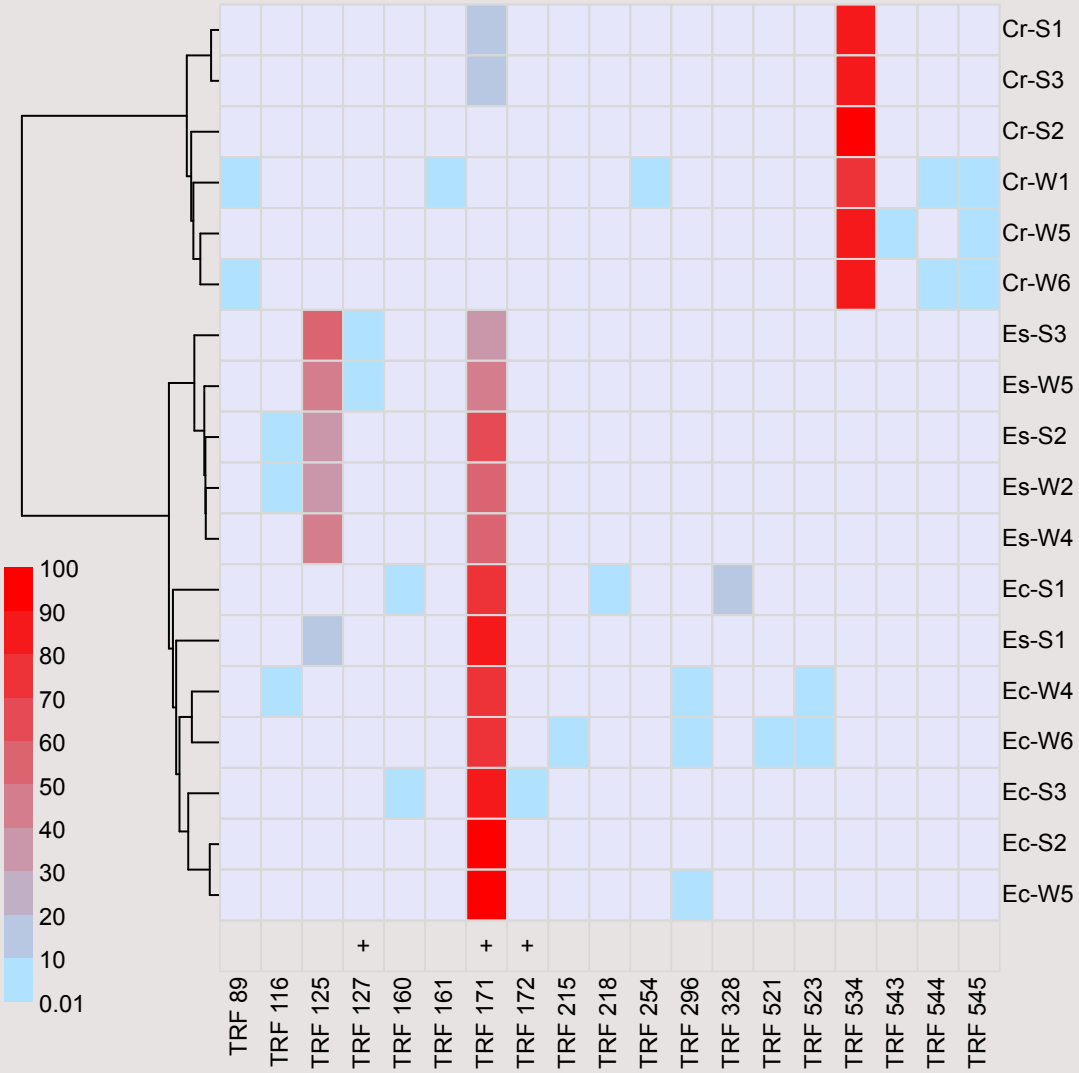


Figure 2 | Relative abundances of *Cfo*I TRFs in gorgonian samples analyzed by T-RFLP. Each row represents a profile of TRFs generated by *Cfo*I digestion of PCR amplicons from three replicate samples of *C. rubrum* (Cr), *E. cavolini* (Ec) and *E. singularis* (Es) that were collected in summer (S) or and winter (W). The bottom raw indicates TRFs previously observed in *P. clavata* bacterial profiles (La Rivière *et al.*, 2013), shown by a plus symbol (+). TRFs were designated by their size (in bp) after binning. The filling colors represent the relative fluorescence (in %) of the TRFs according to the range presented in the color key.

Two TRFs (TRF-534 and TRF-457) that respectively accounted for 82.4 to 100 % and 65.4 to 100 % of the total relative fluorescence for *Cfo*I and *Msp*I restriction, dominated all the bacterial communities from *C. rubrum* (Figures 2 and 3). It is worth noting that these TRFs were not retrieved in profiles from *Eunicella* samples.

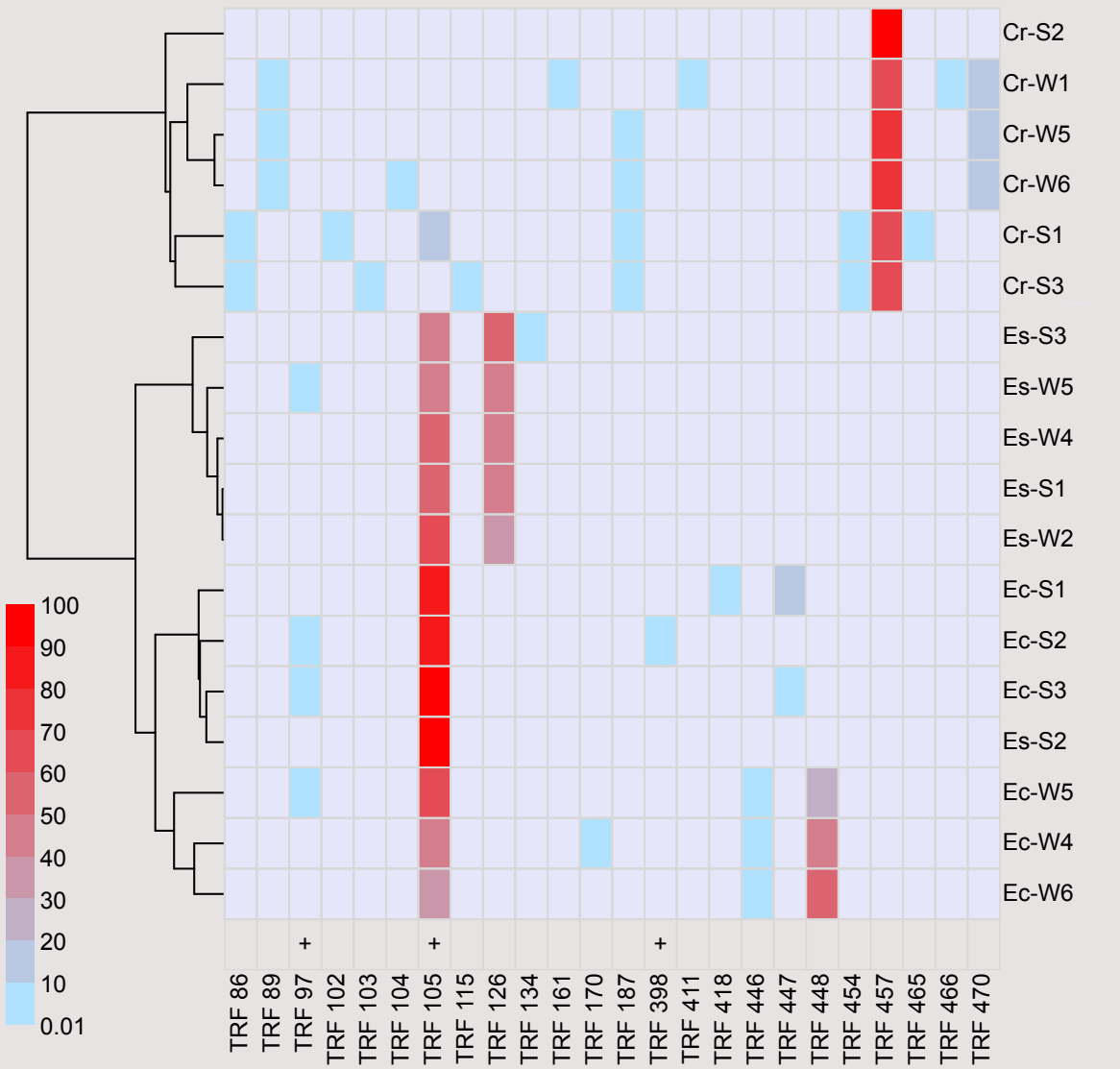


Figure 3 | Relative abundances of *Msp*I TRFs in gorgonian samples analyzed by T-RFLP. As described in Figure 2, with the restriction enzyme *Msp*I.

To examine whether the microbial communities of the three species may share any bacterial group with the previously studied sympatric gorgonian *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013), we checked for co-occurrence of TRFs between the four host species. Comparison of the TRF profiles from individual colonies of the four gorgonians species sampled in summer 2008 and winter 2009 revealed that the dominant TRFs shared by *E. singularis* and *E. cavolini*, *Cfo*I TRF-171 and

*Msp*I TRF-105, were also retrieved as the dominant TRFs in *P. clavata* communities (Figures 2 and 3). Four other TRFs (two for each enzyme) previously identified in *P. clavata* microbial assemblages were also observed in some profiles of the present study but were not consistently observed in replicate samples.

3.2. Taxonomic affiliation of associated bacteria

Because the most abundant TRFs common to both *Eunicella* spp. were only represented in summer samples of *C. rubrum*, the clone libraries were derived from gorgonian colonies collected during the summer season to identify the dominant ribotypes across the communities of the three species. A total of 408 partial 16S rRNA gene sequences were obtained from the libraries of *E. singularis* (168 clones), *E. cavolini* (126 clones) and *C. rubrum* (114 clones). The diversity of the communities was very low, as represented by the Shannon-Weaver index values (*E. singularis*: 0.34; *E. cavolini*: 0.71; *C. rubrum*: 1.33), and the rarefaction curves did not reach saturation (not shown), indicating that further sampling of clone libraries would have increased the number of observed ribotypes.

At the class level, the libraries were dominated by *Gammaproteobacteria*, which represented 92.1 to 96.8 % of the retrieved sequences (Figure 4). The remaining sequences were affiliated to *Alphaproteobacteria*, constituting 2.6 to 4.2 % of the libraries, while a small proportion (5.3 %) of the *C. rubrum* bacterial sequences could not be assigned to any phyla by the RDP database analysis. Within the *Alphaproteobacteria*, members of a variety of order (*Rhizobiales*), families (*Rhodobacteraceae*, *Erythrobacteraceae*) and genera (*Ruegeria*, *Kordiimonas*) were identified but none of these bacterial groups were shared between the gorgonian species. In contrast, we found that most of the *Gammaproteobacteria* sequences (86 to 100 %) in *E. cavolini* and *E. singularis* libraries were affiliated to the *Hahellaceae* family within the *Oceanospirillales* order. A small proportion (9.5 %) of *Hahellaceae* members was also identified among the *Gammaproteobacteria* from the *C. rubrum* bacterial assemblages, while the large majority (81.9 %) of the sequences within this class was not affiliated at a lower taxonomic level in that host species (Figure 4). Representative sequences of *Vibrio*, *Shewanella* and *Neptunomonas* spp. were also found in the *C. rubrum* library, accounting for 1.9 to 4.8 % of the *Gammaproteobacteria* (Figure 4). Noticeably, most of the bacterial sequences from the three gorgonians were related to marine invertebrate-associated bacteria.

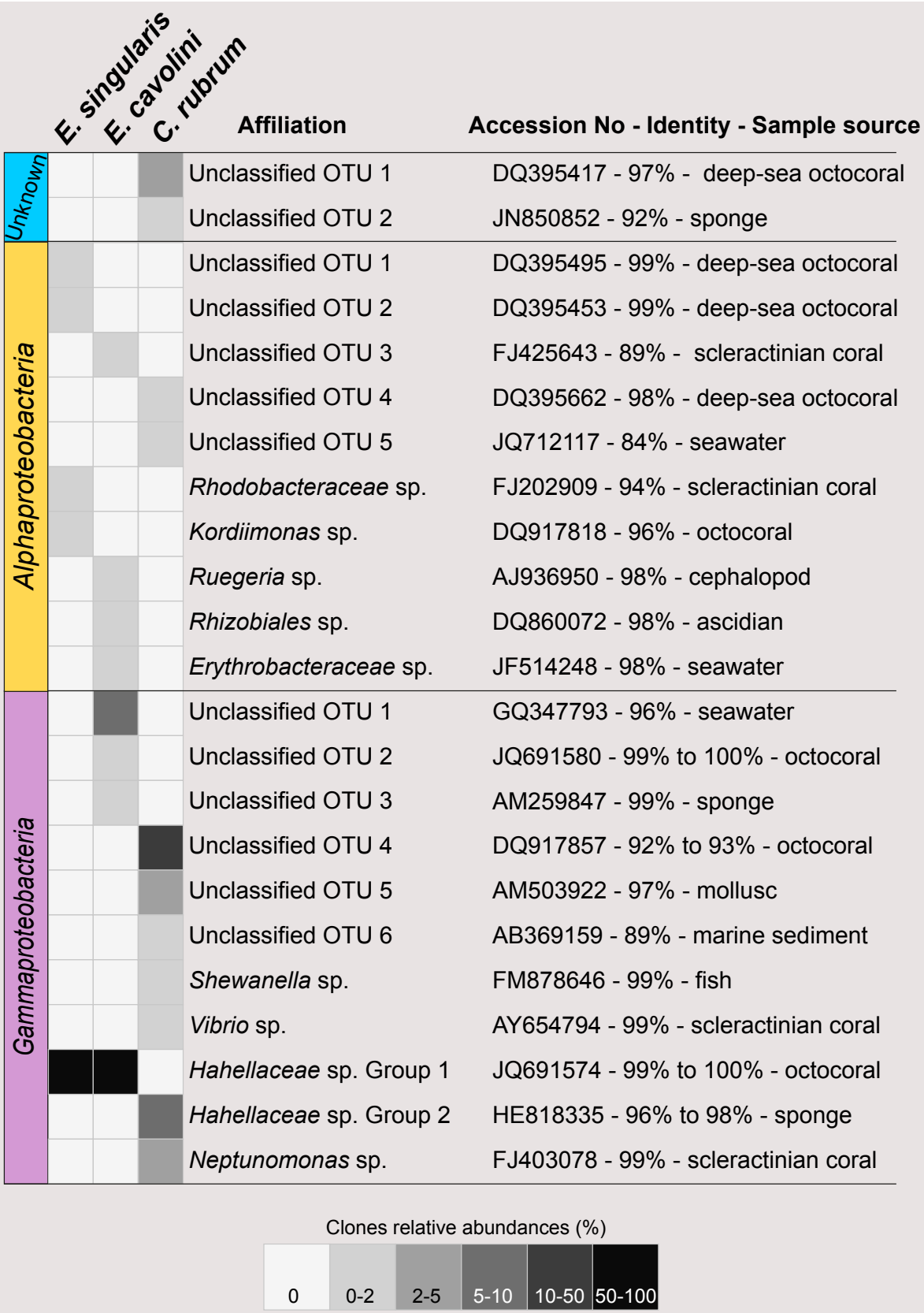


Figure 4 | Taxonomic affiliations and relative abundances of bacterial groups from gorgonian clone libraries.
Sequences were grouped at the genera and class level. The filling colors represent the relative abundances of each taxonomic group in the clone libraries according to the range presented in the color key. OTUs represent clusters of sequences that share >97 % sequence identity. The accession number of the closest sequence match in GenBank and the corresponding sample source are indicated for each group.

In order to further identify the taxonomic relations between the bacteria of the three gorgonian species, a phylogenetic analysis was performed on the pooled set of sequences from the three libraries (n=408). As expected from the bacterial lineages identified above, the main clusters corresponded to the *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* (Figure 5). Within *Gammaproteobacteria,* the largest cluster encompassed all the *Hahellaceae* sequences from *E. singularis* and *E. cavolini*, which grouped very tightly. Pairwise comparisons showed low levels of divergence (<1.9 %) among the 16S rDNA sequences from this cluster. According to BLAST analysis, the closest relatives were uncultured *Hahellaceae* related to *Endozoicomonas* spp. that have been retrieved from *P. clavata* (>94.3 % identity) (La Rivière *et al.*, 2013) and the Caribbean gorgonian *Gorgonia ventalina* (>96.5 % identity) (Sunagawa *et al.*, 2010). Notably, an almost perfect identity (>98.5 to 100 %) was found with a set of sequences recently isolated from a geographically distant population of *E. cavolini* (Bayer *et al.*, 2013). *Hahellaceae* sequences from *C. rubrum* were less tightly grouped, in agreement with a lower identity level within this group (>94.4 %). Most of the *C. rubrum*-associated *Gammaproteobacteria* formed one single cluster of highly similar sequences sharing >99.1 % of identity (Figure 5).

In silico digestions by *Cfo*I and *Msp*I of the 266 *Hahellaceae*-related sequences from *E. singularis* and *E. cavolini* predicted two unique TRFs matching the calculated size of the respective TRFs from the dominant *Hahellaceae* ribotype in *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013). These TRFs corresponded to the dominant peaks observed in the T-RFLP profiles of both *Eunicella* species (*Cfo*I TRF-171 and *Msp*I TRF-105; Figures 2 and 3). Eight of the ten *Hahellaceae*-affiliated sequences from *C. rubrum* library were also predicted to generate the same TRFs, in agreement with their detection in some summer profiles, while the dominant *Cfo*I TRF-534 and *Msp*I TRF-457 matched the predicted size for the TRFs of the dominant *Gammaproteobacteria* ribotype in this species. Noticeably, the *Cfo*I TRF-125 and *Msp*I TRF-126 retrieved in most of the *E. singularis* profiles could not be attributed to one of the identified group of bacterial sequences, suggesting a lack of recovery of the corresponding 16S rRNA gene in the library, possibly due to inefficient cloning of this specific ribotype.

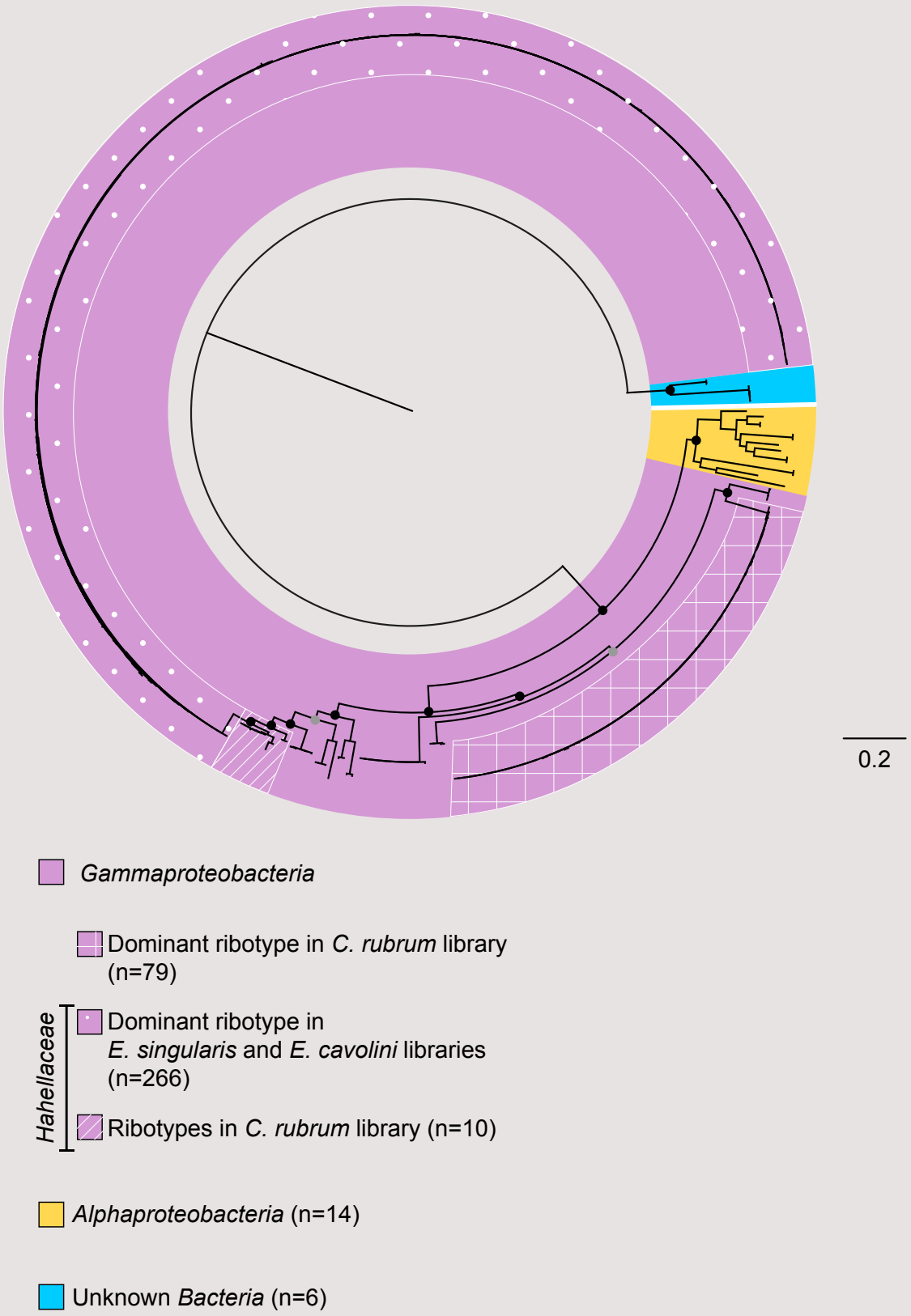


Figure 5 | Phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequences isolated from *E. singularis*, *E. cavolini* and *C. rubrum*.
Taxonomic affiliations at the class level are shown by the different colored sectors of the circular tree. Branch points with support values >50 % or >75 % are indicated by grey and black circles, respectively. The *Archaea Sulfolobus acidocaldarius* U05018 was used as an outgroup. Scale bar represents 0.2 changes per nucleotide.

3.3. Phylogenetic comparison of *Hahellaceae* bacteria from different gorgonian host species

To better understand the relationship between the diversity of *Hahellaceae*-related bacteria and the different lineages of their gorgonian hosts, we compared the phylogenetic positions of 16S rDNA sequences isolated from *E. singularis*, *E. cavolini* and *C. rubrum* (this study), *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013), and the tropical species *G. ventalina* (Sunagawa *et al.*, 2010). This latter species was included in our analysis because *Hahellaceae*-related bacterial sequences constitute the most abundant component of its associated community and they represent the only available full-length 16S rDNA sequences from a tropical gorgonian in database. Among the bacterial sequences of *G. ventalina* deposited in GenBank (n=211), we identified a subset of 71 16S rRNA gene sequences of *Hahellaceae*-related bacteria, sharing >99.3 % identity, that we included in the phylogenetic analysis. The closest related sequences for cultivated type strains within the *Hahellaceae* family (*Endozoicomonas elysicola* MKT110 (AB196667), *Endozoicomonas montiporae* CL-33 (FJ347758), *Endozoicomonas numazuensis* HC50 (AB695088) and *Spongiobacter nickelotolerans* (AB205011) were also considered in the computed tree shown in Figure 6.

Three well-supported monophyletic clusters consisting of *Hahellaceae* sequences were recovered: a large cluster including all the sequences from the congeneric species *E. singularis* and *E. cavolini*, and two other clusters corresponding to the sequences from *P. clavata* and *G. ventalina* (Figure 6). The sequences recovered from *C. rubrum* formed a distinct cluster with *Endozoicomonas* and *Spongiobacter* bacterial strains isolated from other marine invertebrates. Remarkably, the phylogenetic clustering of *Hahellaceae*-affiliated sequences corresponded precisely with the systematic classification of the five gorgonian hosts (Bayer, 1981; Daly *et al.*, 2007). *C. rubrum* is a member of the Corallidae family within the Scleraxonia suborder, while the four other species are members of the Holaxonia suborder. Within this lineage, *E. singularis, E. cavolini* and *G. ventalina* belong to the Gorgoniidae family, while *P. clavata* is a member of the Plexauridae family.

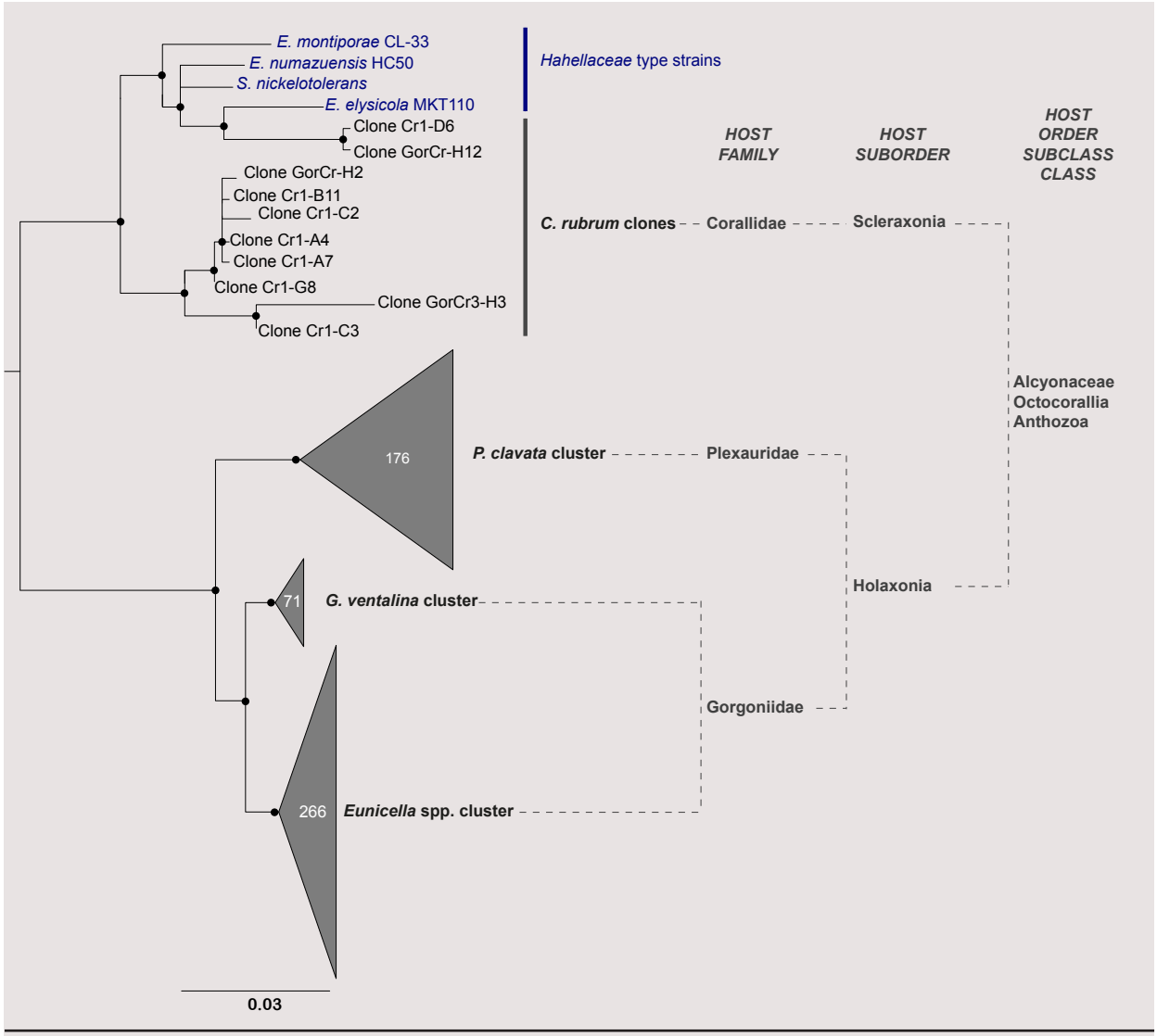


Figure 6 | Phylogenetic relationships among the *Hahellaceae*-affiliated bacteria of different gorgonian host species.
Maximum likelihood tree based on the 16S rRNA gene sequences filtered to ~750 aligned nucleotide positions. The classical taxonomic affiliation is indicated for each gorgonian species. The phylogenetic position of the closest cultured relatives within the *Hahellaceae* bacterial family is shown. Branch points with support values >75 % are indicated by black circles. The *Gammaproteobacteria Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was used as an outgroup and scale bar represents 0.03 changes per nucleotide.

4. DISCUSSION

This study provides the first inter-comparison of the bacterial communities of sympatric gorgonian species in the northwestern Mediterranean. The analysis of the T-RFLP fingerprint data indicated that the dominant bacterial groups associated with *E. singularis*, *E. cavolini* and *C. rubrum* are conserved between individual colonies and are maintained throughout the seasons. Analysis of 16S rDNA clone libraries revealed a high relative abundance of *Gammaproteobacteria*-affiliated sequences, representing 92.1 to 96.8 % of the libraries constructed for the 3 species. This is consistent with the observed predominance of *Gammaproteobacteria* in the microbial

community of a variety of hard and soft corals (Rohwer *et al.*, 2002; Bourne and Munn, 2005; Webster and Bourne, 2007; Lee *et al.*, 2012). A small number of *Alphaproteobacteria* sequences were also retrieved from all gorgonians while the remaining sequences could not be affiliated to any described bacterial phylum.

Bacterial assemblages associated with *E. singularis* and *E. cavolini* were largely dominated by members of a specific group affiliated to the *Hahellaceae* family of the *Oceanospirillales* order. A small number of sequences belonging to this bacterial group also occurred in *C. rubrum* library. Accordingly, the TRFs corresponding to this cluster of 16S rRNA sequences were observed in all the *Eunicella* spp. sample profiles and some of the *C. rubrum* profiles. The *C. rubrum* library was dominated by a distinct unclassified *Gammaproteobacteria* ribotype that was not detected in the *Eunicella* communities.

Remarkably, the closest relatives of the *Hahellaceae* bacteria associated with the two *Eunicella* spp. and *C. rubrum* were found in the microbiota of two other gorgonians, the sympatric species *P. clavata* (La Rivière *et al.*, 2013) and the Caribbean species *G. ventalina* (Sunagawa *et al.*, 2010). In addition, the *Hahellaceae* ribotypes of *E. cavolini* were highly similar (>99 % identity) to those retrieved from this gorgonian species sampled in a remote Mediterranean site (Bayer *et al.*, 2013), thus corroborating a consistent bacterial-host association. All together, the *Hahellaceae*-related bacteria associated with the five gorgonian species shared >95 % of sequence identity (except few of the *C. rubrum* ribotypes with a slightly lower similarity level). The closest cultivated bacterial strains were *Endozoicomonas* and *Spongiobacter* spp. with >92 % identity to this group, a significant but insufficient similarity level to tentatively classify the gorgonian associates in one of these bacterial genus. Thus, the *Hahellaceae* ribotypes revealed in this study may be considered as members of a unique, yet undescribed bacterial genus.

In the last few years, members of *Hahellaceae* have been detected in many coral species worldwide and they have been described as a major component of the associated communities in several of them (Hansson *et al.*, 2009; Kvennefors *et al.*, 2010; Mouchka *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Morrow *et al.*, 2012; Speck and Donachie, 2012; Bayer *et al.*, 2013). However, the relationship between the genetic diversity of this bacterial group and host specificity across different coral lineages has not been investigated yet. The phylogenetic analysis of the sequences retrieved from the four Mediterranean species (*E. singularis, E. cavolini*, *C. rubrum* and

P. clavata) and from the tropical gorgonian *G. ventalina* revealed that *Hahellaceae*-related ribotypes formed distinct monophyletic clusters in relation with their respective host, i.e. the sequences from one gorgonian genus or species clearly clustered together. The two congeneric species *E. cavolini* and *E. singularis* harbored *Hahellaceae* from a same bacterial cluster, suggesting that common selection factors might promote or maintain a conserved association at the host-genus level. Unexpectedly, the *Eunicella*-associated sequences were more closely related to those isolated from *G. ventalina* than to *Hahellaceae* sequences recovered from the sympatric species *P. clavata* and *C. rubrum*. This further strengthens the idea that host-dependent mechanisms are acting to select specific components of the gorgonian microbiota regardless of the geographic vicinity (La Rivière *et al.*, 2013). It is therefore conceivable that the distinct phylotypes of *Hahellaceae* may represent specialized, host-adapted symbiont clades. Moreover, the *Hahellaceae* ribosomal sequences formed monophyletic lineages that apparently correspond with the traditional systematic division of their hosts (Bayer, 1981; Daly *et al.*, 2007), suggesting the potential evolution of a long-term association between the gorgonians and this group of bacteria. Because many aspects of the octocoral phylogeny remain unresolved, including the arrangement of the Plexauridae and Gorgoniidae families containing most of the studied species (Sanchez *et al.*, 2003; Wirshing *et al.*, 2005), this similarity between host classification and bacterial clustering pattern must be cautiously interpreted. However, the tree topology of gorgonian-associated *Hahellaceae* is consistent with the data from a preliminary molecular phylogeny of the five host species considered in our study (Ledoux, 2010).

Different scenarios are possible for the observed convergence between the partitioning of *Hahellaceae* phylotypes and their gorgonian hosts. The vertical transmission of bacterial communities to offspring can generate evolutionary co-adaptation in symbiosis partners. This has been observed in various marine invertebrate-bacterial associations including sponges, bryozoans and bivalves, and several studies indicate that specific bacterial symbionts may have co-evolved with their hosts (Erpenbeck *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004; Roeselers and Newton, 2012). To date, however, no evidence of vertical bacterial transfer from gorgonian colonies to their offspring has been reported, and bacteria could not be detected in *P. clavata* oocytes by FISH observations (La Rivière *et al.*, in prep; Chapter 3). Consistently, this mode of bacterial transmission via gametes was investigated for several spawning coral species (Apprill *et al.*, 2009; Sharp *et al.*, 2010), and

the resulting data suggested that these corals acquire their associated bacteria by horizontal uptake from the surrounding seawater. In contrast, the brooding coral *Porites astreoides* vertically transmits certain bacteria to its offspring (Sharp *et al.*, 2012). Future studies of the onset of bacterial associations in the brooding species *E. singularis, E. cavolini* and *C. rubrum* (Vighi, 1972; Weinberg and Weinberg, 1979), and the spawning species *P. clavata* (Coma *et al.*, 1995) will help our understanding of the interaction of *Hahellaceae* symbionts with the holobiont and their potential vertical inheritance. Interestingly, a recent report highlighted that both spawning and brooding coral species may release bacteria in the water column during reproduction, that might be taken up by their larvae (Ceh *et al.*, 2013). Thus, the intergenerational transfer of stable bacterial associates could rely on other mechanisms than vertical transmission in coral holobionts.

Considering the possibility that gorgonian corals reacquire their respective *Hahellaceae* symbionts from the environment at each generation, robust selection mechanisms have to be involved to drive such level of host-specificity. Assuming that symbionts recruitment might be based on niche selection, it can be hypothesized that some variations in physiological or metabolic properties between related gorgonian hosts result in the uptake of distinct *Hahellaceae* bacterial lineages from the surrounding environment. These *Hahellaceae* phylogenetic groups may represent bacterial ecotypes that are specifically adapted to their respective host species and have evolved under their selection pressure. The evolutionary adaptation to the gorgonian environment may have resulted in functional divergence between closely related *Hahellaceae* phylotypes that could explain their specific distribution. This hypothesis of horizontal acquisition and high specificity of symbionts recruitment is compatible with the resilience of the *Hahellaceae*-dominated communities associated with *P. clavata* following a deep compositional shift observed during a particular summer (La Rivière *et al.*, 2013). Indeed, after a transient shift toward a completely distinct bacterial community, the original *Hahellaceae*-dominated assemblage was restored and only comprised the *P. clavata*-specific ribotype lineage.

Although the observation that the phylogeny of *Hahellaceae* symbionts parallels the systematic division of gorgonian hosts is consistent with the possibility of a shared evolutionary history between holobiont components, there are many ways that this congruent pattern could be produced (Page and Charleston, 1998) and we do not currently have sufficient evidence to exclude that it could arise by chance. In any case, it likely indicates a prevailing impact of host-

dependent factors in selecting the genetic diversity of symbiont and acting as host species barrier between gorgonian taxa. Such mechanisms that could mediate interdependent and complex interactions within the gorgonian holobionts are almost entirely unknown. Future studies to unravel the basis of this intimate pattern of relationships between *Hahellaceae* and gorgonians should include a large biogeographic sampling of different gorgonian lineages, the construction of robust host phylogenies, and the analysis of the functional profiles of *Hahellaceae* associates.

Chapitre VI

Conclusion générale et Perspectives

Ce travail a porté sur la description du compartiment microbien de la gorgone rouge *Paramuricea clavata* en Méditerranée nord-occidentale par différentes approches moléculaires. Les résultats de cette thèse ont permis d'établir que, comme de nombreuses espèces de coraux appartenant à la même classe des Anthozoaires, *P. clavata* doit être considérée comme un organisme holobionte au sein duquel hôte et microbiote (en particulier les bactéries dans le cadre de cette étude) vivent en étroite association et forment un ensemble fonctionnel et interactif.

1. SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

La première partie de cette thèse a été dédiée à la caractérisation des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge dans leur état dit « naturel », c'est-à-dire en l'absence apparente de perturbations environnementales, et à l'évaluation de leur variabilité spatio-temporelle par la comparaison d'échantillons provenant de trois localités différentes du bassin méditerranéen nord-occidental prélevés en été et en hiver durant quatre ans. Des données préliminaires antérieures à cette thèse et acquises par analyse en DGGE avaient permis d'observer que les communautés bactériennes associées à *P. clavata* étaient différentes de celles de l'eau de mer environnante et conservées entre différents échantillons d'une même colonie, et entre échantillons provenant d'individus différents d'une même population. La DGGE présentant de nombreuses limites pour la comparaison d'échantillons multiples, les techniques de T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) et de séquençage de banques de clones d'ADN ribosomique 16S ont été utilisées. Ces analyses ont permis de mettre en évidence la présence d'un ribotype bactérien affilié à la famille des *Hahellaceae* (classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Oceanospirillales*), très largement dominant dans tous les échantillons analysés, sans distinction de leur site d'origine ou saison d'échantillonnage, à l'exception des communautés associées aux gorgones échantillonnées en été 2007. Lors de cet été particulier, les communautés bactériennes ont subi un changement drastique de composition se traduisant par la disparition du ribotype *Hahellaceae* (non détecté par les techniques utilisées) et la dominance d'un ribotype affilié à la famille des *Paenibacellaceae* (ordre des *Firmicutes*, classe des *Bacillales*). Une augmentation de la diversité de séquences bactériennes a également été observée par l'analyse des banques de clones construites à partir des échantillons d'été 2007. D'autre part, les tentatives de culture de l'*Hahellaceae* majoritaire sur des milieux non sélectifs ont échoué, et aucun signal de présence d'*Archaea* dans le microbiote

de la gorgone n'a pu être détecté, bien que leur recherche soit restée préliminaire. La persistance du ribotype *Hahellaceae* dominant les assemblages bactériens, et l'observation d'une résilience de ces communautés après une modification profonde de leur composition, nous ont permis de conclure à une association forte et spécifique entre *P. clavata* et cette espèce bactérienne. Récemment, plusieurs cas d'associations entre différentes espèces de coraux et des bactéries appartenant à l'ordre des *Oceanospirillales* ont été décrits, ce qui suggère un rôle particulier de ces microorganismes pour le fonctionnement de l'holobionte.

La recherche de la localisation des bactéries au sein des tissus de l'hôte par CARD-FISH a permis de mettre en évidence la présence d'agrégats bactériens dans les anthocodias qui correspondent à la région distale du polype comprenant la bouche et les tentacules. Ces observations ont également conclu à une faible quantité de bactéries dans les tissus de la gorgone rouge, pouvant expliquer la difficulté de mise au point des différents protocoles d'analyses moléculaires pour les détecter. L'identification taxonomique de ces structures n'a pas pu être entreprise, mais leur forme et taille concordent avec des agrégats de gammaprotéobactéries précédemment observés chez des coraux tropicaux. De plus, aucune autre structure bactérienne n'ayant été détectée dans les coupes de tissus, et considérant la prédominance des *Hahellaceae* dans les communautés de *P. clavata*, ces agrégats pourraient correspondre à ces microorganismes majoritaires. L'étude microscopique des coupes de *P. clavata* a également permis de fournir la première description de l'organisation structurale des tissus de ce gorgonaire.

Suite à la caractérisation de la diversité bactérienne naturelle associée à *P. clavata*, l'évaluation de la composition des communautés en conditions de stress a été entreprise par T-RFLP afin d'estimer la réponse du compartiment bactérien à des perturbations. L'analyse d'échantillons issus d'une population de gorgones subissant une mortalité *in situ* et de colonies soumises à des stress thermiques a révélé une étonnante stabilité des associations gorgone-*Hahellaceae* quel que soit le stress subi par l'hôte. Ces analyses ont également permis de révéler que des fragments issus de colonies de gorgone présentant des tissus nécrosés pouvaient héberger une diversité bactérienne différente du patron de composition des communautés « naturelles », probablement par l'installation de bactéries opportunistes.

Enfin, face à l'apparente stabilité des associations gorgone rouge-*Hahellaceae* et à l'observation de ribotypes bactériens similaires chez des coraux éloignés aussi bien géographiquement que

phylogénétiquement, l'identification des espèces bactériennes majoritaires chez trois espèces de gorgonaires sympatriques (*Eunicella singularis, Eunicella cavolini* et *Corallium rubrum*) a été entreprise. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de ribotypes *Hahellaceae* associés à chaque espèce hôte et dominant les communautés bactériennes des deux espèces congénériques *E. singularis* et *E. cavolini*. De plus, la phylogénie des séquences de *Hahellaceae* issues de ces trois gorgonaires, ainsi que de *P. clavata* et de l'espèce tropicale *Gorgonia ventalina*, a révélé que les *Hahellaceae* forment des clades distincts pour chaque hôte. Plus intriguant encore, la répartition phylogénétique des clades *Hahellaceae* correspond à la proximité taxonomique des espèces hôtes. Ces résultats confirment l'existence d'associations bactériennes hôtes-spécifiques chez les gorgonaires, ce qui suggère l'intervention de mécanismes importants de sélection et/ou co-adaptation entre partenaires.

2. PROPOSITIONS D'ALTERNATIVES TECHNIQUES ET PERSPECTIVES

Ce travail a nécessité de nombreuses mises au point techniques afin d'adapter des protocoles d'analyses classiquement utilisés en microbiologie à de nouveaux organismes modèles. Malgré tout, certaines limites inhérentes aux méthodes choisies et au type d'échantillons ont été rencontrées. En effet, la difficulté principale de l'étude d'un compartiment microbien au sein d'un organisme eucaryote par des méthodes basées sur l'analyse des acides nucléiques tient au fait que les ADN d'intérêt représentent une fraction mineure des ADN totaux, et sont donc difficilement détectables et amplifiables. De plus, certains métabolites ou composants des tissus de l'hôte tendent à inhiber les réactions moléculaires mises en jeu lors des analyses. Bien que les techniques utilisées dans ce travail soient suffisamment robustes pour réaliser une analyse comparative des communautés bactériennes d'un grand nombre d'échantillons – dans le cas de la T-RFLP- et pour identifier les espèces clés associées – dans le cas de la construction de banques de clones ADNr 16S-, l'utilité de ces méthodes pour une analyse quantitative est limitée. En effet, les biais inhérents à l'extraction ADN et l'amplification PCR affectent les analyses, et la proportion de chaque ribotype observé (par son TRF ou sa séquence ADNr 16S) reflète plus l'abondance de produits d'amplification PCR que l'abondance précise des gènes dans l'environnement naturel. Ainsi, la T-RFLP couplée à l'analyse de banques de clones ne permettent de détecter que la diversité des principaux ribotypes bactériens dans une communauté complexe. Cependant, la caractérisation de la diversité des

communautés grâce à ces techniques est une étape indispensable pour discriminer des groupes bactériens particuliers au sein d'assemblages complexes, permettant ensuite l'analyse fine et ciblée de la composition en espèces par des techniques quantitatives non applicables pour l'étude comparée de grandes séries d'échantillons.

La standardisation de la quantité de matériel bactérien analysé étant peu accessible dans le cas d'un mélange d'acides nucléiques d'origines procaryotes et eucaryotes, le recours à des techniques quantitatives serait souhaitable afin de suivre les variations d'abondance des espèces présentes, y compris celles des ribotypes minoritaires de la communauté bactérienne. Par exemple, l'utilisation d'approches métagénomiques par séquençage en masse permettrait vraisemblablement d'identifier la totalité des ribotypes bactériens présents dans les échantillons. L'analyse par PCR quantitative (qPCR, ou PCR en temps réel) permettrait quant à elle de suivre les variations d'abondance de ribotypes bactériens d'intérêt, sous réserve de validation d'une gamme étalon d'ADN de concentrations connues. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'application de ces techniques à un modèle holobionte est difficile du fait de la proportion majoritaire d'ADN provenant de l'hôte dans les échantillons. Le recours à des protocoles d'enrichissement ou de purification de la fraction bactérienne permettant de mieux discriminer les acides nucléiques d'origine procaryote de ceux d'origine eucaryote pourrait également présenter une alternative intéressante au protocole d'extraction mis au point dans ce travail afin de permettre l'amplification de plus nombreuses espèces bactériennes.

De nouvelles tentatives de cultures des *Hahellaceae* associées aux gorgones devront être effectuées. L'isolement de souches cultivables permettrait non seulement de les utiliser comme standard en PCR quantitative, mais aussi d'investiguer les interactions ou antagonismes possibles entre ces *Hahellaceae* et des pathogènes comme *Vibrio coralliilyticus*, et enfin de décrire les capacités métaboliques de l'espèce bactérienne.

Plus généralement, l'utilisation de techniques de transcriptomique et de protéomique pour l'analyse fonctionnelle des communautés bactériennes permettrait d'accéder à des informations essentielles pour la compréhension des interactions hôte-bactéries et l'identification du rôle potentiel des symbiotes bactériens dans le fonctionnement de l'holobionte.

Alors que ce travail a permis d'identifier des associations très spécifiques entre les gorgonaires et au moins un de leurs symbiotes bactériens, l'exploration de nouveaux axes de recherche

permettrait de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les interactions existantes entre ces partenaires et leur régulation.

L'évaluation des mécanismes d'acquisition et de transmission des bactéries apporterait des connaissances précieuses pour comprendre quand et comment les associations hôte-bactéries sont mises en place au sein de l'holobionte, et permettrait de formuler des hypothèses quant à l'histoire évolutive de la symbiose. La détermination des modes de transmission des symbiotes bactériens est requise pour établir les scenarios évolutifs qui pourraient intervenir dans ces associations. La transmission verticale, c'est-à-dire la transmission d'une génération à l'autre par l'intermédiaire des gamètes, pourrait être recherchée par une approche comparative des communautés bactériennes associées à différents stades de maturation des gamètes entre des espèces se reproduisant par fécondation interne (*E. singularis*, *E. cavolini* et *C. rubrum*) et une espèce se reproduisant par fécondation externe (*P. clavata*). Le suivi de la colonisation des niches bactériennes après expulsion des œufs (dans le cas d'hôtes à fécondation externe) et/ou lors du développement des larves après expulsion par les colonies mères ainsi qu'après recrutement sur le substrat pourrait permettre de distinguer une éventuelle transmission horizontale (d'un individu à l'autre) ou latérale (à partir de l'environnement). La détermination robuste de la phylogénie des gorgonaires sera également nécessaire à l'établissement de l'histoire évolutive des associations entre gorgonaires et bactéries.

Les compartiments hôte et bactéries de l'holobionte apparaissent intimement liés et ces associations symbiotiques sont très probablement régies et influencées par différents facteurs. Ainsi, les études ne considérant que l'un ou l'autre des partenaires, ou un nombre limité de paramètres analysés risquent de négliger des processus clés du fonctionnement de l'holobionte. C'est pourquoi des expérimentations combinant des approches pluridisciplinaires et multifactorielles, prenant en compte la gorgone et son microbiote, seront nécessaires pour progresser dans la compréhension des mécanismes d'interactions symbiotiques. Par exemple, la caractérisation de facteurs de l'hôte influant sur les fonctions et/ou la composition du microbiote associé ne pourra se faire que par de telles approches intégratives. Il serait par exemple intéressant d'observer la réponse des communautés bactériennes à des expériences couplées de stress thermique et d'infection par le pathogène *Vibrio coralliilyticus*. Ce type d'expérimentation permettrait d'évaluer la stabilité des symbiotes face à une infection bactérienne chez un holobionte affaibli par la température

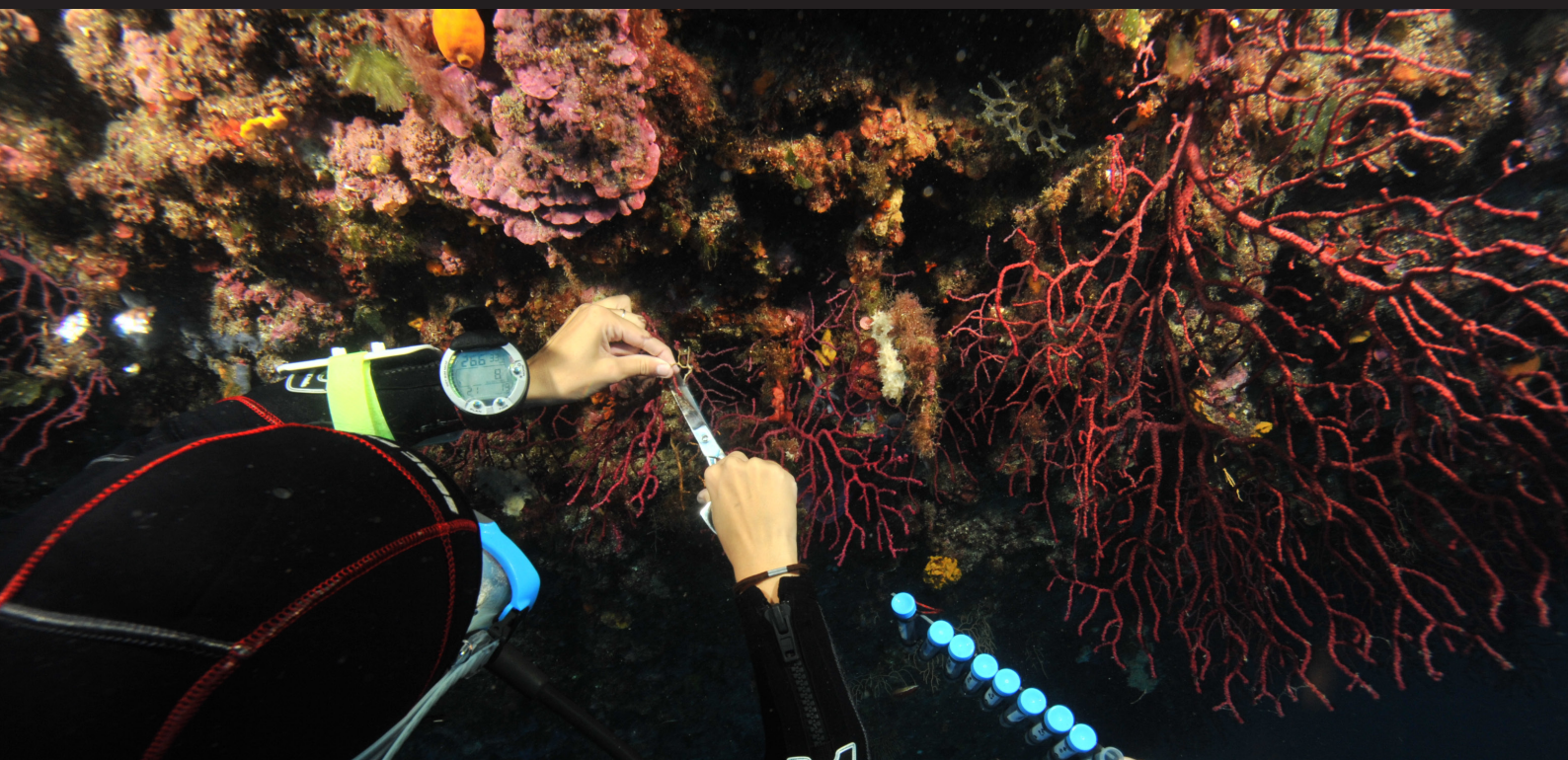
et permettrait d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors de l'installation de ce pathogène (compétition de niches ou opportunisme).

Une spécificité étroite et stable entre gorgone et bactéries, telle que celle observée entre les différentes espèces de gorgonaires et les *Hahellaceae*, implique l'existence de mécanismes de sélection des partenaires bactériens par l'holobionte. L'approche de ces mécanismes est complexe mais différentes démarches expérimentales permettraient de mieux évaluer les processus impliqués. Premièrement, l'étude de la résilience des communautés bactériennes, définie comme le retour à l'état naturel de leur composition après une perturbation naturelle ou artificielle, serait importante. Il apparaît également indispensable d'évaluer la résilience des communautés dans chaque expérience de stress qui pourrait être mise en place. Deuxièmement, il serait intéressant d'évaluer les éventuelles successions microbiologiques qui interviennent lors de l'acquisition des symbiotes bactériens par les gorgones. On pourrait par exemple étudier *in situ* la colonisation des niches bactériennes de larves et/ou de colonies adultes de gorgones préalablement rendues axéniques par des traitements antibiotiques. On pourrait également imaginer des expérimentations *in vitro*, dans différentes conditions d'eau de mer stérile ou non, mettant en contact des individus d'une espèce de gorgone rendus axéniques avec ceux d'une autre espèce afin d'observer si la colonisation par le ribotype *Hahellaceae* d'un autre hôte est possible. La compréhension de ces phénomènes bénéficierait grandement à la connaissance des processus de sélection des partenaires bactériens existant au sein de l'holobionte et permettrait de formuler des hypothèses quant au rôle fonctionnel des symbiotes.

L'apparente stabilité des associations gorgone-*Hahellaceae* dans des conditions de stress conduisant à la détérioration physique de l'hôte semble exclure la possibilité d'utiliser les communautés bactériennes associées comme un bio-indicateur de l'état de santé des gorgones. Cependant, il serait important d'évaluer les effets de la composition bactérienne du milieu environnant sur la communauté associée aux gorgones *in situ*. Pour cela, la comparaison du microbiote de gorgones vivant dans des sites plus ou moins eutrophisés ou pollués, dont les compositions bactériennes de l'eau de mer diffèrent significativement, pourrait permettre d'évaluer les impacts de la qualité de l'environnement sur l'holobionte et la nécessité de leur prise en considération pour la conservation des espèces.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'initier la connaissance du compartiment bactérien de l'holobionte *P. clavata*. Ces éléments et les différents outils mis au point pourront être intégrés à de futures recherches sur la caractérisation d'autres gorgonaires holobiontes méditerranéens et sur le rôle des associations symbiotiques dans la santé de populations de plus en plus menacées par les changements environnementaux en cours.

Annexes



ANNEXE 1

La Rivière M., Roumagnac M., Garrabou J., Bally M., 2013. Transient shifts in bacterial communities associated with the temperate gorgonian *Paramuricea clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea. *PLoS One*, 8 (2): e57385.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Transient Shifts in Bacterial Communities Associated with the Temperate Gorgonian *Paramuricea clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea

Marie La Rivière[1], Marie Roumagnac[1], Joaquim Garrabou[1,2], Marc Bally[1]*

1 Mediterranean Institute of Oceanography (MIO) UM 110, CNRS/INSU, IRD, Aix-Marseille Université, Université du Sud Toulon-Var, Marseille, France, **2** Institut de Ciències del Mar (ICM), CSIC, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Bacterial communities that are associated with tropical reef-forming corals are being increasingly recognized for their role in host physiology and health. However, little is known about the microbial diversity of the communities associated with temperate gorgonian corals, even though these communities are key structural components of the ecosystem. In the Northwestern Mediterranean Sea, gorgonians undergo recurrent mass mortalities, but the potential relationship between these events and the structure of the associated bacterial communities remains unexplored. Because microbial assemblages may contribute to the overall health and disease resistance of their host, a detailed baseline of the associated bacterial diversity is required to better understand the functioning of the gorgonian holobiont.

Methodology/Principal Findings: The bacterial diversity associated with the gorgonian *Paramuricea clavata* was determined using denaturing gradient gel electrophoresis, terminal-restriction fragment length polymorphism and the construction of clone libraries of the bacterial 16S ribosomal DNA. Three study sites were monitored for 4 years to assess the variability of communities associated with healthy colonies. Bacterial assemblages were highly dominated by one *Hahellaceae*-related ribotype and exhibited low diversity. While this pattern was mostly conserved through space and time, in summer 2007, a deep shift in microbiota structure toward increased bacterial diversity and the transient disappearance of *Hahellaceae* was observed.

Conclusion/Significance: This is the first spatiotemporal study to investigate the bacterial diversity associated with a temperate shallow gorgonian. Our data revealed an established relationship between *P. clavata* and a specific bacterial group within the *Oceanospirillales*. These results suggest a potential symbiotic role of *Hahellaceae* in the host-microbe association, as recently suggested for tropical corals. However, a transient imbalance in bacterial associations can be tolerated by the holobiont without apparent symptoms of disease. The subsequent restoration of the *Hahellaceae*-dominated community is indicative of the specificity and resilience of the bacteria associated with the gorgonian host.

Citation: La Rivière M, Roumagnac M, Garrabou J, Bally M (2013) Transient Shifts in Bacterial Communities Associated with the Temperate Gorgonian *Paramuricea clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea. PLoS ONE 8(2): e57385. doi:10.1371/journal.pone.0057385

Editor: Fabiano Thompson, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Received October 31, 2012; **Accepted** January 21, 2013; **Published** February 20, 2013

Copyright: © 2013 La Rivière et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French National Agency for Research (ANR; http://www.agence-nationale-recherche.fr/en/) (MEDCHANGE ANR Project) and the Total Foundation (http://fondation.total.com/) (MAGIC3 Project; http://www.magic3-project.com). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: marc.bally@univ-amu.fr

Introduction

The interactions between microbial communities and sessile marine invertebrates such as sponges or corals are increasingly recognized as a critical component of the overall biology of these organisms. Recent research on the microbiology of scleractinian corals has demonstrated close relationships between the hexacoral animal and numerous prokaryotic organisms, and studies on coral reef ecosystems should consider the coral host with its associated microbiota as a unique evolutionary unit termed the "holobiont" [1–3]. Corals harbor highly diverse bacterial communities, and several reports have highlighted the existence of specific coral-bacteria associations that are mostly maintained among colonies from the same locality or even across distinct geographical locations [2,4–7]. These bacterial assemblages may play important roles in the host's physiology, mainly through their functions in nutrient cycling and health status [8]. In particular, there is increasing evidence for a relationship between coral-associated bacteria and disease resistance, which is likely the result of antibiotics produced by the resident microbiota and/or niche competition with potential pathogens [1,9,10].

In contrast to scleractinian reef-forming corals, information on the microbial diversity associated with gorgonians (octocorals) is limited. A few studies have investigated bacterial associations with tropical or cold-water species [11–13], but to our knowledge, the bacterial diversity of shallow temperate octocorals has not yet been explored. In the Northwestern (NW) Mediterranean Sea, gorgonians play an important ecological role in highly diverse coralligenous outcrops [14]. During the last few decades, coralligenous benthic invertebrates have suffered from large-scale

disease and mortality [15–18]. These events are linked to unusual positive anomalies of seawater temperature in the summer and have affected a wide range of macro-benthic species over hundreds of kilometers, from the Italian to Spanish coasts [19]. Gorgonians populations have undergone extensive damage, although differences in the degree of impact have been observed in various geographic areas.

One of the most affected species is the red gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), a long-lived, aposymbiotic colonial octocoral that is considered a key species within coralligenous assemblages [20]. During the summer mortality outbreaks, *P. clavata* colonies exhibited symptoms of necrosis that may have been caused by multiple factors acting in synergy with thermal stress, including food limitation, metabolic constraints and microbial virulence [15,21]. Colonies that were affected during mass mortality events in 2003 and 2008 harbored culturable isolates of *Vibrio coralliilyticus*, a pathogenic bacterium that can induce host tissue damage at elevated temperatures [22,23]. Members of this *Vibrio* clade were previously identified as the etiologic agents of bleaching in the Indo-Pacific coral *Pocillopora damicornis* and White Syndrome disease in other coral species, thus satisfying Koch's postulate [24,25]. This finding suggests that at least some mechanisms underlying the disease process in *P. clavata* are comparable to the mechanisms involved in tropical coral outbreaks. Several studies have concluded that coral pathogens take advantage of changes in the bacterial community structure during stressful conditions to proliferate and cause tissue damage [4,26,27]. In support of this hypothesis, compositional shifts in bacterial assemblages have been observed in diseased coral colonies [28,29]. Similarly, the recurrent disease and mortality of *P. clavata* may be promoted by a disturbance of the resident microbiota in response to anomalous high-temperature conditions during the summer.

To evaluate the contribution of microbial communities to temperate gorgonian health and disease, a detailed knowledge of the structure of the bacterial assemblages in healthy colonies is required. The objective of the present study was to provide a baseline of the bacterial communities associated with *P. clavata* populations in the NW Mediterranean basin. Given the predicted increase in extreme climatic events in this region, new mortality outbreaks are expected [30,31]. Thus, tracking potential modifications of this baseline during future high-temperature stress could greatly aid our understanding of the role of bacterial associations in maintaining gorgonian health.

In this work, we conducted a seasonal sampling over 4 years (2007–2010) in 3 distinct geographical locations separated by hundreds of kilometers (Provence, Corsican and Catalan coasts), which allowed us to characterize the bacterial communities associated with *P. clavata* and the spatiotemporal variability of their structure. Three different molecular culture-independent approaches (denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and 16S RNA gene clones library construction) were used to determine which bacteria might be conserved across geographically remote *P. clavata* populations. Our findings reveal the presence of host-specific bacterial associations in the gorgonian holobiont, although transient and reversible variations in microbiota composition were also recorded during our seasonal survey.

Materials and Methods

Ethics Statement

The sampling in the Mediterranean Sea was performed in accordance with French professional diving rules and did not involve endangered or protected species. Annual sampling permits for the site located in Riou (France) were delivered by the *Préfet de la region Provence-Alpes-Côte d'Azur*. Specific permits delivered by the *DIRM Méditerranée*, advised by the *Conseil Scientifique de la Réserve Naturelle de Scandola* and the *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya*, were obtained to sample gorgonian tissues in the marine protected areas of Scandola (Corsica) and Medes Islands (Spain). Gorgonian sampling entailed the collection of only a few centimeters of the apical part of the branches. Because gorgonians are colonial organisms, the sampling caused unnoticeable injuries that healed rapidly after the collection.

Sample collection and processing

Samples of *P. clavata* were collected from 3 sites in the NW Mediterranean Sea, Riou Island (France) (43°10.345′ N, 05°23.319′ E), Scandola (France) (42°22.793′ N, 8°33.000′ E) and Medes Island (Spain) (42°2.882′ N, 3°13.579′ E) (Figure 1), at an approximately 20 m depth in winter (January to March) and summer (June to September) from 2007 to 2010. Apical branch fragments (2 cm length) of randomly chosen, apparently healthy colonies (i.e., with no visible signs of necrosis) (n = 3) were collected using shears and placed in plastic bags underwater. Three liters of surrounding seawater were also collected in plastic bottles. The collected samples were then transferred to the Mediterranean Institute of Oceanography within 2 h (Riou site) or frozen on dry ice for subsequent transportation to the laboratory (Scandola and Medes sites).

The *P. clavata* samples were rinsed 3 times with sterile 0.22 µm-filtered seawater to remove loosely associated bacteria. Tissues were detached from the central axis and gently crushed using sterile forceps and a scalpel blade in 3 ml of sterile seawater. The tissue slurry was homogenized and aliquoted into 3 microtubes. Samples were then spun at 13,000 g, and the supernatant was removed before storing the tissue pellets at −80 °C. The surrounding seawater samples were immediately filtered through 0.22 µm Sterivex® filter units (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). The filters were stored at −80 °C for subsequent DNA extraction.

DNA extraction

Bacterial DNA in gorgonian tissue samples was extracted following the protocol of Bourne *et al.* [28]. Briefly, tissue slurries were resuspended in 0.5 ml extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA, 0.75 M sucrose) with 1 µg of salmon sperm DNA and incubated for 5 min at room temperature. Next, a lysozyme solution (75 µl of 100 $mg \cdot ml^{-1}$) was added. The samples were incubated for 1 h at 37 °C with slow agitation and submitted to 3 freeze-thaw cycles (ranging from −80 °C to 70 °C); these steps were followed by the addition of 100 µl 25% sodium dodecyl sulfate (SDS) and a further incubation of 10 min at 70 °C. The samples were digested by proteinase K (20 µl of 20 $mg \cdot ml^{-1}$) for 1 h at 37 °C with slow agitation. The tissue lysates were again submitted to 3 freeze-thaw cycles and extracted by standard phenol-chloroform DNA extraction procedures. After precipitation with 50 µl 3 M sodium acetate and an equal volume of isopropanol, the DNA was pelleted by centrifugation (16,000 g for 30 min at 4 °C), washed with cold 70% ethanol and suspended in 30 µl sterile ultra-pure water. The DNA concentration was estimated by spectrophotometry using a biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany), and the DNA samples were stored at −20 °C until further processing.

To isolate DNA from seawater samples, Sterivex® filter units were filled with 500 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1% SDS) and 12.5 µl proteinase K (20 $mg \cdot ml^{-1}$).

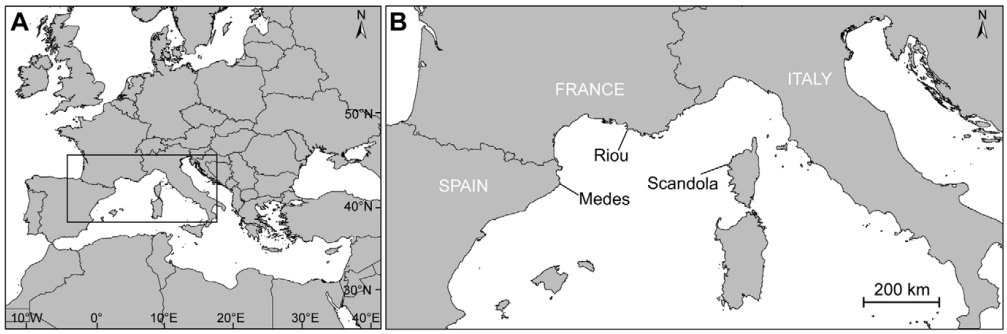


Figure 1. Sampling sites. Map of the Northwestern Mediterranean basin (A) and an enlargement showing the location of the study sites (B).
doi:10.1371/journal.pone.0057385.g001

After an overnight incubation at 55 °C, the cell lysate was recovered from the filter unit, and total DNA was extracted by standard phenol-chloroform extraction procedures. The DNA in the liquid phase was then precipitated with ethanol and concentrated by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4 °C. The DNA pellets were washed with 70% cold ethanol, resuspended in 100 µl sterile ultra-pure water and stored at −20 °C until analysis.

DGGE analysis

PCR amplification. Bacterial 16S rDNA were amplified from genomic DNA extracted from *P. clavata* colonies and seawater using 4 different pairs of universal bacterial primers targetting various hypervariable regions (V) of 16S rRNA gene: 27F/536R (V1–V3) [32], EUB f933/EUB r1387 (V6–V7) [33], 341F/907R (V3–V5) [34] and 341F/907RA (V3–V5) [35]. A 40-bp GC-rich sequence (GC-clamp) was attached to the 5′ end of the forward primers to enhance separation in DGGE [34].

PCR (35 cycles) was performed on a Mastercycler® thermocycler (Eppendorf) in a total volume of 50 µl containing 1 X Taq® Flexi Buffer (Promega, Fitchburg, WI, USA), along with 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1 µM forward and reverse primer, 0.3–3 µl (approximately 100–300 ng) of bacterial DNA template, 1 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), and sterile ultra-pure water. After an initial denaturation of 1 min at 96 °C, a touchdown PCR protocol was performed in which the primer annealing temperature was initially set at 53 °C (27F/536R), 62 °C (EUB f933/EUB r1387) or 58 °C (341F/907R and 341F/907RA) and was decreased by 0.5 °C with each cycle of the next 20 cycles. The final annealing temperature was then maintained for the remaining 15 cycles of the reaction. For each cycle, denaturation was performed at 94 °C for 1 min, followed by annealing for 1 min and extension at 72 °C for 1 min. The PCR products were evaluated by electrophoresis on 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

Electrophoresis conditions and DGGE band analysis. DGGE of the PCR products was performed using the DCode® system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on a 6% (wt/vol) polyacrylamide gel with a linear denaturing gradient of 35% to 60% in 1 X Tris-acetate-EDTA buffer (TAE). Electrophoresis was performed for 17 h at 60 °C at a constant voltage of 80 V. The gels were stained with GelStar® (Cambrex BioScience, East Rutherford, NJ, USA) in 1 X TAE and visualized under UV light with a Gel Doc 2000® image system (Bio-Rad).

To identify the 16S rDNA bacterial sequences, selected DGGE bands were excised from the gels and eluted overnight at 4 °C in 50 µl sterile ultra-pure water. PCR re-amplification was performed with the corresponding primer set. The PCR products were purified with Wizard® PCR Clean-Up minicolumns (Promega), and the recovered 16S rDNA gene fragments were sequenced (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

T-RFLP analysis

PCR amplification, enzymatic digestion and T-RFLP. For T-RFLP analysis, the bacterial 16S rRNA genes were amplified by PCR with the extracted DNA using the universal primers 63F [36] and 786R-Eub (a reverse-complement version of 768F-Eub; [37]). This primer pair target the V1–V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. The forward primer was labeled at the 5′ end with phosphoramidite fluorochrome 6-carboxyfluorescein (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). PCR amplifications were performed in a total volume of 25 µl containing 1 X Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (Fermentas, Burlington, Canada), 200 µM each dNTP, 1 µM forward and reverse primer, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 µg $µl^{-1}$ bovine serum albumin (BSA), 0.3–3 µl (approximately 100–300 ng) bacterial DNA template, 1 U native Taq DNA Polymerase (Fermentas) and sterile ultra-pure water. After an initial denaturation step (5 min at 94 °C), 35 amplification cycles (94 °C for 1 min, 48 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) were performed on a Mastercycler® thermocycler (Eppendorf). Amplification was confirmed by migration on a 1% agarose gel in TAE and ethidium bromide staining. The labeled PCR products were purified using the Wizard® PCR Clean-Up System (Promega) following the manufacturer's instructions and eluted in 30 µl of DNase-free distilled water (Promega).

The restriction reactions were performed for 16 h at 37 °C using a digestion mixture containing 6 µl of the purified PCR products, 1 X reaction buffer (Promega), 0.1 µg $µl^{-1}$ BSA and 20 U *Cfo*I or *Msp*I (Promega) in a final volume of 20 µl. Each digested sample (3 µl) was mixed with 0.3 µl GeneScan 600-LIZ® (Applied Biosystems) size standard and 10 µl Hi-Di® Formamide (Applied Biosystems) in a 96-well plate and denatured at 90 °C for 3 min. The labeled terminal restriction fragments (TRFs) were then separated on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with default fragment analysis parameters. Each sample was run twice as replicates to account for migration discrepancies. All T-RFLP electropherograms were visually inspected for possible artifacts and incorrect peak determination and were tabulated in

GeneMapper® version 4.0 software (Applied Biosystems) using the Local Southern method as the size-calling algorithm [38]. Only fragments longer than 80 bp and smaller than 600 bp were considered.

Statistical analysis of the spatiotemporal variability. The raw data sets (peak sizes in base pairs and peak areas in fluorescence units) for the 2 restriction enzymes were exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). To produce a single composite profile for each sample, the average area and size for each peak were calculated between duplicates (TRFs with sizes within 0.5 bp of each other were considered identical, while TRFs that were present in only one of the duplicates were removed). Because the amount of DNA template loaded for T-RFLP analysis could not be controlled accurately, T-RFLP profiles were normalized by applying the variable percentage threshold, as described by Osborne *et al.* [39]. To eliminate background fluorescence, only peaks contributing to more than 1.2% of total fluorescence (according to the variable percentage threshold result) were considered. Data were binned using the interactive and automatic binning algorithms [40] implemented in the free R programming language [41], applying custom R binning scripts (WS 1; Sh 0.1) to account for size calling imprecision. Based on the "best binned frame" identified by the algorithm, the data were transformed for further graphical and statistical representations. The relative abundances in the different analyzed samples were calculated for each TRF. The data were transformed to a binary matrix (presence/absence), and the distance matrix between samples was computed from the Dice similarity index using R (R package *ade4*; [42]). Patterns of bacterial community similarities were represented on a 2-D scatter plot using multidimensional scaling (MDS) ordination. The K-means clustering method was then performed to determine the center coordinates of the clusters (R package *fpc*; [43]). Confidence ellipses were superimposed on the MDS ordination plot for each previously determined cluster, with 2 confidence levels of 50% and 95% (R package *car*; [44]).

Bacterial clone library construction

The universal bacterial primers 63F and 1389R [36] were used to amplify nearly full-length 16S rRNA genes from the gorgonian tissue samples. The PCR mixtures contained 1 X of Taq® Flexi Buffer (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM each dNTP, 1 µM each primer, 1 U GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega) and 0.3–3 µl (approximately 100–300 ng) DNA template in a total volume of 25 µl. PCR was performed with an initial 5 min denaturation step at 94 °C, followed by 35 amplification cycles consisting of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. The final elongation step was performed at 72 °C for 10 min. For each library, the DNA extracted from 3 *P. clavata* colonies was PCR-amplified in 3 separate reactions, each performed in triplicate. The amplified products were pooled and purified with Wizard® PCR Clean-Up minicolumns (Promega), followed by cloning into the pGEM®-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. After transformation into *E. coli* JM109 competent cells, the orientation of the inserted 16S rRNA gene of each resulting clone was determined by PCR re-amplification using 63F and M13 reverse primers. Clones producing a PCR product of the expected size (approximately 1,500 bp) were sequenced with a plasmid forward primer (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany). A total of 700 partial 16S rRNA gene sequences were obtained. For the Riou site, 3 libraries were constructed from samples collected in winter 2007 (93 clones), summer 2007 (176 clones), and winter 2008 (84 clones). One library per site was constructed from samples collected in summer 2007 for Medes (171 clones) and Scandola (176 clones).

Phylogenetic analysis

All bacterial 16S rDNA clone sequences were trimmed to 750 bp starting at the 5′ end of the 63F primer, and the production of chimeras during PCR was evaluated with the Pintail program [45]. The resulting libraries were dereplicated using FastGroupII ([46]; http://biome.sdsu.edu/fastgroup/index.htm) with a similarity cutoff value of 97% for sequence group definition. The unique sequence groups were classified taxonomically at the family level by the SeqMatch tool of the Ribosomal Database Project (RDP; http://rdp.cme.msu.edu). Within the dominant family-level groups, the sequence affiliations and closest relatives were identified by comparison with the GenBank database using the BLAST algorithm ([47]; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). To describe the compositional differences between the 3 summer 2007 libraries, the Shannon-Weaver index for diversity [48] and the Chao1 richness index [49] were calculated using the RDP Pipeline tools, with sequence groups defined with 97% similarity.

The consistency between the identified ribotypes in the libraries and the major TRFs in each community's peak profiles was confirmed by T-RFLP analysis of representative 16S rDNA clones of dominant ribotypes. Partial sequence reads obtained from the excised DGGE bands were taxonomically assigned by BLAST analysis against the GenBank database.

Nucleotide sequences accession numbers

The nucleotide sequence data for the partial 16S rRNA genes reported in this paper were deposited in GenBank under the accession numbers JX874190-JX874360 (Medes; summer 2007 library), JX874361-JX874536 (Riou; summer 2007 library), JX874537-JX874629 (Riou; winter 2007 library), JX874630-JX874713 (Riou; winter 2008 library) and JX874714-JX874889 (Scandola; summer 2007 library).

Results

DGGE fingerprinting of *P. clavata*-associated bacterial communities

To estimate the intra- and inter-colonial variability of bacterial community composition, apical branches from *P. clavata* colonies sampled in Riou in winter 2007 were analyzed by 16S rDNA-DGGE fingerprinting. PCR amplification with 27F-GC/536R universal primers followed by denaturing electrophoresis yielded repeatable banding patterns for all 3 fragments sampled from each colony (Figure 2, lanes 1–9). The consistency of the banding patterns from different *P. clavata* colonies was clearly apparent, indicating the presence of similar bacterial diversity. By contrast, the DGGE profile of seawater collected in close vicinity of the colonies (Figure 2, lane 10) was markedly different and did not share detectable bands with the *P. clavata* tissue samples. The dominant 16S rDNA band in the fingerprint of *P. clavata* was excised from the gel and sequenced for identification of the corresponding ribotype. This band was related to 16S rDNA sequences from marine bacteria belonging to the order *Oceanospirillales*. The closest cultivated relative was *Spongiobacter nickelotolerans* (GenBank accession number AB205011), with 94% similarity along the 479 bp sequence length.

The dominant DGGE bands obtained with 3 other universal bacterial primer pairs were also sequenced. The band obtained with the EUB f933/EUB r1387 primer pair (Figure 2, lane 11) was related to *Spongiobacter nickelotolerans* 16S rDNA (94% similarity among 417 bp). The sequences recovered from the 341F-GC/907RA and 341F-GC/907R amplifications (Figure 2, lanes 12–13) shared 91 to 92% similarity with the 16S rDNA of *Endozoicomonas*

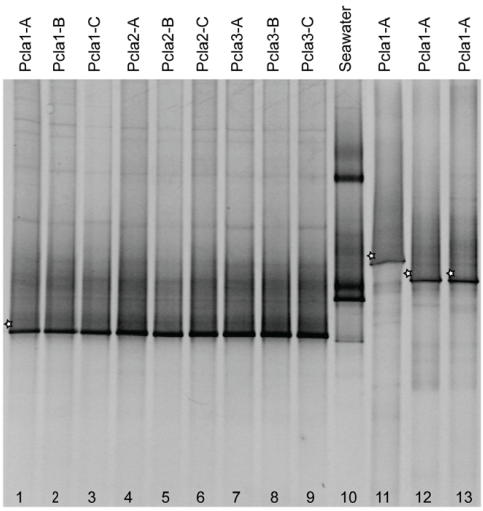


Figure 2. Representative denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of the bacterial community composition. DGGE analysis of bacterial communities associated with triplicate samples (A, B and C) of 3 *P. clavata* colonies (Pcla1 to Pcla3) and the surrounding seawater sampled in Riou in winter 2007. 16S rDNA was amplified with different sets of primers: 27F-GC/536R (lanes 1 to 10), EUB f933-GC/EUB r1387 (lane 11), 341F-GC/907RA (lane 12) and 341F-GC/907R (lane 13). The sequenced DGGE bands are indicated with a star.
doi:10.1371/journal.pone.0057385.g002

elysicola (AB196667), a close relative of *Spongiobacter* spp. This similarity indicated that the predominance of single bands observed in all the *P. clavata* DGGE profiles was not caused by amplification biases but likely resulted from an abundant population of ribotypes belonging to the *Oceanospirillales* order.

T-RFLP analysis of bacterial community variation

Temporal and spatial changes in bacterial diversity associated with *P. clavata* were investigated by T-RFLP analysis. A total of 186 profiles, including run duplicates (96 and 90 profiles for *Cfo*I and *Msp*I digestion, respectively), were obtained from tissues of 48 *P. clavata* colonies that were seasonally sampled between March 2007 and September 2010 at the Riou, Medes and Scandola sites (3 colonies per site for each sampling). The profiles generated by run duplicates were consistent. The diversity and abundance of the detected TRFs are shown in Figures 3 and 4 for each restriction enzyme. In total, 57 different TRFs were observed upon *Cfo*I digestion (Figure 3), and 50 TRFs were observed for *Msp*I digests (Figure 4). None of the TRFs were shared by all samples, independent of the endonuclease. The T-RFLP profiles obtained for replicate colonies of each sampling were consistent, although variations in peak intensity were observed, likely due to the non-quantitative PCR amplification step. However, the dominant TRFs between replicates from the same seasonal sampling were broadly conserved between the *Cfo*I and *Msp*I data sets.

Two dominant TRFs were consistently recovered throughout most of the survey, indicating the presence of conserved ribotypes. The *Cfo*I profiles were dominated by TRF-171.4, with the exception of 9 samples from summer 2007 (Figure 3). When present, this TRF accounted for 37.3 to 91.1% of the total area of the TRF peaks in the fluorescence profiles. Profiles from *P. clavata* colonies sampled in summer 2007 did not contain TRF-171.4 but were dominated by TRF-193.4 (up to 87.0% of the profile's total fluorescence). These 2 TRFs were simultaneously detected in 15 of the *Cfo*I profiles of the survey, although TRF-171.4 was dominant in each case. The same trend was observed for the *Msp*I profiles (Figure 4). All but 9 profiles were dominated by TRF-105.1 (25.7 to 100% of the profile's total fluorescence). The 9 other profiles corresponded to colonies from summer 2007 and were dominated by another restriction fragment (TRF-100.1), with a relative fluorescence of 36.8 to 68.9%. In addition to TRF-100.1, 3 other notable TRFs common to the 9 *Msp*I profiles of summer 2007 were observed: TRF-110.1, TRF-126.1 and TRF-504.1. The last 2 TRFs seemed to be specifically associated with the summer 2007 samples, as they were not observed in any other profile. By contrast, the *Msp*I TRF-100.1 was detected in 10 other profiles from the 2009 and 2010 samples, among which 7 also contained TRF-110.1.

Overall, peak diversity was significantly higher in the summer 2007 profiles, with an average of 8.9 ± 2.5 *Cfo*I TRFs versus 5.9 ± 1.6 for other profiles and 9.3 ± 2.2 *MspI* TRFs versus 3.8 ± 2.8 for other profiles ($p<0.001$). The T-RFLP profiles of the bacterial communities in the surrounding seawater were compared with the profiles of colonies sampled on 3 occasions in Riou (winter 2007 and 2008 and summer 2007). None of the detected TRF peaks were common to the seawater and gorgonian tissue profiles (data not shown).

The ordination of *P. clavata*-associated community profiles by MDS did not demonstrate visible clustering by sampling site (Figure 5) but revealed that most of the *Cfo*I (Figure 5A) and *Msp*I (Figure 5B) profiles grouped regardless of geographic origin. We observed that 32 (67%) of the *Msp*I profiles and 39 (81%) of the *Cfo*I profiles of the 48 *P. clavata* colonies sampled between March 2007 and September 2010 grouped together, thus suggesting the presence of similar bacterial assemblages at most sampling times. However, a tight and distinct clustering of the 9 *Cfo*I bacterial profiles from summer 2007 for the 3 sites was observed (Figure 5A). For the *Msp*I analysis (Figure 5B), the 9 samples from summer 2007 grouped with 7 other samples from Medes in summer and winter 2009, Riou in winter 2010 and Scandola in summer 2009. This difference in ordination of the *Cfo*I and *Msp*I bacterial profiles may have resulted from the common presence of 2 *Msp*I TRFs (TRF-100.1 and TRF-110.1) in these 7 latter samples and all summer 2007 samples, while a single *Cfo*I TRF (TRF-193.4) was shared between all summer 2007 samples.

Phylogenetic analysis of 16S rDNA clone libraries

To determine if the variations in the dominant peaks observed by T-RFLP were associated with changes in the phylogenetic composition of the bacterial communities, bacterial 16S rDNA clone libraries were constructed from the *P. clavata* colonies sampled in Riou during winter 2007 and 2008 and in Riou, Medes and Scandola during summer 2007.

The library constructed from colonies sampled in winter 2007 in Riou was largely dominated by a single ribotype that accounted for 98.9% of the sequenced clones (Figure 6A). The winter 2008 library was exclusively composed of the same ribotype. This uncommon dominance is unlikely to be the consequence of a contamination bias because bacterial DNA extractions were performed separately, in March 2007 and February 2008, for the construction of the corresponding 16S rDNA libraries. The sequence divergence was very low (<1%) between clones belonging to this dominant ribotype in the 2 winter libraries,

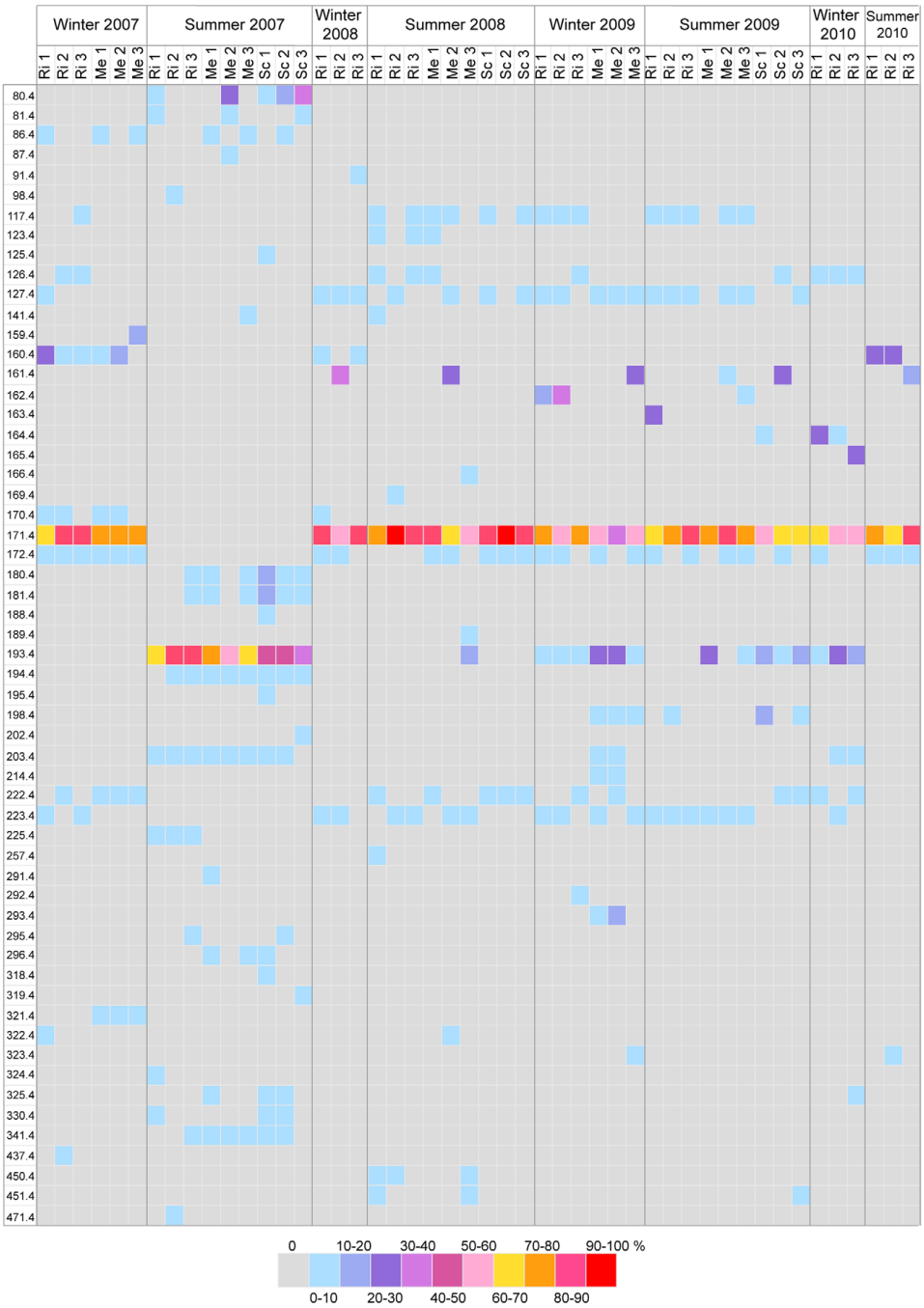

Winter 2007
Summer 2007
Winter 2008
Summer 2008
Winter 2009
Summer 2009
Winter 2010
Summer 2010
Ri 1
Ri 2
Ri 3
Me 1
Me 2
Me 3
Sc 1
Sc 2
Sc 3
80.4
81.4
86.4
87.4
91.4
98.4
117.4
123.4
125.4
126.4
127.4
141.4
159.4
160.4
161.4
162.4
163.4
164.4
165.4
166.4
169.4
170.4
171.4
172.4
180.4
181.4
188.4
189.4
193.4
194.4
195.4
198.4
202.4
203.4
214.4
222.4
223.4
225.4
257.4
291.4
292.4
293.4
295.4
296.4
318.4
319.4
321.4
322.4
323.4
324.4
325.4
330.4
341.4
437.4
450.4
451.4
471.4
0
10-20
30-40
50-60
70-80
90-100 %
0-10
20-30
40-50
60-70
80-90

Figure 3. Relative abundances of *Cfo*I TRFs in *P. clavata* samples analyzed by T-RFLP. Each row represents a TRF generated by *Cfo*I digestion of PCR amplicons from samples that were collected from the different sites (Riou (Ri), Medes (Me) and Scandola (Sc)) during the seasons indicated in columns. TRFs were designated by their size (in bp) after binning. The filling colors represent the relative fluorescence of the TRFs according to the range presented in the color key.
doi:10.1371/journal.pone.0057385.g003

suggesting that it may represent microheterogeneity of 16S rRNA gene copies within a unique bacterial species. According to pairwise comparisons, this ribotype is related to members of the *Hahellaceae* family within the *Oceanospirillales* order (class *Gammaproteobacteria*). The closest cultivated strains were *Endozoicomonas elysicola* (AB196667), *Endozoicomonas montiporae* CL-33 (FJ347758) and *Spongiobacter nickelotolerans* (AB205011), with 92–93% 16S rDNA sequence similarity (see Figure S1 for a 16S rDNA-based phylogenetic tree). Although the *Hahellaceae*-related ribotype is undoubtedly a highly abundant component in the *P. clavata*-associated assemblage, a better description of diversity within these libraries would certainly require the analysis of a larger number of clones.

By contrast, the 16S rDNA sequences obtained from the summer 2007 clone libraries exhibited greater diversity and were distributed among 5 bacterial phyla, namely *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Cyanobacteria* (Figure 6B–D). *Firmicutes* was dominant in each of the libraries, constituting 76.1% of the sequences from Riou, 69.6% from Medes and 43.8% from Scandola. The second most abundant phylum was *Actinobacteria*, which comprised 13.4% of the cloned sequences in the Medes library and 25.0% in the Scandola library. The *Gammaproteobacteria* were represented to a lesser degree in the bacterial community in each of the 3 summer 2007 libraries (2.3% to 6.8%), and none of these ribotypes were related to the *Hahellaceae* family. Analysis at lower taxonomic levels revealed the presence of a high proportion of almost identical sequences affiliated with the genus *Paenibacillus*, accounting for 84.4% to 98.6% of the *Firmicutes* species (36.9% to 75.0% of the clone libraries). According to BLAST and SeqMatch searches, the closest relative is *Paenibacillus validus* (AB073203), which shares >98% sequence similarity with this ribotype. A second dominant ribotype was identified within *Actinobacteria*, which represented 52.4% to 83.5% of this phylum in each of the libraries (9.4% to 14.2% of the total number of clones). The nearest relative of this group of sequences is *Propionibacterium acnes* (AE017283; >98% similarity for 16S rDNA). While *Paenibacillus*- and *Propionibacterium*-related sequences were predominant in the 3 libraries from summer 2007, the communities exhibited differing diversities. The Chao1 and Shannon-Weaver indices were highest in the Scandola library, although there is considerable overlap of the estimated total number of ribotypes at the 95% confidence interval within these 3 libraries (Table 1).

To identify the TRFs of the dominant ribotypes, the T-RFLP profiles of representative clones that were recovered from the 5 libraries were analyzed. The observed TRFs of the winter libraries clones carrying the *Hahellaceae* 16S rDNA sequences matched *Cfo*I TRF-171.4 and *Msp*I TRF-105.1, which correspond to the dominant peaks in all the *P. clavata* community profiles, with the exception of the summer 2007 samples (Figures 3 and 4). Clones corresponding to the *Paenibacillus* sequences in the summer 2007 libraries generated *Cfo*I and *Msp*I TRFs (TRF-193.4 and TRF-100.1, respectively) that matched the dominant peaks in the corresponding T-RFLP summer profiles. *Propionibacterium* 16S rDNA cloned sequences only generated an *Msp*I peak (TRF-126.1), and no signal was detected following *Cfo*I hydrolysis. *In silico* digestions of these *Propionibacterium*-related sequences showed that the size (636 bp) of the predicted *Cfo*I TRF was beyond our detection range.

Discussion

This study provides the first description of the spatial and temporal patterns of the structure of the microbial communities associated with a temperate gorgonian in the Mediterranean Sea. The analysis of the DGGE fingerprint data indicated that the bacterial diversity hosted by *P. clavata* is broadly similar within and between individual colonies from a population and differs from the community composition within the surrounding water. In addition, the MDS ordination of the T-RFLP diversity profiles revealed a lack of clustering by location for the gorgonian populations sampled among our 3 study sites, which are separated by hundreds of kilometers. These results clearly suggest that the structure of bacterial communities that inhabit *P. clavata* does not rely on local environmental drivers or discrete gorgonian populations. Most of the T-RFLP profiles from the 48 colonies sampled between March 2007 and September 2010 grouped together, thus supporting the notion of specific bacterial-host associations. Taken together, data from the T-RFLP analysis and 16S rRNA gene clone libraries indicate that *P. clavata* colonies are associated with an almost permanent microbial population that is highly dominated by a unique gammaproteobacterial ribotype. However, we detected a transient compositional shift between this relatively stable bacterial assemblage that was observed throughout 7 of the 8 investigated seasons, with a strikingly different diversity pattern in summer 2007.

The dominant identified ribotype is affiliated with the family *Hahellaceae* within the order *Oceanospirillales* and is related to *Endozoicomonas* and *Spongiobacter* spp. Interestingly, a meta-analysis of coral-associated bacterial assemblages revealed that *Oceanospirillales*-affiliated sequences were among the most frequent ribotypes found in healthy hexacorals [50], and several recent reports indicated that *Hahellaceae* members may represent a common group of coral-associated *Oceanospirillales*. *Spongiobacter* sequences have been retrieved from the hexacoral *Acropora millepora*, in which they represent the largest proportion of bacterial clone libraries [28,51]. In 2 other hard coral species, *Acropora hyacinthus* and *Stylophora pistillata*, Kvennefors *et al.* [29] identified a cluster of ribotypes that are closely related to the genus *Endozoicomonas*. This so-named "Type A Associates" cluster includes several ribotypes that were previously observed in different tropical coral species or specifically associated with benthic marine invertebrates. *Spongiobacter*-related 16S ribosomal sequences were also detected in the cold-water coral *Madrepora oculata* and dominated the DGGE banding pattern of the associated bacterial community in this species [52]. Very recently, Morrow *et al.* [53] found that *Endozoicomonas* represented the most abundant bacterial genus in communities of the reef-building coral *Porites astreoides*, representing up to 99% of the 16S rRNA sequences recovered from colonies in one of the studied sites. The presence of *Hahellaceae* as a major component of the bacterial communities in both hexacorals and gorgonians (octocorals) suggests that these associates have differentiated to form a stable symbiotic complex specific to a cnidarian taxon. Further research focusing on the patterns of diversity of this bacterial group will certainly help to understand the evolutionary forces that may drive host-associated community composition in divergent phylogenetic lineages of cnidarians.

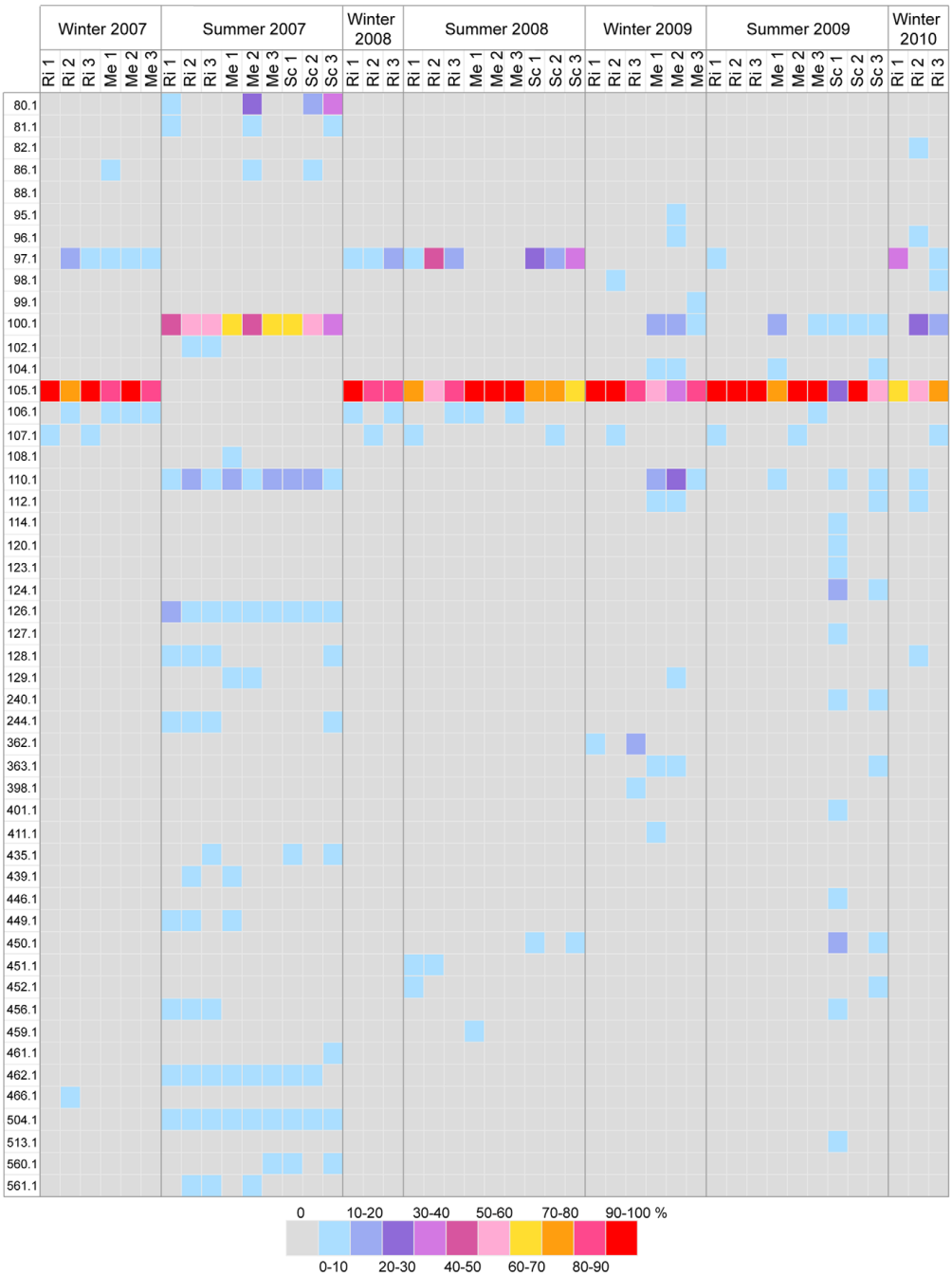

Winter 2007
Summer 2007
Winter 2008
Summer 2008
Winter 2009
Summer 2009
Winter 2010
Ri 1
Ri 2
Ri 3
Me 1
Me 2
Me 3
Sc 1
Sc 2
Sc 3
80.1
81.1
82.1
86.1
88.1
95.1
96.1
97.1
98.1
99.1
100.1
102.1
104.1
105.1
106.1
107.1
108.1
110.1
112.1
114.1
120.1
123.1
124.1
126.1
127.1
128.1
129.1
240.1
244.1
362.1
363.1
398.1
401.1
411.1
435.1
439.1
446.1
449.1
450.1
451.1
452.1
456.1
459.1
461.1
462.1
466.1
504.1
513.1
560.1
561.1
0
10-20
30-40
50-60
70-80
90-100 %
0-10
20-30
40-50
60-70
80-90

Figure 4. Relative abundances of *Msp*I TRFs in *P. clavata* samples analyzed by T-RFLP. As described in Figure 3, with the restriction enzyme *Msp*I.
doi:10.1371/journal.pone.0057385.g004

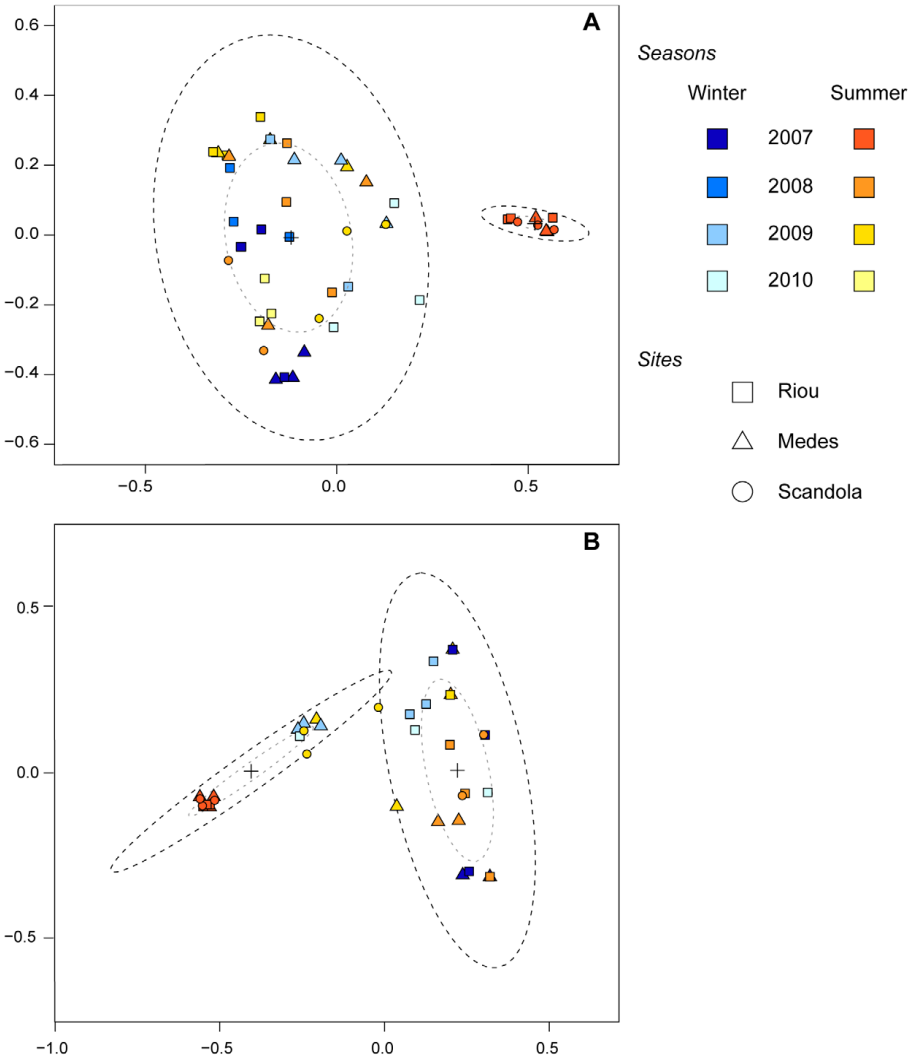


Figure 5. MDS ordination plot of *P. clavata* bacterial communities. 2-D scatter plots of T-RFLP profiles from *P. clavata* colonies sampled at 3 sites in winter and summer from 2007 to 2010 are based on the Dice similarity matrix for the T-RFLP data retrieved from the amplified bacterial 16S rDNA digested with *Cfo*I (A) and *Msp*I (B). Each symbol represents the bacterial community of an individual sample from Riou (square), Medes (triangle) or Scandola (circle), and the colors correspond to different sampling seasons. Sample clusters are based on coordinates determined with the k-means method. Dotted ellipses contain 50% (grey dots) or 95% (dark dots) of the points that contribute to the cluster. The centers of the confidence ellipses are identified with a cross.
doi:10.1371/journal.pone.0057385.g005

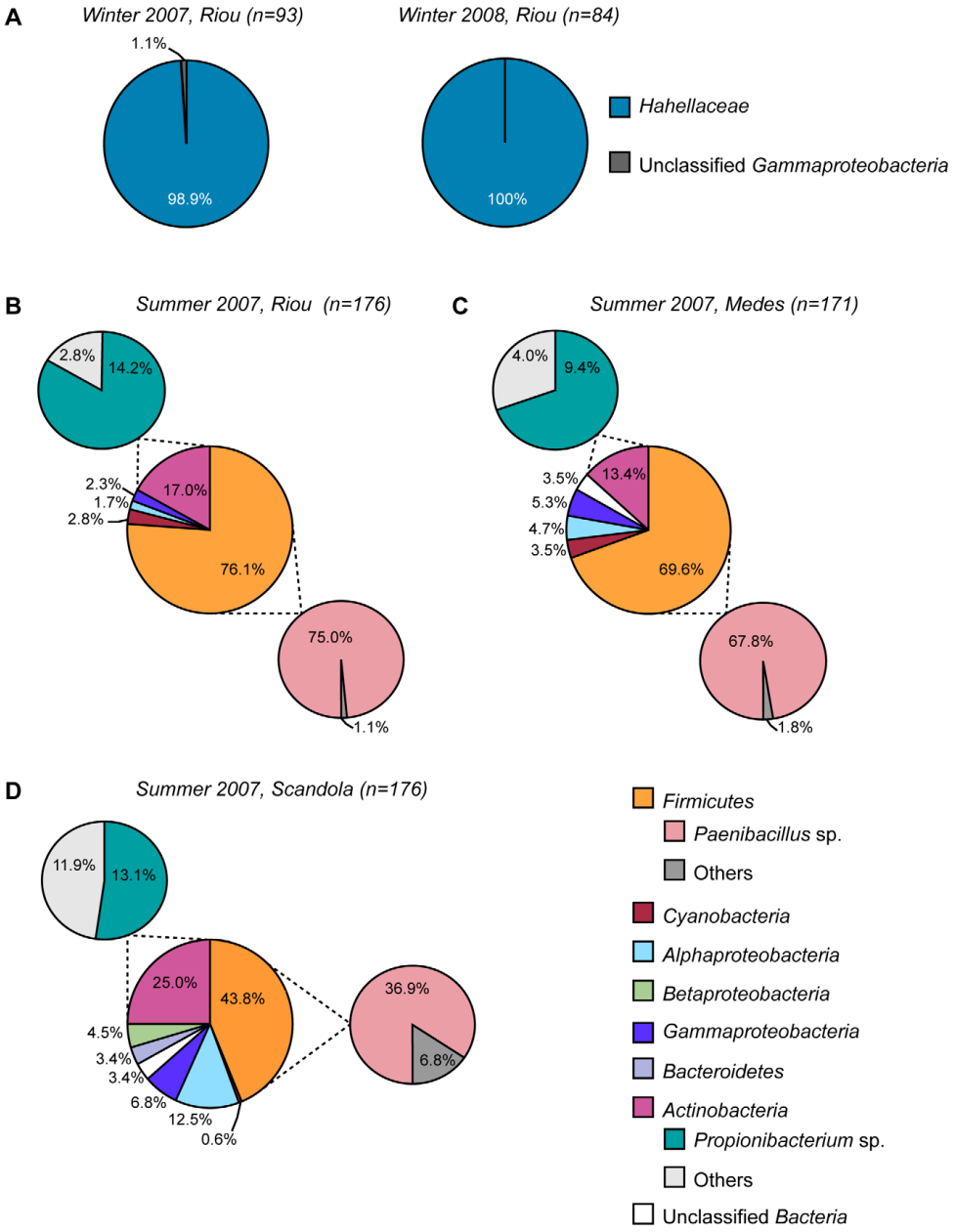


Figure 6. Bacterial diversity of clone libraries derived from *P. clavata* colonies. Pie charts illustrating the composition of bacterial communities in the winter 2007 and winter 2008 samples from Riou (A) and the summer 2007 samples from Riou (B), Medes (C) and Scandola (D). The large pies represent the clone library composition at the family level (A) and at the phyla or class levels (B–D). The smaller pies in B–D represent the affiliations of *Actinobacteria* and *Firmicutes* sequences at the genus level. The relative abundances of the bacterial groups retrieved from the libraries are indicated as percentages.
doi:10.1371/journal.pone.0057385.g006

Table 1. Observed and estimated richness of the 16S rDNA clone libraries from the *P. clavata* samples in summer 2007.

Summer 2007 clone library	No. of clones analyzed	No. of ribotypes observed	Chao1 richness index	Shannon-Weaver diversity index
Riou	176	14	32 (18–95)	0.98
Medes	171	19	28 (21–59)	1.41
Scandola	176	38	49 (41–73)	2.67

Values were determined using a 97% sequence similarity threshold for ribotype groups. Chao1 values given in parentheses are 95% confidence intervals.
doi:10.1371/journal.pone.0057385.t001

In contrast to the unique *Hahellaceae* ribotype revealed by our study in *P. clavata*, several distinct *Endozoicomonas-Spongiobacter* sequences coexist in hexacoral species. This difference suggests that distinct hexa- and octocoral hosts may exert different selective controls on their microbial partners, resulting in various diversity patterns of *Hahellaceae* associates. Consistent with this hypothesis of host-driven control on associated *Hahellaceae* bacteria, the ribotype identified in *P. clavata* did not closely match the *Spongiobacter-Endozoicomonas* sequences found in hexacorals (<93% similar) but was more closely related (>96% similar) to bacterial sequences retrieved from the tropical gorgonian *Gorgonia ventalina* (GenBank accession number GU118518; [13]), suggesting that the species associated with *P. clavata* may belong to a new *Hahellaceae* genus that is adapted to gorgonian hosts.

To date, very little is known about the potential contribution of *Hahellaceae* bacteria to the functioning of the holobiont. One study has shown that *Spongiobacter*-related organisms isolated from *A. millepora* tissues possess the ability to metabolize the organosulfur compound dimethylsulfoniopropionate (DMSP), suggesting a role in sulfur cycling in scleractinian corals [51]. However, because DMSP production in corals is believed to rely on the presence of endosymbiotic zooxanthellae [51], a similar hypothesis for *Hahellaceae*-affiliated bacteria in *P. clavata* seems unlikely because this gorgonian species is devoid of photosynthetic symbionts [20]. Despite multiple trials, we failed to isolate culturable *Hahellaceae* bacteria from *P. clavata* tissues; consequently, their metabolic potential could not be investigated. Another interesting property of the members of the *Oceanospirillales* clade is the production of extracellular hydrolytic enzymes that are involved in the degradation of various complex organic substrates, providing a potential nutritional integration between bacterial associates and their host, as suggested for the endosymbiotic *Oceanospirillales* found in the deep-sea worm *Osedax* [54]. In the case of coral-associated bacteria, one might speculate that heterotrophic *Hahellaceae* help supply the host with macromolecular nutrients that are not directly assimilated under a complex form. The previous identification of *Gammaproteobacteria* aggregates within the gastrodermis tissue layer in the digestive cavity of several reef-building corals suggests that these bacteria may play such a role in the coral diet [55]. However, the available data on the 16S rRNA gene sequences of these intracellular bacteria are restricted to the *Gammaproteobacteria* FISH probe regions, thus precluding phylogenetic affiliation at the genus or family levels and hindering comparisons with *Hahellaceae* sequences. Further investigations, including *in situ* localization of bacteria in *P. clavata,* are clearly required to provide information on their possible role in the functioning of the holobiont. Hopefully, the 16S rRNA gene sequence retrieved from the dominant *Hahellaceae* ribotype in our study will allow us to design oligonucleotide probes for their specific detection in gorgonian tissues.

While our T-RFLP and clone libraries analysis indicated the existence of a relatively stable *Hahellaceae*-dominated microbiota in *P. clavata* populations across a large geographic range and throughout the 4-year survey, we identified a simultaneous and deep compositional shift of communities in summer 2007 at a regional scale. During this summer, the *Hahellaceae* sequences were not detected by either technique and were transiently replaced by more diverse assemblages with prominent *Paenibacillus*- and *Propionibacterium*-related sequences, 2 bacterial genera that respectively belong to *Firmicutes* and *Actinobacteria*. Members of *Firmicutes* and *Actinobacteria* have previously been detected in cold-water and tropical scleractinian corals [4,29,56,57], where they are generally found in low abundance in healthy and/or bleached colonies [50] although representatives of *Paenibacillus* and *Propionibacterium* spp. were among the most commonly recovered bacteria from a Brazilian coral species [58]. Because we did not observe a similar transition in any of the other summers that were analyzed, we suggest that an abnormal and transient disruption of the host-*Hahellaceae* association occurred in summer 2007. However, ordination of the T-RFLP *Msp*I data set revealed that the profiles of all summer 2007 samples grouped with profiles from several colonies sampled in other seasons (Figure 5B). Significantly, the *Paenibacillus* TRF (TRF-100.1) was observed together with the dominant *Hahellaceae* TRF (TRF-105.1) in the latter profiles (Figure 4). These observations indicate a possible overlap between the 2 communities and suggest that bacteria related to *Paenibacillus* could be normal but infrequently detected associates, except during periods of anomalous abundance. Therefore, the shift in dominant ribotypes from *Hahellaceae* to *Paenibacillus* may result from a transient imbalance of endogenous bacterial populations that naturally reside in the holobiont rather than opportunistic colonization by *Paenibacillus* from the surrounding water concomitant with a decrease in the *Hahellaceae* community. The subsequent shift back toward the initial *Hahellaceae*-dominated community further supports the hypothesis that the holobiont strongly regulates its microbial diversity and indicates that *Hahellaceae* most likely represent host-specific bacterial associates of *P. clavata*.

The causes of the transition in *P. clavata* bacterial diversity from *Hahellaceae*- to *Paenibacillus*-dominant ribotypes during summer 2007 are not clear. As mentioned above, the shift occurred at the 3 studied areas in an almost synchronous manner, suggesting the involvement of environmental and/or biological factors acting on a large geographical scale. Several previous studies have identified shifts in coral-associated bacterial communities during bleaching and disease outbreaks or under conditions of environmental stress, such as increased temperature and organic matter enrichment [55,59,60]. For instance, changes in microbial associates were observed in the stony coral *A. millepora* during a mass bleaching event, and occurred prior to visual signs of bleaching on the sampled colonies [28]. Major shifts in bacterial communities were

also observed in diseased colonies of 2 coral species that were affected by White Syndrome disease [29]. Interestingly, the *Hahellaceae*-related bacteria found in healthy colonies were replaced by other bacterial groups in bleached or diseased individuals. Whether the shift in bacterial assemblages is the cause or the effect of the disease is unclear, but these observations indicate that changes in *Hahellaceae*-host associations are related to an altered physiological state of the holobiont during stress conditions.

Regarding the potential causes of stress within the gorgonian populations in summer 2007, the available temperature time series data recorded at the study areas during the survey period (T-MedNet network; http://t-mednet.org) did not reveal any temperature anomaly. In addition, surveys of *P. clavata* populations conducted during and after summer 2007 in the 3 study areas did not reveal any symptoms of disease (J. Garrabou *et al.*, unpublished data). Notably, we did not detect the presence of *Vibrio coralliilyticus* 16S rDNA in the *Paenibacillus*-dominated summer 2007 clone libraries, although this *Vibrio* has been implicated in recent disease outbreaks in *P. clavata* populations during climatic anomalies [22,23]. Several other *Vibrio* species were also involved in *P. clavata* tissue necrosis in Mediterranean [17,61], or recovered from healthy and diseased cold-water gorgonians [62]. Altogether, this suggested that unhealthy conditions of the host are allowing colonization by potentially pathogenic *Vibrio* strains that can also be a natural component of the holobiont and may exploit the disturbance of the normal microbiota [63]. By contrast, we detected only 2 *Vibrionaceae* sequences among the 523 clones that were analyzed from the summer 2007 libraries (data not shown). This result suggests a very moderate abundance of *Vibrio* and indicates that the shift observed in *P. clavata* was likely not related to the onset of a disease. However we cannot rule out that other bacterial groups among the taxon diversity in summer 2007 may represent potential pathogens or detrimental associates that overcome the *Hahellaceae*-dominated natural assemblage. For instance, although *Paenibacillus* and *Propionibacterium* spp. are not considered as coral pathogens and can be normal components of the associated microbiota, their overwhelming dominance in summer 2007 might have resulted in transiently compromised holobiont homeostasis without expression of disease symptoms.

Besides climate-related stresses and disease, regional oceanographic perturbations including land run-off and anthropogenic disturbance have also been shown to cause changes in microbial communities associated with corals [56,64,65]. Degraded ecological conditions may facilitate the existence of alternate states of microbial community structure and overgrowth of opportunistic bacteria [59]. However, an exposure of *P. clavata* colonies to a pollutant or effluent in summer 2007 is very unlikely considering the large geographical area in which this bacterial shift was observed. In addition, our studies sites are variably impacted by anthropogenic effects as the 3 regions are subjected to different levels of protection. Riou site was located in a non-protected region, a few kilometers away from Marseille, the second major French city. Medes and Scandola sites are both located in marine protected areas, Scandola being a no-take area submitted to very limited human pressure. Therefore, local anthropogenic impacts do not seem to be the cause for the bacterial shifts simultaneously observed in the 3 sites in summer 2007, although a monitoring of environmental parameters and microbial community structure in the water column would be required to better evaluate differences between the sites. Finally, the factors that could have directly or indirectly caused a transient change in the natural bacterial community remain unclear and several other hypotheses cannot be ruled out, such as a bacteriophage infection targeting *Hahellaceae* and causing microbial mortality [66], or the occurrence of subtle alterations in gorgonian physiology in summer [67] that would disrupt the host-bacteria relationship without macroscopic disease signs.

In conclusion, the present work provides a reliable evaluation of the structure of and variations in gorgonian-associated bacterial communities. To our knowledge, this is the first spatiotemporal study demonstrating that transient but dramatic shifts in the natural baseline of these assemblages can arise in apparently healthy octocorals. In light of our results, it is important to encourage multi-year monitoring to avoid erroneous or incomplete descriptions of the bacterial assemblages, as we might have drawn by investigating the *P. clavata* microbiota during the phase shift. Although this shift was only observed once in the 4-year survey and thus presumably corresponds to an abnormal or stressful event, it indicates that transient bacterial populations may replace the natural *Hahellaceae*-dominated community without visible evidence of deleterious effects. Further studies are now required to address the question of whether the phase shift in the microbial community may represent a potential monitoring tool for determining the health state of gorgonians and the ecological condition of their environment. This research may aid in understanding the causes of recurrent mass mortalities and designing effective management strategies to preserve one of the most emblematic Mediterranean species.

Supporting Information

Figure S1 Phylogenetic relationships between the dominant *P. clavata*-associated ribotype and its closest relatives. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences filtered to ~720 aligned nucleotide positions. Representative clones retrieved from *P. clavata* libraries in winter 2007 and winter 2008 are marked in red, and the GenBank accession numbers of reference strains are shown in parentheses. Branch points supported by boostrap values >50% or >95% (based on 1000 resamplings) are indicated by open and filled circles, respectively. The *Gammaproteobacteria Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was used as an outgroup. Scale bar represents 0.02 changes per nucleotide.
(TIF)

Acknowledgments

We gratefully acknowledge J. M. Dominici (Réserve Naturelle de Scandola); the staff of Parc Natural del Montgrí, Illes Medes i Baix Ter; B. de Ligondes, C. Marschal and F. Zuberer (Diving staff, Observatoire des Sciences de l'Univers - Institut Pythéas); E. Cebrian (Centre d'Estudis Avançats de Blanes-CSIC); C. Linares and N. Teixido (Ecology Department, University of Barcelona); and O. Bianchimani (Septentrion Environnement) for assistance with sample collection. We also thank C. Rocher (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale - UMR 7263) for technical assistance with the molecular work. Finally, we thank Y. Eynaud, K. J. Soda and G. Meisterhans for assistance with statistical analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MLR MR JG MB. Performed the experiments: MLR MR MB. Analyzed the data: MLR MR MB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLR MR JG MB. Wrote the paper: MLR JG MB.

References

1. Reshef L, Koren O, Loya Y, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2006) The coral probiotic hypothesis. Environ Microbiol 8: 2068–2073.
2. Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Mar Ecol Prog Ser 243: 1–10.
3. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. Nat Rev Microbiol 5: 355–362.
4. Bourne DG, Munn CB (2005) Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. Environ Microbiol 7: 1162–1174.
5. Frias-Lopez J, Zerkle AL, Bonheyo GT, Fouke BW (2002) Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. Appl Environ Microbiol 68: 2214–2228.
6. Lampert Y, Kelman D, Nitzan Y, Dubinsky Z, Behar A, et al. (2008) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. FEMS Microbiol Ecol 64: 187–198.
7. Rohwer F, Breitbart M, Jara J, Azam F, Knowlton N (2001) Diversity of bacteria associated with the Carribean coral *Montastraea franksi*. Coral Reefs 20: 85–91.
8. Sharp KH, Ritchie KB (2012) Multi-partner interactions in corals in the face of climate change. Biol Bull 223: 66–77.
9. Ritchie KB (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. Mar Ecol Prog Ser 322: 1–14.
10. Rypien KL, Ward JR, Azam F (2010) Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. Environ Microbiol 12: 28–39.
11. Bruck TB, Bruck WM, Santiago-Vazquez LZ, McCarthy PJ, Kerr RG (2007) Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate deep water octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. Mar Biotechnol (NY) 9: 561–576.
12. Gray MA, Stone RP, McLaughlin MR, Kellogg CA (2011) Microbial consortia of gorgonian corals from the Aleutian islands. FEMS Microbiol Ecol 76: 109–120.
13. Sunagawa S, Woodley CM, Medina M (2010) Threatened corals provide underexplored microbial habitats. PLoS One 5: e9554.
14. Ballesteros E (2006) Mediterranean coralligenous assemblages: a synthesis of present knowledge. Oceanogr Mar Biol 44: 123–195.
15. Cerrano C, Bavestrello G, Bianchi CN, Cattaneo-Vietti R, Bava S, et al. (2000) A catastrophic mass-mortality episode of gorgonians and other organisms in the Ligurian Sea (Northwestern Mediterranean), summer 1999. Ecol Lett 3: 284–293.
16. Garrabou J, Perez T, Sartoretto S, Harmelin J-G (2001) Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in Provence region (France, NW Mediterranean). Mar Ecol Progr Ser 217: 263–272.
17. Huete-Stauffer C, Vielmini I, Palma M, Navone A, Panzalis P, et al. (2011) *Paramuricea clavata* (Anthozoa, Octocorallia) loss in the Marine Protected Area of Tavolara (Sardinia, Italy) due to a mass mortality event. Mar Ecol 32: 107–116.
18. Rodolfo-Metalpa R, Bianchi CN, Peirano A, Morri C (2005) Tissus necrosis and mortality of the temperate coral *Cladocora caespitosa*. Ital J Zool 72: 271–276.
19. Crisci C, Bensoussan N, Romano JC, Garrabou J (2011) Temperature anomalies and mortality events in marine communities: insights on factors behind differential mortality impacts in the NW Mediterranean. PLoS One 6: e23814.
20. Carpine C, Grasshoff M (1975) Les gorgonaires de la Méditerranée. Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco 71: 1–140.
21. Coma R, Ribes M, Serrano E, Jimenez E, Salat J, et al. (2009) Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 6176–6181.
22. Bally M, Garrabou J (2007) Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. Glob Change Biol 13: 2078–2088.
23. Vezzulli L, Previati M, Pruzzo C, Marchese A, Bourne DG, et al. (2010) Vibrio infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. Environ Microbiol 12: 2007–2019.
24. Ben-Haim Y, Zicherman-Keren M, Rosenberg E (2003) Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. Appl Environ Microbiol 69: 4236–4242.
25. Sussman M, Willis BL, Victor S, Bourne DG (2008) Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. PLoS One 3: e2393.
26. Littman RA, Willis BL, Pfeffer C, Bourne DG (2009) Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef. FEMS Microbiol Ecol 68: 152–163.
27. Littman RA, Bourne DG, Willis BL (2010) Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with *Symbiodinium* type on the same coral host. Mol Ecol 19: 1978–1990.
28. Bourne D, Iida Y, Uthicke S, Smith-Keune C (2008) Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. ISME J 2: 350–363.
29. Kvennefors EC, Sampayo E, Ridgway T, Barnes AC, Hoegh-Guldberg O (2010) Bacterial communities of two ubiquitous Great Barrier Reef corals reveals both site- and species-specificity of common bacterial associates. PLoS One 5: e10401.
30. Bensoussan N, Romano JC, Harmelin JG, Garrabou J (2010) High resolution characterization of northwest Mediterranean coastal waters thermal regimes: To better understand responses of benthic communities to climate change. Estuar Coast Shelf Sci 87: 431–441.
31. Fischer EM, Schär C (2009) Futures changes in daily summer temperature variability: driving processes and role for temperature extremes. Clim Dyn 33: 917–935.
32. Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S (2000) *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. Appl Environ Microbiol 66: 3376–3380.
33. Ji N, Peng B, Wang G, Wang S, Peng X (2004) Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. J Microbiol Methods 57: 409–413.
34. Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, et al. (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, van Elsas JD, editors. Molecular microbial ecology manual. Dordrecht, The Netherlands: Academic Publishers. pp. 743–769.
35. Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, et al. (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. FEMS Microbiol Ecol 34: 243–253.
36. Osborn AM, Moore ER, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environ Microbiol 2: 39–50.
37. Schütte UM, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, et al. (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Appl Microbiol Biotechnol 80: 365–380.
38. Southern EM (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal Biochem 100: 319–323.
39. Osborne CA, Rees GN, Bernstein Y, Janssen PH (2006) New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. Appl Environ Microbiol 72: 1270–1278.
40. Ramette A (2009) Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. Appl Environ Microbiol 75: 2495–2505.
41. R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. version 2.14.0. Vienna, Austria.
42. Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. J Stat Softw 22: 1–20.
43. Hennig C (2012) fpc: Flexible procedures for clustering. R package version 2.1–4.
44. Fox J, Weisberg S (2011) An R Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage.
45. Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. Appl Environ Microbiol 71: 7724–7736.
46. Yu Y, Breitbart M, McNairnie P, Rohwer F (2006) FastGroupII: a web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. BMC Bioinformatics 7: 57.
47. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389–3402.
48. Shannon CE, Weaver W (1949) The Mathematical Theory of Communication. Urbana: Univ of Illinois Press. 125 p.
49. Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scand J Statist 11: 265-270.
50. Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD (2010) Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. Integr Comp Biol 50: 662–674.
51. Raina JB, Tapiolas D, Willis BL, Bourne DG (2009) Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. Appl Environ Microbiol 75: 3492–3501.
52. Hansson L, Agis M, Maier C, Weinbauer MG (2009) Community composition of bacteria associated with cold-water coral *Madrepora oculata*: within and between colony variability. Mar Ecol Prog Ser 397: 89–102.
53. Morrow KM, Moss AG, Chadwick NE, Liles MR (2012) Bacterial associates of two Caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. Appl Environ Microbiol 78: 6438–6449.
54. Goffredi SK, Johnson SB, Vrijenhoek RC (2007) Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax* polychaete worms. Appl Environ Microbiol 73: 2314–2323.
55. Ainsworth TD, Hoegh-Guldberg O (2009) Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress. Aquat Biol 4: 289–296.
56. Klaus JS, Janse I, Heikoop JM, Sanford RA, Fouke BW (2007) Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. Environ Microbiol 9: 1291–1305.

57. Neulinger SC, Jarnegren J, Ludvigsen M, Lochte K, Dullo WC (2008) Phenotype-specific bacterial communities in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and their implications for the coral's nutrition, health, and distribution. Appl Environ Microbiol 74: 7272–7285.
58. de Castro AP, Araújo SD, Reis AMM, Moura RL, Francini-Filho RB, et al. (2010) Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. Microb Ecol 59: 658–667.
59. Vega Thurber R, Willner-Hall D, Rodriguez-Mueller B, Desnues C, Edwards RA, et al. (2009) Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. Environ Microbiol 11: 2148–2163.
60. Garren M, Raymundo L, Guest J, Harvell CD, Azam F (2009) Resilience of coral-associated bacterial communities exposed to fish farm effluent. PLoS One 4: e7319.
61. Martin Y, Bonnefont JL, Chancerelle L (2002) Gorgonians mass mortality during the 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. Water Res 36: 779–782.
62. Hall-Spencer JM, Pike J, Munn CB (2007) Diseases affect cold-water corals too: *Eunicella verrucosa* (Cnidaria: Gorgonacea) necrosis in SW England. Dis Aquat Organ 76: 87–97.
63. Alves Jr N, Neto OSM, Silva BSO, De Moura RL, Francini-Filho RB, et al. (2010) Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. Environ Microbiol Rep 2: 90–95.
64. Bruce T, Meirelles PM, Garcia G, Paranhos R, Rezende CE, et al. (2012) Abrolhos Bank reef health evaluated by means of water quality, microbial diversity, benthic cover, and fish biomass data. PLoS One 7: e36687.
65. Dinsdale EA, Pantos O, Smriga S, Edwards RA, Angly F, et al. (2008) Microbial ecology of four coral atolls in the Northern Line Islands. PLoS One 3: e1584.
66. Hewson I, Brown JM, Burge CA, Couch CS, LaBarre BA, et al. (2012) Description of viral assemblages associated with the *Gorgonia ventalina* holobiont. Coral Reefs 31: 487–491.
67. Coma R, Ribes M (2003) Seasonal energetic constraints in Mediterranean benthic suspension feeders: effects at different levels of ecological organization. Oikos 101: 205–215.

ANNEXE 2

RECHERCHE DE LA PRÉSENCE D'UNE COMMUNAUTÉ ARCHÉENNE ASSOCIÉE À *PARAMURICEA CLAVATA*

Les archées (domaine *Archaea*) sont des organismes procaryotes constituant le troisième domaine du vivant, les deux autres étant ceux des bactéries (domaine *Bacteria*) et des eucaryotes (domaine *Eukarya*) (Woese *et al.*, 1990). Longtemps considérées comme des organismes extrêmophiles, les archées ont également été observées en milieu marin côtier, que ce soit dans les communautés planctoniques (voir par exemple DeLong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992; Winter *et al.*, 2009), dans les sédiments (Munson *et al.*, 1997; Ravenschlag *et al.*, 2001), dans les éponges (Siegl *et al.*, 2008; Radax *et al.*, 2012; Simister *et al.*, 2012a), ou encore les coraux (Kellogg, 2004; Wegley *et al.*, 2004; Wegley *et al.*, 2007; Vega Thurber *et al.*, 2009; Littman *et al.*, 2011). Les archées font en effet partie intégrante du microbiote de l'holobionte corail (également constitué de bactéries, virus et fungi). Comme c'est le cas pour les communautés bactériennes, les communautés archéennes des coraux sont distinctes de celles retrouvées dans l'eau de mer environnante, et diffèrent en fonction du compartiment de l'hôte (mucus ou tissu) (Kellogg, 2004; Wegley *et al.*, 2004). Cependant, contrairement aux bactéries, il n'existe à ce jour pas de données supportant l'existence d'associations espèce-spécifiques entre des archées et des coraux (Kellogg, 2004; Wegley *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2007a). Même si peu d'études ont à ce jour documenté la diversité archéenne associée aux coraux, certaines ont suggéré que ces microorganismes pourraient jouer un rôle important dans le cycle de l'azote au sein de l'holobionte (Beman *et al.*, 2007; Vega Thurber *et al.*, 2009). Dans l'optique de décrire les communautés microbiennes associées à la gorgone rouge *P. clavata* et mieux comprendre le fonctionnement de cet holobionte, nous avons cherché à savoir si des archées pouvaient y être détectées.

Pour ce faire, trois échantillons de gorgone dont la communauté bactérienne a été caractérisée dans le Chapitre 1 ont été analysés à partir des ADN totaux extraits précédemment (Summer2008-Sc1, Summer2009-Me2, Winter2008-Ri1). La recherche d'archées a été réalisée par amplification des ADN ribosomiques 16S archéens par PCR avec 3 couples d'amorces spécifiques : 344F/915R (Casamayor *et al.*, 2002), 340F/1000R (Gantner *et al.*, 2011) et Arch21F/Arch958R (DeLong, 1992). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant

0,8 mM de dNTP, 1 µM de chaque amorce, du tampon FlexiGoTaq (Promega) 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$ (Promega), 1 unité d'enzyme GoTaq (Promega) et 1 µl d'ADN. L'amplification a ensuite été réalisée dans un thermocycleur selon les étapes suivantes : dénaturation initiale 5 min à 95°C, suivie de 35 cycles d'amplification (dénaturation 1 min à 95°C ; hybridation 1 min à 55°C pour Arch21F/Arch958R et 340F/1000R et à 61°C pour 344F/915R ; extension 1 min à 72°C) puis d'une extension finale 10 min à 72°C. La présence d'archées dans les échantillons a été évaluée par la présence d'un signal d'amplification sur gel d'agarose 1% en TAE contenant du bromure d'éthidium. Une souche de *Methanosarcina barkeri* a été utilisée comme contrôle positif, une souche de *Vibrio coralliilyticus* comme contrôle négatif. Un témoin négatif ne contenant que de l'eau stérile a également été amplifié afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Aucun produit correspondant à l'amplification d'ADNr 16S archéens (dont la taille du signal attendu est confirmée par l'amplification de l'échantillon contrôle positif) n'a pu être visualisé pour aucun des échantillons de *P. clavata* (Figure A1). Un signal à multiples bandes, et donc non spécifique, a pu être observé pour l'amplification de l'échantillon Winter2008-Ri par les amorces 340F/1000R. De même l'amplification par les amorces 344F/915R semble donner un signal artéfactuel d'amplification du témoin négatif bactérien (Figure A1). Bien que l'absence d'archées au sein du microbiote de la gorgone rouge puisse paraître surprenante, une observation similaire a été effectuée au sein du corail mou antarctique *Alcyonium antarticum* (Webster et Bourne, 2007). Cependant, l'absence de signal après amplification PCR dans les échantillons de gorgone ne permet pas de conclure avec certitude à l'absence d'archées dans le microbiote de l'holobionte étudié. En effet, des difficultés à amplifier ces ADN ont été observées dans certaines études. Par exemple, l'amplification d'ADN archéens chez *Porites astreoides* a échoué dans les échantillons d'une étude (Kellogg, 2004) mais réussi dans ceux d'une autre (Wegley *et al.*, 2004). Il est possible que les échantillons analysés contiennent une faible proportion d'archées, dont le signal d'amplification est trop faible pour être détecté sur gel. De nouveaux tests sur d'autres échantillons devraient donc être mis en œuvre afin de s'assurer de la complète absence d'archées des communautés microbiennes associées à *P. clavata*.

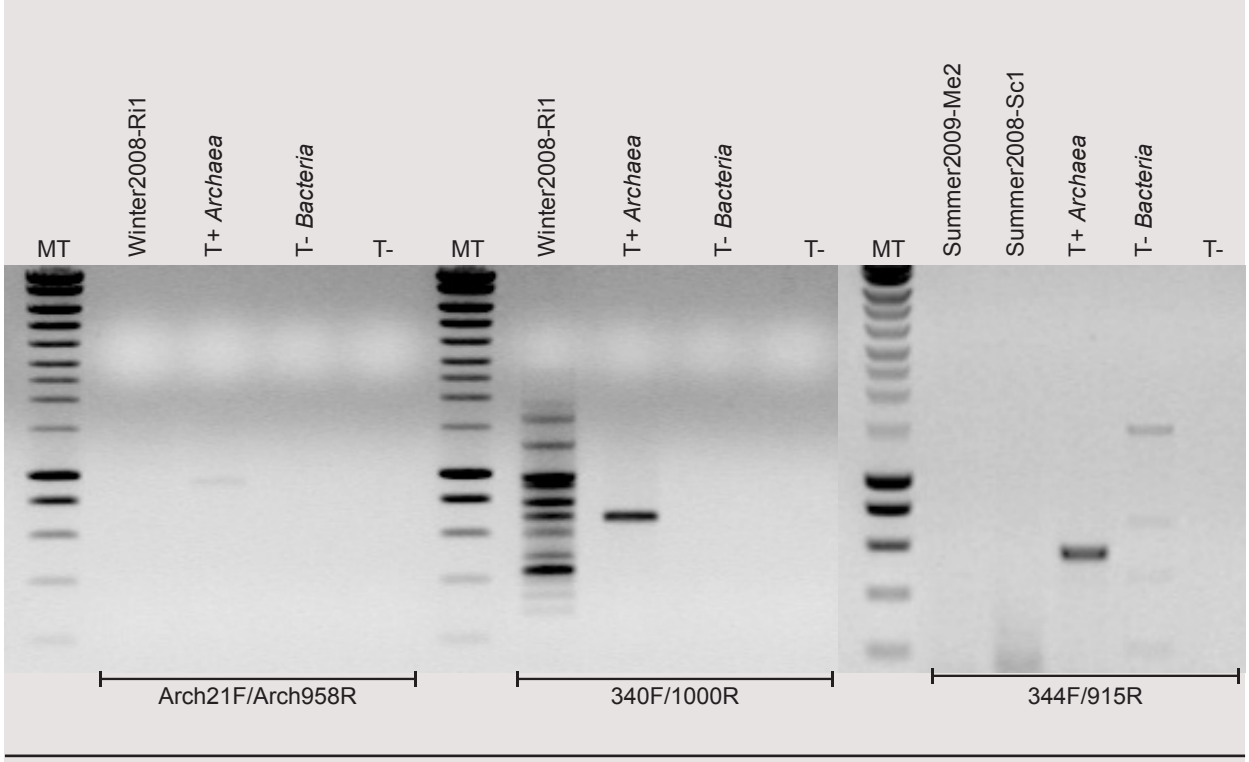


Figure A1 | Analyse PCR des ADNr 16S archéens dans des échantillons de *P. clavata*.
Gels (agarose 1% en TAE 1X) de contrôle des réactions d'amplification par PCR des ADN archéens aves les amorces Arch21F/Arch958R, 340F/1000R et 344F/915R. MT : marqueur de taille Smart Ladder®(Eurogentec) ; T+ *Archaea*: contrôle positif, ADN de *Methanosarcina barkeri* ; T- *Bacteria* : contrôle négatif, ADN de *Vibrio coralliilitycus* ; T- : contrôle négatif, sans ADN.

ANNEXE 3

RECHERCHE DE BACTÉRIES CULTIVABLES ASSOCIÉES À *P. CLAVATA*

La caractérisation taxonomique au rang de souche, l'analyse métabolique et physiologique des bactéries, ainsi que l'évaluation des interactions interspécifiques entre bactéries nécessite la culture des espèces d'intérêt. Nous avons donc entrepris une tentative de culture des bactéries associées à *P. clavata*.

Lors de l'échantillonnage des colonies de *P. clavata* prélevées au site Riou (Marseille, France) en hiver 2008 (profondeur 20 m), trois fragments de 2 cm de long provenant des mêmes colonies que celles utilisées pour la caractérisation des communautés bactériennes par T-RFLP (colonies Ri 1, Ri 2 et Ri 3) ont été prélevés pour l'approche culturale. Ces fragments ont été lavés en eau de mer stérile filtrée, puis les tissus ont été broyés à l'aide d'une lame de scalpel. Après homogénéisation du broyat par vortex et piston dans 1 ml d'eau de mer stérile filtrée, des dilutions en séries des tissus ont été réalisées. Nous avons ensuite procédé à l'étalement de 200 µl de suspensions non diluées, diluées au 1/10ème et diluées au 1/100ème sur milieu non sélectif Marine Agar 2216 (Difco) pour chaque échantillon de gorgone (4 boîtes de culture par dilution et par échantillon). De l'eau de mer stérile filtrée (200 µl) utilisée pour le broyage et les étalements a également été étalée sur boîtes afin de s'assurer de l'absence de contamination. Après 3 jours d'incubation à 23°C, l'abondance des colonies bactériennes était très hétérogène entre les 3 échantillons, et même entre boîtes réplicats d'un même fragment (de 10 clones pour l'échantillon Ri 2 à 1000 clones pour l'échantillon Ri 3, en moyenne). Peu de morphotypes de colonies (déterminés visuellement) étaient partagés entre deux fragments de gorgone rouge (données non montrées). Pour chaque broyat de tissu, toutes les colonies bactériennes issues de la dilution permettant d'obtenir le plus grand nombre de colonies distinctes ont été réensemencées individuellement sur de nouvelles boîtes afin d'obtenir des colonies de taille homogène. Après 3 jours à 23°C, toutes les colonies bactériennes provenant d'un même fragment de gorgone ont été rassemblées dans 4 ml d'eau de mer stérile filtrée. Le mélange a ensuite été centrifugé (3 min, 4000 g) pour permettre la sédimentation des cellules bactériennes, puis le culot a été conservé à -20°C jusqu'à extraction de l'ADN. Les ADN des bactéries cultivées ont ensuite été extraits selon le même protocole que celui utilisé pour les ADN des tissus de gorgones, décrit dans le Chapitre

2. Afin d'évaluer si les bactéries dominantes des communautés associées à *P. clavata* font partie de la communauté cultivable, les ADN ribosomiques des bactéries cultivées ont été analysés par T-RFLP (enzyme de restriction : *Cfo*I ; limites de taille : 80 à 600 pb ; seuil: 2% de l'intensité de fluorescence totale ; binning : WS 0.5, Sh 0.1) et les profils obtenus ont été comparés à ceux des communautés bactériennes totales (Figure A2).

Aucun TRF n'était commun entre la communauté bactérienne cultivable et la communauté bactérienne totale pour un même fragment de gorgone (Figure A2). Ceci indique que les ribotypes *Hahellaceae* majoritaires des assemblages bactériens associés à *P. clavata* décrits dans le Chapitre 2 ne sont pas cultivables sur le milieu Marine Agar 2216, montré comme le milieu donnant le plus grand nombre de morphotypes lors d'une étude sur les bactéries des éponges tropicales (Webster *et al.*, 2001). Les données indiquent également que la communauté cultivable ne représente qu'une portion très minoritaire de la communauté bactérienne totale car aucun TRF des communautés cultivables n'est observé dans les communautés totales. Une différence drastique entre la diversité des bactéries cultivables et celle des ribotypes identifiés par des techniques moléculaires chez des coraux a déjà été observée (Galkiewicz *et al.*, 2011; Rohwer *et al.*, 2001). Ce résultat n'est pas surprenant, car il a été décrit que moins de 1% des espèces bactériennes sont cultivables (Rappé et Giovannoni, 2003). Ces résultats illustrent également une des limites de la T-RFLP qui ne permet pas d'identifier la totalité de la communauté bactérienne en présence, mais seulement les ribotypes dominants. C'est pourquoi il est conseillé de coupler les méthodes culture-dépendantes à des analyses basées sur les acides nucléiques pour étudier les communautés bactériennes.

L'approche culturale reste la seule permettant (i) l'identification taxonomique au rang de souche, (ii) l'étude détaillée de la physiologie, et (iii) l'étude de la fonction écologique des bactéries d'intérêt. De nombreuses informations permettant une description plus complète des bactéries dominant les communautés de la gorgone rouge, en particulier les bactéries de la famille *Hahellaceae*, pourraient être obtenues si leur culture parvenait à être mise au point. L'utilisation de différents milieux de culture, par exemple des milieux enrichis en extraits de tissus de gorgone pouvant contenir des métabolites nécessaires à la croissance des bactéries symbiotiques, pourrait aider à accroître la diversité des bactéries cultivables et éventuellement permettre la culture des espèces dominantes de la communauté microbienne associée à *P. clavata*.

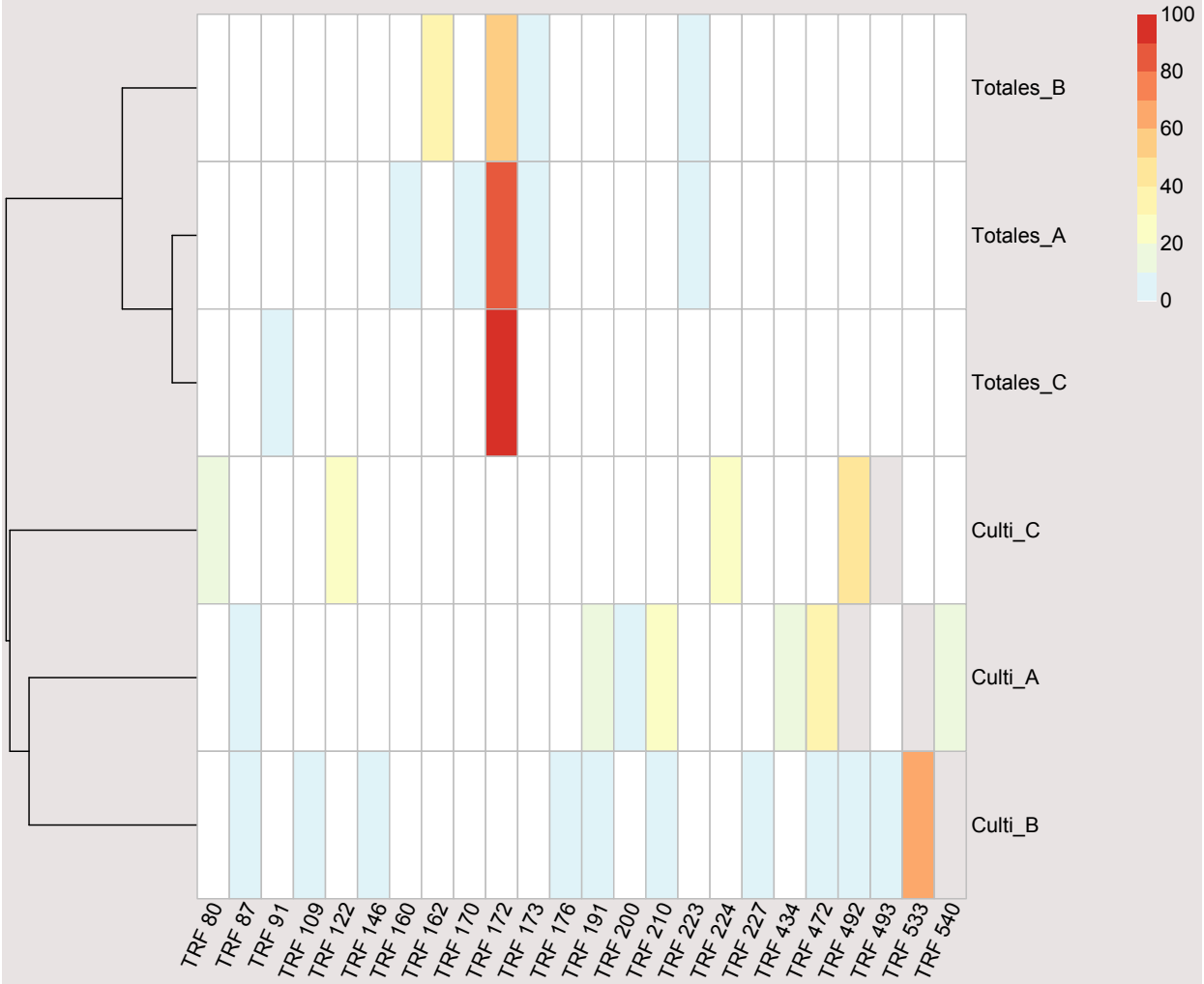


Figure A2 | Abondances relatives des TRFs des communautés bactériennes totales et cultivables analysées par T-RFLP avec l'enzyme *Cfo*I.
Les 3 premières lignes représentent les profils T-RFLP de la communauté bactérienne associée aux échantillons de *P. clavata* échantillonnés à Riou (Marseille, France) en hiver 2008 (Totales_A, B et C) et les 3 dernières lignes représentent les profils des communautés bactériennes cultivables (Culti_A, B et C) associées aux mêmes échantillons générés par la digestion par *Cfo*I. Les TRFs sont désignés par leur taille (en paires de bases) après binning. Les couleurs représentent l'intensité de fluorescence relative (en %) d'après l'échelle de couleur indiquée à droite.

ANNEXE 4

OBSERVATION DE L'ULTRASTRUCTURE DES TISSUS DE *P. CLAVATA* EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE

Des fragments apicaux de gorgone rouge ont été échantillonnés sur le site de Riou (Marseille, France) à 20 m de profondeur en février 2011. Les échantillons ont été rincés au laboratoire avec de l'eau de mer stérile filtrée à 0,2 µm, puis fixés durant la nuit à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% (1 volume), cacodylate de sodium 0,4 M (4 volumes) et d'eau de mer stérile filtrée (5 volumes). Les fragments fixés ont ensuite été rincés trois fois en eau de mer stérile filtrée, puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol (30, 50, 70, 90 et 100 %). Les échantillons ont ensuite été fragmentés dans de l'azote liquide à l'aide d'une lame de rasoir. Cette cryofracture permet de casser le matériel selon des plans de coupes aléatoires. Les échantillons coupés ont alors été séchés au point critique, montés sur un porte-objet puis métallisés à l'or-palladium. Enfin, les fragments ont été observés sur un microscope électronique à balayage (Hitachi S570).

L'observation de l'ultrastructure des tissus de *P. clavata* a pu mettre en évidence différentes structures particulières au sein des tissus (Figure A3). La surface des colonies était recouverte de cils à la surface de l'épiderme (Figure A3-B). Des objets semblables à des débris ou déchets organiques ont également pu être observés à la surface de la gorgone, mais aucune structure bactérienne n'a pu y être identifiée (Figure A3-B). A l'intérieur des tissus, différentes structures qui sembleraient être des sclérites ont été observées (Figure A3-C). De nombreux nématocystes, type particulier de cnidocystes, ont pu être identifiés, alignés dans la bordure des tissus des tentacules des polypes (Figure A3-D et E). Ce sont des structures elliptiques en forme de grain de riz dont la capsule constituée de collagène renferme un tubule qui sera dévaginé en cas de contact avec une proie (Figure A3-F). Aucun plan de coupe aléatoire obtenu ne nous a permis d'observer des structures pouvant être assimilées à des bactéries.

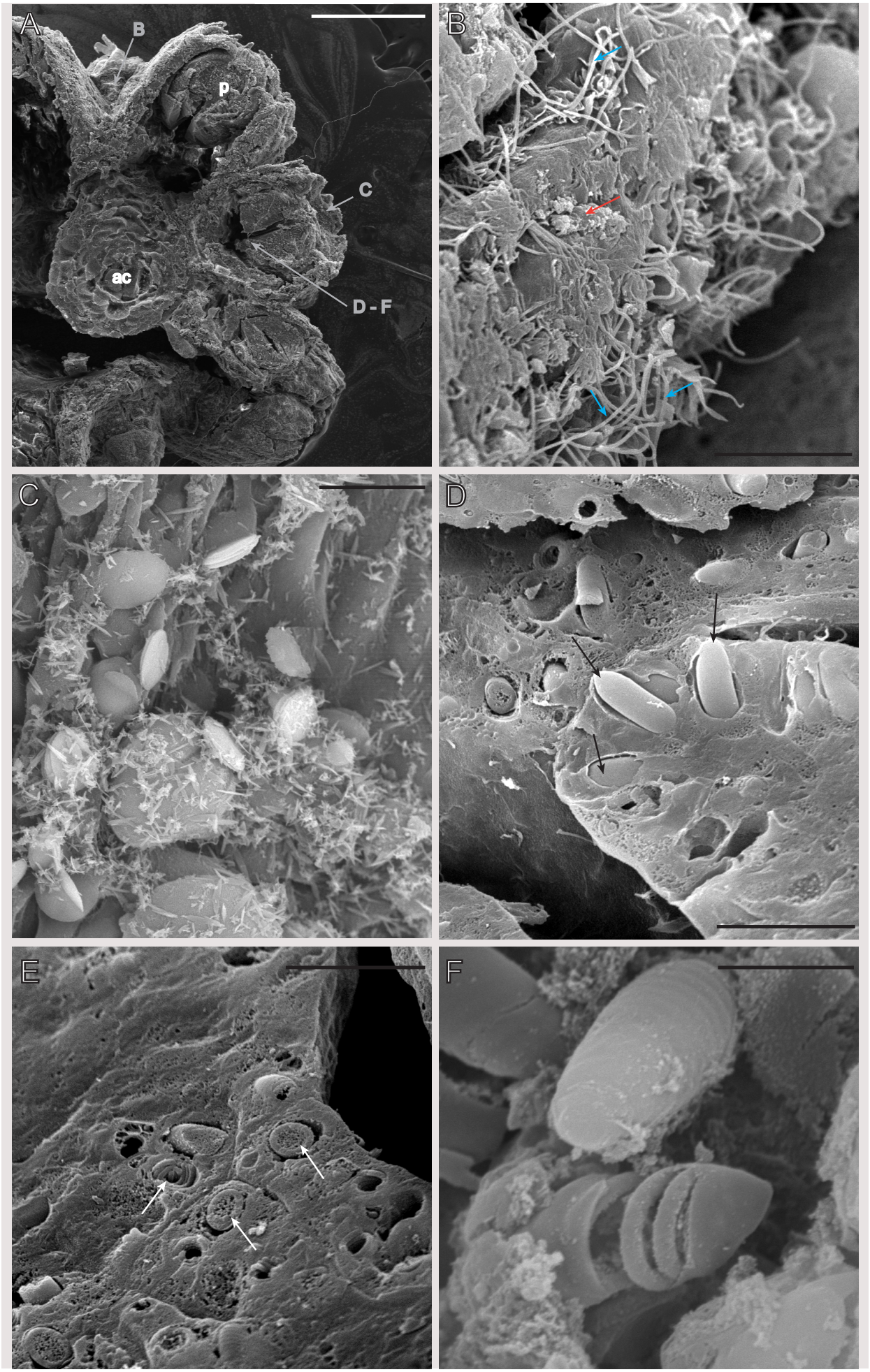

A
B
p
C
ac
D - F
B
C
D
E
F

Figure A3 | Observations d'une colonie de *P. clavata* en microscopie électronique à balayage.
A : Vue générale de la coupe selon un axe transversal. Les flèches grises indiquent la position des photos B à F. ac : axe squelettique central, p : polype rétracté (Barre d'échelle : 1 mm).
B : Vue externe de l'épiderme portant les cils (flèches bleues) et des détritus (flèches rouges) (Barre d'échelle : 10 µm).
C : Vue interne de l'épiderme contenant des sclérites (Barre d'échelle : 10 µm).
D : Vue de l'organisation des nématocystes (flèches noires) dans la partie apicale du tentacule du polype (Barre d'échelle : 12 µm).
E : Vue de l'ultrastructure de nématocystes coupés transversalement (flèches blanches) (Barre d'échelle : 10 µm).
F : Vue d'un nématocyste dont le tubule est en cours de dévagination (Barre d'échelle : 3 µm).

ANNEXE 5

MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE CARD-FISH (CATALYZED REPORTER DEPOSITION FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION) POUR L'HYBRIDATION DE CELLULES BACTÉRIENNES DANS LES TISSUS DE LA GORGONE ROUGE *P. CLAVATA*

1. Mise au point du protocole de coupes transversales fines des tissus

Après échantillonnage et rinçage des fragments de gorgone rouge à l'eau de mer stérile filtrée (ESF), nous avons déterminé que l'ajout de cristaux de menthol aux échantillons laissés à 4°C durant une nuit dans de l'ESF permet le déploiement et une anesthésie légère des polypes.

Plusieurs tests ont dû être menés pour parvenir à obtenir des coupes transversales fines (5 µm d'épaisseur) sans déchirer les tissus adjacents à l'axe central rigide de manière à pouvoir identifier les structures tissulaires en microscopie. Contrairement aux sclérites présentes dans les tissus de la gorgone, ce squelette corné essentiellement constitué de protéines ne réagit pas à l'EDTA couramment utilisé dans les protocoles d'histologie des coraux pour décalcifier les squelettes calcaires. Différents produits fixateurs de tissus vivants (paraformaldéhyde 4% (poids/vol) en PBS pH 8,3, fixateur de Bouin, formol 4%, solution formol-zinc 5%) et différents temps de fixation (4h, 8h, nuit) ont été testés afin de choisir les conditions permettant de couper les échantillons le plus facilement. Le protocole de déshydratation, inclusion en paraffine puis coupes a ensuite dû être mis au point (en collaboration avec le service d'histologie du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy) afin de déterminer un protocole optimisé pour l'obtention des coupes respectant au mieux l'intégrité des tissus.

2. Difficultés liées à l'autofluorescence des tissus de la gorgone

L'application de la technique CARD-FISH pour la visualisation de cellules bactériennes au sein des tissus de la gorgone rouge nécessite de pouvoir distinguer le signal spécifique lié à l'hybridation des bactéries du bruit de fond d'autofluorescence.

2.1. Choix des fluorochromes

Nous avons tout d'abord entrepris une analyse par spectrofluorimétrie afin de déterminer le spectre d'émission des tissus (en collaboration avec Marc Tedetti du MIO, Marseille). Pour ce faire, un fragment de gorgone fixé ayant subi le même protocole de fixation et décalcification que les fragments utilisés pour les coupes fines a été broyé avec une lame de scalpel, en prenant soin de retirer l'axe squelettique. Une attention particulière a été portée à l'homogénéisation des tissus dans de l'eau ultra-pure stérile avec un piston, afin d'avoir le moins de particules possible en solution. Après homogénéisation, les tissus ont été centrifugés (1 min, 5000 g) afin de permettre la sédimentation des grosses particules. Une dilution en série du surnageant a ensuite été effectuée dans de l'eau ultra-pure stérile. La matrice de fluorescence a été réalisée sur la solution diluée au 1/100ème à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi F-7000 sur le domaine spectral 200-500 nm avec un pas de 5 nm pour l'excitation, et sur le domaine spectral 280-550 nm avec un pas de 2 nm pour l'émission. Les largeurs de bande des longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient de 5 nm. La vitesse de scan était de 1200 nm.min-1. Pendant l'analyse, l'échantillon était maintenu à une température constante de 20°C grâce un système de circulation d'eau externe.

La matrice de fluorescence obtenue a permis de déterminer que le fluorochrome Alexa488 et le marqueur fluorescent DAPI ont des propriétés de fluorescence compatibles avec le spectre des tissus de gorgone (Figure A4). Il est cependant important de garder à l'esprit que cette matrice n'a pu être obtenue que pour un échantillon dilué au 1/100ème et que les molécules autofluorescentes sont donc présentes en concentration beaucoup plus importantes dans les coupes de tissus et impossibles à diluer pour l'observation des structures tissulaires intactes.

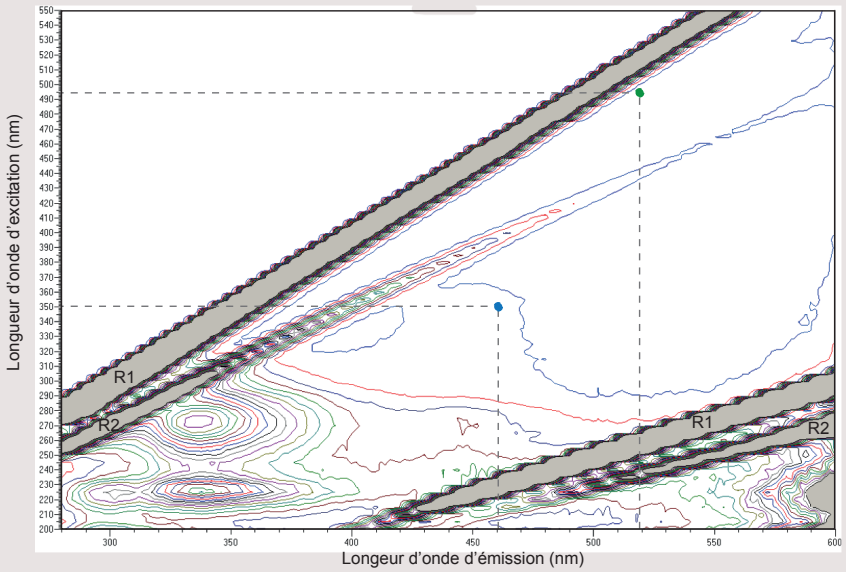


Figure A4 | Matrice d'excitation-émission de fluorescence des tissus de *P. clavata* obtenue en spectrofluorimétrie.
Matrice après analyse en spectrofluorimétrie d'un broyat de tissus de *P. clavata* dilué au 1/100ème. R1 et R2, émissions de fluorescence parasite dues au solvant (R1, diffusion de Rayleigh ; R2, diffusion de Raman) ; Point bleu, zone de fluorescence du DAPI (maximum d'excitation 350 nm/maximum d'émission 461 nm) ; Point vert, zone de fluorescence de l'Alexa488 (maximum d'excitation 495 nm/ maximum d'émission 519 nm).

2.2. Identification de l'origine de la fluorescence de bruit de fond

Des cultures d'*Escherichia coli* ont été utilisées comme contrôles positifs pour tester la fonctionnalité du protocole CARD-FISH (adapté de Neulinger *et al.*, 2009) pour l'hybridation de bactéries. Même en utilisant un fluorochrome qui semble adapté, le signal fluorescent obtenu par hybridation des souches cultivées était d'une intensité semblable à l'intensité d'autofluorescence des tissus de *P. clavata* en coupe (Figure A5, panneaux A et B).

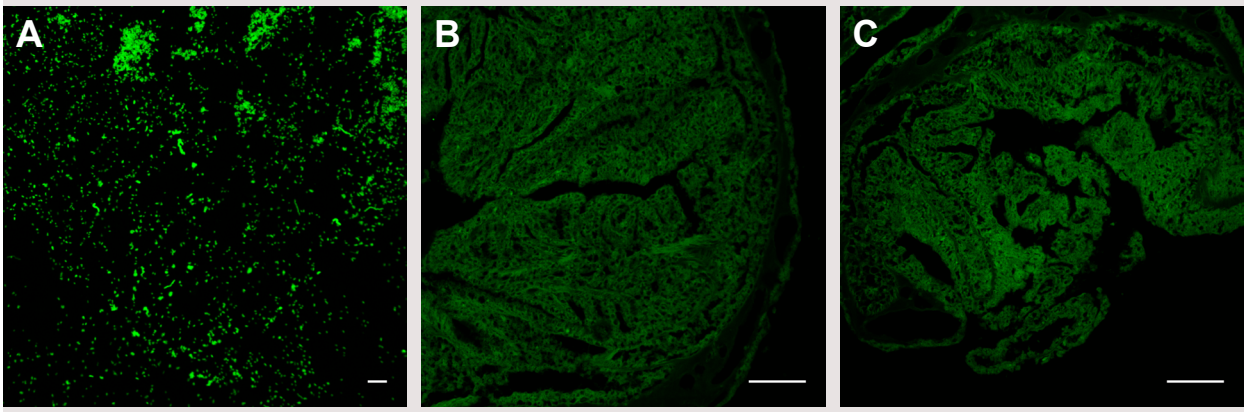


Figure A5 | Fluorescence émise par des coupes traitées par le protocole CARD-FISH observées en microscopie confocale.
La couleur verte a été rajoutée en post-traitement, les images étant initialement acquises en niveaux de gris).
A : Etalement de cellules d'*Escherichia coli* hybridées avec le mélange de sondes Eub338 (Barre d'échelle : 20 µm).
B : Coupe de *P. clavata* hybridée avec le mélange de sondes Eub338 (Barre d'échelle : 100 µm)
C : Coupe de *P. clavata* soumise au protocole CARD-FISH sans l'ajout de sonde dans le tampon d'hybridation (contrôle négatif) (Barre d'échelle : 100 µm).

Il était donc impossible de détecter des bactéries hybridées associées aux tissus dans ces conditions, d'autant plus que les souches cultivées contiennent en général davantage d'ARN ribosomal que les bactéries symbiotiques car elles sont métaboliquement plus actives, et émettent donc un signal plus fort. Nous avons alors testé différentes hypothèses pouvant expliquer l'important bruit de fond :

1. *Le signal pourrait être dû à une hybridation aspécifique de la sonde avec les tissus générant une dégradation uniforme du substrat fluorescent et produisant une fluorescence générale de la coupe.*

L'observation comparée d'une coupe ayant subi le protocole CARD-FISH avec le mélange de sondes Eub338 et d'une coupe ayant subi le même protocole sans ajout de sonde a permis d'écarter cette hypothèse car une intensité d'autofluorescence similaire pouvaient être observée avec ou sans la sonde spécifique (Figure A5, panneaux B et C).

2. *Le signal pourrait être dû à une inactivation incomplète des péroxydases endogènes qui dégraderaient le substrat fluorescent de manière non spécifique.*

Cette hypothèse a pu être écartée après le test de différents réactifs pour l'inactivation (HCl, H_20_2, HCl couplé à H_20_2) et de différents temps d'incubation, sans réduction notable de l'autofluorescence des tissus (données non montrées).

3. *Le signal d'hybridation est trop faible et/ou les bactéries sont trop peu nombreuses pour pouvoir être détectées en microscopie confocale.*

Afin de « diluer » l'autofluorescence qui pourrait être liée à des molécules fluorescentes en quantité importante dans les tissus et se soustraire d'une possible inaccessibilité partielle des bactéries au sein de l'épaisseur des tissus sur une coupe, nous avons réalisé un test d'hybridation sur des tissus broyés. Pour ce faire, les tissus d'un fragment de *P. clavata* de 2 cm de long ont été broyés à l'aide d'un scalpel et homogénéisés dans 1,5 ml d'eau de mer stérile filtrée à l'aide d'un piston. Le broyat de tissu a ensuite été fixé au formol 4% et décalcifié selon le protocole utilisé pour les coupes. Après décalcification, le culot de tissus broyés a été lavé dans un bain de PBS 1X pH 8,3 puis conservé en PBS 1X pH 8,3. L'échantillon a ensuite été soumis à 3 cycles de sonication (dans un bain à ultrasons) et vortex (à puissance maximale) de 1 min chacun, afin de rompre les aggrégats de tissus qui auraient subsisté après homogénéisation manuelle. Enfin, la solution a été divisée en 3 aliquots de volumes égaux qui ont été pré-filtrés sur des filtres de porosité 2 µm, puis filtrés sur des filtres de porosité 0,2 µm. Les filtres ont ensuite été séchés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Une portion de filtre a été soumise au même protocole CARD-FISH que les coupes. Après hybridation avec le mélange de sondes Eub338, des signaux fluorescents ont pu être observés pour des structures pouvant être identifiées comme des bactéries

(Figure A6, panneau A). Cette identification a pu être confirmée par le contre-marquage en DAPI (Figure A6, panneau B) et l'absence de signaux similaire par hybridation avec la sonde Non-Eub (données non montrées). Nous avons ainsi pu confirmer que le protocole CARD-FISH fonctionnait pour l'hybridation des bactéries associées à *P. clavata* et que le signal d'hybridation émis par ces bactéries était détectable en microscopie confocale. Nous avons également pu remarquer que ces bactéries étaient de taille relativement faible.

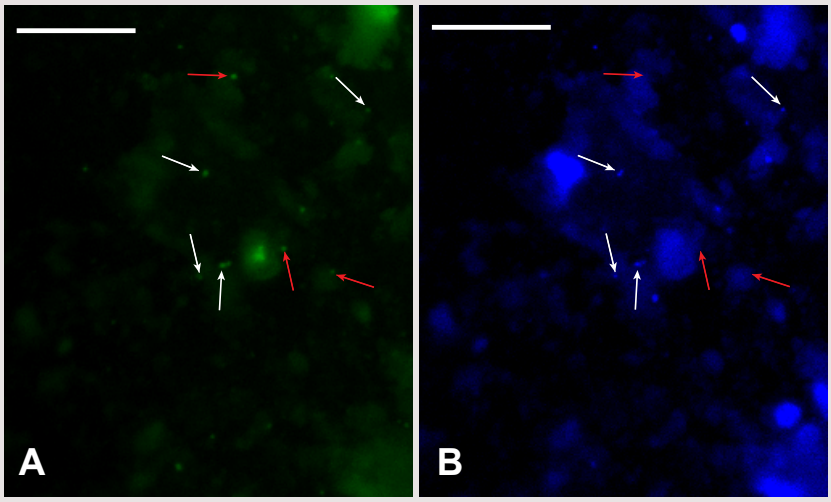


Figure A6 | Broyat de tissus de *P. clavata* filtré sur un filtre de porosité 0,2 µm traité par le protocole CARD-FISH et observé en microscopie confocale.
Filtre de porosité 0,2 µm sur lequel a été filtré un broyat de tissus de *P. clavata* (pré-filtré sur 2 µm) hybridé avec le mélange de sondes Eub338 et amplifié avec le marquage fluorescent Alexa488 (A) ou DAPI (B). Les flèches blanches indiquent des bactéries isolées contre-marquées au DAPI. Les flèches rouges indiquent des signaux artéfactuels (absence de contre-marquage en DAPI).
Les couleurs verte et bleue ont été rajoutées en post-traitement, les images étant initialement acquises en niveaux de gris. Barre d'échelle : 20 µm.

Au vu de ces résultats, il restait deux hypothèses permettant d'expliquer l'incapacité à observer des signaux bactériens dans les coupes de tissus:

- Les bactéries sont contenues dans des structures complexes au sein des tissus (qui auraient été détruites lors du test de filtration de broyat de tissus) et sont inaccessibles à la sonde, ce qui empêche leur hybridation.
- L'autofluorescence des tissus est trop importante et masque le signal fluorescent émis par les bactéries hybridées.

La localisation des bactéries dans les tissus de la gorgone nécessite de conserver l'organisation des tissus intacte. Il nous était donc impossible de pallier à l'éventualité de la première hypothèse.

Nous avons alors entrepris des tentatives de réduction de l'autofluorescence des tissus. Dans la mesure où les techniques d'hybridation *in situ* fluorescente sont basées sur l'hybridation des ARN ribosomiques, le recours à des traitements des tissus à la javel ou aux UV, couramment utilisés pour dégrader les pigments et autres molécules autofluorescentes, était proscrite en raison du risque de dégradation des acides nucléiques.

Un test de réduction de l'autofluorescence a été réalisé sur coupes avec le réactif Autofluorescence Eliminator Reagent (Chemicon-Millipore) en testant deux temps d'incubation : 50 min (selon les instructions du fournisseur) et durant la nuit (17 h). Une réduction remarquable de l'autofluorescence a pu être obtenue après incubation la nuit (Figure A7).

Nous avons ensuite entrepris l'adaptation et l'optimisation des différentes étapes du protocole CARD-FISH décrit par Neulinger *et al.* (2009) (durées et températures d'incubation, concentrations des réactifs, nombre et durée des lavages) pour l'observation des bactéries hybridées sur des coupes de tissus de *P. clavata* (Tableau A1).

Figure A7 | Niveaux d'intensité de fluorescence après différents traitements de réduction de l'autofluorescence des tissus de *P. clavata*.
Images spectrales obtenues à différentes longueurs d'onde d'excitation par microscopie confocale.
A : sans traitement.
B : incubation 50 min dans le réactif Autofluorescence Eliminator Reagent.
C : incubation une nuit dans le réactif Autofluorescence Eliminator Reagent.

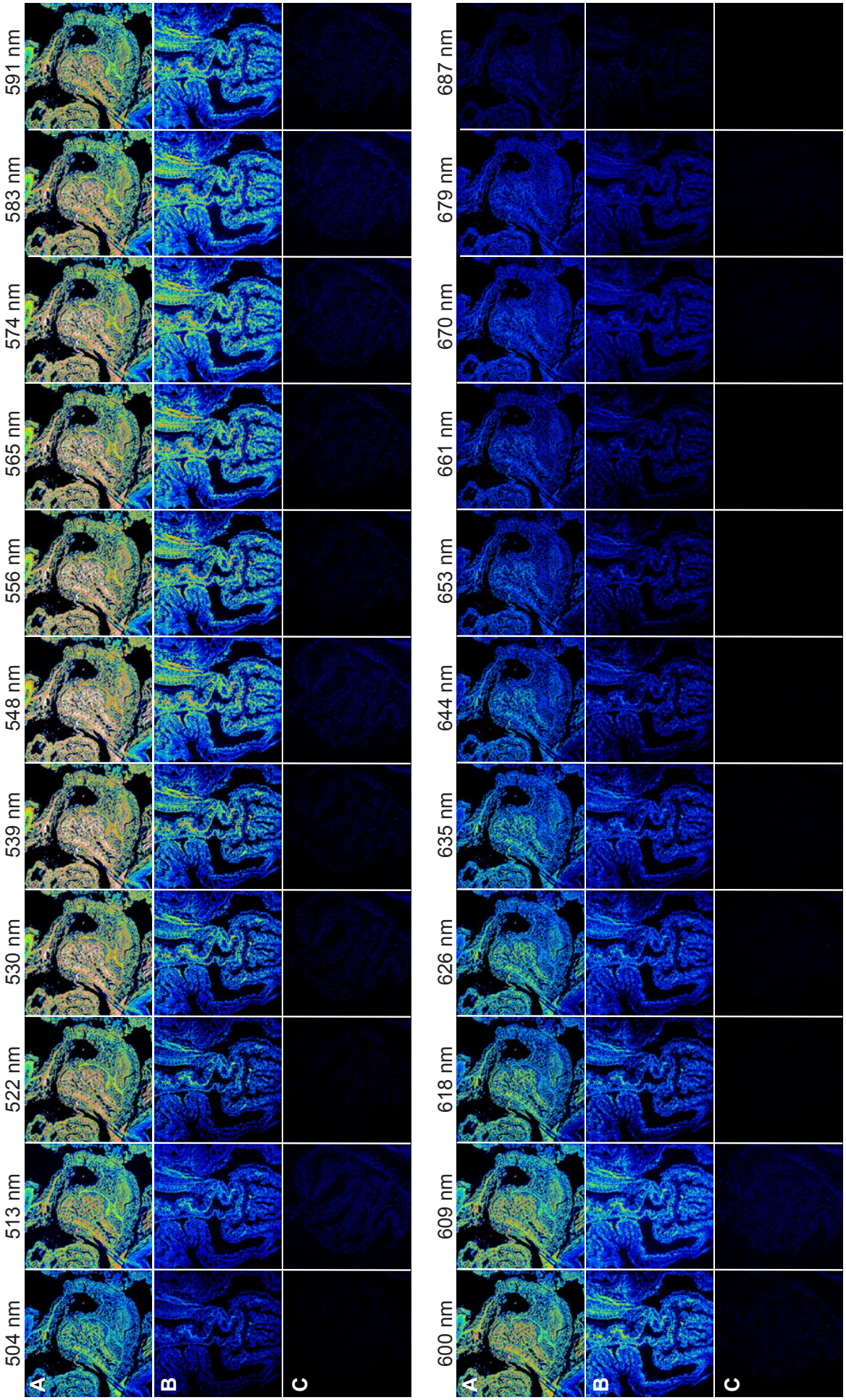

504 nm
513 nm
522 nm
530 nm
539 nm
548 nm
556 nm
565 nm
574 nm
583 nm
591 nm
600 nm
609 nm
618 nm
626 nm
635 nm
644 nm
653 nm
661 nm
670 nm
679 nm
687 nm
A
B
C

Tableau A1 | Résumé des étapes du protocole CARD-FISH pour les tissus de *P. clavata*.

Etape	Etape N°	Description[a]
Fixation	1	Rincer les échantillons en eau de mer stérile filtrée
	2	Anesthésier les polypes dans solution eau de mer stérile filtrée-menthol (ON-4°C)
	3	Incuber dans formol 4 % (ON-RT)
	4	Rincer PBS pH 7.4
Coupe	5	Décalcifier dans EDTA 20 % (wt/vol) en PBS pH 7.4 (2 jours-RT) - Changement de solutions 3 fois
	6	Déshydrater dans EtOH 70 %, EtOH 80 %, EtOH 95 %, EtOH 100 % (3x), xylène 100 % (3x) (1 h chaque-RT)
	7	Inclure en paraffine (2x 1 min-60°C)
	8	Réaliser les coupes de 5 µm d'épaisseur sur lames SuperFrost Plus[b]
Perméabilisation et inactivation des péroxydases endogènes	9	Déparaffiner dans NeoClear (2x 15min-RT)
	10	Réhydrater dans EtOH 100 % (2x),EtOH 95 %, EtOH 90 %, EtOH 80 %, H_20
	11	Sécher à l'air
	12	Incuber dans tampon lysozyme (2 h-37°C)
	13	Laver en H_20 (3x 1 min-RT)
	14	Incuber dans tampon achromopeptidase (1 h-37°C)
	15	Laver en H_20 (3x 1 min-RT)
	16	Sécher à l'air
	17	Incuber dans HCl 0.01 M (30 min-RT)
	18	Laver en H_20 (3x 1 min-RT)
	19	Sécher à l'air[c]
Hybridation	20	Préparer la solution d'hybridation : tampon d'hybridation + solution stock de la sonde (concentration finale 55 ng.µl^{-1})
	21	Incuber dans solution d'hybridation (4 h-35°C-obscurité)
	22	Laver dans tampon de lavage préchauffé (15 min-37°C-obscurité)
	23	Laver en H_20 froide (3 sec)
	24	Enlever le liquide en excès à l'aide d'un papier absorbant sans laisser la lame sécher
Amplification du signal[d]	25	Incuber dans PBS pH 7.4 (15 min-RT-obscurité)
	26	Préparer la solution d'amplification : tampon amplification + H_20_2 5 % final + substrat tyramide fluorescent 1:100
	27	Enlever le liquide en excès à l'aide d'un papier absorbant sans laisser la lame sécher
	28	Incuber dans la solution d'amplification (30 min-37°C-obscurité)
	29	Enlever le liquide en excès à l'aide d'un papier absorbant sans laisser la lame sécher
	30	Laver en PBS pH 7.4 (20 min-RT-obscurité)
	31	Laver en H_20 (3x 1 min-RT-obscurité)
	32	Sécher à l'air (obscurité)
	33	Monter avec lamelle et solution de montage (Citifluor, Vectashield, DAPI)[c]

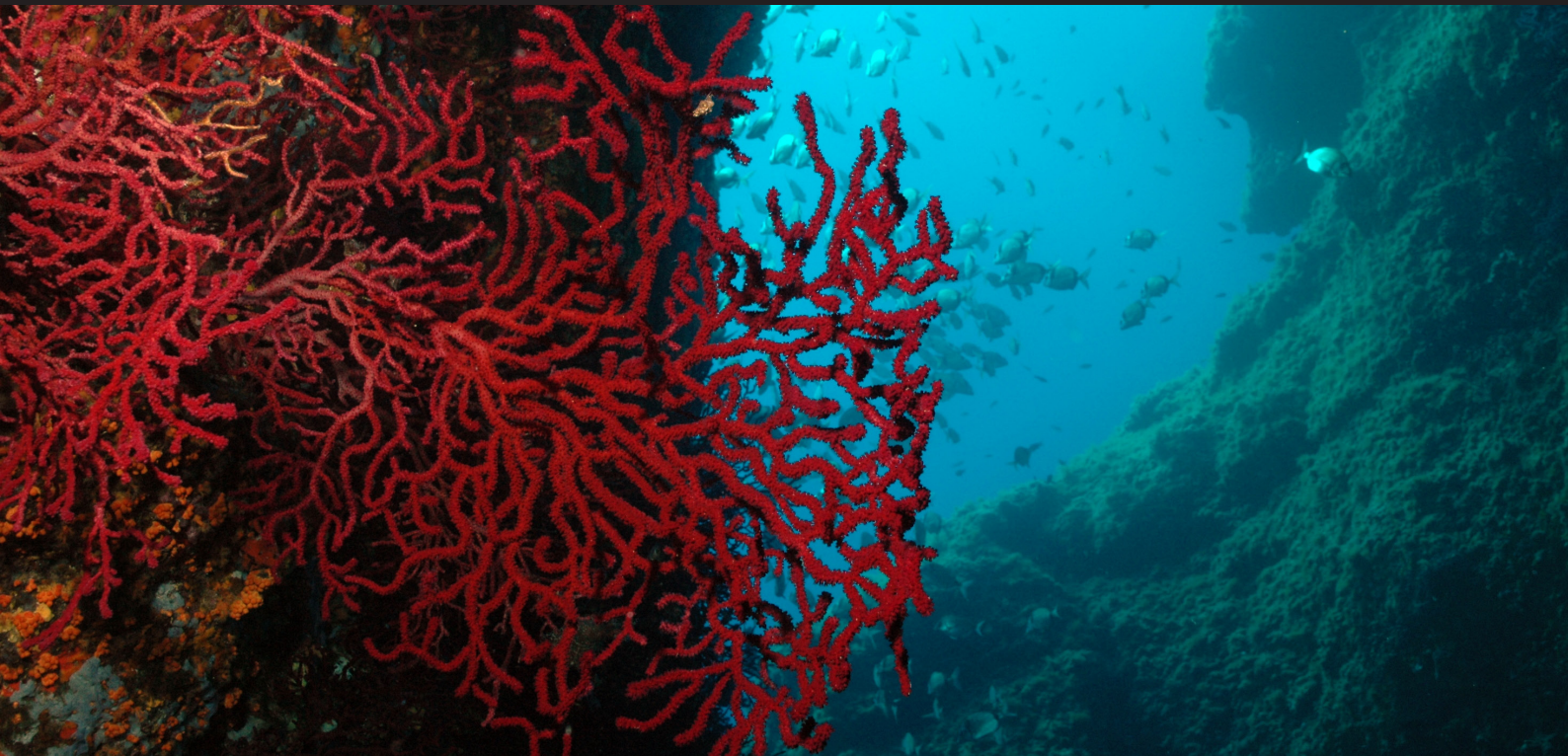
[a] ON, durant la nuit (overnight) - RT, température ambiante (room temperature) - EtOH, éthanol - H_20, eau ultra-pure stérile et filtrée sur 0.2 µm

[b] Les lames peuvent être conservées au sec et à l'obscurité pendant plusieurs mois

[c] Les lames peuvent être conservées à -20°C pendant plusieurs semaines

[d] Etapes à réaliser dans la glace

Glossaire



Alcyonacea : Ordre rassemblant des organismes de l'embranchement des Cnidaires, classe des Anthozoaires, sous-classe des Octocoralliaires.

Anthocodia (ou anthocodie) : Partie distale du polype comprenant la bouche et les tentacules.

Anthostèle : Partie basale du polype dans laquelle l'anthocodia peut se rétracter.

Anthozoaires (Anthozoa) : Littéralement « animal fleur ». Ils représentent l'une des quatre classes des Cnidaires et sont subdivisés en deux sous-classes **:** les Octocoralliaires et les Hexacoralliaires.

ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) : Technique d'empreinte moléculaire basée sur le polymorphisme de taille des séquences intergéniques entre les gènes ARNr 16S et 23S (ou région ITS1) caractérisées par une variabilité significative de longueur entre les différents génotypes bactériens (Fisher et Triplett, 1999).

Bactérie : Organisme vivant unicellulaire, procaryote (dépourvu de noyau) et appartenant au règne des *Bacteria*.

Biocénose : Ensemble des organismes qui peuplent un écosystème donné.

Binning : Regroupement de TRFs dans une même classe de taille déterminée en fonction de la précision sur la taille des TRFs atteinte par l'analyse en séquenceur automatique.

Clonage-séquençage : Technique permettant d'obtenir une séquence à partir de fragments ADN. Le clonage consiste en l'insertion des fragments ADN amplifiés par PCR dans un vecteur lui-même introduit dans une cellule hôte, appelée cellule compétente. Les cellules hôtes sont ensuite cultivées, ce qui permet d'obtenir une quantité importante de fragments ADN clonés. Les clones, contenant chacun un fragment ADN unique répliqué en plusieurs milliers d'exemplaires, sont alors séquencés par la méthode Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences obtenues peuvent être comparées avec les séquences pré-existantes dans les bases de données, permettant d'accéder à l'identité de la séquence et son positionnement phylogénétique (voir schéma explicatif Introduction-Figure 6).

Cnidaires (Cnidaria) : Phylum d'organismes eucaryotes métazoaires invertébrés exclusivement aquatiques regroupant les classes des Anthozoaires (Anthozoa), Hydrozoaires (Hydrozoa), Scyphozoaires (Scyphozoa) et Cubozoaires (Cubozoa).

Coenenchyme : Tissu colonial entourant les polypes des octocoralliaires.

Coralligène : Structure d'origine biogénique principalement édifiée par le concrétionnement d'algues calcaires encroûtantes et foliacées vivant dans des conditions de luminosité réduite (algues sciaphiles). Le terme coralligène fait aussi référence à l'écosystème riche et complexe constitué des diverses espèces de substrats durs (principalement des espèces fixées cnidaires, bryozoaires et spongiaires et les espèces mobiles associées) qui se développent sur le concrétionnement d'algues calcaires et dont la diversité varie en fonction des conditions de luminosité, de courant, de sédimentation et de température.

DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ou TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) : Techniques d'empreinte moléculaire basées sur la séparation sur gel dénaturant (gradient de concentrations en urée ou formamide pour DGGE; gradient de températures pour TGGE) de fragments ADNr 16S amplifiés en fonction de leur comportement de fusion conditionné par leur composition en bases nucléiques (Muyzer *et al.*, 1993). Les bandes obtenues peuvent être excisées individuellement du gel puis séquencées de manière à obtenir l'iidentification taxonomique de l'espèce bactérienne correspondante.

Epibionte : Organisme vivant à la surface d'un autre être vivant, sans en dépendre.

Eutrophisation : Enrichissement excessif en nutriments d'un écosystème aquatique donnant lieu à accumulation de matière organique entraînant un appauvrissement en oxygène du milieu et une augmentation de la turbidité par la prolifération d'algues.

FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) : Technique basée sur la localisation de cellules bactériennes *in situ* en les ciblant avec des sondes d'acides nucléiques spécifiques couplées à un marqueur fluorescent avant observation en microscopie à épifluorescence ou en microscopie confocale (Levsky et Singer, 2003; Moter et Gobel, 2000) (voir schéma explicatif Introduction-Figure 8).

Fitness (ou valeur sélective, ou succès reproducteur) : Capacité d'un individu à survivre et à se reproduire. C'est une mesure de la sélection naturelle, concept central de la théorie de l'évolution de C. Darwin.

Gonochorique : Qualifie une espèce dont les sexes sont distincts, par opposition à hermaphrodite.

Gorgonaire : Dénomination commune d'un groupe paraphylétique constitué des octocoraux branchus contenant un axe scléro-protéique (sous-ordres des Calcaxonia, Holaxonia, Scleraxonia).

Hexacoralliaire (Hexacorallia) : Sous-classe des Anthozoaires dont la bouche est entourée par un multiple de six tentacules. Ils peuvent être solitaires ou coloniaux.

Holobionte : Ensemble complexe fonctionnel constitué d'un hôte et de tout le microbiote qui lui est associé.

Itéropare : Qualifie un organisme possédant la capacité de se reproduire plusieurs fois au cours de sa vie.

Longévif : Qualifie un organisme qui a une durée de vie importante.

Maladie : Altération physiologique ou fonctionnelle d'un organisme caractérisée par des causes, des symptômes, une évolution et des possibilités thérapeutiques propres.

Métagénomique : Méthode moléculaire de séquençage à haut débit consistant à analyser l'ensemble des gènes contenus dans un échantillon. Elle peut permettre de décrire la diversité spécifique ou la diversité fonctionnelle en fonction des gènes ciblés. La métagénomique regroupe plusieurs techniques telles que le pyroséquençage ou le séquençage Illumina/Solexa.

Microbiote : Ensemble des micro-organismes (bactéries, fungi, virus, protistes) peuplant le microbiome, un environnement spécifique.

Nématocyste (ou cnidocyste) : Organite contenu dans les nématocytes (ou cnidocytes), type cellulaire caractéristique de l'embranchement des Cnidaires. Cette cellule, hautement spécialisée, sert à la capture des proies et à la protection de l'organisme.

Nécrose : Mort d'un tissu organique ou d'une cellule d'un organisme vivant.

Octocoralliaires (Octocorallia) : Sous-classe des Anthozoaires dont la bouche est entourée d'un multiple de huit tentacules pennés (petites extensions des tentacules disposées en deux rangées). Ils sont tous coloniaux.

OTU – Operational Taxonomic Unit : Unité taxonomique utilisée en microbiologie pour décrire un ensemble de séquences ou empreintes moléculaires basée sur un critère de regroupement arbitrairement choisi par l'utilisateur.

Phototaxie : Réaction de locomotion d'organismes mobiles par rapport à la lumière qui peut être positive (attraction) ou négative (répulsion).

Phylotype : Unité taxonomique alternative représentant un ensemble de séquences regroupées selon un critère de ressemblance identifié phylogénétiquement.

Polype : Stade sessile des cnidaires et unité constitutive de base d'un Anthozoaire. Le polype est fixé et ne possède qu'un seul orifice (faisant office de bouche et d'anus) entouré par une ou plusieurs rangées de tentacules. La bouche aboutit dans la cavité gastrovasculaire. Chez les octocoralliaires, de nombreux polypes reliés entre eux par le coenenchyme forment une colonie.

Postulats de Koch : Critères destinés à établir la relation de cause à effet liant un microbe et une maladie. Pour satisfaire ces critères, le microorganisme doit : (i) être retrouvé en abondance dans la plupart des individus ou organes souffrant de la maladie, et ne pas être retrouvé (ou rarement) chez des individus ou organes indemnes, (ii) pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro*, (iii) entraîner l'apparition de la maladie lorsque introduit dans un organisme sain, et (iv) être à nouveau isolé de l'organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

qPCR (*PCR quantitative* ou *PCR en temps réel*) : Technique basée (i) sur la co-amplification d'une séquence cible et d'une gamme étalon (de séquence et concentration connues), et (ii) sur l'incorporation d'un marqueur fluorescent tout au long de la réaction d'amplification (Brunk *et al.*, 2002). L'intensité de fluorescence mesurée à chaque cycle d'amplification est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons, elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon analysé. La comparaison entre l'intensité de fluorescence de l'échantillon et celle de la gamme étalon permet ainsi d'estimer la quantité d'ADN présent en temps réel (Brunk *et al.*, 2002).

Ribotype : Unité taxonomique alternative représentant un ensemble de séquences d'ADN ribosomique 16S regroupées selon un critère arbitrairement défini par l'utilisateur.

Sciaphile : Qualifie un organisme appréciant les conditions de luminosité réduite.

SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) : Technique d'empreinte moléculaire basée sur la séparation d'amplicons ADNr 16S selon leur vitesse de migration dans le gel, conditionnée par leur conformation structurale sous forme simple brin (Lee *et al.*, 1996).

Suspensivore : Qualifie un organisme qui s'alimente des particules en suspension transportées par les courants.

Sympatrique : Qualifie des espèces qui vivent dans la même aire géographique sans s'hybrider.

TRF (Fragment de restriction terminal) : Fragment d'ADN qui correspond à l'extrémité de la séquence amplifiée marquée par un fluorochrome, produit par clivage de l'ADN par une enzyme de restriction et détecté en T-RFLP.

T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) : Technique d'empreinte moléculaire basée sur le polymorphisme de taille de fragments terminaux de restriction (TRFs) obtenus après digestion enzymatique d'amplicons d'ADNr 16S marqués par un fluorochrome (Liu *et al.*, 1997). Comme son nom le suggère, la T-RFLP est une variante de la RFLP qui permet de visualiser des variations de séquences dans des échantillons ADN plus ou moins complexes, à la différence que seuls les fragments de restriction terminaux sont analysés en T-RFLP. La longueur des fragments est déterminée par la position du site de restriction dans la séquence digérée (voir schéma explicatif Introduction-Figure 7).

Références

Ainsworth T. D., Fine M., Blackall L. L., Hoegh-Guldberg O., 2006. Fluorescence *in situ* hybridization and spectral imaging of coral-associated bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 72 (4): 3016-3020.

Ainsworth T. D., Kramasky-Winter E., Loya Y., Hoegh-Guldberg O., Fine M., 2007a. Coral disease diagnostics: what's between a plague and a band? *Appl Environ Microbiol*, 73 (3): 981-992.

Ainsworth T. D., Kvennefors E. C., Blackall L. L., Fine M., Hoegh-Guldberg O., 2007b. Disease and cell death in white syndrome of Acroporid corals on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 151 (1): 19-29.

Ainsworth T. D., Hoegh-Guldberg O., 2009. Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress. *Aquat Biol*, 4 (3): 289-296.

Albouy C., Guilhaumon F., Leprieur F., Lasram F. B., Somot S., Aznar R., Velez L., Le Loc'h F., Mouillot D., 2013. Projected climate change and the changing biogeography of coastal Mediterranean fishes. *J Biogeogr*, 40 (3): 534-547.

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25 (17): 3389-3402.

Alves N., Neto O. S. M., Silva B. S. O., de Moura R. L., Francini R. B., Castro C. B. E., Paranhos R., Bitner-Mathe B. C., Kruger R. H., Vicente A. C. P., Thompson C. C., Thompson F. L., 2010. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. *Env Microbiol Rep*, 2 (1): 90-95.

Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H., 1995. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59 (1): 143-169.

Amann R., Fuchs B. M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol*, 6 (5): 339-348.

Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R., Stahl D. A., 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 56 (6): 1919-1925.

Amann R. I., Krumholz L., Stahl D. A., 1990b. Flurorescent-oligonucleotide probing of whole celles for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*, 172 (2): 762-770.

Anisimova M., Gascuel O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol*, 55 (4): 539-552.

Apprill A., Marlow H. Q., Martindale M. Q., Rappé M. S., 2009. The onset of microbial associations in the coral *Pocillopora meandrina*. *Isme J*, 3: 685-699.

Ashelford K. E., Chuzhanova N. A., Fry J. C., Jones A. J., Weightman A. J., 2005. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol*, 71 (12): 7724-7736.

Austin B., Austin D., Sutherland R., Thompson F., Swings J., 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environ Microbiol*, 7 (9): 1488-1495.

Avis P. G., Dickie I. A., Mueller G. M., 2006. A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Mol Ecol*, 15 (3): 873-882.

Ballesteros E., 2006. Mediterranean coralligenous assemblages: a synthesis of present knowledge. *Oceanogr Mar Biol*, 44: 123-195.

Bally M., Garrabou J., 2007. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Global Change Biol*, 13 (10): 2078-2088.

Barott K. L., Rodriguez-Mueller B., Youle M., Marhaver K. L., Vermeij M. J., Smith J. E., Rohwer F. L., 2012. Microbial to reef scale interactions between the reef-building coral *Montastraea annularis* and benthic algae. *Proc Biol Sci*, 279 (1733): 1655-1664.

Baschong W., Suetterlin R., Laeng R. H., 2001. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem*, 49 (12): 1565-1571.

Bavestrello G., Cerrano C., Zanzi D., Cattaneo-Vietti R., 1997. Damage by fishing activities in the Gorgonian coral *Paramuricea clavata* in the Ligurian Sea. *Aquat Conserv*, 7: 253-262.

Bayer F. M., 1981. Key to the genera of Octocorallia exclusive of Pennatulacea (Coelenterata: Anthozoa), with diagnoses of new taxa. *P Biol Soc Wash*, 94: 902-947.

Bayer T., Arif C., Ferrier-Pages C., Zoccola D., Aranda M., Voolstra C. R., 2013. Bacteria of the genus *Endozoicomonas* dominate the microbiome of the Mediterranean gorgonian coral *Eunicella cavolini*. *Mar Ecol Prog Ser*, 479: 75-84.

Bellantuono A. J., Hoegh-Guldberg O., Rodriguez-Lanetty M., 2011. Resistance to thermal stress in corals without changes in symbiont composition. *Proc Biol Sci*: 279 (1731): 1100-1107.

Beman J. M., Roberts K. J., Wegley L., Rohwer F., Francis C. A., 2007. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Appl Environ Microbiol*, 73 (17): 5642-5647.

Ben-Haim Y., Rosenberg E., 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral Pocillopora damicornis. *Marine Biology*, 141: 47-55.

Ben-Haim Y., Thompson F. L., Thompson C. C., Cnockaert M. C., Hoste B., Swings J., Rosenberg E., 2003a. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53 (Pt 1): 309-315.

Ben-Haim Y., Zicherman-Keren M., Rosenberg E., 2003b. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl Environ Microbiol*, 69 (7): 4236-4242.

Bensoussan N., Romano J. C., Harmelin J. G., Garrabou J., 2010. High resolution characterization of northwest Mediterranean coastal waters thermal regimes: To better understand responses of benthic communities to climate change. *Estuar Coast Shelf S*, 87 (3): 431-441.

Bethoux J. P., Gentili B., Morin P., Nicolas E., Pierre C., Ruiz-Pino D., 1999. The Mediterranean Sea: a miniature ocean for climatic and environmental studies and a key for the climatic functioning of the North Atlantic. *Prog Oceanogr*, 44: 131-146.

Bianchi C. N., Morri C., 2000. Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, problems and prospets for future research. *Mar Pollut Bull*, 40 (5): 367-376.

Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T., Prinsep M. R., 2011. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 28 (2): 196-268.

Bobrow M. N., Harris T. D., Shaughnessy K. J., Litt G. J., 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*, 125 (1-2): 279-285.

Boudouresque C. F., Bernard G., Pergent G., Shili A.,Verlaque M., 2009. Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: a critical review. *Bot Mar*, 52 (5): 395-418.

Bourne D. G., 2005. Microbiological assessment of a disease outbreak on corals from Magnetic Island (Great Barrier Reef, Australia). *Coral Reefs*, 24 (2): 304-312.

Bourne D. G., Munn C. B., 2005. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environ Microbiol*, 7 (8): 1162-1174.

Bourne D. G., Iida Y., Uthicke S., Smith-Keune C., 2008. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *Isme J*, 2 (4): 350-363.

Bourne D. G., Garren M., Work T. M., Rosenberg E., Smith G. W., Harvell C. D., 2009. Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol*, 17 (12): 554-562.

Bourne D. G., Muirhead A., Sato Y., 2011. Changes in sulfate-reducing bacterial populations during the onset of black band disease. *Isme J*, 5 (3): 559-564.

Bramanti L., Movilla J., Guron M., Calvo E., Gori A., Dominguez-Carrio C., Grinyo J., Lopez-Sanz A., Martinez-Quintana A., Pelejero C., Ziveri P., Rossi S., 2013. Detrimental effects of ocean acidification on the economically important Mediterranean red coral (*Corallium rubrum*). *Global Change Biol*, 19 (6): 1897-1908.

Brierley A. S., Kingsford M. J., 2009. Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. *Curr Biol*, 19 (14): R602-14.

Brosius J., Dull T. J., Noller H. F., 1980. Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. *P Natl Acad Sci USA*, 77 (1): 201-204.

Bruce T., Meirelles P. M., Garcia G., Paranhos R., Rezende C. E., de Moura R. L., Filho R. F., Coni E. O., Vasconcelos A. T., Amado Filho G., Hatay M., Schmieder R., Edwards R., Dinsdale E., Thompson F. L., 2012. Abrolhos Bank reef health evaluated by means of water quality, microbial diversity, benthic cover, and fish biomass data. *PLoS One*, 7 (6): e36687.

Bruck T. B., Bruck W. M., Santiago-Vazquez L. Z., McCarthy P. J., Kerr R. G., 2007. Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate deep water octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. *Mar Biotechnol (NY)*, 9 (5): 561-576.

Brunk C. F., Li J., Avaniss-Aghajani E., 2002. Analysis of specific bacteria from environmental samples using a quantitative polymerase chain reaction. *Curr Issues Mol Biol*, 4 (1): 13-18.

Bukovska P., Jelinkova M., Hrselova H., Sykorova Z., Gryndler M., 2010. Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G+C nucleotide content and secondary structure melting point. *J Microbiol Meth*, 82 (3): 223-228.

Bythell J. C., Barer M. R., Cooney R. P., Guest J. R., O'Donnell A. G., Pantos O., Le Tissier M. D. A., 2002. Histopathological methods for the investigation of microbial communities associated with disease lesions in reef corals. *Lett Appl Microbiol*, 34 (5): 359-364.

Calvo E., Simo R., Coma R., Ribes M., Pascual J., Sabates A., Gili J. M., Pelejero C., 2011. Effects of climate change on Mediterranean marine ecosystems: the case of the Catalan Sea. *Clim Res*, 50 (1): 1-29.

Cardenas A., Rodriguez L. M., Pizarro V., Cadavid L. F., Arevalo-Ferro C., 2012. Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *Isme J*, 6 (3): 502-512.

Caron D. A., 2005. Marine microbial ecology in a molecular world: what does the future hold? *Sci Mar*, 69 (Suppl. 1): 97-110.

Carpine C., Grasshoff M., 1975. Les gorgonaires de la Méditerranée. *Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco*, 71: 1-140.

Casamayor E. O., Massana R., Benlloch S., Ovreas L., Diez B., Goddard V. J., Gasol J. M., Joint I., Rodriguez-Valera F., Pedros-Alio C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol*, 4 (6): 338-348.

Cebrian E., Uriz M. J., Garrabou J., Ballesteros E., 2011. Sponge mass mortalities in a warming Mediterranean Sea: are cyanobacteria-harboring species worse off? *PLoS One*, 6 (6): e20211.

Cebrian E., Linares C., Marschal C., Garrabou J., 2012. Exploring the effects of invasive algae on the persistence of gorgonian populations. *Biol Invasions*, 14 (12): 2647-2656.

Ceh J., van Keulen M., Bourne D. G., 2011. Coral-associated bacterial communities on Ningaloo Reef, Western Australia. *FEMS Microbiol Ecol*, 75 (1): 134-144.

Ceh J., van Keulen M., Bourne D. G., 2013. Intergenerational transfer of specific bacteria in corals and possible implications for offspring fitness. *Microb Ecol*, 65 (1): 227-231.

Cerrano C., Bavestrello G., Bianchi C. N., Cattaneo-vietti R., Bava S., Morganti C., Morri C., Picco P., Sara G., Schiaparelli S., Siccardi A., Sponga F., 2000. A catastrophic mass-mortality episode of gorgonians and other organisms in the Ligurian Sea (Northwestern Mediterranean), summer 1999. *Ecol Lett*, 3 (4): 284-293.

Chao A., 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist*, 11: 265-270.

Chen C. P., Tseng C. H., Chen C. A., Tang S. L., 2011. The dynamics of microbial partnerships in the coral *Isopora palifera*. *Isme J*, 5 (4): 728-740.

Clement B. G., Kehl L. E., DeBord K. L., Kitts C. L., 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Meth*, 31 (3): 135-142.

Coll M., Piroddi C., Steenbeek J., Kaschner K., Ben Rais Lasram F., Aguzzi J., Ballesteros E., Bianchi C. N., Corbera J., Dailianis T., Danovaro R., Estrada M., Froglia C., Galil B. S., Gasol J. M., Gertwagen R., Gil J., Guilhaumon F., Kesner-Reyes K., Kitsos M. S., Koukouras A., Lampadariou N., Laxamana E., Lopez-Fe de la Cuadra C. M., Lotze H. K., Martin D., Mouillot D., Oro D., Raicevich S., Rius-Barile J., Saiz-Salinas J. I., San Vicente C., Somot S., Templado J., Turon X., Vafidis D., Villanueva R., Voultsiadou E., 2010. The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PLoS One*, 5 (8): e11842.

Colwell R. R., Clayton R. A., Ortiz-Conde B. A., Jacobs D., Russek-Cohen E., 1995. *The microbial species concept and biodiversity*. In: Microbial diversity and ecosystem function (Allsopp, D., Colwell, R. R., Hawksworth, D. L., Eds) 315 pp. CAB International, Oxon.

Coma R., Gili J. M., Zabala M., Riera T., 1994. Feeding and prey capture cycles in the aposymbiontic gorgonian *Paramuricea clavata*. *Mar Ecol Prog Ser*, 115: 257-270.

Coma R., Ribes M., Zabala M., Gili J. M., 1995. Reproduction and cycle of gonadal development in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Mar Ecol Prog Ser*, 117: 173-183.

Coma R., Ribes M., Zabala M., Gili J.-M., 1998. Growth in a modular colonial marine invertebrate. *Estuar Coast Shelf S*, 47: 459-470.

Coma R., Ribes M., 2003. Seasonal energetic constraints in Mediterranean benthic suspension feeders: effects at different levels of ecological organization. *Oikos*, 101 (1): 205-215.

Coma R., Pola E., Ribes M., Zabala M., 2004. Long-term assessment of temperate octocoral mortality patterns, protected vs. unprotected areas. *Ecol Appl*, 14 (5): 1466-1478.

Coma R., Ribes M., Serrano E., Jimenez E., Salat J., Pascual J., 2009. Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *P Natl Acad Sci USA*, 106 (15): 6176-6181.

Crisci C., 2011. Effets du changement climatique sur les écosystèmes littoraux de la Mer Méditteranée Nord-occidentale: étude de la relation entre les conditions de température et la réponse biologique pendant les évènements de mortalité massive. PhD dissertation: 222 pp. Université de la Méditerranée, Marseille, France.

Crisci C., Bensoussan N., Romano J. C., Garrabou J., 2011. Temperature anomalies and mortaliy events in marine communities: insights on factors behind differential mortality impacts in the NW Mediterranean. *PLoS One*, 6 (9): e23814.

Croquer A., Bastidas C., Elliott A., Sweet M., 2013. Bacterial assemblages shifts from healthy to yellow band disease states in the dominant reef coral *Montastraea faveolata*. *Env Microbiol Rep*, 5 (1): 90-96.

Dahllof I., Baillie H., Kjelleberg S., 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*, 66 (8): 3376-3380.

Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K. H., Wagner M., 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol*, 22 (3): 434-444.

Daly M., Brugler M. R., Cartwright P., Collins A. G., Dawson M. N., Fautin D. G., France S. C., McFadden C. S., Opresko D. M., Rodriguez E., Romano S. L., Stake J. L., 2007. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, (1668): 127-182.

de Castro A. P., Araujo S. D., Reis A. M. M., Moura R. L., Francini R. B., Pappas G., Rodrigues T. B., Thompson F. L., Kruger R. H., 2010. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from Eastern Brazil. *Microb Ecol*, 59 (4): 658-667.

de Madron X. D., Guieu C., Sempere R., Conan P., Cossa D., D'Ortenzio F., Estournel C., Gazeau F., Rabouille C., Stemmann L., Bonnet S., Diaz F., Koubbi P., Radakovitch O., Babin M., Baklouti M., Bancon-Montigny C., Belviso S., Bensoussan N., Bonsang B., Bouloubassi I., Brunet C., Cadiou J. F., Carlotti F., Chami M., Charmasson S., Charriere B., Dachs J., Doxaran D., Dutay J. C., Elbaz-Poulichet F., Eleaume M., Eyrolles F., Fernandez C., Fowler S., Francour P., Gaertner J. C., Galzin R., Gasparini S., Ghiglione J. F., Gonzalez J. L., Goyet C., Guidi L., Guizien K., Heimburger L. E., Jacquet S. H. M., Jeffrey W. H., Joux F., Le Hir P., Leblanc K., Lefevre D., Lejeusne C., Leme R., Loye-Pilot M. D., Mallet M., Mejanelle L., Melin F., Mellon C., Merigot B., Merle P. L., Migon C., Miller W. L., Mortier L., Mostajir B., Mousseau L., Moutin T., Para J., Perez T., Petrenko A., Poggiale J. C., Prieur L., Pujo-Pay M., Pulido V., Raimbault P., Rees A. P., Ridame C., Rontani J. F., Pino D. R., Sicre M. A., Taillandier V., Tamburini C., Tanaka T., Taupier-Letage I., Tedetti M., Testor P., Thebault H., Thouvenin B., Touratier F., Tronczynski J., Ulses C., Van Wambeke F., Vantrepotte V., Vaz S., Verney R., MerMex G., 2011. Marine ecosystems' responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Prog Oceanogr*, 91 (2): 97-166.

DeLong E. F., Wickham G. S., Pace N. R., 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243 (4896): 1360-1363.

DeLong E. F., 1992. *Archaea* in coastal marine environments. *P Natl Acad Sci USA*, 89 (12): 5685-5689.

Dinsdale E. A., Pantos O., Smriga S., Edwards R. A., Angly F., Wegley L., Hatay M., Hall D., Brown E., Haynes M., Krause L., Sala E., Sandin S. A., Thurber R. V., Willis B. L., Azam F., Knowlton N., Rohwer F., 2008. Microbial ecology of four coral atolls in the Northern Line Islands. *PLoS One*, 3 (2): e1584.

Doney S. C., Fabry V. J., Feely R. A., Kleypas J. A., 2009. Ocean acidification: the other CO2 problem. *Ann Rev Mar Sci*, 1: 169-192.

Dray S., Dufour A. B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Softw*, 22: 1-20.

Dunbar J., Ticknor L. O., Kuske C. R., 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 67 (1): 190-197.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E., 2006. *The Prokaryote 3rd edition: a handbook on the biology of bacteria*. Springer publ., New York, USA.

Egert M., Friedrich M. W., 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol*, 69 (5): 2555-2562.

Erpenbeck D., Breeuwer J. A. J., van der Velde H. C.,van Soest R. W. M., 2002. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Marine Biology*, 141 (2): 377-386.

Fan L., Liu M., Simister R., Webster N. S., Thomas T., 2013. Marine microbial symbiosis heats up: the phylogenetic and functional response of a sponge holobiont to thermal stress. *Isme J*, 7 (5): 991-1002.

Fautin D. G., 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon*, 54 (8): 1054-1064.

Fernandez-Guerra A., Buchan A., Mou X., Casamayor E. O., Gonzalez J. M., 2010. T-RFPred: a nucleotide sequence size prediction tool for microbial community description based on terminal-restriction fragment length polymorphism chromatograms. *BMC Microbiol*, 10: 262.

Ferrier-Pages C., Tambutte E., Zamoum T., Segonds N., Merle P. L., Bensoussan N., Allemand D., Garrabou J., Tambutte S., 2009. Physiological response of the symbiotic gorgonian *Eunicella singularis* to a long-term temperature increase. *J Exp Biol*, 212 (18): 3007-3015.

Fischer E. M., Schär C., 2009. Futures changes in daily summer temperature variability: driving processes and role for temperature extremes. *Clim Dynam*, 33: 917-935.

Fisher M. M., Triplett E. W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 65 (10): 4630-4636.

Forney L. J., Zhou X., Brown C. J., 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr Opin Microbiol*, 7 (3): 210-220.

Forrest A., Nix D. E., Ballow C. H., Goss T. F., Birmingham M. C., Schentag J. J., 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 37 (5): 1073-1081.

Fox J., Weisberg S., 2011. *An R companion to applied regression, Second Edition*. Sage publ., Thousand Oaks ,CA, USA.

Frey J. C., Angert E. R., Pell A. N., 2006. Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *J Microbiol Meth*, 67 (1): 9-19.

Frias-Lopez J., Zerkle A. L., Bonheyo G. T., Fouke B. W., 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 68 (5): 2214-2228.

Fuchs B. M., Wallner G., Beisker W., Schwippl I., Ludwig W., Amann R., 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4973-4982.

Fuhrman J. A., McCallum K., Davis A. A., 1992. Novel major archaebacterial group from marine plankton. *Nature*, 356 (6365): 148-149.

Galkiewicz J. P., Pratte Z. A., Gray M. A., Kellogg C. A., 2011. Characterization of culturable bacteria isolated from the cold-water coral *Lophelia pertusa*. *FEMS Microbiol Ecol*, 77 (2): 333-346.

Galloway S. B., Work T. M., Bochsler V. S., Harley R. A., Kramarsky-Winter E., McLaughlin S. M., Meteyer C. U., Morado J. F., Nicholson J. H., Parnell P. G., Peters E. C., Reynolds T. L., Rotstein D. S., Sileo L., Woodley C. M., 2007. *Coral disease and health workshop: Coral histopathology II*. publ. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4.: 84 pp. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD.

Gantner S., Andersson A. F., Alonso-Saez L., Bertilsson S., 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J Microbiol Meth*, 84 (1): 12-18.

Garrabou J., Perez T., Sartoretto S., Harmelin J. G., 2001. Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in Provence region (France, NW Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser*, 217: 263-272.

Garrabou J., Perez T., Chevaldonné P., Bensoussan N., Torrents O., Lejeusne C., Romano J.-C., Vacelet J., Boury-Esnault N., Harmelin-Vivien M., Verlaque M., Boudouresque C.-F., Harmelin J.-G., 2003. Is global change a real threat for conservation of the NW Mediterranean marine biodiversity ? *Geophys Res Abstracts*, 5: 10522.

Garrabou J., Coma R., Bensoussan N., Bally M., Chevaldonne P., Cigliano M., Diaz D., Harmelin J. G., Gambi M. C., Kersting D. K., Ledoux J. B., Lejeusne C., Linares C., Marschal C., Perez T., Ribes M., Romano J. C., Serrano E., Teixido N., Torrents O., Zabala M., Zuberer F., Cerrano C., 2009. Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biol*, 15 (5): 1090-1103.

Garren M., Raymundo L., Guest J., Harvell C. D., Azam F., 2009. Resilience of coral-associated bacterial communities exposed to fish farm effluent. *PLoS One*, 4 (10): e7319.

Gilbert J. A., Hill R., Doblin M. A., Ralph P. J., 2012. Microbial consortia increase thermal tolerance of corals. *Marine Biology*, 159 (8): 1763-1771.

Giuliani S., Virno Lamberti C., Sonni C., Pellegrini D., 2005. Mucilage impact on gorgonians in the Tyrrhenian sea. *Sci Total Environ*, 353 (1-3): 340-349.

Goffredi S. K., Johnson S. B., Vrijenhoek R. C., 2007. Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax* polychaete worms. *Appl Environ Microbiol*, 73 (7): 2314-2323.

Gomez-Gil B., Soto-Rodriguez S., Garcia-Gasca A., Roque A., Vazquez-Juarez R., Thompson F. L., Swings J., 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150 (Pt 6): 1769-1777.

Gordon R. E., 1978. A species definition. *Int J Syst Bacteriol*, 28: 605-607.

Gori A., Linares C., Rossi S., Coma R., Gili J. M., 2007. Spatial variability in reproductive cycle of the gorgonians *Paramuricea clavata* and *Eunicella singularis* (Anthozoa, Octocorallia) in the Western Mediterranean Sea. *Marine Biology*, 151 (4): 1571-1584.

Gosling S. N., Warren R., Arnell N. W., Good P., Caesar J., Bernie D., Lowe J. A., van der Linden P., O'Hanley J. R., Smith S. M., 2011. A review of recent developments in climate change science. Part II: The global-scale impacts of climate change. *Prog Phys Geog*, 35 (4): 443-464.

Gray M. A., Stone R. P., McLaughlin M. R., Kellogg C. A., 2011. Microbial consortia of gorgonian corals from the Aleutian islands. *FEMS Microbiol Ecol*, 76 (1): 109-120.

Gray M. W., 1989. The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet*, 5 (9): 294-299.

Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 59 (3): 307-321.

Hall-Spencer J. M., Pike J., Munn C. B., 2007. Diseases affect cold-water corals too: *Eunicella verrucosa* (Cnidaria: Gorgonacea) necrosis in SW England. *Dis Aquat Organ*, 76 (2): 87-97.

Hansson L., Agis M., Maier C., Weinbauer M. G., 2009. Community composition of bacteria associated with cold-water coral *Madrepora oculata*: within and between colony variability. *Mar Ecol Prog Ser*, 397: 89-102.

Harley C. D. G., Hughes A. R., Hultgren K. M., Miner B. G., Sorte C. J. B., Thornber C. S., Rodriguez L. F., Tomanek L., Williams S. L., 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol Lett*, 9: 228-241.

Harmelin J. G., Marinopoulos J., 1994. Population structure and partial mortality of the gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso) in the North-Western Mediterranean (France, Port-Cros Island). *Marine Life*, 4 (1): 5-13.

Harvell C. D., Mitchell C. E., Ward J. R., Altizer S., Dobson A. P., Ostfeld R. S., Samuel M. D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296 (5576): 2158-2162.

Haygood M. G., Schmidt E. W., Davidson S. K., Faulkner D. J., 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J Mol Microb Biotech*, 1 (1): 33-43.

Heaney S. A., Maloy A. P., Slater J. W., 2011. Evaluation of fixatives and autofluorescence reduction treatments for marine bivalve larvae. *J Mar Biol Assoc UK*, 91 (7): 1567-1576.

Hennig C., 2012. *fpc: Flexible procedures for clustering.* R package version 2.1-4. http://CRAN.R-project.org/package=fpc

Hewson I., Brown J. M., Burge C. A., Couch C. S., LaBarre B. A., Mouchka M. E., Naito M., Harvell C. D., 2012. Description of viral assemblages associated with the Gorgonia ventalina holobiont. *Coral Reefs*, 31 (2): 487-491.

Higuchi T., Agostini S., Casareto B. E., Yoshinaga K., Suzuki T., Nakano Y., Fujimura H., Suzuki Y., 2013. Bacterial enhancement of bleaching and physiological impacts on the coral *Montipora digitata*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 440: 54-60.

Hoegh-Guldberg O., Mumby P. J., Hooten A. J., Steneck R. S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C. D., Sale P. F., Edwards A. J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C. M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N., Bradbury R. H., Dubi A., Hatziolos M. E., 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318 (5857): 1737-1742.

Hoegh-Guldberg O., Bruno J. F., 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 328 (5985): 1523-1528.

Hoffmann F., Rapp H. T., Reitner J., 2006. Monitoring microbial community composition by fluorescence *in situ* hybridization during cultivation of the marine cold-water sponge *Geodia barretti*. *Mar Biotechnol*, 8 (4): 373-379.

Hong M. J., Yu Y. T., Chen C. A., Chiang P. W., Tang S. L., 2009. Influence of species specificity and other factors on bacteria associated with the coral *Stylophora pistillata* in Taiwan. *Appl Environ Microbiol*, 75 (24): 7797-7806.

Huete-Stauffer C., Vielmini I., Palma M., Navone A., Panzalis P., Vezzulli L., Misic C., Cerrano C., 2011. *Paramuricea clavata* (Anthozoa, Octocorallia) loss in the Marine Protected Area of Tavolara (Sardinia, Italy) due to a mass mortality event. *Mar Ecol-Evol Persp*, 32: 107-116.

IPCC, 2007. *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., Miller, H. L., eds. Cambridge University Press publ.: 996 pp. Cambridge.

Jensen S., Duperron S., Birkeland N. K., Hovland M., 2010. Intracellular *Oceanospirillales* bacteria inhabit gills of Acesta bivalves. *FEMS Microbiol Ecol*, 74 (3): 523-533.

Ji N., Peng B., Wang G., Wang S., Peng X., 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *J Microbiol Meth*, 57 (3): 409-413.

Kaplan C. W., Kitts C. L., 2003. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Meth*, 54 (1): 121-125.

Kellogg C. A., 2004. Tropical *Archaea*: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Mar Ecol Prog Ser*, 273: 81-88.

Kent A. D., Smith D. J., Benson B. J., Triplett E. W., 2003. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 69 (11): 6768-6776.

Kiernan J. A., 2002. Suppressing autofluorescence. *Biotech Histochem*, 77 (4): 232.

Kimes N. E., Grim C. J., Johnson W. R., Hasan N. A., Tall B. D., Kothary M. H., Kiss H., Munk A. C., Tapia R., Green L., Detter C., Bruce D. C., Brettin T. S., Colwell R. R., Morris P. J., 2012. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Isme J*, 6 (4): 835-846.

Kipson S., Linares C., Teixido N., Bakran-Petricioli T., Garrabou J., 2012. Effects of thermal stress on early developmental stages of a gorgonian coral. *Mar Ecol Prog Ser*, 470: 69-78.

Kitts C. L., 2001. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2 (1): 17-25.

Klaus J. S., Frias-Lopez J., Bonheyo G. T., Heikoop J. M., Fouke B. W., 2005. Bacterial communities inhabiting the healthy tissues of two Carribean reef corals: interspecific and spatial variation. *Coral Reefs*, 24: 129-137.

Klaus J. S., Janse I., Heikoop J. M., Sanford R. A., Fouke B. W., 2007. Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. *Environ Microbiol*, 9 (5): 1291-1305.

Knowlton N., Rohwer F., 2003. Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as a habitat. *Am Nat*, 162 (4 Suppl): S51-62.

Koh E. G. L., 1997. Do scleractinian corals engage in chemical warfare against microbes? *J Chem Ecol*, 23 (2): 379-398.

Kolasa J., Biesiadka E., 1984. Diversity concept in ecology. *Acta Biotheoretica*, 33 (3): 145-162.

Kolde R., 2012. *pheatmap: Pretty Heatmaps.* R package version 0.7.4.

Konig G. M., Kehraus S., Seibert S. F., Abdel-Lateff A., Muller D., 2006. Natural products from marine organisms and their associated microbes. *Chembiochem*, 7 (2): 229-238.

Kovacs A., Yacoby K., Gophna U., 2010. A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. *Res Microbiol*, 161 (3): 192-197.

Krediet C. J., Ritchie K. B., Paul V. J., Teplitski M., 2013. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proc Biol Sci*, 280 (1755): 20122328.

Kroeker K. J., Kordas R. L., Crim R. N., Singh G. G., 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol Lett*, 13 (11): 1419-1434.

Kunin V., Engelbrektson A., Ochman H., Hugenholtz P., 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol*, 12 (1): 118-123.

Kvennefors E. C., Sampayo E., Ridgway T., Barnes A. C., Hoegh-Guldberg O., 2010. Bacterial communities of two ubiquitous Great Barrier Reef corals reveals both site- and species-specificity of common bacterial associates. *PLoS One*, 5 (4): e10401.

Kvennefors E. C., Sampayo E., Kerr C., Vieira G., Roff G., Barnes A. C., 2011. Regulation of bacterial communities through antimicrobial activity by the coral holobiont. *Microb Ecol*, 63 (3): 605-618.

La Rivière M., Roumagnac M., Garrabou J., Bally M., 2013. Transient shifts in bacterial communities associated with the temperate gorgonian *Paramuricea clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea. *PLoS One*, 8 (2): e57385.

La Rivière M., Garel M., Tamburini C., Garrabou J., Bally M., in prep. The histological picture of the gorgonian holobiont *Paramuricea clavata*: evidence for a resident bacterial population.

Lampert Y., Kelman D., Nitzan Y., Dubinsky Z., Behar A., Hill R. T., 2008. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. *FEMS Microbiol Ecol*, 64 (2): 187-198.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.

Ledoux J. B., 2010. Biologie de la conservation du corail rouge, *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758): Impact du changement global sur l'évolution des populations infralittorales en Méditerranée Nord-Occidentale. PhD dissertation: 281 pp. Université de la Méditerranée, Marseille, France.

Lee D. H., Zo Y. G., Kim S. J., 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 62 (9): 3112-3120.

Lee O. O., Yang J., Bougouffa S., Wang Y., Batang Z., Tian R., Al-Suwailem A., Qian P. Y., 2012. Spatial and species variations in bacterial communities associated with corals from the Red Sea as revealed by pyrosequencing. *Appl Environ Microbiol*, 78 (20): 7173-7184.

Lejeusne C., Chevaldonne P., Pergent-Martini C., Boudouresque C. F., Perez T., 2010. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends Ecol Evol*, 25 (4): 250-260.

Lesser M. P., Bythell J. C., Gates R. D., Johnstone R. W., Hoegh-Guldberg O., 2007. Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. *J Exp Mar Biol Ecol*, 346 (1-2): 36-44.

Levitus S., Antonov J. I., Boyer T. P., Stephens C., 2000. Warming of the World Ocean. *Science*, 287 (5461): 2225-2229.

Levsky J. M., Singer R. H., 2003. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *J Cell Sci*, 116 (14): 2833-2838.

Linares C., Coma R., Diaz D., Zabala, M., Hereu B., Dantart L., 2005. Immediate and delayed effects of a mass mortality event on gorgonian population dynamics and benthic community structure in the NW Mediterranean Sea. *Mar Ecol Prog Ser*, 305: 127-137.

Linares C., Doak D. F., Coma R., Diaz D., Zabala M., 2007. Life history and viability of a long-lived marine invertebrate: The octocoral *Paramuricea clavata*. *Ecology*, 88: 918-928.

Linares C., Coma R., Mariani S., Diaz D., Hereu B., Zabala M., 2008a. Early life history of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*: implications for population dynamics. *Invertebr Biol*, 127 (1): 1-11.

Linares C., Coma R., Zabala M., 2008b. Restoration of threatened red gorgonian populations: An experimental and modelling approach. *Biol Conserv*, 141 (2): 427-437.

Linares C., Cebrian E., Coma R., 2012. Effects of turf algae on recruitment and juvenile survival of gorgonian corals. *Mar Ecol Prog Ser*, 452: 81-88.

Littman R. A., Willis B. L., Pfeffer C., Bourne D. G., 2009. Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol Ecol*, 68 (2): 152-163.

Littman R. A., Bourne D. G., Willis B. L., 2010. Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with *Symbiodinium* type on the same coral host. *Mol Ecol*, 19: 1978-1990.

Littman R. A., Willis B. L., Bourne D. G., 2011. Metagenomic analysis of the coral holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. *Env Microbiol Rep*, 3 (6): 651-660.

Liu W. T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 63 (11): 4516-4522.

Lonkar S. S., Kedar G. T., Kotangale J. P., Kale M. A., 2011. Dyes and chemicals used in biomaterial study as stains for invertebrates. *Int J Chem Res*, 2 (4): 22-25.

Luna G. M., Bongiorni L., Gili C., Biavasco F., Danovaro R., 2010. Vibrio harveyi as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. *Env Microbiol Rep*, 2 (1): 120-127.

Magurran A. E., 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell publ.: 256 pp. Oxford, UK.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K. H., 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, 15 (4): 593-600.

Margulis L., Fester R., 1991. *Symbiosis as source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT press publ.: 454 pp.

Marsh T. L., 1999. Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol*, 2 (3): 323-327.

Marsh T. L., Saxman P., Cole J., Tiedje J., 2000. Terminal-restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol*, 66 (8): 3616-3620.

Martin Y., Bonnefont J. L., Chancerelle L., 2002. Gorgonians mass mortality during the 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. *Water Res*, 36 (3): 779-782.

Matias M. G., Underwood A. J., Hochuli D. F., Coleman R. A., 2010. Independent effects of patch size and structural complexity on diversity of benthic macroinvertebrates. *Ecology*, 91 (7): 1908-1915.

Mayr E., 1963. *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harbard University publ.: 797 pp.

McCarthy U. M., Urquhart K. L., Bricknell I. R., 2008. An improved *in situ* hybridization method for the detection of fish pathogens. *J Fish Dis*, 31 (9): 669-677.

Meziti A., Ramette A., Mente E., Kormas K. A., 2010. Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 74 (2): 472-484.

Miller A. W., Richardson L. L., 2011. A meta-analysis of 16S rRNA gene clone libraries from the polymicrobial black band disease of corals. *FEMS Microbiol Ecol*, 75 (2): 231-241.

Mills L. S., Soule M. E., Doak D. F., 1993. The keystone-species concept in ecology and conservation. *Bioscience*, 43: 219-224.

Mistri M., Ceccherelli V. U., 1996. Effects of a mucilage event on the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. I-Short term impacts at the population and colony levels. *Ital J Zool*, 63: 221-230.

Moeseneder M. M., Arrieta J. M., Muyzer G., Winter C., Herndl G. J., 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 65 (8): 3518-3525.

Mokhtar-Jamai K., Pascual M., Ledoux J. B., Coma R., Feral J. P., Garrabou J., Aurelle D., 2011. From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Mol Ecol*, 20 (16): 3291-3305.

Morita R. Y., 1997. *Bacteira in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle*. Chapman & Hall, N. Y., N. Y., USA. publ. 1: pp.

Morrow K. M., Moss A. G., Chadwick N. E., Liles M. R., 2012. Bacterial associates of two caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. *Appl Environ Microbiol*, 78 (18): 6438-6449.

Mosiman V. L., Patterson B. K., Canterero L., Goolsby C. L., 1997. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: An *in situ* method. *Cytom*, 30 (3): 151-156.

Moter A., Gobel U. B., 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Meth*, 41 (2): 85-112.

Mouchka M. E., Hewson I., Harvell C. D., 2010. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr Comp Biol*, 50: 662-674.

Munson M. A., Nedwell D. B., Embley T. M., 1997. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Appl Environ Microbiol*, 63 (12): 4729-4733.

Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59 (3): 695-700.

Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., Wawer C., 2004. *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology.* In: Molecular microbial ecology manual (Kowalchuk, G. A., de Bruijn, F. J., Head, I. M., Akkermans, A. D., van Elsas, J. D., Eds) 743-769 pp. Dordrecht, The Netherlands.

Negandhi K., Blackwelder P. L., Ereskovsky A. V., Lopez J. V., 2010. Florida reef sponges harbor coral disease-associated microbes. *Symbiosis*, 51 (1): 117-129.

Neulinger S. C., Jarnegren J., Ludvigsen M., Lochte K., Dullo W. C., 2008. Phenotype-specific bacterial communities in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and their implications for the coral's nutrition, health, and distribution. *Appl Environ Microbiol*, 74 (23): 7272-7285.

Neulinger S. C., Gartner A., Jarnegren J., Ludvigsen M., Lochte K., Dullo W. C., 2009. Tissue-associated "*Candidatus Mycoplasma corallicola*" and filamentous bacteria on the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia). *Appl Environ Microbiol*, 75 (5): 1437-1444.

Neumann M., Gabel D., 2002. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem*, 50 (3): 437-439.

Nissimov J., Rosenberg E., Munn C. B., 2009. Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*. *FEMS Microbiol Lett*, 292 (2): 210-215.

Nithyanand P., Pandian S. K., 2009. Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS Microbiol Ecol*, 69 (3): 384-394.

Nocker A., Burr M., Camper A. K., 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microb Ecol*, 54 (2): 276-289.

Occhipinti-Ambrogi A., 2007. Global change and marine communities: Alien species and climate change. *Mar Pollut Bull*, 55 (7-9): 342-352.

Oksanen J., Blanchet F. G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H., Wagner H., 2012. *vegan: Community Ecology Package.* R package version 2.0-5. http://CRAN.R-project.org/package=vegan

Orr J. C., Fabry V. J., Aumont O., Bopp L., Doney S. C., Feely R. A., Gnanadesikan A., Gruber N., Ishida A., Joos F., Key R. M., Lindsay K., Maier-Reimer E., Matear R., Monfray P., Mouchet A., Najjar R. G., Plattner G. K., Rodgers K. B., Sabine C. L., Sarmiento J. L., Schlitzer R., Slater R. D., Totterdell I. J., Weirig M. F., Yamanaka Y., Yool A., 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437 (7059): 681-686.

Osborn A. M., Moore E. R., Timmis K. N., 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol*, 2 (1): 39-50.

Osborne C. A., Rees G. N., Bernstein Y., Janssen P. H., 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 72 (2): 1270-8.

Ozbek S., Balasubramanian P. G., Holstein T. W., 2009. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon*, 54 (8): 1038-45.

Ozbek S., 2011. The cnidarian nematocyst: a miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasma*, 248 (4): 635-40.

Öztürk B., Aktan Y., Topaloglu B., Keskin C., Karakulak S., Öztürk A. A., Dede A., Turkozan O., 2004. *Marine life of Turkey in the Aegean and Mediterranean seas.* Turkish Marine Research Foundation (TÜDAV) publ. Marine Education Series. 10: 200 pp. Istanbul, Turkey.

Page R. D. M., Charleston M. A., 1998. Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends Ecol Evol*, 13 (9): 356-359.

Palleroni N. J., 1997. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 72 (1): 3-19.

Pedros-Alio C., 2006a. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol*, 14 (6): 257-63.

Pedros-Alio C., 2006b. Genomics and marine microbial ecology. *Int Microbiol*, 9 (3): 191-7.

Perez T., Garrabou J., Sartoretto S., Harmelin J.-G., Francour P., Vacelet J., 2000. Mortalité massive d'invertébrés marins: un évènement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale. *C R Acad Sci III*, 323 (10): 853-65.

Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., 2002. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 68 (6): 3094-3101.

Perry A. L., Low P. J., Ellis J. R., Reynolds J. D., 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, 308 (5730): 1912-1915.

Peters E. C., 1984. A survey of cellular reactions to environmental-stress and disease in Caribbean scleractinian corals. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37 (1-4): 113-137.

Pey A., Zamoum T., Allemand D., Furla P., Merle P. L., 2011. Depth-dependant thermotolerance of the symbiotic Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*: Evidence from cellular stress markers. *J Exp Mar Biol Ecol*, 404 (1-2): 73-78.

Piel J., 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep*, 21 (4): 519-38.

Piel J., 2009. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Pro Rep*, 26 (3): 338-362.

Pollock F. J., Morris P. J., Willis B. L., Bourne D. G., 2010a. Detection and quantification of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* by real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl Environ Microbiol*, 76 (15): 5282-5286.

Pollock F. J., Wilson B., Johnson W. R., Morris P. J., Willis B. L., Bourne D. G., 2010b. Phylogeny of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Env Microbiol Rep*, 2 (1): 172-178.

Previati M., Scinto A., Cerrano C., Osinga R., 2010. Oxygen consumption in Mediterranean octocorals under different temperatures. *J Exp Mar Biol Ecol*, 390 (1): 39-48.

R Development Core Team (2011) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. version 2.14.0. Vienna, Austria.

Radax R., Rattei T., Lanzen A., Bayer C., Rapp H. T., Urich T., Schleper C., 2012. Metatranscriptomics of the marine sponge *Geodia barretti*: tackling phylogeny and function of its microbial community. *Environ Microbiol*, 14 (5): 1308-1324.

Raina J. B., Tapiolas D., Willis B. L., Bourne D. G., 2009. Coral-qssociated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Appl Environ Microbiol*, 75 (11): 3492-3501.

Ramette A., 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75 (8): 2495-505.

Rappé M. S., Giovannoni S. J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*, 57: 369-94.

Ravenschlag K., Sahm K., Amann R., 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl Environ Microbiol*, 67 (1): 387-395.

Reid P. C., Fischer A. C., Lewis-Brown E., Meredith M. P., Sparrow M., Andersson A. J., Antia A., Bates N. R., Bathmann U., Beaugrand G., Brix H., Dye S., Edwards M., Furevik T., Gangsto R., Hatun H., Hopcroft R. R., Kendall M., Kasten S., Keeling R., Le Quere C., Mackenzie F. T., Malin G., Mauritzen C., Olafsson J., Paull C., Rignot E., Shimada K., Vogt M., Wallace C., Wang Z., Washington R., 2009. Chapter 1. Impacts of the oceans on climate change. *Adv Mar Biol*, 56: 1-150.

Reis A. M., Araujo S. D., Jr., Moura R. L., Francini-Filho R. B., Pappas G., Jr., Coelho A. M., Kruger R. H., Thompson F. L., 2009. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *J Appl Microbiol*, 106 (4): 1378-1387.

Reshef L., Koren O., Loya Y., Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E., 2006. The coral probiotic hypothesis. *Environ Microbiol*, 8 (12): 2068-2073.

Ribes M., Coma R., Gili J. M., 1999. Heterogeneous feeding in benthic suspension feeders: the natural diet and grazing rate of the temperate gorgonian *Paramuricea clavata* (Cnidaria : Octocorallia) over a year cycle. *Mar Ecol Prog Ser*, 183: 125-137.

Ritchie K. B., 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser*, 322: 1-14.

Rodolfo-Metalpa R., Bianchi C. N., Peirano A., Morri C., 2005. Tissus necrosis and mortality of the temperate coral *Cladocora caespitosa*. *Ital. J Zool*, 72: 271-276.

Roeselers G., Newton I. L. G., 2012. On the evolutionary ecology of symbioses between chemosynthetic bacteria and bivalves. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94 (1): 1-10.

Rohwer F., Breitbart M., Jara J., Azam F., Knowlton N., 2001. Diversity of bacteria associated with the Carribean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs*, 20: 85-91.

Rohwer F., Seguritan V., Azam F., Knowlton N., 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser*, 243: 1-10.

Romano J.-C., Bensoussan N., Younes W. A., Arlhac D., 2000. Thermal anomaly in waters of the Gulf of Marseilles during the summer of 1999. A partial explanation of the mortality of certain fixed invertebrates? *C R Acad Sci III*, 323 (4): 415-427.

Romano J. C., Lugrezi M., 2007. Série du marégraphe de Marseille : mesures de températures de surface de la mer de 1885 à 1967. *CR Geosci*, 339: 57-64.

Ros J., Olivella I., Gili J. M., 1984. *Els sistemes naturals de les Iles Medes*. Institud d'estudis catalans publ.: 828 pp. Barcelona, Espagne.

Rosenberg E., Kellogg C. A., Rohwer F., 2007a. Coral Microbiology. *Oceanography*, 20 (2): 146-154.

Rosenberg E., Koren O., Reshef L., Efrony R., Zilber-Rosenberg I., 2007b. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol*, 5 (5): 355-362.

Rosenberg E., Zilber-Rosenberg I., 2011. Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Research Part C-Embryo Today-Reviews*, 93 (1): 56-66.

Rossello-Mora R., Amann R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25 (1): 39-67.

Rypien K. L., Ward J. R., Azam F., 2010. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environ Microbiol*, 12 (1): 28-39.

Salerno J. L., Reineman D. R., Gates R. D., Rappé M. S., 2011. The effect of a sublethal temperature elevation on the structure of bacterial communities associated with the coral *Porites compressa*. *J Mar Biol*, 2011 (Article ID 969173) : 9 pp.

Sanchez J. A., McFadden C. S., France S. C., Lasker H. R., 2003. Molecular phylogenetic analyses of shallow-water Caribbean octocorals. *Marine Biology*, 142 (5): 975-987.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA*, 74 (12): 5463-5467.

Santos E. D., Alves N., Dias G. M., Mazotto A. M., Vermelho A., Vora G. J., Wilson B., Beltran V. H., Bourne D. G., Le Roux F., Thompson F. L., 2011. Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. *Isme J*, 5 (9): 1471-1483.

Sato Y., Willis B. L., Bourne D. G., 2010. Successional changes in bacterial communities during the development of black band disease on the reef coral, *Montipora hispida*. *Isme J*, 4 (2): 203-214.

Schafer H., Bernard L., Courties C., Lebaron P., Servais P., Pukall R., Stackebrandt E., Troussellier M., Guindulain T., Vives-Rego J., Muyzer G., 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol*, 34 (3): 243-253.

Schleifer K. H., 2004. Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Syst Appl Microbiol*, 27 (1): 3-9.

Schonhuber W., Fuchs B., Juretschko S., Amann R., 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63 (8): 3268-3273.

Schottner S., Wild C., Hoffmann F., Boetius A., Ramette A., 2012. Spatial scales of bacterial diversity in cold-water coral reef ecosystems. *PLoS One*, 7 (3): e32093.

Schramm A., Fuchs B. M., Nielsen J. L., Tonolla M., Stahl D. A., 2002. Fluorescence *in situ* hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environ Microbiol*, 4 (11): 713-720.

Schuett C., Doepke H., Grathoff A., Gedde M., 2007. Bacterial aggregates in the tentacles of the sea anemone *Metridium senile*. *Helgoland Mar Res*, 61 (3): 211-216.

Schütte U. M., Abdo Z., Bent S. J., Shyu C., Williams C. J., Pierson J. D., Forney L. J., 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80 (3): 365-380.

Shannon C. E., Weaver W., 1949. *The mathematical theory of communication*. Press, Univ of Illinois Press publ.: 125 pp. Urbana.

Sharp K. H., Ritchie K. B., Schupp P. J., Ritson-Williams R., Paul V. J., 2010. Bacterial acquisition in juveniles of several broadcast spawning coral species. *PLoS One*, 5 (5): e10898.

Sharp K. H., Distel D., Paul V. J., 2012. Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *Isme J*, 6 (4): 790-801.

Sharp K. H., Ritchie K. B., 2012. Multi-partner interactions in corals in the face of climate change. *Biol Bull*, 223 (1): 66-77.

Shashar N., Cohen Y., Loya Y., Sar N., 1994. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in stony corals: Evidence for coral-bacteria interactions. *Mar Ecol Prog Ser*, 111 (3): 259-264.

Shnit-Orland M., Kushmaro A., 2009. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiol Ecol*, 67 (3): 371-380.

Siegl A., Bayer K., Kozytska S., Hentschel U., Schmitt S., 2008. Sponges and microbes - New frontiers in an ancient symbiosis. *Vie Et Milieu-Life and Environment*, 58 (2): 165-174.

Simister R. L., Deines P., Botte E. S., Webster N. S., Taylor M. W., 2012a. Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environ Microbiol*, 14 (2): 517-524.

Simister R. L., Taylor M. W., Tsai P., Webster N. S., 2012b. Sponge-microbe associations survive high nutrients and temperatures. *PLoS One*, 7 (12): e52220.

Siyambalapitiya N., Blackall L. L., 2005. Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence *in situ* hybridization probe for *Gammaproteobacteria*. *FEMS Microbiol Lett*, 242 (2): 367-73.

Southern E. M., 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 100 (2): 319-323.

Speck M. D., Donachie S. P., 2012. Widespread *Oceanospirillaceae* bacteria in *Porites* spp. *J Mar Biol*, 2012: Article ID 746720.

Stat M., Baker A. C., Bourne D. G., Correa A. M., Forsman Z., Huggett M. J., Pochon X., Skillings D., Toonen R. J., van Oppen M. J., Gates R. D., 2012. Molecular delineation of species in the coral holobiont. *Adv Mar Biol*, 63: 1-65.

Stoecker K., Dorninger C., Daims H., Wagner M., 2010. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence i*n situ* hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol*, 76 (3): 922-926.

Sunagawa S., DeSantis T. Z., Piceno Y. M., Brodie E. L., DeSalvo M. K., Voolstra C. R., Weil E., Andersen G. L., Medina M., 2009. Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Isme J*, 3 (5): 512-521.

Sunagawa S., Woodley C. M., Medina M., 2010. Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PLoS One*, 5 (3): e9554.

Sussman M., Willis B. L., Victor S., Bourne D. G., 2008. Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. *PLoS One*, 3 (6): e2393.

Sutherland K. P., Porter J. W., Torres C., 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Mar Ecol Prog Ser*, 266: 273-302.

Sweet M. J., Croquer A., Bythell J. C., 2011a. Dynamics of bacterial community development in the reef coral *Acropora muricata* following experimental antibiotic treatment. *Coral Reefs*, 30 (4): 1121-1133.

Sweet M. J., Croquer A., Bythell J. C., 2011b. Bacterial assemblages differ between compartments within the coral holobiont. *Coral Reefs*, 30 (1): 39-52.

Taylor M. W., Schupp P. J., Dahllof I., Kjelleberg S., Steinberg P. D., 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ Microbiol*, 6 (2): 121-130.

Taylor M. W., Radax R., Steger D., Wagner M., 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol R*, 71 (2): 295-347.

Team R. D. C., 2011. *R: A language and environment for statistical computing.*

Teixido N., Casas E., Cebrian E., Linares C., Garrabou J., 2013. Impacts on coralligenous outcrop biodiversity of a dramatic coastal storm. *PLoS One*, 8 (1): e53742.

Thacker R. W., Freeman C. J., 2012. *Sponge-microbe symbioses: recent advances and new directions*. In: Advances in Sponge Science: Physiology, Chemical and Microbial Diversity, Biotechnology (Becerro, M. A., Uriz, M. J., Maldonado, M., Turon, X., Eds) 57-111 pp. San Diego, USA.

Tremblay P., Weinbauer M. G., Rottier C., Guerardel Y., Nozais C., Ferrier-Pages C., 2011. Mucus composition and bacterial communities associated with the tissue and skeleton of three scleractinian corals maintained under culture conditions. *J Mar Biol Assoc UK*, 91 (3): 649-657.

Tujula N. A., Holmstrom C., Mussmann M., Amann R., Kjelleberg S., Crocetti G. R., 2006. A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. *J Microbiol Meth*, 65 (3): 604-607.

Tujula N. A., Crocetti G. R., Burke C., Thomas T., Holmstrom C., Kjelleberg S., 2010. Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine Ulvacean alga. *Isme J*, 4 (2): 301-311.

Uria A.,Piel J., 2009. Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. *Phytochem Rev*, 8 (2): 401-414.

Vega Thurber R. L., Willner-Hall D., Rodriguez-Mueller B., Desnues C., Edwards R. A., Angly F., Dinsdale E., Kelly L., Rohwer F., 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ Microbiol*, 11 (8): 2148-2163.

Vezzulli L., Previati M., Pruzzo C., Marchese A., Bourne D. G., Cerrano C., 2010. *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environ Microbiol*,12 (7): 2007-2019.

Vidal-Dupiol J., Ladriere O., Meistertzheim A.-L., Foure L., Adjeroud M., Mitta G., 2011. Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *J Exp Biol*, 214 (9): 1533-1545.

Viegas M. S., Martins T. C., Seco F., do Carmo A., 2007. An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Eur J Histochem*, 51 (1): 59-66.

Vighi M., 1972. Etude sur la reproduction de *Corallium rubrum* (L.). *Vie Et Milieu-Life and Environment*, 23: 21-32.

Vizcaino M. I., Johnson W. R., Kimes N. E., Williams K., Torralba M., Nelson K. E., Smith G. W., Weil E., Moeller P. D., Morris P. J., 2010. Antimicrobial resistance of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* and Caribbean sister phylotypes isolated from a diseased octocoral. *Microb Ecol*, 59 (4): 646-657.

von Wintzingerode F., Gobel U. B., Stackebrandt E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*, 21 (3): 213-229.

Wallner G., Amann R., Beisker W., 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytom*, 14 (2): 136-143.

Webster N. S., Wilson K. J., Blackall L. L., Hill R. T., 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge Rhopaloeides odorabile. *Appl Environ Microbiol*, 67 (1): 434-444.

Webster N. S., Bourne D. G., 2007. Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol Ecol*, 59 (1): 81-94.

Wegley L., Yu Y. N., Breitbart M., Casas V., Kline D. I., Rohwer F., 2004. Coral-associated archaea. *Mar Ecol Prog Ser*, 273: 89-96.

Wegley L., Edwards R., Rodriguez-Brito B., Liu H., Rohwer F., 2007. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol*, 9 (11): 2707-2719.

Weinberg S., 1975. Ecologie des octocoralliaires communs du substrat dur dans la région de Banyuls-Sur-Mer. *Bijdragen Tot de Dierkunde*, 45: 50-70.

Weinberg S., Weinberg F., 1979. Life-cycle of a gorgonian - *Eunicella singularis* (Esper, 1794). *Bijdragen Tot de Dierkunde*, 48 (2): 127-140.

Weinberg S., 1980. Autoecology of shallow-water octocorallia from Mediterranean rocky substrata. II. Marseille, Côte d'Azur and Corsica. *Bijdragen Tot de Dierkunde*, 50: 73-86.

Weinberg S., 1994. *Découvrir l'Atlantique, la Manche et la Mer du Nord*. Nathan publ.: 384 pp. Paris.

Wentrup C., Wendeberg A., Huang J. Y., Borowski C., Dubilier N., 2013. Shift from widespread symbiont infection of host tissues to specific colonization of gills in juvenile deep-sea mussels. *Isme J*, 7 (6): 1244-1247.

Widmer F., Hartmann M., Frey B., Kolliker R., 2006. A novel strategy to extract specific phylogenetic sequence information from community T-RFLP. *J Microbiol Meth*, 66 (3): 512-520.

Wilson B., Aeby G. S., Work T. M., Bourne D. G., 2012. Bacterial communities associated with healthy and Acropora white syndrome-affected corals from American Samoa. *FEMS Microbiol Ecol*, 80 (2): 509-520.

Winter C., Kerros M. E., Weinbauer M. G., 2009. Seasonal changes of bacterial and archaeal communities in the dark ocean: Evidence from the Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr*, 54 (1): 160-170.

Wirshing H. H., Messing C. G., Douady C. J., Reed J., Stanhope M. J., Shivji M. S., 2005. Molecula evidence for multiple lineages in the gorgonian family Plexauridae (Anhozoa: Octocorallia). *Marine Biology*, 147: 497-508.

Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *P Natl Acad Sci USA*, 87 (12): 4576-4579.

Xue Z. Q., Tian J., Han D., Ma X., 2011. A novel method for eliminating autofluorescence of small animals in fluorescence molecular imaging. *Medical Imaging 2011: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging*, 7965D.

Yang C. S., Chen M. H., Arun A. B., Chen C. A., Wang J. T., Chen W. M., 2010. *Endozoicomonas montiporae* sp nov., isolated from the encrusting pore coral *Montipora aequituberculata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 1158-1162.

Yeates C., Saunders A. M., Crocetti G. R., Blackall L. L., 2003. Limitations of the widely used GAM42a and BET42a probes targeting bacteria in the Gammaproteobacteria radiation. *Microbiology*, 149 (Pt 5): 1239-1247.

Yu Y., Breitbart M., McNairnie P., Rohwer F., 2006. FastGroupII: a web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC Bioinformatics*, 7: 57.

Zabala M., Ballesteros E., 1989. Surface-dependent strategies and energy flux in benthic marine communities or why corals do not exist in the Mediterranean. *Sci Mar*, 53: 3-17.

Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*, 32 (5): 723-35.

Abstract

Conservation of Mediterranean coastal ecosystems is increasingly threatened by environmental disturbances linked to global change. Coralligenous communities dominated by gorgonian species (Cnidaria, Anthozoa, Octocorallia) have been severely affected by diseases and mass mortality events linked to the current warming trends reported for the Mediterranean Sea. The isolation of bacterial pathogens from diseased colonies of the red gorgonian *Paramuricea clavata* highlighted the implication of microorganisms in health status of this species. Moreover, several recent microbiological studies evidenced that corals host specific bacterial communities that can play a key role in the physiology of the holobiont, defined as the host and its associated microbiota. The characterization of the natural microbial compartment of this temperate gorgonian species becomes a crucial step in the evaluation of the bacterial contribution to health and functioning of the *P. clavata* holobiont.

Under these circumstances, the global aim of this PhD work was to describe the interactions existing between the red gorgonian *P. clavata* and its associated bacteria in the Northwestern Mediterranean basin. The culture-independent analyses based on the bacterial 16S ribosomal DNA included (i) the characterization of spatiotemporal variation of the bacterial communities between remote sites (Provence, Corsica and Catalan coast) during 4 years (2007 to 2010), (ii) the localization of the bacteria within host tissues, (iii) the evaluation of the stability of gorgonian-bacterial associations under stress conditions in the natural environment (*in situ* mortality) and under experimental conditions (thermal stress in aquaria) and (iv) the determination of the host-specificity of dominant bacteria in different sympatric gorgonian species (*Eunicella singularis*, *Eunicella cavolini* and *Corallium rubrum*).

The results of this study highlighted that *P. clavata* and its microbiota form a holobiont in which host and bacteria live in close association. This association is spatiotemporally stable and maintained under stress conditions. Bacterial communities associated with the red gorgonian are mostly endosymbiotic and dominated by a bacterial ribotype belonging to a new genus within the *Hahellaceae* family (*Gammaproteobacteria*, *Oceanospirillales*). This ribotype is also retrieved in the other studied gorgonians and seems to be host-specific. These results suggest a particular role of this bacterial genus in the gorgonian holobionts.

The present work enabled to initiate the understanding of the bacterial compartment in the 4 most abundant gorgonian species dwelling in the Mediterranean coastal habitats. This knowledge and the different tools that have been developed can be incorporated to new researches on the role of symbiotic associations in health and future trajectories of gorgonian populations in the current climate change context.

Keywords

Bacteria, gorgonian, holobiont, *Hahellaceae*, *Paramuricea clavata*, 16S ribosomal DNA

Résumé

La conservation des écosystèmes côtiers de Méditerranée est sous la menace croissante de différentes perturbations environnementales associées au changement global. Les communautés du coralligène dominées par des gorgonaires (Cnidaires, Anthozoaires, Octocoralliaires) ont été sévèrement affectées par des évènements de maladies et mortalités massives liés au réchauffement de la Méditerranée. L'isolement de bactéries pathogènes à partir de colonies affectées de la gorgone rouge *Paramuricea clavata* a mis en évidence l'implication de micro-organismes dans l'état de santé de cette espèce. Par ailleurs, de nombreuses études microbiologiques récentes ont établi que les coraux hébergent des communautés bactériennes spécifiques jouant un rôle clé dans la physiologie de l'holobionte, défini comme l'hôte et son microbiote associé. Pour évaluer la contribution des bactéries associées à l'holobionte *P. clavata* à son fonctionnement et sa santé, il est apparu primordial de caractériser le compartiment microbien naturel de ce gorgonaire tempéré.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était de décrire les interactions existant entre la gorgone rouge *P. clavata* et ses bactéries associées en Méditerranée nord-occidentale. Les analyses entreprises par des techniques culture-indépendantes basées sur l'analyse des ADN ribosomiques 16S bactériens ont inclus (i) la caractérisation de la variation spatio-temporelle des communautés bactériennes entre sites distants (Provence, Corse, Catalogne) durant 4 années (2007 à 2010), (ii) la localisation des bactéries dans les tissus de l'hôte, (iii) l'évaluation de la stabilité des associations gorgones-bactéries en conditions de stress en milieu naturel (mortalité *in situ*) ou en conditions expérimentales (stress thermique en aquariums) et (iv) la détermination de la spécificité d'hôte des bactéries dominantes entre différentes espèces de gorgonaires sympatriques (*Eunicella singularis*, *Eunicella cavolini* et *Corallium rubrum*).

Les résultats obtenus ont établi que *P. clavata* et son microbiote forment un holobionte au sein duquel hôte et bactéries vivent en étroite association, stable dans le temps et l'espace ou en conditions de stress. Les communautés bactériennes associées à la gorgone rouge sont principalement endosymbiotiques et dominées par un ribotype bactérien appartenant à un genre nouveau au sein de la famille des *Hahellaceae* (*Gammaproteobacteria*, *Oceanospirillales*) qui est aussi retrouvé chez les autres gorgonaires étudiés et semble présenter une forte spécificité d'hôte. Ces résultats suggèrent un rôle particulier de ce genre bactérien chez les holobiontes gorgonaires.

Ces travaux ont permis d'initier la connaissance du compartiment bactérien des quatre espèces de gorgonaires les plus abondantes dans les habitats côtiers. Les éléments acquis et les différents outils mis au point pourront être intégrés à de nouvelles recherches sur le rôle des associations symbiotiques dans la santé et le devenir des populations de gorgonaires face aux changements environnementaux en cours.

Mots-clés

Bactéries, gorgonaires, holobionte, *Hahellaceae*, *Paramuricea clavata*, ADN ribosomique 16S