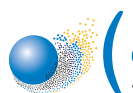




Projet MAGIC₃

Rapport final

Microorganisms
Associated
with Gorgonians
in a Climate
Change Context



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

Avec le soutien de

FONDATION
TOTAL



Microorganisms Associated with Gorgonians in a Climate Change Context

Rapport établi à la suite du travail de recherche effectué
au laboratoire DIMAR (UMR 6540) puis au laboratoire
MIO (UM 110) de septembre 2009 à février 2013

Marie La Rivière : Chargée d'études

Marc Bally : Responsable scientifique

Avec le soutien de



Ce rapport doit être cité comme suit :

La Rivière M., Bally M., 2013. *Projet MAGIC₃ - Microorganisms Associated with Gorgonians In a Climate Change Context - Rapport final*. Convention Fondation Total, CNRS et Université Aix-Marseille. MIO publ.: 36 pp. Marseille, France.

01. Contexte et Objectifs



01. Contexte et Objectifs

Le changement climatique est aujourd'hui au cœur des préoccupations (IPCC, 2007). Ses effets sur les continents sont bien connus, mais ceux agissant sur le milieu marin le sont beaucoup moins (Brierley *et al.*, 2009). Les océans et tous les organismes qu'ils contiennent ne sont pourtant pas à l'abri de cette modification profonde du climat qui se manifeste par une augmentation de la température de l'air et de l'eau, et une concentration croissante des gaz à effet de serre. Ces modifications impactent le milieu marin à de multiples niveaux par des effets en cascade (Fig. 1). Les scientifiques prévoient notamment une intensification des événements climatiques extrêmes (tempêtes, cyclones, canicules) pour les décennies à venir. Tous les milieux (tropicaux, polaires et même tempérés) sont touchés par ces phénomènes mais les écosystèmes côtiers sont les plus impactés (Harley *et al.*, 2006). La plupart des espèces marines sont affectées, à des degrés variables selon leur biologie et leur habitat. Les invertébrés fixés sont cependant les plus menacés car ils ne peuvent pas se déplacer lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables.

En mer Méditerranée, l'augmentation de la température est une des menaces les

plus pesantes, en particulier par le caractère exceptionnel des anomalies climatiques observées depuis une décennie (de Madron *et al.*, 2011 ; Lejeusne *et al.*, 2010). L'été 2003 est resté dans les mémoires en Europe en raison de sa canicule estivale hors-norme. Les températures extrêmement chaudes ont aussi été ressenties en mer, avec une eau atteignant plus de 26°C pendant plusieurs semaines dans certaines zones littorales (Crisci *et al.*, 2011). La canicule a provoqué des mortalités chez plusieurs dizaines d'espèces d'invertébrés fixés (éponges, coraux, gorgones, bivalves), en particulier dans l'écosystème coralligène considéré comme un des plus riches de Méditerranée (Cerrano *et al.*, 2000 ; Garrabou *et al.*, 2009). Ces épisodes ont été qualifiés de « mortalités massives » en raison de leur ampleur géographique (plusieurs centaines de kilomètres de côtes, de l'Italie à l'Espagne en passant par la Corse) et du nombre important d'organismes touchés. Des mortalités de ce type ont déjà été observées trois fois durant les 15 dernières années, au cours des étés 1999, 2003 et 2006. La récurrence de ces événements empêche la récupération de l'état initial d'abondance et de diversité des populations. Leurs effets néfastes s'additionnent dans le temps et

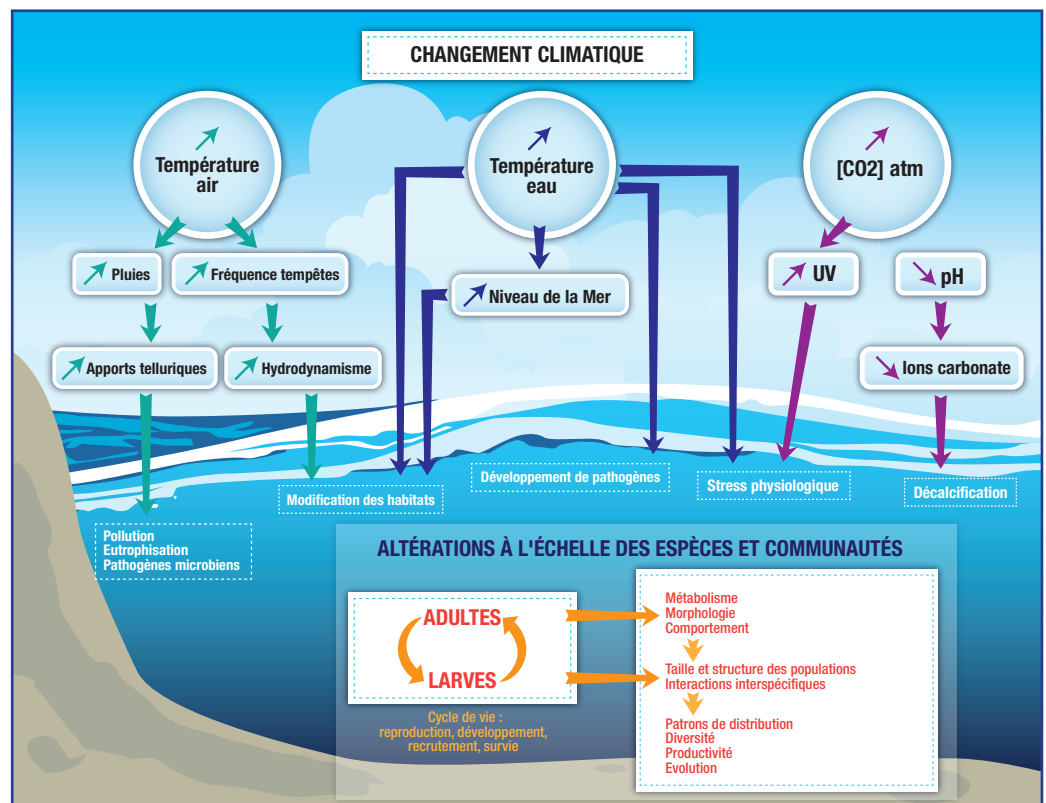


Figure 1 | Les principaux effets du changement climatique sur les écosystèmes côtiers marins.

Le changement climatique se traduit par trois principales modifications : l'augmentation de la température de l'air, l'augmentation de la température de l'eau et l'augmentation de la concentration de dioxyde carbone dans l'atmosphère. Chacune de ces modifications de l'environnement a des effets à différentes échelles en milieu marin. (Apports telluriques : apports en provenance de la terre, Eutrophisation : apport en excès de substances nutritives - nitrates et phosphates).

Coralligène

Milieu sous-marin très riche formé par l'accumulation d'algues calcaires



Figure 2 | Colonie de *Paramuricea clavata*.

Les colonies de gorgone rouge sont majoritairement de couleur rouge violacée, mais certains individus exhibent un dégradé de couleurs allant du carmin au jaune. (© F. Zuberer)

menacent l'écosystème, notamment par l'atteinte des populations de gorgonaires qui sont les espèces structurantes du coralligène (Linares *et al.*, 2005). Pour mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans ces mortalités et tenter de contrôler leurs effets par des mesures de protection adaptées, les scientifiques ont mis en place de nombreuses études dans différents domaines, comme la démographie, la génétique des populations ou l'étude des mécanismes de la tolérance au stress thermique.

La plupart des études de terrain sur les impacts des mortalités se basent sur la gorgone rouge *Paramuricea clavata* comme espèce modèle. Ce cnidaire colonial, proche des coraux, appartient à l'ordre des gorgonaires (Fig. 2). C'est l'un des plus grands invertébrés méditerranéens, mesurant jusqu'à 1 mètre de haut, ce qui en fait une espèce clé de l'écosystème coralligène dans lequel elle vit. De plus, elle représente l'attrait principal pour les plongeurs dans les zones rocheuses littorales de cette région de Méditerranée nord-occidentale. Durant les épisodes de mortalités, *P. clavata* a compté parmi les espèces les plus touchées (Garrabou *et al.*, 2009). Les symptômes observables à l'œil nu se caractérisent par la nécrose des tissus qui deviennent progressivement noirs puis se détachent de l'axe de l'animal, laissant un

paysage constitué de squelettes semblable à une forêt brûlée (Fig. 3). Les colonies de gorgone rouge ont une vitesse de croissance très lente, de l'ordre du centimètre en hauteur par an (Coma *et al.*, 1998). Les populations ont donc une faible capacité de récupération lorsqu'elles sont atteintes par des maladies de cette ampleur. La gorgone rouge ayant une forte valeur patrimoniale, écologique et économique, il est important d'explorer les mécanismes mis en jeu dans les maladies qui l'affectent et de comprendre les processus de récupération. Les travaux de recherche engagés sur cette espèce ont en particulier permis d'isoler une bactérie pathogène impliquée dans les nécroses, qui a été décrite et très étudiée dans le cas de maladies de coraux tropicaux (Bally et Garrabou, 2007).

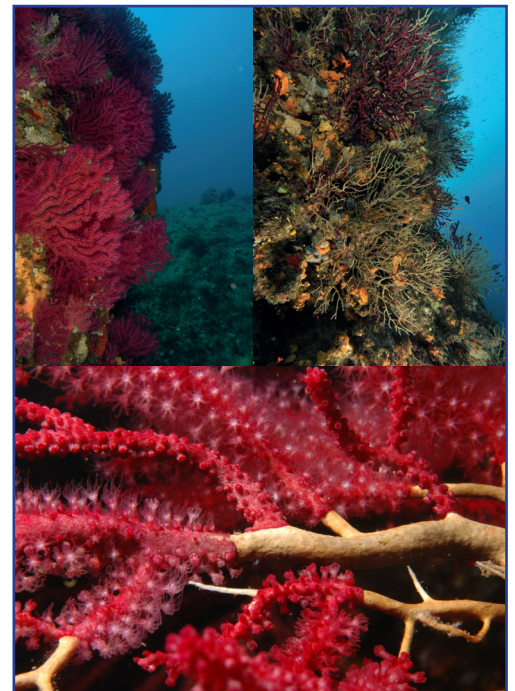


Figure 3 | Colonies de *Paramuricea clavata* saines et atteintes par une mortalité.

De droite à gauche, et de haut en bas : Population de gorgones rouges saines, population de gorgones rouges atteintes, détail de nécrose des tissus. (© O. Bianchimani - F. Zuberer)

Une attention particulière dans le domaine de la recherche en écologie marine est portée aux coraux tropicaux, eux aussi très sensibles aux effets du changement climatique qui impactent le fonctionnement de l'écosystème récifal. En effet, l'augmentation du nombre de maladies entraînant des mortalités en masse est liée à l'augmentation de la température de l'eau selon différents effets directs ou indirects (Sokolow, 2009). La diminution de l'abondance et de la diversité des coraux engendre de lourdes conséquences socio-économiques, en particulier par la disparition

Gorgonaire

Ordre appartenant à l'embranchement des cnidaires, classe des anthozoaires, sous-classe des octocoralliaires

Nécrose

Mort et décomposition d'une cellule ou d'un tissu vivant

Pathogène

Agent biologique (bactérie, virus, parasite) qui engendre une maladie

01. Contexte et Objectifs

de paysages attractifs pour le tourisme sous-marin et la diminution des stocks d'espèces récifales exploitées. L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) estime que les effets des maladies de coraux représenteront une perte d'environ 104 milliards de dollars dans les 50 prochaines années. Cette situation préoccupante a suscité la mise en place de nombreux travaux de recherche, en particulier dans le domaine de la microbiologie, pour tenter de comprendre les mécanismes impliqués dans le déclenchement des maladies (Garren et Azam, 2012). Ces études ont permis de mettre en évidence qu'une colonie de corail abrite une communauté microbienne particulière (appelé microbiome), composée de bactéries, virus, archées, fungi et microorganismes photosynthétiques, avec laquelle s'établit une symbiose, c'est-à-dire une étroite association pouvant conduire à des bénéfices réciproques. Le super-organisme constitué du corail hôte et de son microbiome est nommé holobionte (Fig. 4) (Rohwer *et al.*, 2002). Il a été montré que l'holobionte fonctionne grâce à un équilibre fragile d'échanges entre l'hôte et les microorganismes. Par exemple, les bactéries procurent au corail des composés nutritifs et une protection antibiotique contre des pathogènes. Si une perturbation des conditions environnementales affecte le corail et/ou un membre du microbiome, ces associations peuvent être déstabilisées, ce

qui peut influencer l'état de santé de l'hôte et favoriser l'infection par des pathogènes (Fig. 4) (Bourne *et al.*, 2009). Il est cependant très difficile de décrire le fonctionnement intime de l'holobionte en situation de stress car les organismes qui le composent sont vraisemblablement soumis à un ensemble de perturbations en cascade qui les affaiblissent et dont les impacts précis sur la santé du corail sont encore mal connus.

Nous avons transposé cette hypothèse du rôle des microorganismes dans la santé de leur hôte au modèle *Paramuricea clavata*. A notre connaissance, aucun programme de recherche n'avait encore porté sur l'étude microbiologique d'un gorgonaire en milieu tempéré, alors que plusieurs dizaines de travaux existent pour les coraux tropicaux ou les coraux profonds. L'objectif de ce projet a été de caractériser les communautés bactériennes associées à *P. clavata* et rechercher leur rôle potentiel dans la santé de la gorgone. La possibilité de prévention ou traitement des maladies en milieu naturel reste peu probable, mais la connaissance du fonctionnement de l'holobionte devrait faciliter : (1) la détection précoce des maladies, (2) la définition des populations/zones à risque, et (3) l'anticipation de l'évolution des populations de gorgones face au changement climatique pour une protection plus efficace.

Archées

Groupe de microorganismes unicellulaires formant le troisième grand domaine du vivant (avec les bactéries et les eucaryotes)

Fungi

Règne du domaine eucaryote regroupant les organismes appelés communément « champignons ». Les fungi peuvent être unicellulaires (levures) ou pluricellulaires

Symbiose

Association durable à bénéfices réciproques entre des organismes d'espèces différentes (symbiotes)

Holobionte

Ensemble constitué d'un organisme hôte et de tous les microorganismes symbiotiques qui lui sont associés

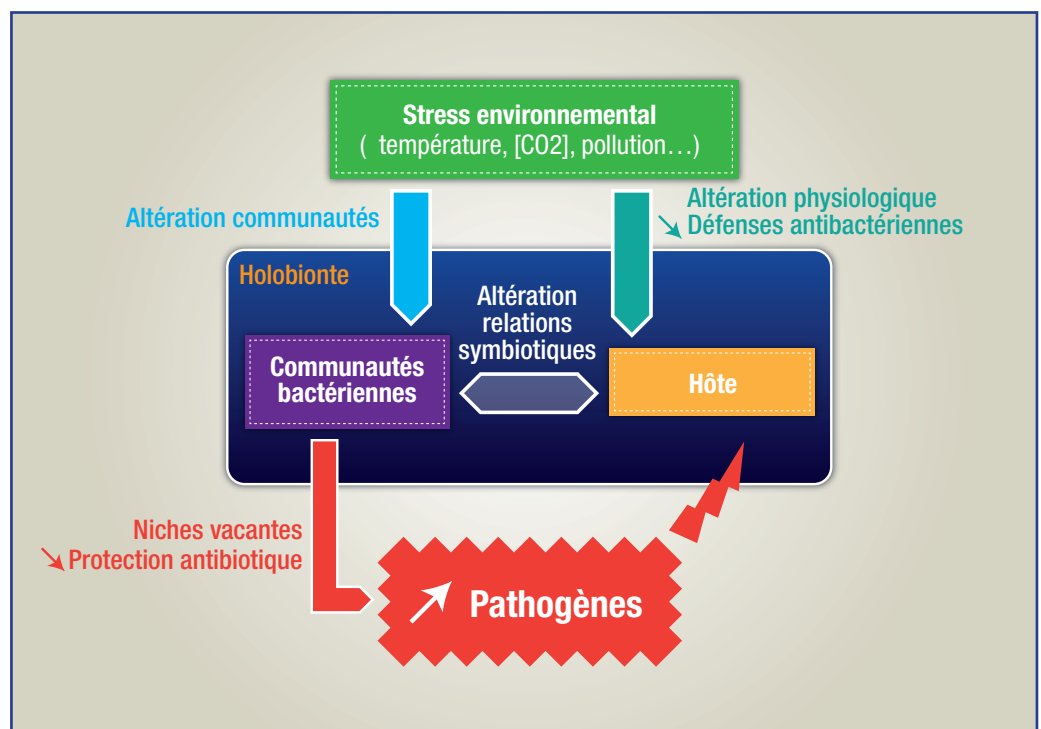


Figure 4 | Mécanismes de déstabilisation de l'holobionte.

L'holobionte, constitué d'un hôte et de symbiotes (ici les communautés bactériennes), peut subir des altérations suite à un stress environnemental, menant à la colonisation par des pathogènes.

Cette étude étant pionnière sur ce modèle biologique, la plupart des protocoles expérimentaux utilisés ont dû être adaptés et de nombreuses difficultés techniques ont été rencontrées dans chacune des approches que nous avons initiées. La première partie du travail a consisté en la description des communautés bactériennes (diversité, variations spatio-temporelles entre différentes populations de gorgones, localisation dans les tissus de l'hôte). La deuxième partie du projet s'est portée sur une approche fonctionnelle visant à déstabiliser les associations gorgone-bactéries en reproduisant un stress similaire à celui observé sur le terrain lors des mortalités massives, puis à observer leur résilience. Enfin, un travail préliminaire basé sur les méthodes développées sur la gorgone rouge a été appliqué à trois autres espèces de gorgonaires également affectées lors des mortalités estivales, dans le but d'aider à une compréhension plus globale du rôle possible des bactéries chez ces organismes.

02. Description des communautés bactériennes associées



02. Description des communautés bactériennes associées

Caractérisation de la diversité

Si le rôle des microorganismes dans la biologie des coraux tropicaux fait l'objet de nombreuses études depuis plus d'une décennie, la diversité microbienne associée aux gorgonaires de Méditerranée demeurait inexplorée jusqu'à nos travaux sur *Paramuricea clavata*. Notre première démarche a consisté à comparer les communautés bactériennes associées à des populations de gorgones issues de 3 sites côtiers (l'île de Riou à Marseille, la presqu'île de Scandola en Corse et les îles Medes en Catalogne ; Fig. 5) en été et en hiver durant 4 ans (entre 2007 et 2010).

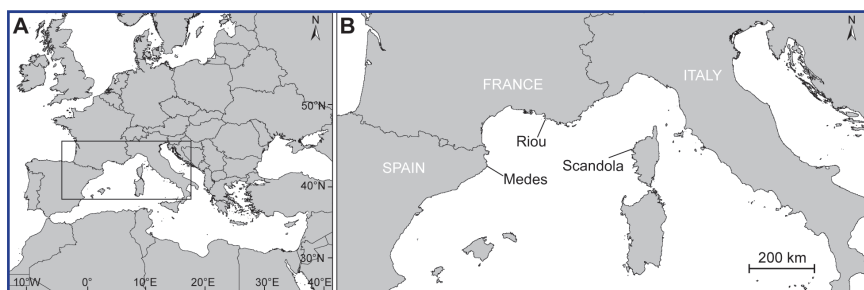


Figure 5 | Sites échantillonnés.

Carte du bassin nord-ouest méditerranéen (A) et agrandissement montrant la localisation des sites d'étude (B).

En l'absence d'études moléculaires antérieures sur ce nouveau modèle biologique, des difficultés techniques dans la préparation des ADN bactériens à partir des tissus de gorgones ont été rencontrées, puis surmontées par la mise au point d'un protocole adapté à *P. clavata*. Les résultats obtenus par 2 approches génétiques ont été confrontés pour la caractérisation des associations bactériennes naturelles :

- l'analyse par T-RFLP (Fig. 6) de la structure globale des communautés bactériennes et de leurs variations dans l'espace et dans le temps,

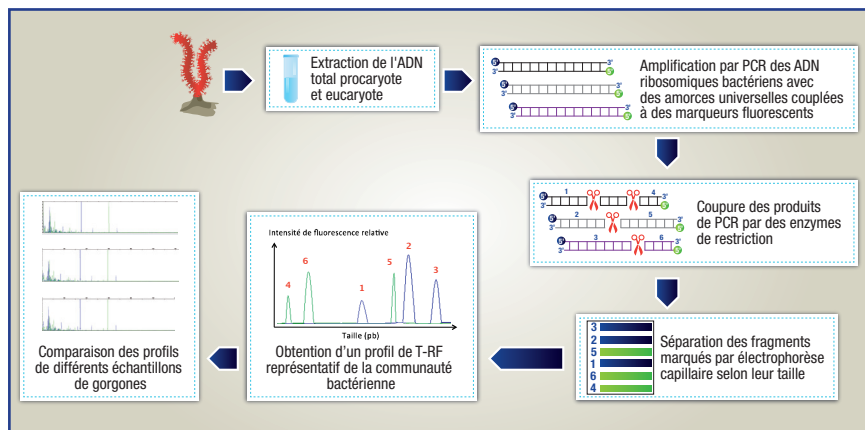


Figure 6 | T-RFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism.

Etapes de l'analyse des communautés bactériennes présentes dans un échantillon de gorgone par T-RFLP.

- le séquençage ADN de banques de clones (Fig. 7) pour l'identification des espèces bactériennes présentes.

Le profilage génétique par T-RFLP a révélé une étonnante conservation des communautés bactériennes entre les 3 populations de gorgones pourtant distantes de plusieurs centaines de kilomètres, ce qui témoigne d'associations spécifiques entre gorgones et microorganismes. Les profils bactériens issus de l'eau de mer environnante ont également été analysés pour certains prélèvements, confirmant une composition différente entre bactérioplankton et communautés associées aux colonies de *P. clavata*.

L'analyse statistique globale des 186 profils T-RFLP réalisés à partir de colonies échantillonnées aux 3 sites montre clairement qu'une grande majorité des communautés bactériennes possède une composition similaire et indépendante de la localisation géographique des populations (Fig. 8). Toutefois, une structure différente apparaît pour les assemblages bactériens de toutes les colonies prélevées en été 2007 aux 3 sites.

Le séquençage des ADN bactériens clonés a permis d'identifier les principaux groupes bactériens associés à chaque type de profil :

- la plupart des profils sont dominés (voire uniquement constitués) par des bactéries de la famille des *Hahellaceae* (classe des Gammaprotéobactéries),
- les profils typiques «été 2007» sont associés à des communautés plus diversifiées et dominées par des bactéries des genres *Paenibacillus* et *Propionibacterium*.

Malgré plusieurs tentatives sur différents milieux de culture, l'espèce bactérienne *Hahellaceae* majoritaire dans les communautés associées à *P. clavata* n'a pas pu être isolée et serait donc non-cultivable. Son interaction avec la gorgone hôte apparaît particulièrement stable car, après le profond changement de composition bactérienne en été 2007, un retour rapide à la situation initiale de domination des communautés par cette *Hahellaceae* a été constaté.

Les raisons du changement radical de structure de communautés en été 2007 restent obscures. Aucun évènement environnemental particulier ayant pu agir à une aussi large échelle géographique (vague de chaleur, pollution, apports telluriques...) n'a été décelé durant cette saison.

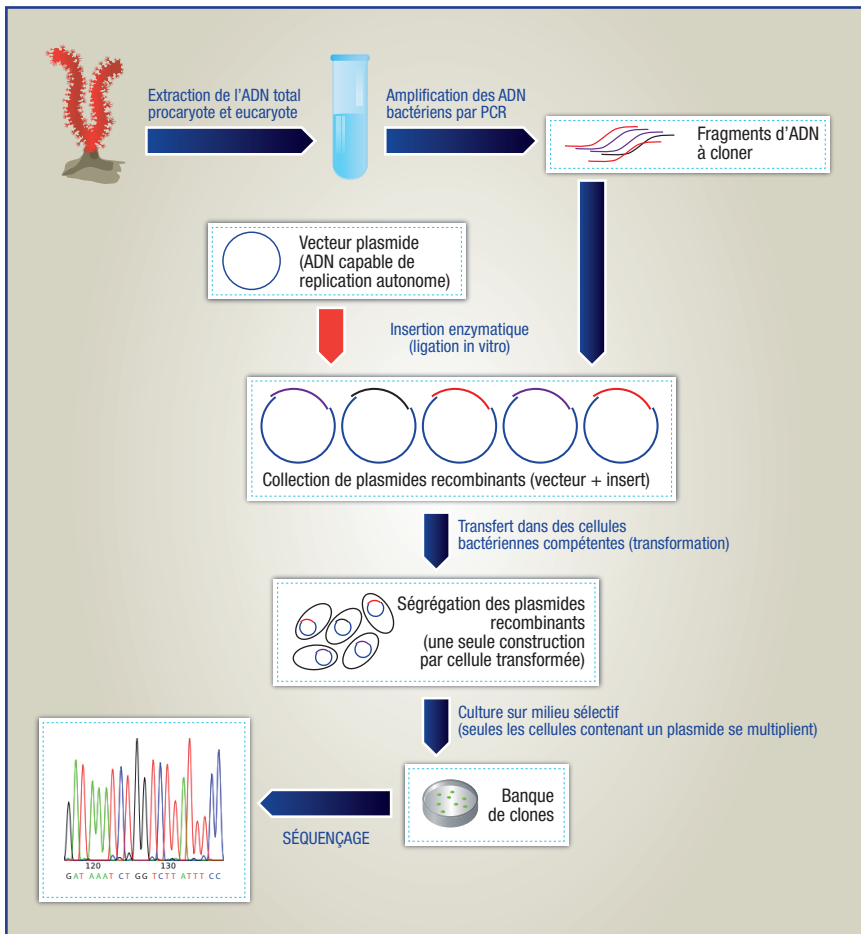


Figure 7 | Construction d'une banque de clones.

Étapes de la construction d'une banque de clones d'ADN ribosomique 16S à partir d'un échantillon de gorgone.

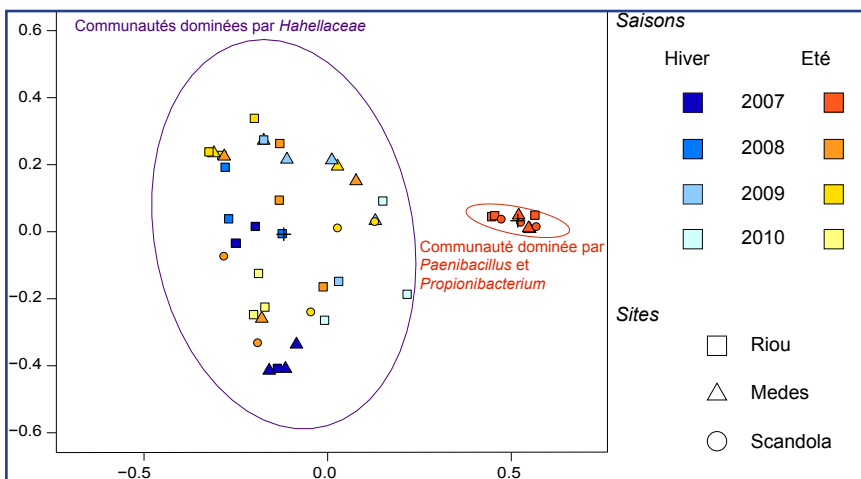


Figure 8 | Représentation graphique MDS des communautés bactériennes de *P. clavata*.

Graphique 2-D représentant les similarités de compositions entre les communautés bactériennes des colonies de gorgone échantillonnées à 3 sites en été et hiver entre 2007 et 2010 et analysées par T-RFLP (digestion par l'enzyme *CfoI*).

possibles mais non vérifiables à posteriori.

Une des conclusions principales issue de ce travail est la tolérance de la gorgone rouge à des changements radicaux de composition de sa communauté bactérienne associée. Les recherches en microbiologie des coraux tropicaux ont associé des changements rapides de communautés bactériennes à une altération de l'état de santé de l'hôte. Chez plusieurs espèces de coraux récifaux, ces changements observés lors de stress environnementaux conduisent au développement de bactéries pathogènes et au déclenchement de maladies. Cette réponse diffère donc de celle de notre gorgonaire modèle pour lequel il semble que même si une interaction forte et spécifique existe avec les *Hahellaceae*, leur remplacement – au moins temporaire – par d'autres bactéries ne soit pas associé à une dégradation visible de l'état biologique. Aucun phénomène de mortalité massive n'a été détecté en été 2007 mais il est possible qu'un changement aussi étendu des communautés associées ait fragilisé les gorgonaires si un stress anormal (par exemple une température élevée de l'eau de mer) était survenu au même moment. Nous avons tenté de répondre à cette hypothèse dans une série d'expériences en aquariums décrites plus bas dans ce rapport.

Ce travail sur la diversité microbienne associée a fait l'objet d'une publication dans un journal scientifique en 2013 (La Rivière *et al.*, 2013), puis a été complété par la recherche d'archées associées à *P. clavata*. Chez les coraux tropicaux, des membres de cette lignée de microorganismes ont été mis en évidence chez certaines espèces. Il existe peu d'éléments pour évaluer la spécificité des associations archées-coraux, mais le potentiel métabolique de ce groupe pourrait conduire à mieux comprendre l'intégration des fonctions microbiennes dans la biologie des coraux. Nos tentatives de mise en évidence d'archées par PCR se sont toutes révélées infructueuses, ce qui semble exclure l'existence d'une population archéenne stable dans le cas de la gorgone rouge.

Histologie

L'étape d'identification des bactéries dominantes associées à la gorgone rouge étant franchie, nous avons recherché leur localisation à la surface ou dans les tissus de l'hôte car cette information peut conduire à formuler différentes hypothèses sur le rôle des associations. Ainsi, l'observation

D'autres hypothèses, basées sur des facteurs biologiques (par exemple, une infection virale des bactéries *Hahellaceae* causant leur disparition temporaire, ou bien la rupture d'une interaction symbiotique bactérie-hôte par modification du métabolisme des gorgones en été 2007) sont

02. Description des communautés bactériennes associées

de bactéries particulières dans le conduit digestif, les tentacules ou le mucus de différents cnidaires (anémones, coraux mous, coraux durs) a suggéré une implication dans la digestion, la production de nutriments ou la protection antibiotique de leur hôte. L'organisation des bactéries au sein de structures tissulaires ou cellulaires particulières (par exemple de simples agrégats ou bien des vésicules spécialisées) peut aussi renseigner sur le niveau d'intégration des microorganismes et guider la recherche d'un rôle fonctionnel.

Pour cette étude, nous avons utilisé la technique d'hybridation CARD-FISH qui permet de visualiser la position des bactéries dans les tissus grâce un marquage fluorescent spécifique observable en microscopie (Fig. 9).

Dans un premier temps, un protocole adapté de fixation et de coupe des tissus a dû être mis au point pour obtenir des coupes de qualité suffisante pour reconnaître les structures tissulaires de la gorgone. La caractérisation histologique des tissus de *P. clavata*, c'est-à-dire la description de l'anatomie microscopique de la gorgone, n'avait encore jamais été réalisée et a été entreprise en se basant sur la connaissance de la structure d'autres cnidaires (Fig. 10).

Enfin, un protocole d'hybridation en CARD-FISH a été spécialement développé et mis au point pour permettre la détection de signaux bactériens sur ces coupes. Cette étape a été la plus critique, car très peu de travaux sur des organismes proches sont rapportés dans la littérature et de nombreuses difficultés techniques ont été rencontrées. En particulier, l'auto-fluorescence des tissus de la gorgone rouge liée à une forte charge en pigments a constitué une difficulté majeure en masquant tous les signaux émis par les cellules bactériennes hybridées. Ce problème a été

accentué par la faible intensité des signaux spécifiques car les bactéries associées à des animaux sont connues pour être peu actives et donc pauvres en ribosomes hybridables.

Les images de microscopie confocale que nous avons réussi à obtenir montrent deux types de structures identifiables par hybridation in situ (Fig. 11) :

- type I : structures marquées sous formes d'agrégats peu denses de signaux individualisés, localisées dans l'actinopharynx qui mène à la cavité gastrique du polype,

- type II : structures en amas compacts (10 à 15 μm de diamètre) localisées au niveau des tentacules des polypes.

De manière générale, ces résultats ont permis de conclure que les bactéries sont présentes en relativement faible proportion dans les tissus de la gorgone.

Aucune conclusion définitive n'a pu être tirée concernant l'identité des structures de type I car ces signaux sont observés aussi bien avec les sondes spécifiques des bactéries qu'avec les sondes contrôles qui ne devraient pas s'hybrider. De nouvelles tentatives doivent être réalisées pour confirmer si ces structures sont bien des bactéries.

Les structures de type II semblent correspondre à des amas ou des micro-colonies de bactéries et émettent des signaux majoritaires et spécifiques par CARD-FISH. On pourrait s'attendre à ce qu'elles correspondent aux Gammaprotéobactéries du genre *Hahellaceae* qui dominent les communautés bactériennes analysées par T-RFLP et par clonage. Cependant ces amas ne sont pas marqués par la sonde spécifique des Gammaprotéobactéries, ce qui pourrait contredire cette identification. Des essais avec des sondes spécifiques des séquences *Hahellaceae* et différents protocoles de perméabilisation des membranes bactériennes seront nécessaires pour permettre d'affirmer que ces amas correspondent à la bactérie dominante des communautés observées par les techniques de profilage génétique. A l'appui de cette hypothèse, il est cependant remarquable que la forme et l'aspect des agrégats de type II soient très similaires à ceux de structures bactériennes décrites dans la cavité gastrique et les tissus épithéliaux d'une espèce de corail tropical hébergeant aussi des Gammaprotéobactéries, ce qui suggère que ce type d'amas pourrait représenter une organisation bactérienne commune à différents cnidaires.

Pour compléter ces données nous avons

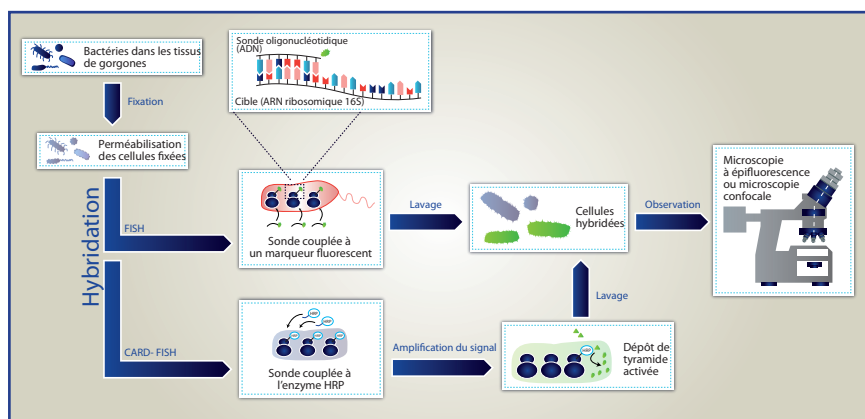


Figure 9 | FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition FISH).

Étapes de la visualisation de bactéries d'intérêt dans des coupes de tissus de gorgone par deux techniques d'hybridation.

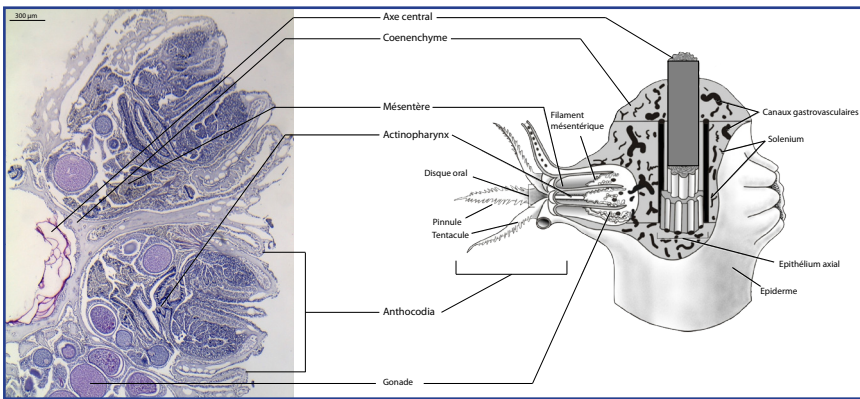


Figure 10 | Description histologique de *P. clavata*.

Gauche : Coupe transversale semi-fine (épaisseur 5 µm) de gorgone rouge colorée en hématoxyline-éosine. Droite : Schéma organisationnel d'un gorgonaire type (d'après Galloway *et al.*, 2007)

également tenté de visualiser les bactéries associées aux tissus de *P. clavata* par microscopie électronique à balayage (MEB), qui permet l'observation des structures tissulaires et cellulaires en trois dimensions. La limitation principale de cette technique est liée à l'observation d'échantillons de tissus coupés aléatoirement, ce qui ne permet pas de choisir avec précision le plan de coupe examiné comme par CARD-FISH. Aucune des structures observées au MEB n'a pu être apparentée à des cellules bactériennes typiques. Dans la mesure où les bactéries semblent être présentes en faible quantité dans les tissus, il est probable que nous ne soyons pas parvenus à les détecter dans les coupes aléatoires. Cependant, les observations au MEB ont permis d'observer la disposition tridimensionnelle de structures de la gorgone qui n'avaient jamais été

visualisées par ces moyens auparavant (Fig. 12) et qui seront utiles pour une poursuite de ces investigations.

Ces résultats feront prochainement l'objet d'une publication dans un journal scientifique (La Rivière *et al.*, in prep).

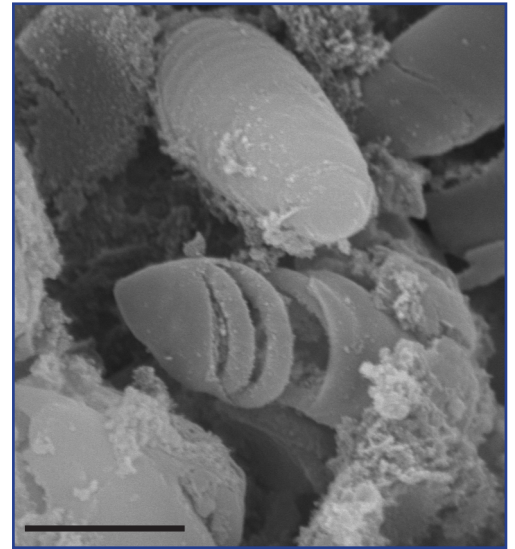


Figure 12 | Cnidocytes de *P. clavata*.

Observation de cnidocytes au microscope électronique à balayage. La barre d'échelle représente 3 µm.

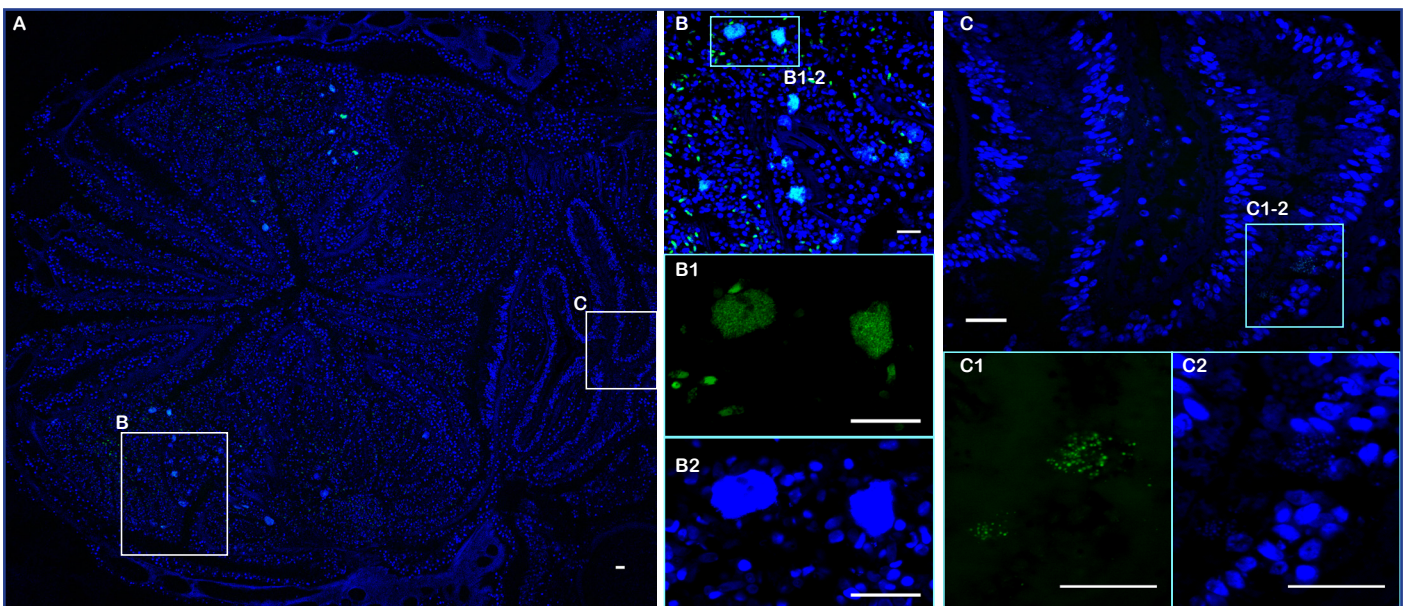


Figure 11 | Bactéries hybridées par CARD-FISH dans des coupes de *P. clavata*.

Observations en microscopie confocale des bactéries situées dans des coupes semi-fines (épaisseur 5 µm) de gorgone rouge. Bleu : DAPI (marquage de tous les noyaux eucaryotes et procaryotes), Vert : sonde Eub-338 (universelle bactéries) révélée par le fluorochrome Alexa488. A : photo composite entre les 2 couleurs montrant un polype entier, B : photo composite zoom sur les structures de types II, B1 : marquage Eub338-Alexa488 de structures de type II, B2 : marquage DAPI de structures de type II, C : photo composite zoom sur les structures de type I, C1 : marquage Eub338-Alexa488 de structures de type I, C2 : marquage DAPI de structures de type I. La barre d'échelle représente 20 µm.

03. Expérimentations de stress et mortalité in situ

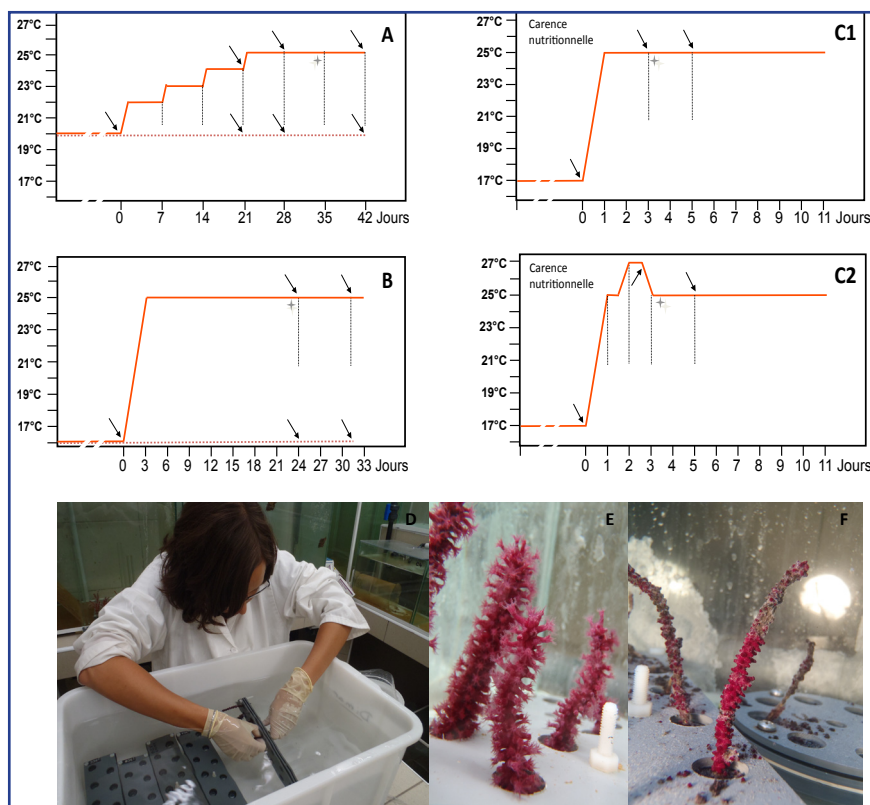


03. Expérimentations de stress et mortalité in situ

Etude de stress thermique in vitro

Dans cette série d'expériences en aquarium, nous avons étudié la réponse des communautés bactériennes de la gorgone rouge à des stress de température. Quelques travaux de ce type ont été menés sur des coraux tropicaux afin de rechercher un lien causal entre état de stress, déstabilisation de l'holobionte et colonisation par une nouvelle communauté microbienne à caractère pathogène. Cependant aucune étude similaire permettant de comparer holobiontes tropicaux et tempérés dans leurs modalités de réponse au stress thermique n'avait jamais été menée sur un gorgonaire.

Trois 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 et celles de l'Institut de Ciències del Mar (ICM) à Barcelone.



D'autres travaux antérieurs de l'équipe ont déterminé que les premiers symptômes de nécroses apparaissent à partir d'une température de 25°C pour la gorgone rouge. Dans les trois expérimentations qui suivent, cette température a servi de seuil. Avant chaque protocole de stress, les fragments de gorgones ont subi une période d'acclimatation à la température enregistrée sur le terrain au moment du prélèvement, pour éviter un stress additionnel dû à la manipulation et au transfert des échantillons en aquarium (Fig. 13).

Expérience 1

Des fragments apicaux de *P. clavata* ont été placés dans 2 groupes d'aquariums et soumis à 2 conditions différentes : un traitement de stress thermique avec montée de la température par palier ou un traitement contrôle avec maintien constant de la température enregistrée sur le terrain (Fig. 13-A). Les communautés bactériennes de chaque prélèvement de colonies stressées ont été analysées par T-RFLP puis comparées aux colonies contrôles n'ayant subi aucun stress thermique. Certaines des colonies en conditions de stress à 25°C hébergeaient une population bactérienne co-dominée par des *Hahellaceae* et des *Paenibacillus*, pouvant indiquer une transition vers une communauté proche de celle observée in situ en été 2007. Cependant nous avons constaté que des profils similaires étaient aussi obtenus pour des colonies contrôles de cette expérience, et sans que cela soit corrélé avec la durée de vie en aquarium. L'explication la plus probable à ces différences de communautés serait une variabilité entre les échantillons au moment du prélèvement empêchant la détection fine d'effets causés par le stress en aquarium.

Expérience 2 (collab. ICM, Barcelone)

Une population de gorgone rouge a été échantillonnée de façon clonale (plusieurs fragments étant issus d'une même colonie) pour s'affranchir de la variabilité inter-individus. Deux traitements ont été appliqués : une montée lente de la température ou un maintien à la température enregistrée sur le terrain au moment de l'échantillonnage (Fig. 13-B). A l'apparition des premiers signes de nécrose sur un fragment, tous les fragments de la colonie correspondante ont été prélevés des aquariums et analysés par T-RFLP. Dans ces conditions représentatives de la limite de tolérance avant nécrose des organismes, nous avons observé que les bactéries *Hahellaceae* restent le composant majeur des communautés associées. L'analyse statistique des profils complets

ne révèle pas de différence probante entre les colonies stressées et les contrôles. Il est cependant notable que pour une colonie, la présence de *Paenibacillus* (en plus des *Hahellaceae*) a été détectée sur la majorité des fragments testés, sans corrélation avec la température à 25°C ou 16°C. Ce constat confirme qu'une variabilité inter-colonies existe pour la présence de *Paenibacillus* au moins, ce qui explique les résultats peu clairs de l'expérimentation précédente.

Expérience 3

Il nous a paru intéressant de combiner température élevée et carence nutritionnelle pour s'approcher des conditions in situ rencontrées par les organismes en fin d'été. Durant cette période où surviennent les mortalités massives, les eaux sont particulièrement pauvres en ressources nutritives et les contraintes énergétiques qui en résultent seraient un des facteurs de déclenchement des maladies. La combinaison des 2 causes de stress pouvait ainsi révéler des modifications des communautés bactériennes passées inaperçues par les 2 expériences précédentes. Deux variantes du protocole d'élévation de la température ont été appliquées sur des fragments clonaux maintenus en aquarium sans ajout d'alimentation : une montée rapide de la température au seuil de 25°C, suivie d'un maintien au seuil (Fig. 13-C1) ou d'un bref passage à 27°C puis un retour à 25°C (Fig. 13-C2). Pour chaque colonie, deux répliquats clonaux ont été analysés en parallèle pour chacune des conditions afin d'évaluer la

variabilité de réponse. Quel que soit le traitement, aucun changement sensible des communautés n'est visible par T-RFLP. Après 1 à 2 jours supplémentaires post-stress à 27°C, de nombreux fragments ont été nécrosés. Dans ces conditions, les tissus encore vivants montrent une tendance à héberger une diversité bactérienne accrue mais qui ne semble pas corrélée à une baisse significative des signaux des *Hahellaceae*.

Il y a donc peu d'éléments en faveur de l'hypothèse d'un rôle central de la communauté bactérienne naturelle dans le déclenchement de la nécrose. Les variations que nous avons pu observer dans la 3^{ème} série d'expérience (principalement une augmentation de la diversité spécifique) se sont produites au moment des nécroses et sont plus probablement liées à l'arrivée de nouvelles bactéries se développant sur des gorgones en phase de mortalité qu'à une réelle transition entre différentes communautés bactériennes de l'holobionte. Ces travaux montrent au contraire une forte stabilité des communautés en condition de stress, même dans des conditions conduisant à la mort des organismes.

Etude de stress par les antibiotiques

Pour rechercher un autre moyen d'agir in vitro sur les communautés qui nous permette ensuite de mieux comprendre leur niveau d'interaction au sein de l'holobionte, nous avons cherché à modifier ou éliminer les bactéries associées par

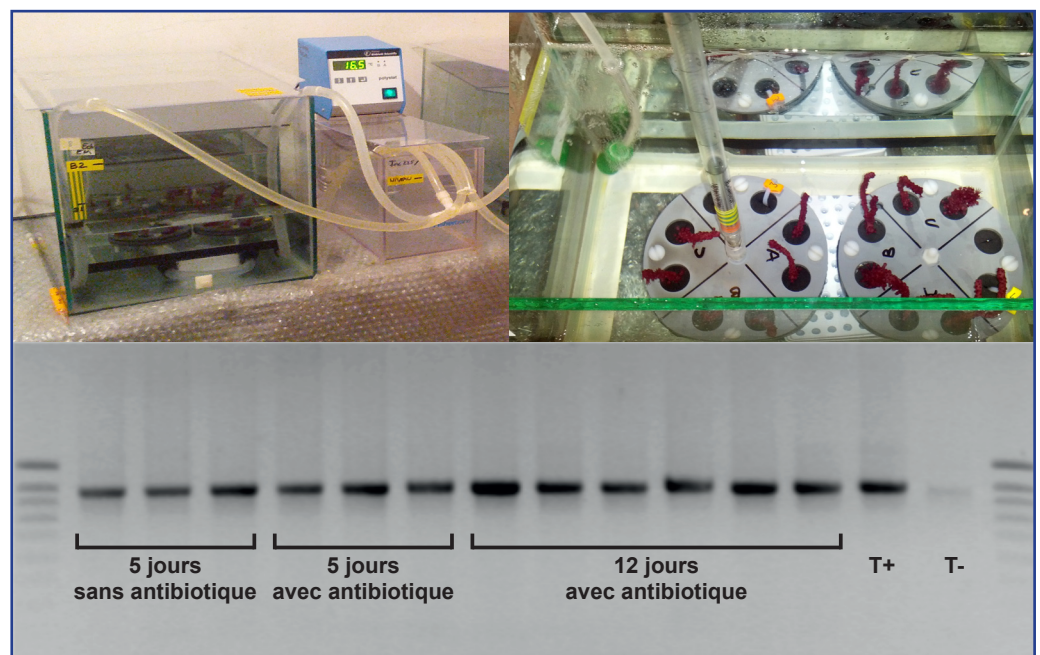


Figure 14 | Expérimentation de stress antibiotique.

Haut : Dispositif expérimental mis en place lors des expérimentations de stress antibiotique. Bas : Gel PCR des ADN 16S ribosomiques bactériens des échantillons après 5 j sans stress antibiotique, après 5 j en présence d'antibiotique (Ciprofloxacine 40 µg/ml), après 12 j en présence d'antibiotique (Ciprofloxacine 40 µg/ml) - T+ : témoin positif (ADN contrôle), T- : témoin négatif (sans ADN) . (© M. Bally)

03. Etude d'une mortalité de gorgones in situ

des traitements antibiotiques couvrant un large spectre antibactérien (Ciprofloxacine, Ampicilline, Tétracycline, Streptomycine, utilisées à plusieurs concentrations). Ces expérimentations ont été menées dans des conditions proches de la stérilité (eau de mer filtrée à 0,2 µm, matériel désinfecté, aquariums fermés) pour limiter les contaminations extérieures (Fig. 14).

Malgré les doses élevées d'antibiotiques utilisées, il n'a pas été possible d'affecter de façon concluante les *Hahellaceae* dominantes, alors que ces traitements précédemment appliqués à des coraux tropicaux induisent de fortes perturbations des communautés. Cette absence d'effets pourrait être liée à la présence de structures particulières contenant les bactéries au sein des tissus de la gorgone rouge, cette compartimentation pouvant limiter la diffusion et l'action des antibiotiques.

Etude d'une mortalité in situ

La survenue d'un épisode de mortalité de gorgonaires dans la région du Cap d'Antibes (Fig. 15) en fin d'été 2011 nous a fourni une opportunité d'investigation des modifications de communautés bactériennes en situation naturelle.

canalisés une masse d'eau plus chaude provenant des golfes voisins, provoquant un stress inhabituel des organismes. D'autres causes biologiques (épidémie virale ou bactérienne) ou anthropiques (pollution locale) ne sont pas exclues mais aucun indice particulier n'a pu être relevé en faveur d'une ou l'autre de ces hypothèses.

Les données d'analyses T-RFLP menées sur les échantillons de colonies de *P. clavata* issus de ces missions de prélèvement sont similaires à celles issues des expérimentations en aquariums : il n'y a pas de changement net des profils bactériens en situation de stress entre colonies d'apparence saine et colonies malades. A l'appui de cette conclusion, nous avons pu extraire les ADN d'échantillons de gorgones prélevées lors de la mortalité massive de 1999 dans la région de Marseille dont l'analyse T-RFLP montre aussi le maintien de communautés dominées par les *Hahellaceae* durant l'anomalie climatique estivale exceptionnelle de cette année.

Ces données feront également prochainement l'objet d'une publication scientifique.

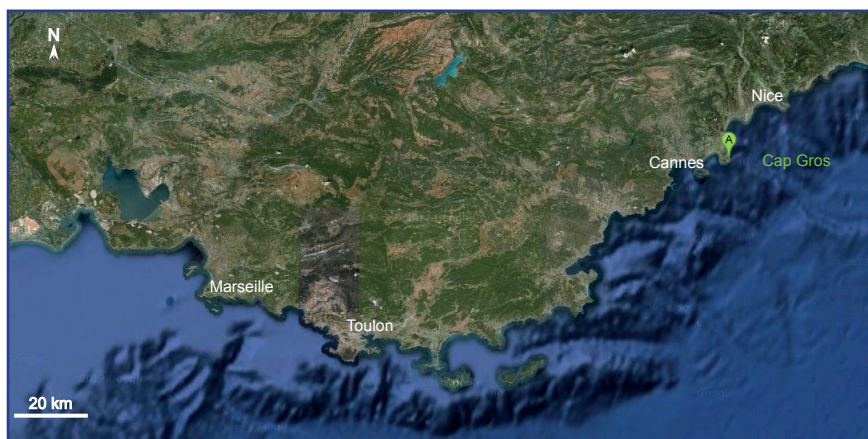


Figure 15 | Site de Cap Gros (Antibes).

Carte du site de Cap Gros où a eu lieu la mortalité de gorgones en 2011.

Cet événement nous a été signalé grâce au réseau d'alerte que nous avons mis en place auprès des clubs de plongée de Provence et Côte d'Azur. Nous avons ainsi pu intervenir rapidement sur site pour des prélèvements de colonies à différents stades de la maladie. Plus de 70% des colonies de la population étaient atteintes par des nécroses (Fig. 16). Les causes de cette mortalité restent cependant énigmatiques car l'atteinte s'est limitée à cette seule population, ce qui suggère un stress très localisé. Il est possible que les courants au niveau de ce cap aient

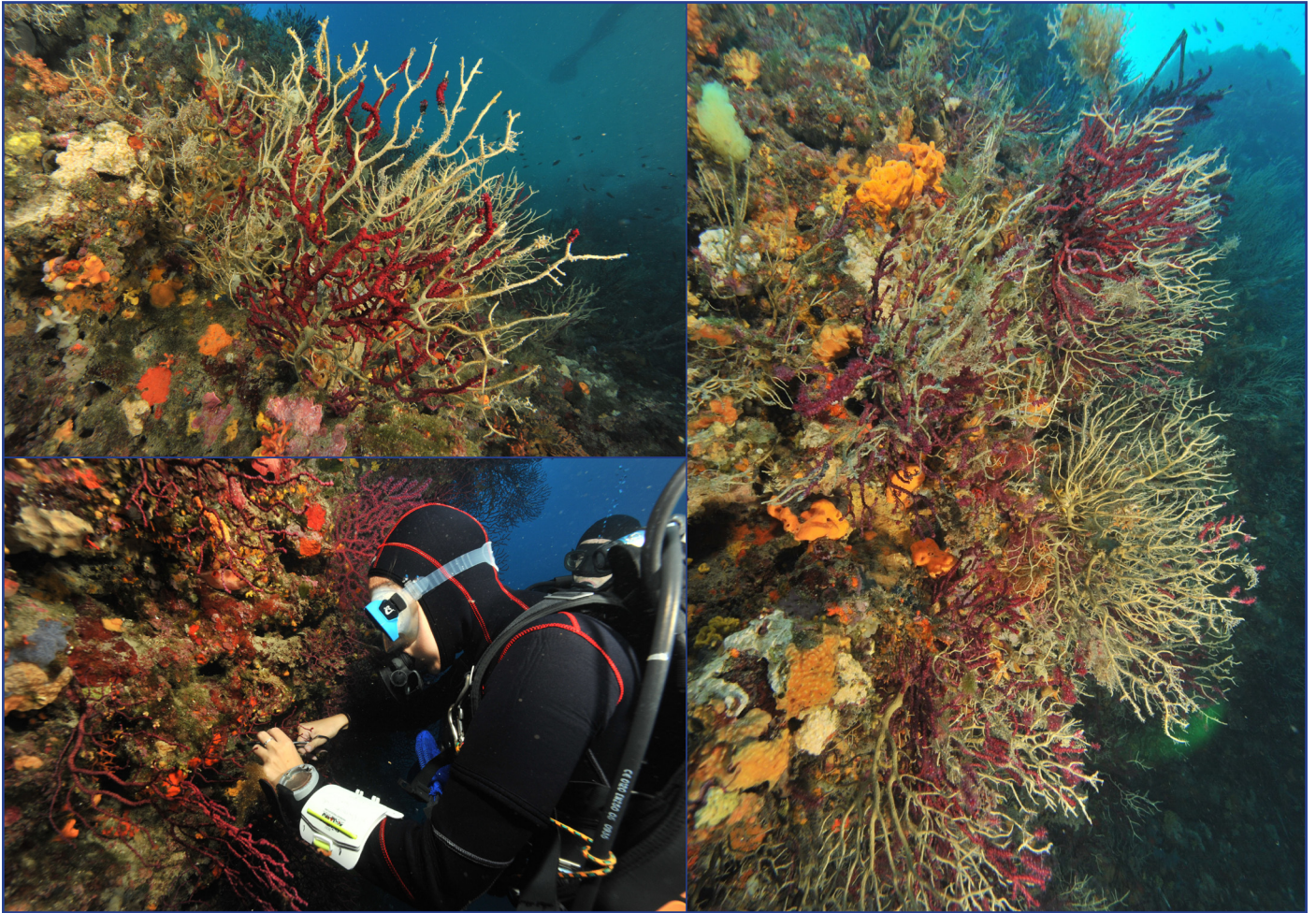
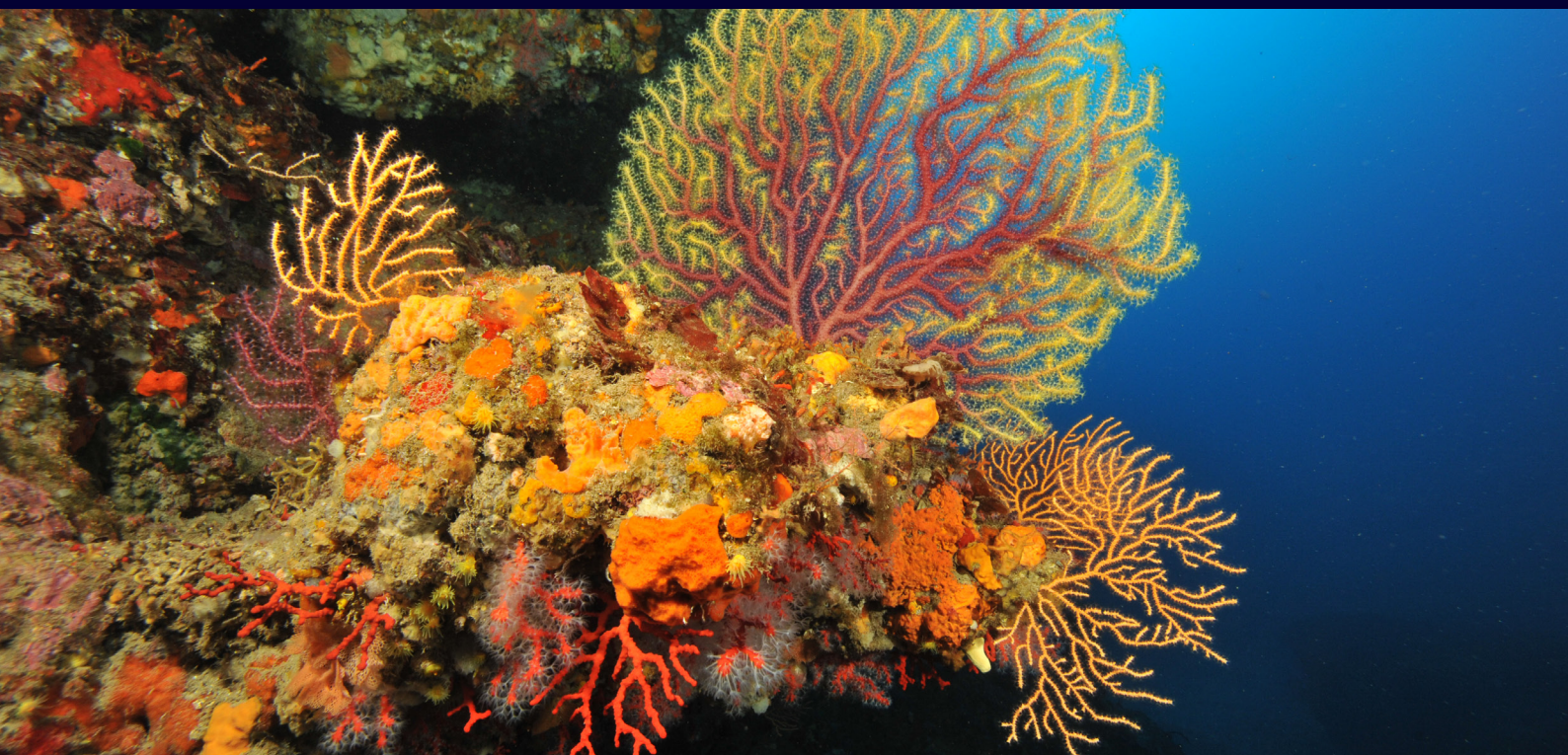


Figure 16 | Mortalité de gorgone rouge au Cap Gros.

Haut gauche et droite : Colonies de *P. clavata* atteintes de nécrose en octobre 2011 (site Cap Gros). Bas : Plongeurs échantillonnant des colonies de gorgone rouge pour les analyses microbiologiques. (© O. Bianchimani)

04. Comparaison des communautés bactériennes d'autres espèces de gorgonaires



04. Communautés bactériennes d'autres espèces

Après l'identification d'un groupe bactérien particulier qui domine les communautés microbiennes associées à la gorgone rouge, nous avons recherché si d'autres gorgonaires de Méditerranée partageaient les mêmes assemblages bactériens ou bien hébergeaient des espèces différentes. Les 3 espèces que nous avons étudiées, la gorgone blanche *Eunicella singularis*, la gorgone jaune *Eunicella cavolinii* et le corail rouge *Corallium rubrum* (Fig. 17), sont présentes en un même site de la rade de Marseille (île de Riou) où elles cohabitent avec une population de *P. clavata*. Cette situation a permis d'analyser des colonies des 4 espèces prélevées à proximité les unes des autres et soumises aux mêmes facteurs environnementaux.

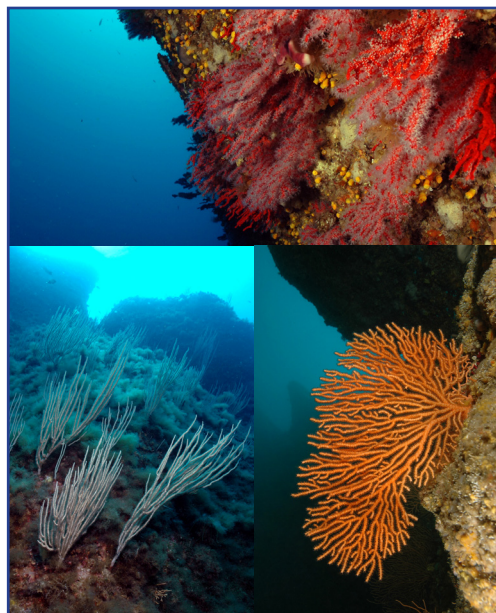


Figure 17 | Espèces de gorgonaires de Méditerranée.
De haut en bas et de gauche à droite : Corail rouge (*Corallium rubrum*), Gorgone blanche (*Eunicella singularis*) et Gorgone jaune (*Eunicella cavolinii*). (© O. Bianchimani - F. Zuberer)

L'analyse en T-RFLP montre que des communautés distinctes sont associées à chacune des espèces de gorgonaires et qu'elles subissent peu de changements entre les saisons d'été et d'hiver. Malgré des structures différentes entre ces communautés, le séquençage de banques de clones d'ADN ribosomique 16S bactérien fait ressortir une forte présence (plus de 80%) de ribotypes de *Hahellaceae* chez les 2 espèces du genre *Eunicella*. Chez le corail rouge, la famille des *Hahellaceae* est moins représentée (13% des clones) et une autre Gammaprotéobactérie non identifiée est majoritaire chez ce gorgonaire. Ces résultats renforcent donc l'hypothèse d'une relation particulière établie entre les gorgonaires et les *Hahellaceae* que nous avons émise

à partir des travaux décrits précédemment.

Une analyse de phylogénie à partir des séquences obtenues montre un regroupement des séquences de *Hahellaceae* issues de *E. singularis* et *E. cavolinii* qui semblent même indistinguables à ce niveau d'analyse. Les espèces d'un même genre de gorgonaire (ici le genre *Eunicella*) pourraient donc héberger des bactéries extrêmement proches entre elles. Les séquences obtenues à partir de la gorgone rouge sont phylogénétiquement distinctes bien que très voisines de celles des *Eunicella*. Enfin, les *Hahellaceae* identifiées chez le corail rouge appartiennent à un autre groupe plus éloigné des précédents, et certaines d'entre elles sont proches d'*Hahellaceae* trouvées chez des éponges ou d'autres invertébrés marins (Fig. 18). Par des analyses de comparaison de séquences avec les bases de données publiques, nous avons mis en évidence une ressemblance remarquable entre les bactéries *Hahellaceae* identifiées chez les 4 gorgonaires méditerranéens et un groupe de bactéries présent chez la gorgone tropicale *Gorgonia ventalina* (Fig. 18).

Ces regroupements phylogénétiques des séquences en fonction de l'espèce de gorgonaire indiquent que ces associations sont hôte-spécifiques. Ceci suggère d'une part un rôle biologique conservé des *Hahellaceae* au sein des différents holobiontes et d'autre part une adaptation de ces bactéries à chaque gorgonaire hôte. De plus, ces données sont compatibles avec une hypothèse de co-évolution entre *Hahellaceae* et gorgones car l'arrangement phylogénétique des séquences *Hahellaceae* correspond à l'arbre des gorgonaires (Fig. 18). En effet les genres *Eunicella* et *Gorgonia* sont des représentants de la famille des Gorgoniidae et hébergent des *Hahellaceae* extrêmement proches. Le genre *Paramuricea* appartient à la famille des Plexauridae et le genre *Corallium* aux Coralliidae, chacun hébergeant des *Hahellaceae* différentes. Les études de phylogénie basées sur des marqueurs mitochondriaux de ces gorgonaires montrent que *P. clavata* est en fait plus proche des 2 espèces d'*Eunicella* que de *C. rubrum*, ce qui est à nouveau compatible avec la phylogénie des groupes de *Hahellaceae* trouvés chez ces gorgonaires.

Une co-évolution entre les *Hahellaceae* et leur gorgone hôte expliquerait la faible diversité bactérienne observée car cette population serait dans ce cas soumise à un processus de sélection qui favoriserait les bactéries les plus performantes pour leur faculté à se maintenir dans l'holobionte. Il

Phylogénie

Etude des relations de parentés entre différents organismes vivants en vue de comprendre leur évolution

existe peu de cas suggérant une co-évolution possible entre bactéries et invertébrés marins, et une telle relation évolutive soulève de nombreuses questions sur le mode d'acquisition et de transmission de ces bactéries, l'origine de leur stabilité à de grandes échelles temporelles, ou bien sur les liens évolutifs entre espèces de gorgones actuellement trouvées dans des régions du monde éloignées. Ces questions dépassent les objectifs de notre étude mais renforcent l'idée que la compréhension de la nature des interactions entre les *Hahellaceae* et les gorgonaires est une des clés pour expliquer des aspects essentiels de la biologie de ces organismes et mieux définir les critères de leur bon état écologique.

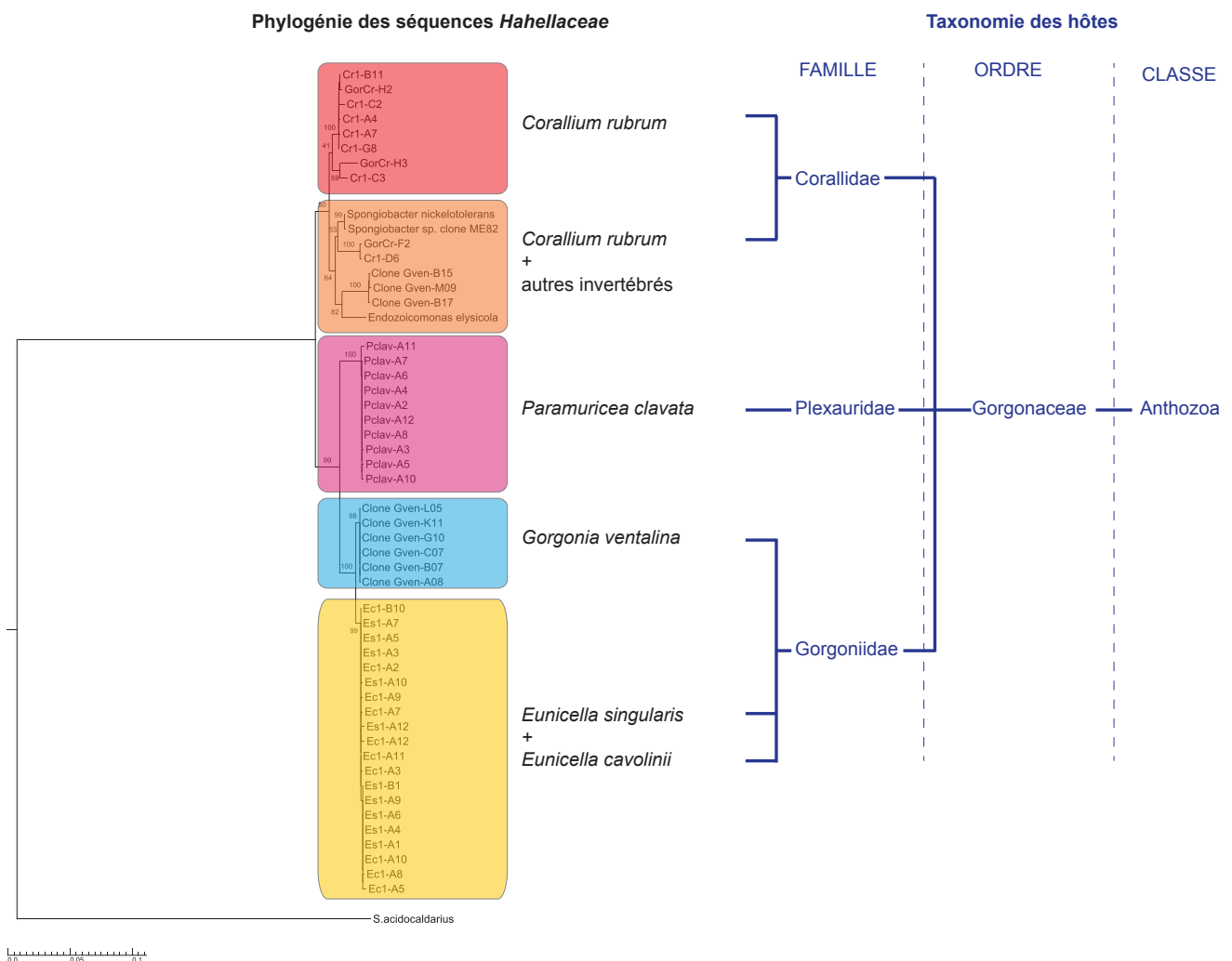
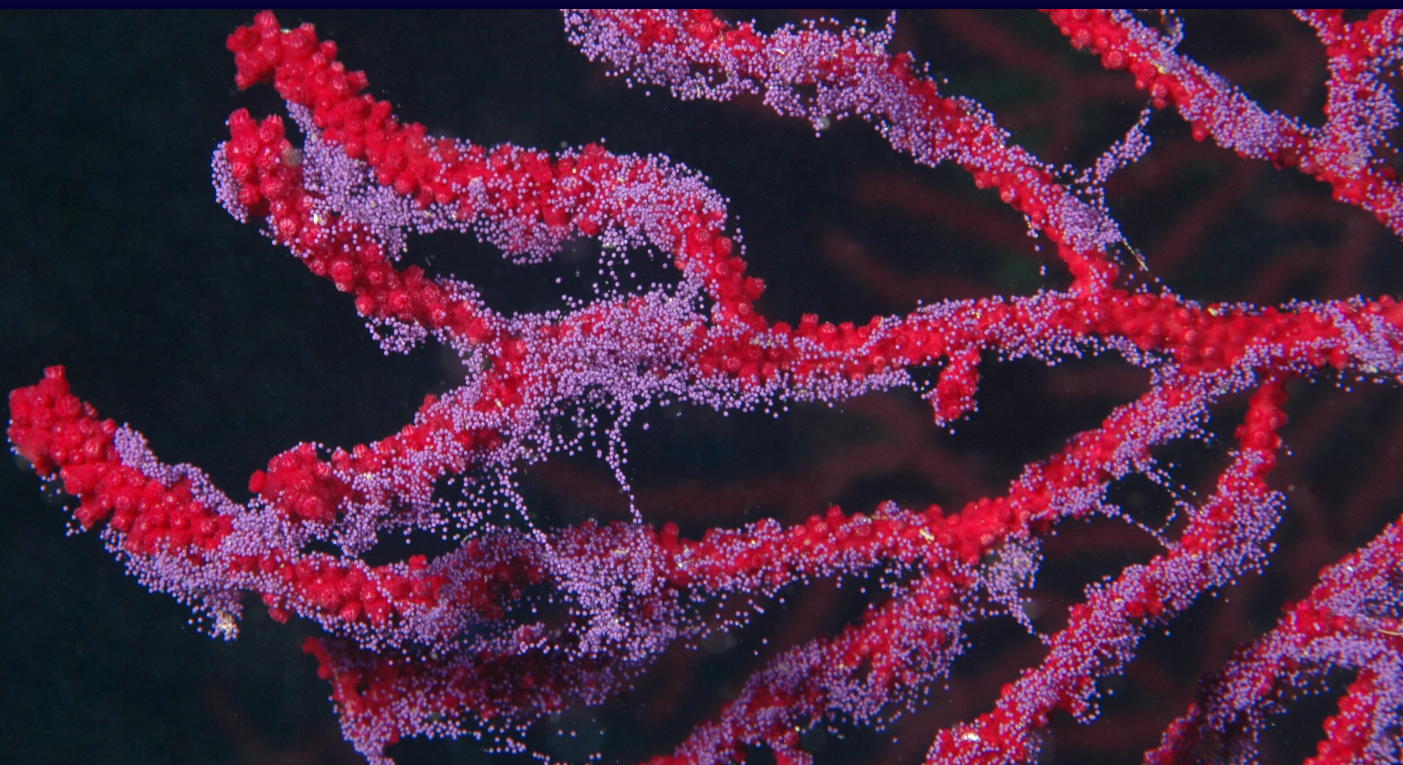


Figure 18 | Phylogénie des séquences *Hahellaceae* associées aux gorgonaires.

Arbre phylogénétique obtenu par Neighbor Joining montrant le regroupement des *Hahellaceae* selon la classification taxonomique des gorgonaires hôtes.

05. Perspectives et Valorisation



Perspectives

Les travaux entrepris dans ce projet ont permis de mettre en évidence une association spécifique entre la gorgone rouge *Paramuricea clavata* et une communauté bactérienne dominée par une espèce nouvelle au sein de la famille des *Hahellaceae*. Nos résultats contribuent à plusieurs niveaux de connaissance de cette interaction :

- Cette association s'avère très stable dans l'espace et le temps, et même en conditions de stress imposées à des colonies hôtes. Un unique cas de changement profond mais réversible de la diversité bactérienne associée a été observé in situ sans que sa cause ait pu être expliquée et sans corrélation avec une mortalité des gorgonaires. En conséquence, les communautés bactériennes ne semblent pas pouvoir être utilisées comme indicateurs d'un état de stress de l'organisme, malgré un potentiel de réponse à des stimuli externes encore inconnus.
- La localisation intra-tissulaire des bactéries est le signe d'une forte intégration dans le fonctionnement de l'holobionte. La mise au point d'une méthode de visualisation des bactéries chez les gorgonaires permettra de rechercher des modifications de ces structures à une échelle microscopique en lien avec l'état biologique de l'hôte.
- Le fort degré d'interaction bactéries-gorgones serait le produit d'une co-évolution procaryote-eucaryote indépendante de la distribution géographique des organismes. Cette histoire évolutive commune pourrait expliquer le regroupement de la micro-diversité génétique des *Hahellaceae* selon chaque espèce de gorgonaire hôte.

Ce projet de recherche qui s'inscrit à la frontière de l'écologie et de la microbiologie environnementale a nécessité de nombreux travaux pluridisciplinaires de terrain, d'expérimentations biologiques, de biologie moléculaire et de microbiologie. Les résultats obtenus présentent un fort intérêt non seulement pour la communauté des microbiologistes des coraux par la description d'un nouvel holobionte en milieu tempéré, mais aussi pour celle des biologistes de la conservation par l'étude innovante de processus microbiologiques potentiellement reliés à la santé d'organismes clés d'un écosystème menacé.

L'ensemble de ce travail a permis de

poser les jalons de la connaissance de ce nouveau modèle biologique malgré de nombreuses difficultés techniques nécessitant la remise en cause de protocoles souvent considérés comme universels. Cette démarche pionnière est délicate mais ouvre de nouvelles pistes méthodologiques et conceptuelles, nécessaires pour la compréhension de mécanismes complexes et multifactoriels.

Différents travaux vont pouvoir s'inscrire dans la suite de ce projet :

- L'utilisation d'approches par métagénomique pour décrire plus précisément l'espèce d'*Hahellaceae* associée à *P. clavata*. La description des capacités métaboliques de ce groupe bactérien permettrait une meilleure compréhension du rôle fonctionnel des bactéries au sein de l'holobionte.
- L'application des protocoles d'observation mis au point sur *P. clavata* (hybridation fluorescente et microscopie confocale ou électronique) à d'autres espèces de gorgonaires pour la description de nouveaux cas d'holobiontes tempérés.
- La réalisation de suivis de la reproduction de gorgonaires pour déterminer le mécanisme d'acquisition et de transmission des communautés bactériennes (transmission verticale, de la colonie mère à la larve ; ou horizontale, d'une colonie à l'autre) chez des espèces présentant des modes de fécondation différents (*P. clavata* ayant une fécondation externe et *C. rubrum* une fécondation interne).
- La mise en place d'expérimentations de terrain visant à comparer les communautés bactériennes de gorgones vivant dans des sites pollués (par exemple, populations localisées à proximité d'émissaires d'eaux usées) et dans des sites protégés, pour évaluer l'impact de la qualité du milieu sur l'holobionte. Des colonies de chaque site pourront être échangées par transplantation artificielle pour évaluer les capacités d'acquisition de nouvelles bactéries ou de lutte contre la colonisation par des microorganismes opportunistes lorsque la qualité de l'eau de mer environnante change.

Enfin, le réseau de communication entre scientifiques, usagers et gestionnaires de l'espace marin littoral continuera d'être développé car il constitue à ce jour le seul moyen efficace pour une veille de l'état des écosystèmes à une grande échelle géographique. Les informations collectées facilitent le déclenchement précoce d'alertes

en cas d'évènements particuliers dans le milieu naturel et leur prise en compte par les scientifiques. Si la mise en œuvre de tels réseaux ne peut malheureusement pas permettre d'anticiper ou de limiter les impacts des anomalies climatiques ou d'autres perturbations anthropiques, ils constituent un levier important pour mobiliser de manière concertée les différents intervenants, orienter la recherche et promouvoir une meilleure sensibilisation du public et des médias.



Valorisation

Articles scientifiques

Les résultats du projet sont ou seront prochainement publiés sous forme d'articles dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture comme listé ci-dessous.

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.

Bally M., La Rivière M., Garrabou J. (in prep). Interspecific comparisons of host-associated bacterial diversity support coevolution of Hahellaceae and gorgonian corals.

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.

La Rivière M., Roumagnac M., Garrabou J., Bally M. (in prep). Stability of the microbiota associated with the gorgonian *Paramuricea clavata* in controlled thermal stress conditions.

Présentations à des congrès et séminaires

La Rivière M., Garrabou J., Bally M., 2013. *Bacterial assemblages associated with the gorgonian holobiont Paramuricea clavata in Mediterranean Sea : a long-term baseline study*. 13th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Stresa, Italie.

La Rivière M., Garrabou J., Bally M., 2013. *Diversity of four mediterranean Gorgonian-associated bacterial communities*. 40th Congress of CIESM, Marseille, France.

La Rivière M., Roumagnac M., Garrabou J., Bally M., 2012. *Diversity of gorgonian-associated bacterial communities in Northwestern Mediterranean Sea*. 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, Danemark.

La Rivière M., Roumagnac M., Garrabou J., Bally M., 2012. *Diversité et dynamique*

des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge Paramuricea clavata. Congrès annuel de l'EDSE, Marseille, France. (Prix du meilleur poster)

La Rivière M., Garrabou J., Bally M., 2011. *Bacteria associated with the Mediterranean gorgonian Paramuricea clavata : a spatio-temporal characterization*. "Microorganisms facing their environment" International Microorganism Conference, Paris, France.

La Rivière M., Bally M., 2011. *The MAGIC3 project : objectives and main results*. International workshop of the "Brown algal biodiversity and ecology in eastern Mediterranean Sea" project, Rhodes, Grèce.

La Rivière M., Garrabou J., Bally M., 2010. *Spatial and temporal analysis of microbial diversity associated with the Mediterranean gorgonian Paramuricea clavata*. 13th International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, USA.

La Rivière M., Garrabou J., Bally M., 2010. *Spatial and temporal analysis of bacterial diversity associated with the Mediterranean gorgonian Paramuricea clavata*. 39th Congress of CIESM, Venice, Italie.

Communication et vulgarisation

Site internet de présentation du projet : www.magic3-project.com

Article dans la presse grand public : « Alerte, les gorgones meurent », paru dans le quotidien Nice Matin, édition du 27 novembre 2011.

Présentation de nos travaux au Master 2 «Evolution, patrimoine naturel et sociétés», parcours «Toxiques, Micro-organismes et Médiateurs Chimiques dans les Ecosystèmes» du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris).

Participation à la mise en place d'une veille biologique concernant les mortalités de gorgonaires en région PACA :

- Lancement d'alertes à la vigilance des plongeurs sur les mortalités de gorgones en fin d'été (réseau des clubs de plongée)
- Correction des protocoles d'alertes mortalités du Parc National de Port-Cros
- Participation au réseau des Pêcheurs Sentinelles en tant que référent scientifique

Spatial and temporal analysis of microbial diversity associated with the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*



Marie La Rivière^{1*}, Joaquim Garrabou² and Marc Bally¹
¹ DIMAR, CNRS-Université de la Méditerranée, Centre d'Océanologie de Marseille, France
² Institut de Ciències del Mar – CSIC, Barcelona, Spain
 *Contact : marie.la-riviere@univmed.fr



Context

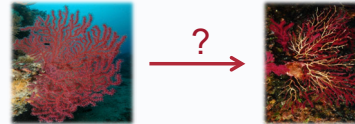
- Mass mortalities recently occurred in NW Mediterranean affecting *P. clavata* and other benthic macroinvertebrate species.
- A thermodependent bacterial pathogen (*Vibrio coralliilyticus*) has experimentally been shown to trigger disease in *P. clavata* ⁽¹⁾.



1 - Bally & Garrabou (2007) Global Change Biology 13: 2078-2088

Aim

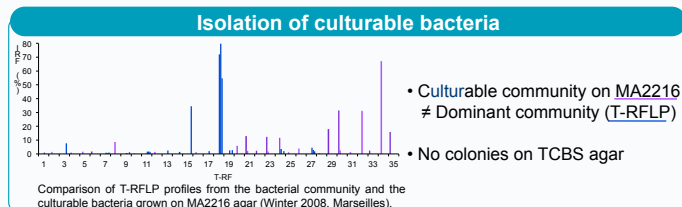
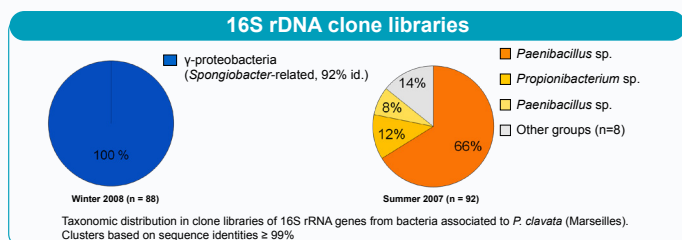
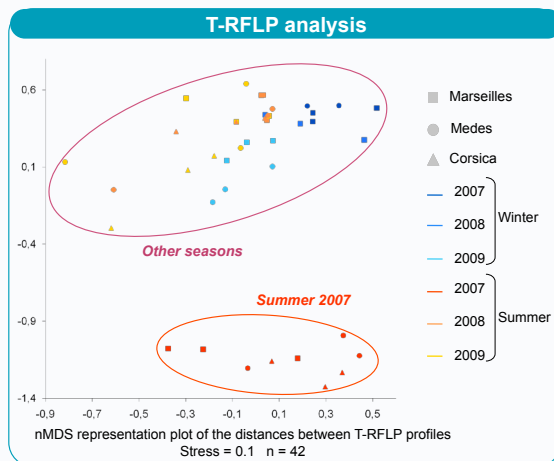
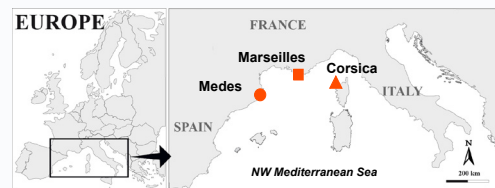
Acquisition of a « baseline » of diversity and abundance of associated bacterial communities to assess the potential microbial contribution to gorgonian fitness and disease mechanisms.



How does the associated bacterial diversity vary in space and time ?

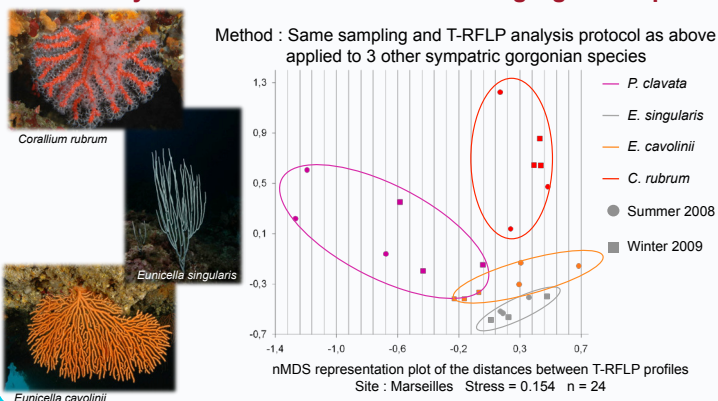
Methods :

- Seasonal sampling of apical fragments from healthy *P. clavata* colonies at 3 sites
- T-RFLP analysis of associated bacteria
- Sequencing of bacterial 16S rDNA clones
- Isolation of culturable bacteria on MA2216 marine agar and TCBS Vibrio agar



➡ Shifts in microbial composition can occur simultaneously in geographically remote populations while the global bacterial community seems to be conserved across space and time.

Preliminary data from other Mediterranean gorgonian species



Conclusions

- ✓ Bacterial communities from geographically remote *P. clavata* populations in NW Mediterranean are similar.
- ✓ Different gorgonian species seem to harbor specific microbiotas.
- ✓ Bacterial diversity is conserved in the majority of monitored seasons.
- ✓ *Vibrio coralliilyticus* was not found in the healthy sampled *P. clavata* colonies.
- ✓ At least in *P. clavata*, deep but transient shift in bacterial communities composition can occur.

Open questions

- Is there a functional role of bacterial associations in gorgonians ?
- Which factors may drive changes in bacterial assemblages composition ?
- Are shifts in bacterial diversity involved in disease outbreaks, and could they be used as early warning indicators of illness ?

Diversité et dynamique des communautés bactériennes associées à la gorgone rouge *Paramuricea clavata*



Marie La Rivière¹, Joaquim Garrabou² et Marc Bally¹

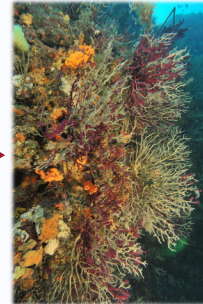
¹ Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO), CNRS-Univ. Aix-Marseille UMR 7294, Marseille, France

² Institut de Ciències del Mar – CSIC, Barcelona, Spain



La Gorgone rouge *Paramuricea clavata*, un hôte modèle

- Espèce patrimoniale et structurante de l'écosystème
- Cnidaire colonial longévif sensible aux perturbations
- Affectée par les mortalités massives en Méditerranée nord-occidentale



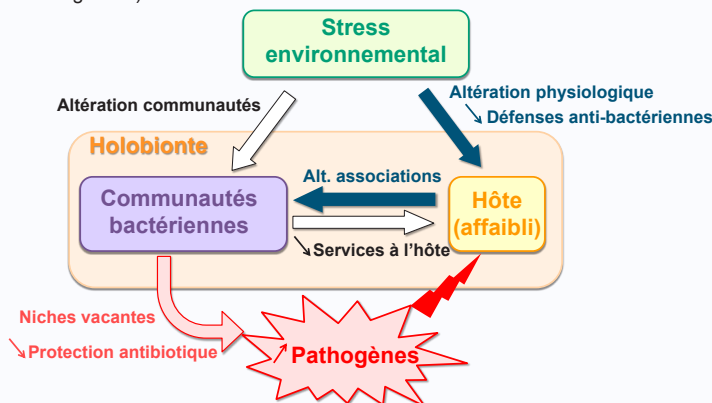
- Maladies liées aux températures anormalement élevées
- Implication d'une bactérie pathogène thermodépendante *Vibrio coralliilyticus*

Objectif

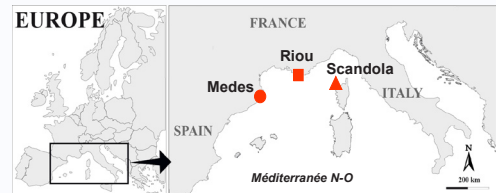
Estimer la diversité et l'abondance des communautés bactériennes associées.
Évaluer la contribution potentielle des bactéries à la santé de la gorgone.

Comment un stress peut-il mener à une infection ?

Holobionte : entité fonctionnelle regroupant un hôte et les communautés microbiennes qui lui sont associées (bactéries, archées, fungi, virus, microalgues...)



Méthodes d'analyses des communautés



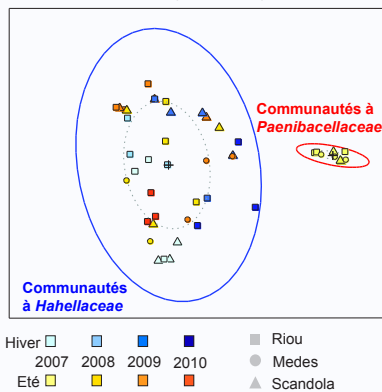
Echantillonnage saisonnier de fragments apicaux de colonies de *P. clavata* saines à 3 sites.

Analyses moléculaires basées sur l'ADNr 16S bactérien :

- T-RFLP : Comparaison de la diversité bactérienne entre échantillons
- Séquençage : Identification phylogénétique des bactéries dominantes

Principaux résultats

Représentation MDS des similarités entre échantillons basées sur la composition des profils T-RFLP



- 2 patrons de composition bactérienne distincts : "normal" et "été 2007".
- Présence de ribotypes bactériens fortement dominants : *Haellaceae* dans le patron "normal", *Paenibacellaceae* dans le patron "été 2007".
- Communautés associées différentes de l'eau de mer (non présente)

Conclusions

- ✓ Les communautés bactériennes associées à des populations distantes en Méditerranée NO sont similaires.
- ✓ La diversité bactérienne semble conservée au cours du temps.
- ✓ La composition bactérienne peut changer de manière brutale et transitoire.
- ✓ *Vibrio coralliilyticus* n'a pas été détecté dans les colonies de *P. clavata* saines.

Suggestion d'une association forte et spécifique entre *P. clavata* et ses bactéries.

Questions ouvertes...

- Quels facteurs peuvent mener à un changement de la composition des assemblages bactériens ?
- Les changements de diversité bactérienne sont-ils impliqués dans le déclenchement des maladies, et peuvent-ils être utilisés comme indicateur de l'état de santé des gorgones ?

Détente ► Mer

nice-matin
Dimanche 27 novembre 2011

À noter

Le dernier coup de mer vient de permettre aux archéologues d'Anao, l'aventure sous-marine (FMAS), de découvrir des pièces de toute beauté en rade de Villefranche.

Les rendez-vous

Le Salon nautique de Paris ouvre ses portes le week-end prochain. Il se déroule du 3 au 11 décembre, à la porte de Versailles. 1200 exposants et 1400 marques seront présents. Les professionnels de la région feront le déplacement. Nouveautés garanties.

À lire

Les éditions du Rocher sortent *Pirate des Abysses, l'enfant de la Grande Bleue*, de Pierre Frolla, le 1^{er} décembre. La préface du livre de ce jeune apnéiste monégasque est signée du prince Albert, qui partage avec l'auteur la passion de l'écologie.

Alerte, les gorgones meurent !

Et si les gorgones rouges et orange disparaissaient totalement de nos tombants sous-marins ? C'est un cri d'alarme que viennent de lancer des scientifiques du Centre d'océanologie de Marseille, qui ont constaté une importante mortalité de ces espèces au cap Gros, à Antibes.

En septembre dernier, alertée par des plongeurs antibois, la palanquée qui découvre le cimetière sous-marin dresse un constat alarmant. Par 25 mètres de fond, 70 % des gorgones rouges *paramuricea clavata* et oranges *eunicella cavolinii* sont atteintes d'un mal inconnu qui ronge les branches de ces animaux. Un premier bilan scientifique est effectué au fond, ainsi que des prélèvements.

De retour au laboratoire, la situation est prise très au sérieux, car les gorgones sont considérées comme des bio-indicateurs incontournables dans tous les océans.

Pour l'heure, pas de réponse à ce fléau mystérieux qui attaque leurs bras fleuris de polypes qui se nourrissent de plancton. Un changement de température de l'eau de mer, une pollution locale ou une attaque bactérienne ? Rien n'est écarté. « Des cas similaires de mortalité massive avaient été constatés de l'Espagne à l'Italie en 1999, 2003 et 2006 », précise Marie La Rivière, doctorante en océanographie, dont le projet est soutenu par la Fondation Total pour la biodiversité et la mer. « Nous cherchons les facteurs responsables de ces phénomènes afin de les protéger. »

Les gorgones sont les arbres d'une forêt. Elles abritent des centaines d'espèces très fragiles. Leur disparition serait une véritable catastrophe écologique pour nos fonds marins.

ÉRIC DULIÈRE
eduliere@nicematin.fr



Marie La Rivière effectue des prélèvements sur une gorgone malade. (Photos Olivier Bianchimani, Septentrion Environnement)



70 % des gorgones du cap Gros, à Antibes, sont atteintes d'un mal inconnu.

En bref

Exposition : « Quand les baleines marchaient »

C'est le titre de l'exposition organisée par le Centre de découverte du monde marin et la Ville de Villefranche, avec le soutien du Grec (Groupe de recherche sur les cétacés). Elle sera présentée du 3 décembre au 31 janvier à la chapelle Saint-Elme de Villefranche-sur-Mer.

Ce que l'on vous propose de découvrir, c'est l'incroyable évolution et adaptation des cétacés, de l'animal terrestre à quatre pattes à ceux que nous connaissons aujourd'hui. Pas de textes à lire mais des audioguides (versions adulte et enfant) qui vous conduiront de bulle en bulle pour vous raconter la formidable adaptation au monde marin d'ambulocétus, de pakicétus et de mésonyx.

Des maquettes en trois dimensions pour remonter à l'époque des dinosaures et comprendre pourquoi les hippopotames sont les cousins des baleines.

L'exposition sera ouverte du lundi au vendredi de 8 heures à 16 h 30. L'entrée sera gratuite. L'inauguration est prévue vendredi 2 décembre à 18 heures.

06. Remerciements et Références



06. Remerciements et Références

Nous remercions toutes les personnes et institutions impliquées dans ce projet, et qui ont pu faciliter sa réalisation par leur contribution scientifique, technique ou logistique.



Dr C. Tamburini, M. Garel, C. Mahé, M. Roumagnac (Assistante Ingénieur MAGIC₃), J. Paperou (Stagiaire), S. Bonato (Stagiaire)



Dr J. Garrabou, Dr C. Linares, Dr N. Teixido, Dr E. Cebrian, Dr S. Kipson, Dr C. Crisci



F. Zuberer, L. Vanboostal, B. de Ligondes



M. Fallet, Dr C. Schiff, L. Chasson, F. Baudimont



C. Rocher, C. Marschal



B. Durand



J.-M. Dominici



J. Escorihuela Mestre



O. Bianchimani

Références

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 (eds. Solomon SD, Qin M, Manning Z, et al.), 996pp. Cambridge University Press, Cambridge and New York.

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

Harley C. D. G., Hughes A. R., Hultgren K. et al., 2006. *The impacts of climate change in coastal marine systems*. Ecol. Lett., 9: 228-241.

de Madron X. D., Guieu C., Sempere R., et al. MerMex G., 2011. *Marine ecosystems' responses to climatic and anthropogenic forcings in the mediterranean*. Progr. Oceanogr., 91 (2): 97-166.

Lejeune C., Chevaldonne P., Pergent-Martini C., et al., 2010. *Climate change effects on a miniature ocean: The highly diverse, highly impacted mediterranean sea*. Trends Ecol. Evol., 25 (4): 250-260.

Crisci C., Bensoussan N., Romano J. C., 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 (9): e23814.

Cerrano C., Bavestrello G., Bianchi C. N., et al., 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.

Garrabou J., Coma R., Bensoussan N., et al., 2009. *Mass mortality in northwestern mediterranean rocky benthic communities: Effects of the 2003 heat wave*. Global Change Biol., 15 (5): 1090-1103.

Linares C., Coma R., Diaz D., et al., 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. Progr. Ser., 305: 127-137.

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

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.

Sokolow S., 2009. *Effects of a changing climate on the dynamics of coral infectious disease: A review of the evidence*. Dis. Aquat. Organ., 87 (1-2): 5-18.

Garren M., Azam F., 2012. *New directions in coral reef microbial ecology*. Environ. Microbiol., 14 (4): 833-44.

Rohwer F., Seguritan V., Azam F., Knowlton N., 2002. *Diversity and distribution of coral-associated bacteria*. Mar. Ecol. Progr. Ser., 243: 1-10.

Bourne D. G., Garren M., Work T. M., et al., 2009. *Microbial disease and the coral holobiont*. Trends Microbiol., 17 (12): 554-562.

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.

Galloway SB, Work TM, Bochsler VS, et al., 2007. *Coral Disease and Health Workshop: Coral Histopathology II*. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. 84pp.

Avec le soutien de

FONDATION
D'ENTREPRISE
TOTAL

