



**HAL**  
open science

**Médiateurs chimiques dans la symbiose  
Cnidaire-Dinoflagellés : caractérisation, distribution et  
réponse au stress**

Johana Revel

► **To cite this version:**

Johana Revel. Médiateurs chimiques dans la symbiose Cnidaire-Dinoflagellés : caractérisation, distribution et réponse au stress. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4108 . tel-01310668

**HAL Id: tel-01310668**

**<https://theses.hal.science/tel-01310668>**

Submitted on 3 May 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.

UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences  
Ecole Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliquées (SFA)

# T H E S E

pour obtenir le titre de

**Docteur en Sciences**  
de l'Université Nice Sophia Antipolis

Discipline : Sciences de l'Environnement

Présentée et soutenue par

***Johana REVEL***

## MEDIATEURS CHIMIQUES DANS LA SYMBIOSE CNIDAIRE- DINOFLAGELLES

caractérisation, distribution et réponse au stress

Thèse dirigée par le Dr. ***Cécile SABOURAULT***

soutenue le *04 décembre 2015*

### Jury :

<b>Mme Marie-Lise Bourguet-Kondracki</b>	Directrice de Recherche UMR 7245 CNRS/MNHN	Rapporteur
<b>Mme Sophie Tomasi</b>	Professeur Institut des Sciences Chimiques de Rennes 1	Rapporteur
<b>M. Michel Ponchet</b>	Chargé de Recherche INRA, Institut Sophia-Agrobiotech	Examineur
<b>M. Michel Salzet</b>	Professeur INSERM U1192, Université de Lille 1	Examineur
<b>M. Joël Fleurence</b>	Professeur EA 2160, Université de Nantes	Examineur
<b>Mme Laure Capron</b>	Maître de Conférences Institut de Chimie de Nice, UNS	Co-directrice de thèse
<b>Mme Cécile Sabourault</b>	Maître de Conférences UMR 7138 EPS, UNS	Directrice de thèse



### Médiateurs chimiques dans la symbiose Cnidaire-Dinoflagellés : caractérisation, distribution et réponse au stress

Le succès évolutif des Cnidaires symbiotiques réside en grande partie dans leurs échanges trophiques établis avec les Dinoflagellés du genre *Symbiodinium*. Cependant, le réchauffement climatique global ainsi que les pollutions ont un impact fort sur les écosystèmes coralliens, notamment en conduisant à la rupture de la symbiose, phénomène appelé blanchissement. La compréhension des mécanismes qui régissent l'établissement, le maintien et la rupture de la symbiose est essentielle à la prévention des épisodes de blanchissement massif. Dans ce contexte, les objectifs de mon projet de thèse sont de caractériser les médiateurs chimiques de l'anémone de mer *Anemonia viridis*, de les localiser, et d'analyser leur réponse face à un stress. Le modèle *A. viridis* présente l'avantage, contrairement aux coraux, de pouvoir travailler sur les tissus de l'hôte séparés (épiderme et gastroderme), et les cellules de *Symbiodinium*.

Une étude globale comparative a tout d'abord été réalisée en vue de caractériser et d'analyser la distribution des médiateurs chimiques de l'anémone symbiotique. Par cette approche, 96 composés ont été caractérisés. Il a été déterminé que le métabolome d'*A. viridis* contient une majorité de lipides, mais aussi des bêtaïnes et des neuropeptides. Leur distribution relative n'est pas uniforme entre les compartiments analysés. Parmi les composés caractérisés, les lipides de bêtaïne ne sont pas synthétisés par les animaux, mais ont pu être identifiés pour la première fois dans les tissus de l'hôte Cnidaire, démontrant un transfert de ces composés des symbiotes vers leur hôte. La diversité et l'abondance de lipides observés chez *A. viridis* a conduit à réaliser une étude par approche lipidomique. Ces travaux ont permis de caractériser 70 acides gras issus de lipides neutres et polaires de l'anémone dont la répartition est statistiquement différente selon le compartiment analysé. A partir de ces résultats, des hypothèses de transfert de lipides et d'acides gras entre hôte et symbiotes ont pu être formulées.

Dans un second temps, des anémones de mer ont été traitées en laboratoire par un stress thermique ou un stress chimique afin de provoquer la rupture de la symbiose et le blanchissement des individus. Une étude cinétique a été menée par une approche globale comparative identique à celle réalisée sur l'anémone symbiotique. Il a pu être déterminé que la plupart des composés présents dans l'anémone symbiotique sont absents de l'individu aposymbiotique, et certains galactolipides et lipides de bêtaïne ont été proposés comme marqueurs du blanchissement. Une cartographie de l'évolution de ces composés a été réalisée par MALDI-MSI à partir de coupes de tentacules, et a montré que l'évolution n'était pas linéaire. Des lipides de bêtaïne ont ainsi été proposés comme marqueurs précoces de stress. La réponse au stress a été évaluée par approche lipidomique, et a permis d'identifier trois indicateurs lipidiques de réponse précoce au stress, basés sur des marqueurs de fluidité membranaire.

L'ensemble de ces résultats apporte de nouveaux éléments de réponse concernant le rôle des médiateurs chimiques clés dans le maintien de la symbiose, ainsi que leur influence sur sa rupture.

## Abstract

---

### Chemical mediators in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis: characterization, distribution and stress response

The ecological success of cnidarian-dinoflagellate symbiosis mainly relies on nutrient recycling. Environmental changes, such as global warming or pollution, often result to symbiosis breakdown called cnidarian bleaching. The understanding of mechanisms regulating the symbiosis establishment, maintenance and breakdown is essential to prevent massive bleaching phenomena. In this respect, my PhD project focused on the characterization of chemical mediators in the sea anemone *Anemonia viridis*, their localization and their stress response. *A. viridis* was chosen as a model because, unlike corals, the host's tissues (epidermis and gastrodermis) and *Symbiodinium* cells can be easily separated.

A comparative study was first conducted to characterize the chemical mediators and analyze their distribution within the symbiotic sea anemone. Following this approach, 96 metabolites have been characterized. The *A. viridis* metabolome is mainly composed of lipids, but also betaines and neuropeptides. Their relative distribution is not uniform between analyzed tissues. Betaine lipids cannot be synthesized by animals, but have been identified for the first time in *A. viridis* host tissues, suggesting a transfer from symbionts to their host. Further investigations were performed to focus on abundance and diversity of *A. viridis* lipids using a lipidomic approach. We characterized 70 fatty acids from neutral or polar lipids, and found that they are statistically not uniformly distributed between the sea anemone tissues. From these results, we described possible transfers of FAs between the symbiotic partners.

A thermal stress and a chemical stress have also been applied in laboratory-controlled conditions in order to induce symbiosis breakdown and bleaching of the sea anemones, in order to correlate *A. viridis* metabolome to its symbiotic status. This study has been conducted with the same procedure as for the symbiotic sea anemone. Most of the predominant metabolites of the symbiotic sea anemone are absent from the aposymbiotic counterpart, leading us to propose some galactolipids and betaine lipids as bleaching indicators. A mapping of these metabolites has been performed by MALDI-MSI of tentacle cross-sections, as well as their evolution following stress, and highlighted a non-linear metabolite response. Some betaine lipids have thus been proposed as short-term indicators of stress. *A. viridis* stress response has also been evaluated with a lipidomic approach, and allowed to identify 3 lipid indicators of early stress response based on membrane fluidity markers.

Overall, this study provides insight on key chemical mediators that may regulate the symbiosis maintenance, and may contribute to the symbiosis breakdown.



## Remerciements

---

Si nous savons tous que la recherche est un travail d'équipe, j'ai appris au cours de ma thèse qu'il s'agissait plutôt d'un travail d'équipes, comme en témoigne l'ampleur de ces remerciements. J'espère n'oublier personne.

Je remercie le Pr. Paola Furla de m'avoir accueillie au sein de son équipe Symbiose Marine.

Je remercie ma directrice de thèse, le Dr. Cécile Sabourault et ma co-directrice de thèse, le Dr. Laure Capron, de m'avoir confié ce sujet de recherche passionnant. Merci de m'avoir accordé votre soutien tout au long de ces trois années de thèse.

Je suis très honorée que le Dr. Marie-Lise Bourguet-Kondracki et le Pr. Sophie Tomasi aient accepté d'être mes rapporteurs et de juger les travaux réalisés durant ces 3 années de thèse, je les en remercie particulièrement. Je remercie aussi le Dr. Michel Ponchet, le Pr. Joël Fleurence et le Pr. Michel Salzet d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit, qu'ils trouvent ici l'expression de ma considération.

J'adresse mes remerciements au Dr. Anne-Violette Lavoir, au Dr. Alain Brunelle, et à nouveau au Dr. Marie-Lise Bourguet-Kondracki d'avoir participé à mon comité de thèse et d'avoir jugé mon travail à mi-parcours. Cette expérience fut très enrichissante et m'a permis de gagner en confiance.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr. Lionel Massi et au Dr. Mohamed Mehiri (dans l'ordre de leur apparition dans ma petite vie étudiante) de leur accueil au sein de l'Institut de Chimie de Nice, de m'avoir formée, transmis leur savoir et leur rigueur scientifique, de m'avoir accordé de leur temps et de m'avoir si bien soutenu durant ces trois années.

Je remercie le Dr. Rachid Benhida ainsi que la directrice de l'institut, le Dr. Elisabet Duñach de m'avoir acceptée au sein de l'équipe Molécules Bioactives et de l'Institut de Chimie de Nice.

Merci au Dr. Patrick Mayzaud, émérite dans l'équipe Processus dans les Écosystèmes Pélagiques du Laboratoire Océanologique de Villefranche, pour vos conseils précieux, notamment en lipidomique marine et en biostatistiques, ainsi qu'à Marc Boutoute de m'avoir initiée aux techniques de laboratoire de base pendant mon stage de Master 2, et d'avoir toujours été présent pour répondre à mes interminables questions. J'en profite pour remercier le Dr. Carolina Giraldo et l'ensemble de l'équipe de la vieille forge du LOV pour leur accueil et leur gentillesse.

Je remercie le Dr. Maxence Wisztorski et Dounia Mouajjah du laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse de l'université de Lille ainsi que le directeur de l'équipe (et membre de mon jury) le Pr. Michel Salzet d'avoir réalisé les analyses MALDI-MSI très utiles au suivi de la réponse au stress. Je vous remercie de m'avoir accueillie ces quelques jours (d'hiver) au sein de votre laboratoire, et de m'avoir initiée à des techniques de pointe.

Merci au Pr. Serge Antonczak et au Dr. Julien Diharce de l'équipe Arômes, Parfums, Synthèse, Modélisation de l'ICN d'avoir pu modéliser la protéine Av-NPC2d et d'avoir initié des expériences de docking *in silico*. J'en profite pour remercier le Dr. Fabien Fontaine-Vive d'avoir pris le temps de m'initier à la modélisation 3D, et de m'avoir fait découvrir la puissance de certains logiciels.

Je remercie chaleureusement le Dr. Marc Gaysinski du temps qu'il a pu me consacrer pour m'expliquer les bases et me former en RMN, de sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci au Dr. Jean-Marie Guigonis d'avoir réalisé des analyses LC/MS haute résolution en un temps record, mais surtout merci de m'avoir formée à la technique d'imagerie par DESI-MS et d'avoir su gérer les multiples caprices de cet appareil.

J'adresse mes remerciements au Dr. Guillaume Sandoz ainsi qu'à son doctorant Yannick Comoglio pour m'avoir si gentiment accueillie dans leur laboratoire le temps de prélèvements d'œufs de xénope (on ne peut pas imaginer la quantité d'œufs extraits de leur si petit ventre !) et de tests de bioactivité sur les canaux TREK.

Je remercie le Dr. Jean-Roger Desmurs et la société CDP Innovation de m'avoir permis d'assister à une formation des plus intéressantes sur les interactions macromolécule-ligand. J'espère de tout cœur que vous pourrez très vite vous rétablir.

Je remercie Sarra Ghouma qui a effectué les premières extractions et purifications d'anémone lors de son stage de M2.

Un grand merci à Marine Valentin, stagiaire de 3<sup>ème</sup> année de génie biologique que j'ai eu l'honneur de former, et qui m'a impressionnée par ses capacités de compréhension, d'adaptation et de rédaction.

Merci ensuite, à l'UMR Evolution Paris Seine de l'UPMC, à son directeur le Pr. Dominique Higuët ainsi qu'à l'ensemble des membres de l'équipe, étudiants et permanents, pour leur accueil chaleureux chaque année aux JDD... et aux après JDD ! Ce fût une expérience très enrichissante que j'espère, vous allez poursuivre encore de nombreuses années.

Merci, à tous les membres du master SDUEE OEM de l'UPMC, mais aussi et surtout au Dr. Christophe Migon du LOV, qui à travers ses cours sur les cycles biogéochimiques entre atmosphère et océans (entre autres) a su m'attirer vers la chimie, car ce n'était pas gagné. Ce sont vos cours précisément qui m'ont poussée à remettre en question ma vision de la recherche et de comprendre la force de l'interdisciplinarité.

Je remercie le l'ensemble de l'équipe Symbiose Marine de m'avoir acceptée au sein de leur joyeuse équipe, malgré mes apparitions ponctuelles et souvent inopinées. C'était toujours un plaisir pour moi d'écouter vos conseils et vos commentaires. Je remercie Fabrice Priouzeau d'avoir réalisé les cultures de *Symbiodinium* avec tant de soin, Brigitte pour son efficacité et sa gentillesse, Richard pour ses conseils très avisés et ses histoires passionnantes, les doctorants Vincent, Cédric et Patricia pour quelques instants de partage (scientifiques, ou non), les permanents Stéphanie, Thamilla, Didier ainsi que Paola

pour la bonne humeur qu'ils font circuler au labo. A Pierre-Laurent aussi, que nous regrettons tous beaucoup. Il était un chercheur passionné, le bricoleur de l'équipe et sa curiosité à toute épreuve m'a inspiré tout au long de ma thèse, je lui en suis reconnaissante.

Merci à Vincent Dani, ce fut un réel plaisir de partager avec toi ces 3 années de thèse, sur un sujet si lié au mien et tellement différent à la fois. Nos discussions et notre entraide constantes m'ont permis de toujours voir plus loin que mon petit projet.

Et puis les copains chimistes, que de riches rencontres à l'ICN ! Les meilleurs sont au 4<sup>ème</sup> bien sûr, tout d'abord Irène l'italienne, qui m'a littéralement nourri les midis, qui m'a réconforté dans les moments de doute et de faiblesse, et qui réalise des œuvres d'art à partir de présentations ppt et poster ! Et puis Vincent, qui a réussi la prouesse de rallier les étudiants au travers de nombreux apéros, qui a une bonne humeur chronique et contagieuse, mais surtout : il est breton ! ; Pierrick, qui a beau être notre président, futur leader et qui est en plus allé aux States 2 fois (!!!) ne comprend toujours pas que oui, Archive est un groupe génial. Les copains qui ont donné de la vie à « mon » bureau autrefois tout vide, Pascal, parce qu'il faut bien un représentant Corse à grande gueule dans chaque unité, et que c'était un plaisir de partager le bureau d'en face ; Loïc, l'homme du labo, voisin de paillasse avec qui c'était si agréable de travailler, le seul non-thésard et pourtant le plus sérieux ; Najiba, je suis heureuse de t'avoir vu réussir et surmonter les difficultés, tu as beaucoup de mérite ; Sofia, ces quelques mois passés parmi nous ont été bien trop rapides, mais je n'oublierai pas ta gentillesse, ta simplicité et ta passion pour ton sujet de recherche (et le Jäger) ; Hélène « a voté ! » à double personnalité, bosseuse acharnée jusqu'à ce que l'on dise le mot clé « \*\*\*\*\* » ; et puis ma petite Estelle, certainement la personne la plus gentille et la plus humble que j'ai pu rencontrer. Je suis sûre que maintenant, vous savez tous dessiner un dinoflageollé ! Je n'oublierai pas Nathalie, merci d'avoir toujours répondu à mes incessantes questions et d'avoir pris le temps de m'expliquer les subtilités de la chimie analytique lorsque je commençais au labo et que tu rédigeais ton manuscrit.

Merci aussi à ceux des autres étages, à Claire qui a certainement la carrière la plus prometteuse d'entre nous, et qui le mérite amplement ; à Antoine, qui respire aussi bien que moi ; à Anthony, Mr 1<sup>er</sup> CNRS, qui nous a appris à tasser les poubelles ; à Mélo, je suis fière de soutenir le même jour que toi ; à Daniel et sa moitié Iza, car l'un ne va pas sans l'autre ; à Julien, on sait quand tu es là, même deux étages plus haut ! ; je citerai aussi JB, Florian, Eva et Marie-Aude, Coralie, Luisa et j'espère n'oublier personne. Bien sûr, je remercie l'ensemble des petits poneys de l'ICN pour leur soutien jour après jour.

Je n'oublierai pas les copains de longue date et chers amis, je ne les citerai pas ici, mais sachez que votre présence et votre soutien m'a aidé à avancer chaque jour. Je tiens quand même à remercier ma Coline, ma meilleure copine, qui a une place si chère et unique dans ma petite existence ; Leslie et mes petits Râ, je suis désolée de n'avoir pu vous voir plus souvent, et Gros Louis, un énorme MERCI pour ces schémas de cnidaire que tu as fait, et que je présente fièrement dans ce manuscrit !



Merci enfin, à ma famille, dont je suis terriblement fière, et qui tient une place si importante dans ma vie. Merci tout d'abord à mes parents, qui m'ont toujours soutenue, aimée, protégée et poussé à faire les choses, et pas seulement à les rêver. Merci à mes frères ensuite, de s'être intéressés autant qu'ils le pouvaient à mon sujet de thèse. Merci John d'être mon opposé, de me soutenir malgré tout, même si tu ne comprend pas mes choix et merci Angélique d'être là tout simplement. Je garde une place importante pour mes grands-parents, qui n'ont jamais très bien compris ce que je faisais ni pourquoi je le faisais, mais que j'aime profondément. Vous avez toujours été là si proches si aimants si réconfortants. J'ai les meilleurs grands parents que l'on puisse avoir. Mon papi, en ces temps difficiles je te dédicace ce manuscrit.

Mon dernier merci, et le plus grand, ira à mon chéri, qui est je crois au moins aussi heureux que moi que je rende enfin ce manuscrit ! Merci d'être resté, de m'avoir supportée, nourrie, réveillée (ou du moins essayé), et d'avoir veillé avec moi.

# Table des matières

---

<b>RESUME</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PRESENTATION DU MODELE</b>	<b>18</b>
<b>I. La symbiose : un moteur de l'évolution</b>	<b>20</b>
1. Définition de la symbiose, évolution dans la perception de la symbiose	20
2. Une symbiose, des symbioses	21
3. Les avantages apportés par une vie en symbiose mutualiste	23
<b>II. La symbiose Cnidaire-Dinoflagellés</b>	<b>25</b>
1. Importance des Cnidaires dans l'écosystème marin	25
2. Taxonomie et anatomie des Cnidaires	26
3. Les Dinoflagellés et le genre Symbiodinium	30
4. La relation symbiotique entre Cnidaire et Dinoflagellés	32
<b>III. La métabolomique pour l'étude des relations symbiotiques</b>	<b>42</b>
1. Introduction à la métabolomique	42
2. Les métabolites spécifiques chez les Cnidaires	47
3. La communication moléculaire entre Cnidaires et Dinoflagellés	52
<b>IV. Contexte de l'étude</b>	<b>57</b>
1. L'équipe SYMAR et son modèle d'étude	57
2. Etudes préliminaires	59
3. Description et objectifs du projet de thèse	60

<b>CHAPITRE 2 : CARACTERISATION ET DISTRIBUTION DES MEDIATEURS CHIMIQUES CHEZ <i>A. VIRIDIS</i></b> -----	<b>63</b>
<b>I. Introduction</b> -----	<b>65</b>
<b>II. Problématique scientifique et contexte de l'étude</b> -----	<b>66</b>
<b>III. Comparaison des profils métabolomiques d'<i>A. viridis</i></b> -----	<b>68</b>
1. Empreinte métabolomique sur l'individu entier -----	69
2. Analyse par compartiment cellulaire -----	70
3. Empreintes métabolomiques de <i>Symbiodinium</i> spp. symbiotiques et de culture -----	71
<b>IV. Identification des métabolites présents chez <i>A. viridis</i></b> -----	<b>73</b>
1. Fraction F <sub>1</sub> : bétaines -----	75
2. Fraction F <sub>1</sub> ' : peptides et pseudopeptides -----	81
3. Fraction F <sub>2</sub> : lipides membranaires -----	89
4. Fraction F <sub>3</sub> : stérols et cérides -----	108
<b>V. Caractérisation du lipidome d'<i>A. viridis</i></b> -----	<b>118</b>
1. Lipides totaux -----	119
2. Répartition en classes de lipides -----	119
3. Distribution des acides gras issus des lipides de réserve et de structure -----	120
4. Distribution des stérols -----	128
5. Discussion -----	129
<b>VI. Conclusions et perspectives</b> -----	<b>134</b>
<b>CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA REPONSE AU STRESS CHEZ <i>A. VIRIDIS</i></b> -----	<b>136</b>
<b>I. Introduction</b> -----	<b>137</b>
<b>II. Problématique scientifique et contexte de l'étude</b> -----	<b>139</b>
1. Un stress thermique, un stress chimique -----	140
2. Evaluation de la réponse au stress -----	142
<b>III. Modifications du métabolome d'<i>A. viridis</i> en réponse à un stress</b> -----	<b>144</b>
3. Densité relative de symbiotes -----	145
4. Comparaison des empreintes chimiques -----	146

5.	Individu entier (stress chimique)	149
<b>IV.</b>	<b>Localisation des composés par MALDI-MSI</b>	<b>156</b>
1.	Localisation de médiateurs chimiques par MALDI-MSI	157
2.	Suivi de la réponse au stress par MALDI-MSI	160
<b>V.</b>	<b>Modifications du lipidome d'<i>A. viridis</i> en réponse à un stress</b>	<b>168</b>
1.	Contexte de l'étude	168
2.	Densité en Symbiodinium	169
3.	Indicateurs lipidiques de stress	170
4.	Discussion générale	173
<b>VI.</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>175</b>
	<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b>	<b>178</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>184</b>
	<b>DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE</b>	<b>213</b>
<b>I.</b>	<b>Instruments et matériel biologique</b>	<b>214</b>
1.	Instruments	214
2.	Matériel biologique	215
<b>II.</b>	<b>Etude métabolomique globale</b>	<b>218</b>
1.	Extraction et fractionnement des métabolites	218
2.	Acquisition des empreintes chimiques	219
3.	Isolement et caractérisation des métabolites	221
<b>III.</b>	<b>Etude lipidomique</b>	<b>225</b>
1.	Extraction et séparation des composés	225
2.	Analyse des composés	226
3.	Analyses statistiques	228
<b>IV.</b>	<b>Induction d'un stress</b>	<b>230</b>
1.	Stress thermique et chimique	230
2.	Stress thermique ajusté pour l'étude lipidomique	231
3.	Quantification de la densité en symbiotes	232

4. Inclusion et coupe des tentacules -----	232
<b>ANNEXES-----</b>	<b>233</b>
<b>Annexe 1 : extraits bruts organiques d'<i>A. viridis</i>-----</b>	<b>235</b>
<b>Annexe 2 : extraits bruts organiques de <i>Symbiodinium</i> en culture -----</b>	<b>236</b>
<b>Annexe 3 : spectres RMN (1D, 2D) Du composé 1-----</b>	<b>237</b>
<b>Annexe 4 : spectres RMN (1D, 2D) Du composé 2-----</b>	<b>243</b>
<b>Annexe 5 : Spectres RMN (1D, 2D) Du composé 3-----</b>	<b>248</b>
<b>Annexe 6 : évolution des empreintes chimiques au cours d'un stress -----</b>	<b>253</b>
<b>Annexe 7 : acides gras au cours d'un stress thermique-----</b>	<b>258</b>
<b>Annexe 8 : publication n°1-----</b>	<b>263</b>
<b>Annexe 9 : publication n°2-----</b>	<b>271</b>
<b>Annexe 10 : publication n°3-----</b>	<b>301</b>

## Liste des abréviations

---

AG : Acide Gras

CAEP : Céramide Aminoéthylphosphonate

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CS : *Symbiodinium* en Culture

DEDL : Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière

DGCC : DiacylGlycérylCarboxyhydroxyméthylCholine

Epi : Epiderme

ESI : Ionisation par ElectroSpray

FIS : *Symbiodinium* fraîchement isolés

Gas : Gastroderme

HRF : libération de facteurs de l'hôte (Host Release Factor)

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

LBs : gouttelettes lipidiques (Lipid Bodies)

LC : Chromatographie en phase Liquide

MAA : acides aminés ressemblant à des mycosporines (Mycosporine like Amino Acids)

MALDI : désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization)

MAMP : motifs moléculaires associés aux microorganismes (Microbe-Associated Molecular Pattern)

MS : Spectrométrie de Masse

MS/MS : Spectrométrie de Masse en tandem

NPC : Niemann-Pick de type C

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PRR : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor)

RE : Réticulum Endoplasmique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

SEM : erreur standard de la moyenne (Standard Error of Mean)

SPE : Extraction en Phase Solide

UV : ultraviolets

## **Introduction générale**

---

Les symbioses marines entre Cnidaires (anémones de mer, coraux, gorgones) et Dinoflagellés du genre *Symbiodinium* ont un rôle écologique majeur : ils sont la base de la formation des récifs coralliens, qui abritent plus de 30 % de la biodiversité marine. Les écosystèmes coralliens sont également une source économique indispensable essentielle au développement d'activités humaines telles que la pêche et le tourisme. La biodiversité de ces écosystèmes en fait un réservoir de molécules bioactives exploitées pour la santé humaine. Le succès évolutif des Cnidaires symbiotiques réside en grande partie dans les **échanges trophiques** établis avec leurs symbiotes Dinoflagellés. Ces derniers transfèrent une partie de leurs photosynthétats vers les cellules du gastroderme de l'hôte Cnidaire. Celui-ci acquiert de nouvelles capacités métaboliques et devient en partie **autotrophe**, sans renoncer toutefois à l'**hétérotrophie**. Les Dinoflagellés peuvent exporter jusqu'à 90% du carbone fixé lors de la photosynthèse vers leur hôte, sous forme de glycérol, lipides, acides aminés ou glucose. En échange, l'hôte absorbe et transfère à ses symbiotes les nutriments nécessaires à la photosynthèse : carbone inorganique principalement, mais aussi azote, phosphore et sulfate.

Paradoxalement, bien que très intime, la relation entre l'hôte Cnidaire et ses symbiotes Dinoflagellés n'en est pas moins fragile : des conditions environnementales défavorables (réchauffement global, pollution, acidification des océans ou augmentation des rayonnements UV), peuvent être à l'origine d'une **rupture de la symbiose**. Cette rupture peut être transitoire ou définitive, et donne lieu au phénomène appelé "blanchissement". La perte des symbiotes peut conduire à terme à la mort de l'hôte Cnidaire. Depuis la révolution industrielle, les perturbations d'origine anthropique conduisent régulièrement à des phénomènes de blanchissement de grande ampleur visibles dans toutes les mers et océans. L'étendue du phénomène en fait une catastrophe écologique majeure aux conséquences socio-économiques lourdes. Si de nombreuses études recensent des phénomènes de blanchissement et/ou de mortalité massive, peu de travaux portent sur la recherche de **médiateurs chimiques** potentiellement responsables du maintien de la symbiose ou de sa rupture en réponse à un stress.

Les objectifs de ce projet de thèse ont été i) d'établir l'**empreinte métabolomique** d'un cnidaire symbiotique, afin de caractériser les médiateurs chimiques ainsi que leur distribution entre les partenaires de la symbiose ([Chapitre 2](#)), et ii) de suivre les modifications du métabolome lors d'une cinétique de blanchissement afin d'étudier la **réponse au stress** au niveau métabolomique, ainsi que les étapes précoces de rupture de la symbiose ([Chapitre 3](#)). L'approche métabolomique a été basée sur une méthodologie de chimie extractive par extraction/séparation/purification de composés, et leur caractérisation par différentes techniques de spectrométrie de masse et/ou de

résonnance magnétique nucléaire. L'étude de la réponse au stress a été réalisée selon la même méthodologie, par comparaison des empreintes chimiques d'individus symbiotiques et d'individus blanchis, et a permis de déterminer l'impact de la rupture de la symbiose au niveau moléculaire. Un suivi des médiateurs chimiques d'intérêt a été réalisé au cours de la cinétique de blanchissement par des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse, par cartographie sur des coupes de tissu. Ce projet pluridisciplinaire a bénéficié des compétences, de la complémentarité et des infrastructures des équipes suivantes : l'équipe Symbiose Marine (UMR 7138), l'équipe Molécules Bioactives de l'Institut de Chimie de Nice (ICN, UMR 7272), la plateforme de chimie analytique de l'ICN et le Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (INSERM U 1192, Université Lille 1).

La démarche scientifique mise en œuvre pour ce projet est basée sur l'organisme modèle de l'équipe Symbiose Marine : l'anémone de mer de Méditerranée *Anemonia viridis* (Figure 1a). Le choix de ce Cnidaire symbiotique comme modèle d'étude repose sur des avantages déterminants pour la mise en œuvre de ce projet. En effet, les individus peuvent être maintenus en aquarium, il est possible d'obtenir des organismes blanchis artificiellement (maintenus dans des aquariums à l'obscurité, Figure 1b), mais aussi de séparer les tissus de l'animal (l'épiderme et le gastroderme) et des symbiotes. Des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées ont pu être mises en culture.

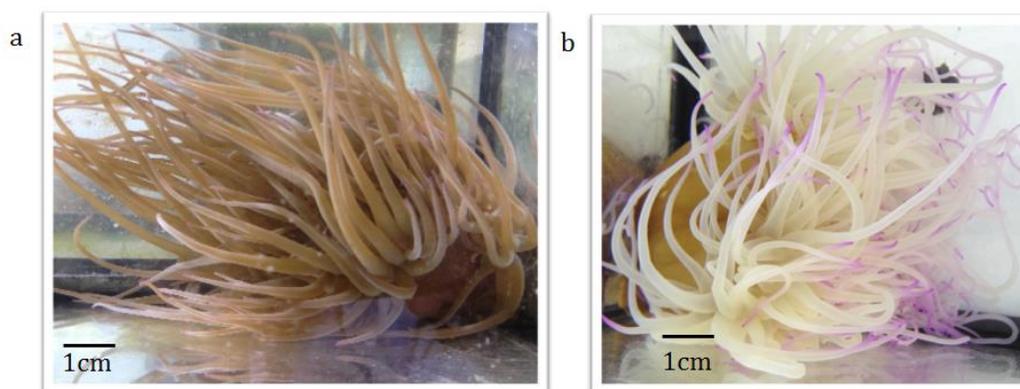


Figure 1 Photographies d'anémones de mer *A. viridis* maintenues au laboratoire de l'équipe Symbiose Marine. a : anémone symbiotique ; b : anémone blanchie.

La stratégie du projet est donc basée sur une étude comparative d'anémones maintenues en conditions standard, en conditions de stress ainsi que d'organismes blanchis.

La caractérisation des médiateurs chimiques chez un Cnidaire symbiotique, *A. viridis*, ainsi que leur localisation et la réponse observée en réponse à un stress ont permis de mieux appréhender les mécanismes moléculaires nécessaires au maintien de la symbiose, mais aussi leur évolution lors d'un stress menant à sa rupture.

# **Chapitre 1 : contexte scientifique et présentation du modèle**

---



# I. La symbiose : un moteur de l'évolution

## 1. Définition de la symbiose, évolution dans la perception de la symbiose

L'association symbiotique entre espèces est reconnue et très bien documentée dans le monde vivant. Jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, seules les interactions entraînant des dysfonctionnements d'un système biologique étaient remarquées. Ces interactions néfastes entre espèces étaient considérées comme du parasitisme ; le microorganisme ou « microbe » porte encore aujourd'hui une connotation négative. La reconnaissance de l'existence de relations non forcément négatives entre espèces différentes a été faite par le botaniste allemand Anton DeBary, lors de ses travaux sur les lichens. Il définit alors la symbiose comme « *l'association permanente entre plusieurs organismes d'espèces distinctes, au moins pendant une partie de leur cycle de vie* » (DeBary, 1866). L'utilisation du terme symbiose (ou plus précisément, *symbiotismus*) en biologie fut introduite par Albert Frank, pour décrire l'association entre des champignons et des racines végétales (Frank, 1876). Dans les années qui suivirent la découverte de ces notions, la perception de la symbiose a très vite évolué vers le « vivre ensemble » (*e.g* Perru 2006, parmi de nombreux ouvrages consacrés à l'histoire de la perception de la symbiose).

La notion d'endosymbiose a ensuite été initiée par le français Paul Portier en 1918, qui propose que la mitochondrie, initialement découverte en 1890 (Altmann 1890), serait d'origine bactérienne (Portier, 1918). Par la suite, la microbiologiste américaine Lynn Margulis a présenté la théorie endosymbiotique (Margulis 1967), basée sur l'hypothèse que la cellule eucaryote actuelle est le résultat d'une succession d'associations symbiotiques avec des organismes procaryotes, devenus au fil de l'évolution des organites. Cette théorie est universellement acceptée depuis la découverte des origines différentes de l'ADN chloroplastique et mitochondrial, par rapport à l'ADN du noyau eucaryote. Pourtant, dès 1883, la théorie sur l'origine microbienne des chloroplastes fut déjà formulée (Schimper 1883), mais les technologies disponibles à cette époque ne suffirent pas à valider cette hypothèse. La mitochondrie était à l'origine une alpha-protéobactérie phagocytée par la cellule eucaryote (Wallin 1923), dont la preuve formelle est apportée en 1981 (Anderson et al. 1981). Les chloroplastes proviennent eux d'une phagocytose de cyanobactéries (Stocking et Gifford 1959) apparue il y a 1,5 milliard d'années, dont l'ADN a été découvert en 1967 chez l'algue brune *Egregia menziesii* (Bisalputra & Bisalputra 1967).

La cellule eucaryote ainsi munie de ses organites additionnels a pu acquérir de nouvelles fonctions dont le rôle fut primordial dans l'évolution. Ces transformations ont permis la production d'énergie dans la cellule par la synthèse d'ATP dans les mitochondries, ainsi que la photosynthèse par les chloroplastes à l'origine de la concentration de dioxygène dans l'atmosphère. Elles ont été le moteur de véritables bonds dans l'évolution de la biodiversité et sont encore aujourd'hui largement étudiées (Chu et al. 2004). D'une certaine manière tous les eucaryotes sont donc symbiotiques, mais plus généralement, les associations symbiotiques inter-espèces sont très répandues et représentées dans tous les phyla du monde vivant.

La symbiose, phénomène décrit comme presque marginal jusqu'au XX<sup>ème</sup> siècle, est aujourd'hui considérée comme ayant un rôle clé dans l'évolution du monde vivant.

## 2. Une symbiose, des symbioses

La notion de symbiose d'un point de vue anglo-saxon est donc un terme global définissant l'interaction entre deux ou plusieurs espèces, pour lequel un certain nombre de spécificités ont été décrites, permettant d'identifier les particularités propres à chaque symbiose. En général, une symbiose est mise en place entre un individu, appelé **hôte**, et un autre relativement plus petit, appelé **symbiote**. Le type de symbiose est défini en fonction de l'apport de la symbiose pour l'hôte (Tableau 1) : on parle alors de symbiose mutualiste lorsque la « **fitness** » (valeur sélective définie par la fertilité et la longévité d'un individu) de l'hôte est augmentée par la présence du symbiote. Le cas du lichen résulte par exemple de l'association entre champignon (mycobionte) et cyanobactérie.

Tableau 1 Les différentes interactions possibles entre deux espèces

		Partenaire B		
		+	0	-
Partenaire A	+	Mutualisme	Commensalisme	Parasitisme
	0		Neutralisme	Amensalisme
	-			Compétition

+ : effet positif    0 : effet neutre    - : effet négatif

Au contraire, la symbiose est de type parasite, voire pathogène lorsque la « fitness » de l'hôte est altérée par l'état symbiotique. Le parasite *Plasmodium falciparum*, appartenant à l'embranchement des Apicomplexes (un groupe frère des Dinoflagellés), est par exemple responsable de la malaria. Le commensalisme vient du latin *com mensa*, et signifie « partager la table », il est défini dans le cas où

aucun bénéfice ni aucun effet néfaste n'est observé pour l'hôte (par exemple, la levure *Candida albicans* vit dans les muqueuses de l'Homme sans interférer sur la digestion ou les systèmes de défense de l'hôte).

Ces types de symbioses ne sont pas figés, un symbiote mutualiste peut par exemple devenir parasite. L'association symbiotique est donc régie par un état en constante évolution qui va du **mutualisme** au **parasitisme**, et qui est régulé en fonction de paramètres environnementaux et/ou génétiques (Figure 2 ; Thrall et al. 2007).

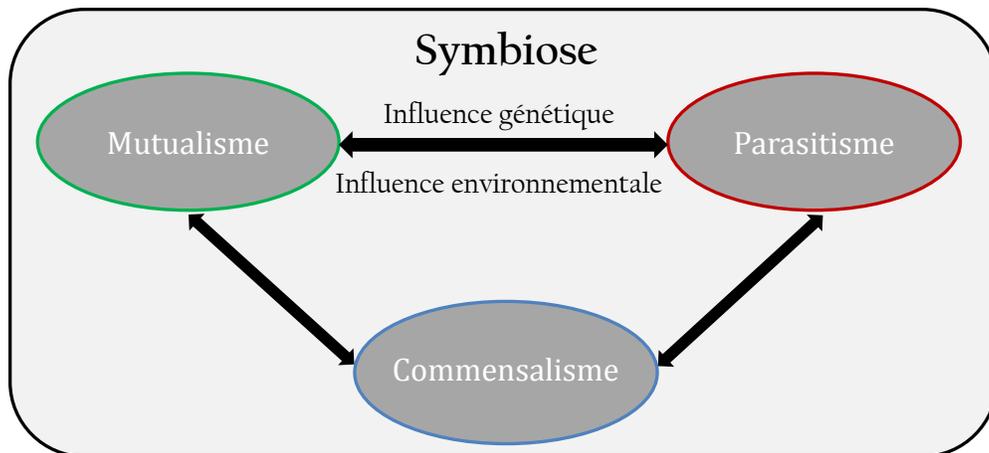


Figure 2 Schéma représentatif de l'évolution de l'association symbiotique

Il existe différents niveaux de symbiose : l'ectosymbiose, lorsque le symbiote loge à l'extérieur des tissus de l'hôte, et l'endosymbiose, extracellulaire ou intracellulaire, aussi appelée endocytobiose. Un exemple d'ectosymbiose très connu est l'association entre l'arbre *Acacia cornigera* et les fourmis mutualistes *Pseudomyrmex ferruginea*, qui protègent leur hôte contre les envahisseurs et herbivores.

La notion de symbiose est souvent restreinte à l'interaction entre deux espèces, mais souvent, un organisme hôte abrite un grand nombre de symbiotes appartenant à des groupes taxonomiques différents. C'est notamment le cas des éponges marines ou des Cnidaires, dont la diversité en symbiotes d'origine bactérienne, cyanobactérienne ou fongique n'est pas totalement élucidée (Starcevic et al. 2008 ; Webster et al. 2010 ; Kaluzhnaya et al. 2011 ; Di Camillo et al. 2012). De manière générale, le super-organisme issu de la symbiose entre deux ou plusieurs espèces est appelé **holobionte**.

### 3. Les avantages apportés par une vie en symbiose mutualiste

Toute symbiose est basée sur des échanges, qui offrent un certain nombre de bénéfices à l'un des participants au moins. Les interactions biologiques à bénéfices réciproques ont requis une attention particulière ces dernières décennies. Ces avantages sont très souvent de nature trophique, mais il peut s'agir de protection physique, ou d'avantages reproductifs. Dans un contexte d'échanges moléculaires, ne seront cités ici que certains bénéfices liés à des apports métaboliques.

L'apport de nutriments est très souvent à la base d'une association symbiotique. La symbiose mycorhizienne représente un exemple de régulation trophique très étudiée. Pour pallier les carences en phosphore et azote présents dans les sols, 90% des plantes sont associées à des champignons au niveau de leurs racines, appelées mycorhizes. La plante autotrophe apporte des nutriments carbonés (sucres, lipides) aux symbiotes, qui, en retour, métabolisent phosphore et azote inorganiques et en transfèrent une large partie de ces métabolites à leur hôte (en revue dans Bonfante et Genre 2010). La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est un autre exemple d'adaptation trophique chez les plantes de la famille des Fabacées, capables de fixer l'azote cette fois-ci en formant des nodosités hébergeant des bactéries du genre *Rhizobium*. Les symbioses chimiosynthétiques (capables de synthétiser de la matière organique à partir de composés minéraux ou organiques) sont très répandues dans les milieux extrêmes, tels que les cheminées hydrothermales. En effet, l'absence de lumière dans ces écosystèmes ne permet pas la photosynthèse, et pousse des invertébrés marins à des adaptations chimiosymbiotiques. De nombreux organismes symbiotiques de bactéries chimiosynthétiques ont ainsi été recensés, tels que porifères, nématodes, mollusques, arthropodes, annélides et échinodermes (en revue dans Stewart et al. 2005). Le ver vestimentifère *Riftia pachyptila* par exemple, vit en symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes capables de synthétiser des nutriments à partir de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S, de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub>.

Certains symbiotes peuvent aussi offrir une protection physique à leur hôte, nous pouvons par exemple citer le cas entre insectes et bactéries : de grandes quantités de tyrosine et phénylalanine sont nécessaires à la production de dihydroxyphénylalanine (DOPA), une molécule essentielle à la formation de la cuticule chez les insectes. Ces acides aminés sont par exemple secrétés par des bactéries du genre *Sodalis*, endosymbiotes de charençons (Wicker et al. 1985) ; il a été démontré que les individus aposymbiotiques possédaient une cuticule très fine comparée à leurs homologues symbiotiques. Lorsque les bénéfices dépassent la demande de l'hôte, les insectes sont même capables de recycler leurs endosymbiotes (Vigneron et al. 2014).

Ces exemples illustrent les bénéfices liés à l'interaction symbiotique. Dans certains cas, l'intimité entre les partenaires est telle qu'elle engage une forte dépendance, le plus souvent par la perte de fonctions assurées par le partenaire. Mais cette dépendance engage une irréversibilité qui peut être facilement schématisée (Figure 3, adaptée de Selosse et al. 2014).

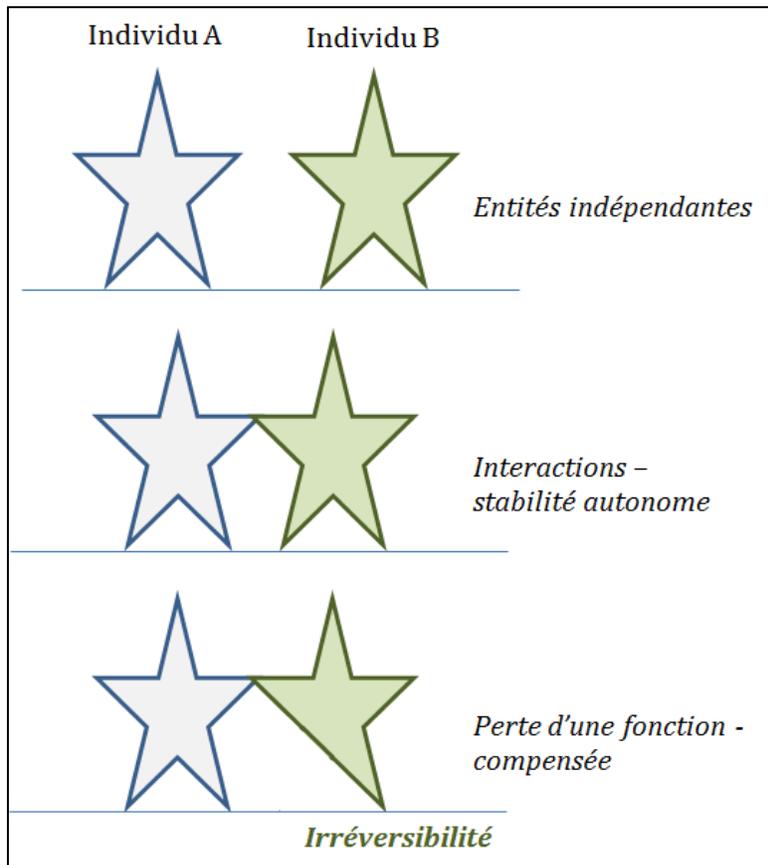


Figure 3 Schéma de l'évolution possible entre entités indépendantes vers des systèmes symbiotiques où la perte d'une fonction favorise l'interdépendance et l'irréversibilité (modifié d'après Selosse et al. 2014).

## II. La symbiose Cnidaire-Dinoflagellés

### 1. Importance des Cnidaire dans l'écosystème marin

Les Cnidaire symbiotiques sont très représentés par les coraux constructeurs de récifs, ayant colonisé les fonds marins peu profonds, tropicaux et oligotrophes. Ces structures bioconstruites sont la fondation de l'écosystème récifal. Les récifs coralliens sont présents sur seulement 0,1% de la surface de la planète, et pourtant abritent plus d'un tiers de la faune marine connue à ce jour (Hoegh-Guldberg 1999 ; Porter et Tougas. 2001, Figure 4).

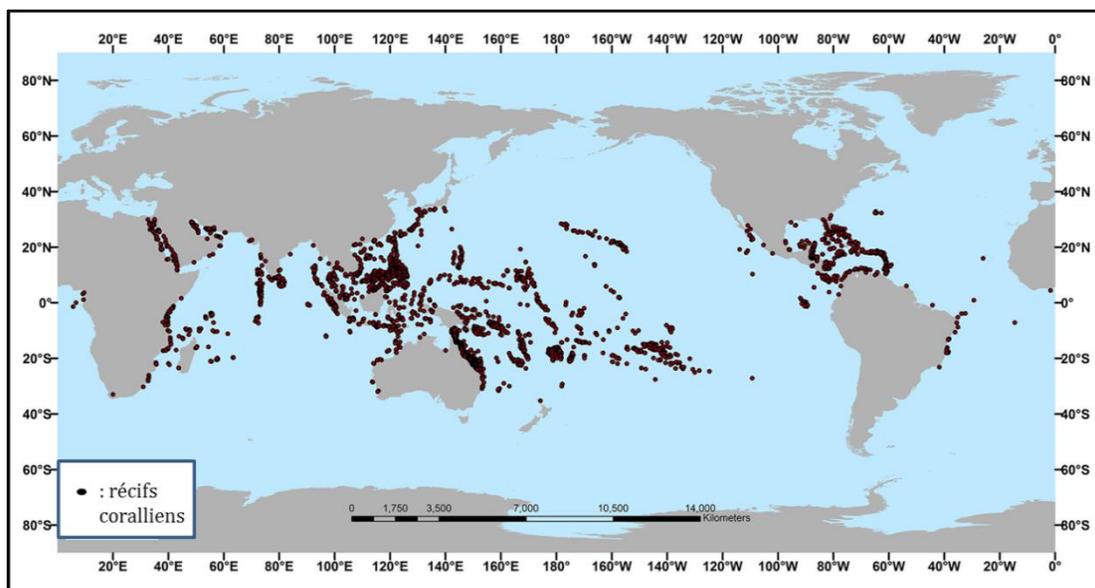


Figure 4 Répartition mondiale des récifs coralliens. D'après National Oceanic and Atmospheric Administration (<http://oceanservice.noaa.gov>)

Ils abritent quelques 2000 espèces de poissons et 5000 espèces de mollusques (Reaka-Kudla 1997), pour lesquels ils forment une nurserie idéale, et apportent par la pêche une nourriture indispensable aux populations locales. En effet, la survie de près de 30 millions de personnes dans plus de 100 pays dépend directement de la pêche locale apportée par les récifs (Wilkinson 2008). Formés près des côtes, ils constituent une barrière naturelle protégeant les littoraux contre l'érosion par la houle, les tempêtes et les tsunamis. Ils offrent également un patrimoine culturel aux populations locales qui profitent ainsi d'une économie touristique conséquente. La valeur économique des récifs coralliens a d'ailleurs été estimée à 0,1-0,6 millions de dollars par kilomètre carré et par an (Hoegh-Guldberg et al. 2007), ressource absolument indispensable dans un grand

nombre de régions. Enfin, ils sont une source de nouvelles molécules bioactives pour une application dans le domaine thérapeutique, dont on peut citer les molécules antitumorales (Rocha et al. 2011).

L'ensemble des apports écologiques et surtout économiques des récifs coralliens est considérable, mais les stress provoqués par une pression anthropique toujours plus forte démontrent aujourd'hui leur fragilité, dont les conséquences sont déjà visibles.

## 2. Taxonomie et anatomie des Cnidaires

L'embranchement des Cnidaires regroupe des organismes aquatiques et essentiellement marins. Il existe cependant quelques Cnidaires dits d'eau douce, appartenant au genre *Hydra*. Leur apparition date de l'ère Précambrienne, il y a 700 millions d'années, et compte aujourd'hui plus de 10 000 espèces répertoriées (Daly et al. 2007, Zhang et al. 2011). Les Cnidaires possèdent une symétrie externe radiaire. Leur corps appelé colonne recouvre la cavité coelentérique ou cavité gastrovasculaire, contient les organes reproducteurs et se termine par une bouche servant à la fois à l'ingestion et à l'excrétion, entourée de tentacules (Figure 5).

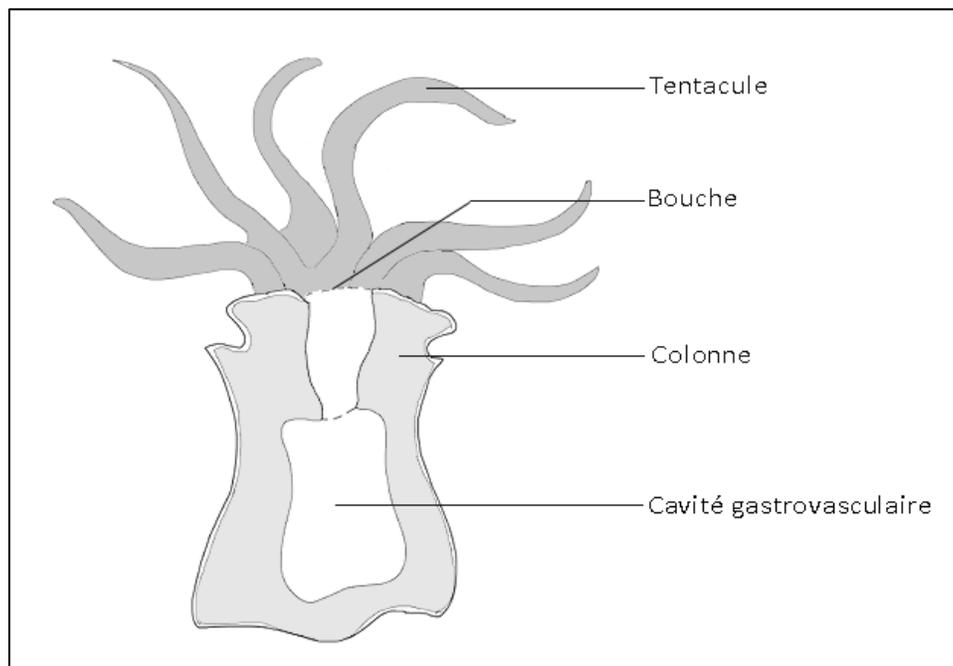


Figure 5 Anatomie générale d'un polype de Cnidaire.

Les Cnidaires présentent deux morphotypes : la forme méduse, libre dans la colonne d'eau, et la forme polype, fixée au substrat. La taxonomie des Cnidaires est complexe et de nombreux

remaniements de leur phylogénie ont régulièrement lieu, que ce soit au niveau de la classe ou au niveau de l'espèce et du genre (Zapata et al. 2015). En effet, certains ouvrages divisent l'embranchement des Cnidaires en deux classes, les Anthozoaires qui ont un stade adulte fixé et médusoaires pélagiques, d'autres proposent une division en 4, ou 5 classes (cette dernière division sera adoptée ici). De plus, une même espèce peut présenter plusieurs morphes, ce qui a souvent conduit à nommer plusieurs fois la même espèce.

La Figure 6 présente une phylogénie simplifiée de l'embranchement des Cnidaires (d'après Daly et al. 2007), qui regroupe 5 classes : celle des Anthozoaires, présents sous le morphotype polype au stade fixé (coraux et anémones de mer), les classes des Scyphozoaires et Cubozoaires, présentant une forme méduse permanente (méduses), les Hydrozoaires, qui alternent les deux morphotypes (hydres) et les Staurozoaires, méduses fixées à l'état adulte.

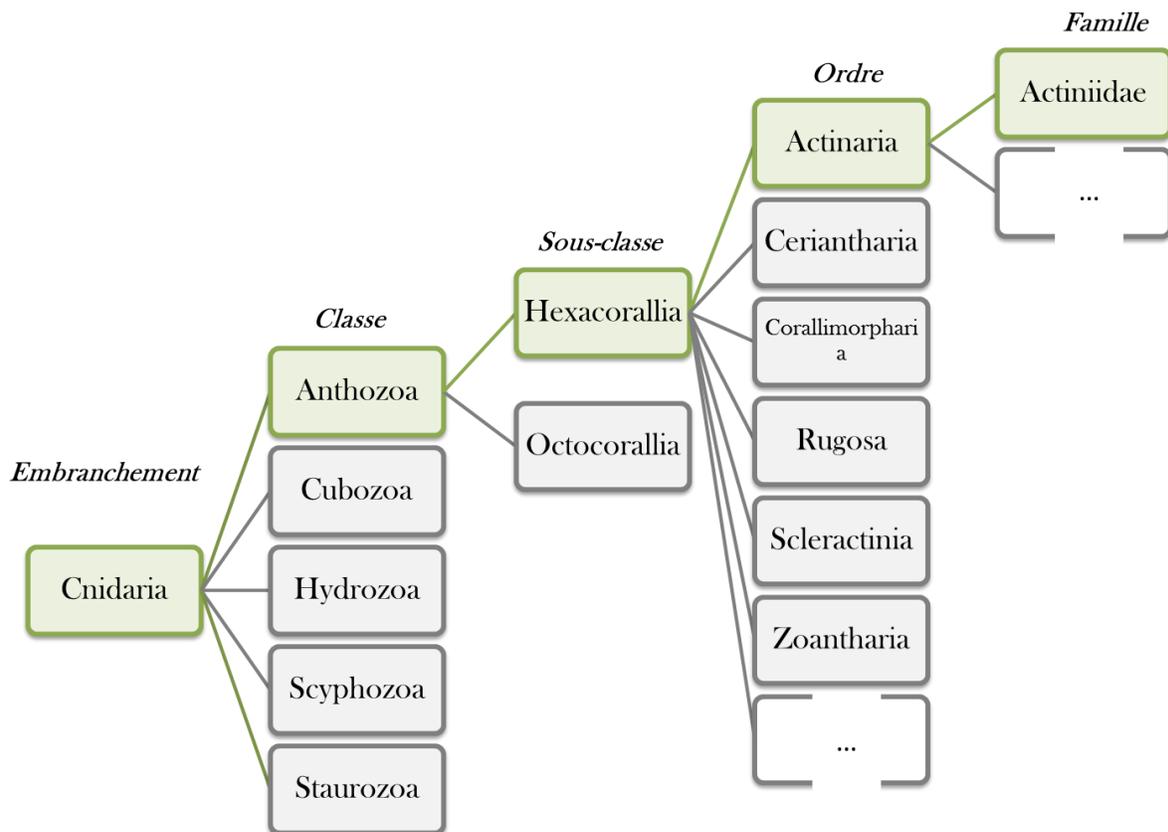


Figure 6 Phylogénie simplifiée des Cnidaires. D'après Daly et al. 2007 et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>. En vert est indiquée la phylogénie de l'espèce étudiée.

La classe des Anthozoaires est caractérisée par un stade larvaire libre et cilié, et un stade polype (adulte) sexué. Au stade adulte, les polypes sont solitaires (anémones de mer) ou coloniaux (gorgones et la plupart des coraux), à sécrétion calcaire ou non (organismes « mous »).

Les Cnidaires sont des organismes diploblastiques, c'est-à-dire composés de deux couches cellulaires, l'ectoderme ou épiderme (couche extérieure) et l'endoderme ou gastroderme (couche intérieure), séparées par une couche majoritairement acellulaire, la mésogée (Figure 7).

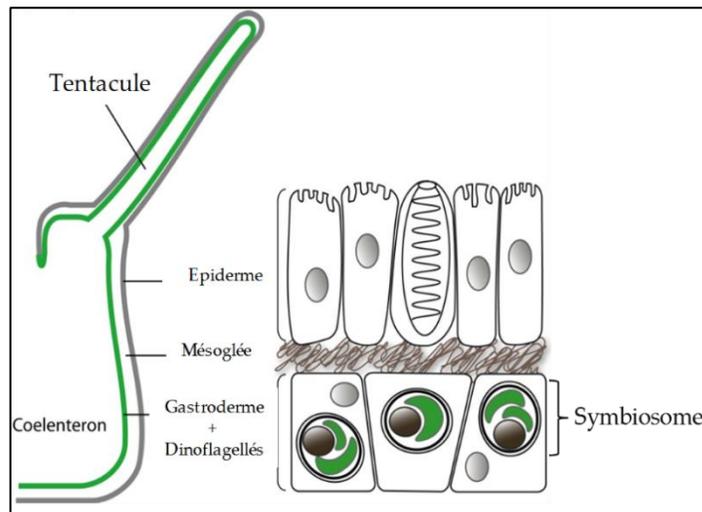


Figure 7 Représentation schématique d'un polype de Cnidaire (Adaptée de Ganot et al. 2011).

Leur épiderme comprend des cellules spécialisées sensorielles et urticantes appelées cnidocytes (Figure 8), à l'origine de l'appellation de cet embranchement. Le terme Cnidaire est d'ailleurs dérivé du Grec Knide signifiant « ortie », « urticant ». Plus de 30 types de cnidocytes ont été répertoriés chez les Cnidaires. Ces cellules renferment un filament urticant, enroulé et baignant dans un mélange liquide complexe (contenant des toxines) à l'intérieur d'une capsule appelée cnidocyste (ou cnidoblaste). Le pôle apical des cnidocytes est agrémenté d'un cnidocil, unité sensorielle qui lors d'un contact ou stimulus engendre un signal électrique permettant la dévagination et l'expulsion du filament afin de paralyser et capturer les proies. Ces cellules ne peuvent se régénérer et sont donc continuellement remplacées par différenciation des cellules interstitielles pluripotentes.

En plus des cnidocytes, l'épiderme est constitué de cellules spécialisées dans la sécrétion de mucus, majoritairement lipidique (glycolipides hydrosolubles et cires liposolubles) et associé à une communauté bactérienne, qui va former la première barrière de défense (Shnit-Orland et Kushmaro 2009), mais aussi permettre la nutrition par l'incorporation de composés organiques dissous (Schlichter 1984), la protection contre la sédimentation et la dessiccation (lors de marées basses).

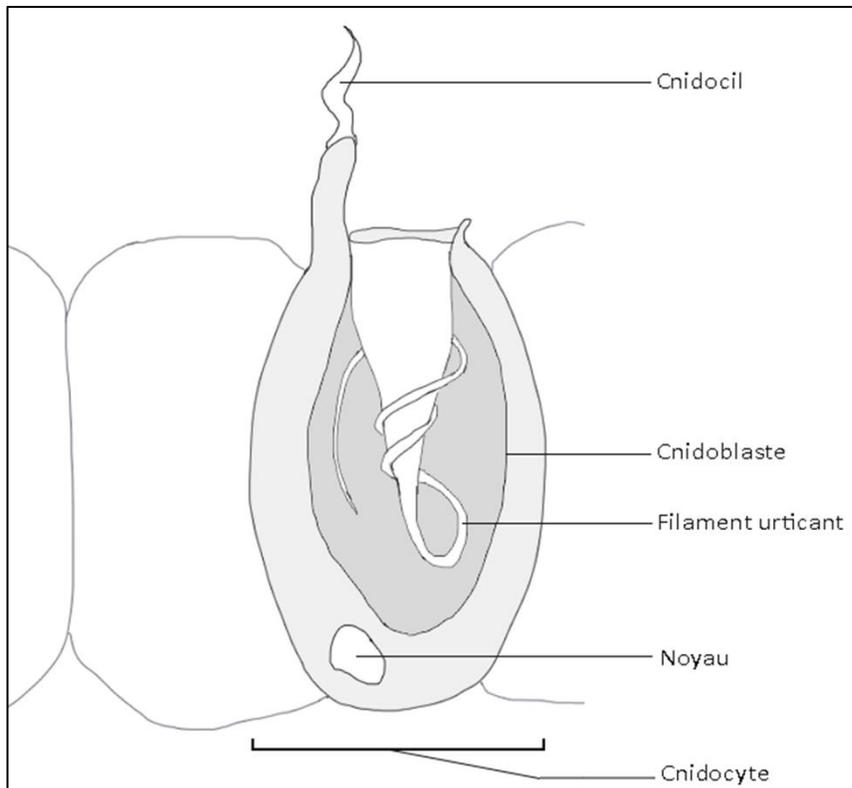


Figure 8 Schéma d'une cellule urticante (cnidocyte) dans le tissu épidermique de Cnidaire.

La cavité gastrovasculaire des Anthozoaires est divisée en mésentères (portant les gonades), dont l'ordre de symétrie définit la sous-classe à laquelle ils appartiennent : les Octocoralliaires possèdent une symétrie d'ordre 8, correspondant à leurs partitions mésentériques, et 8 tentacules ; ils sont tous coloniaux et sont largement représentés par les gorgones et coraux mous. Les Hexacoralliaires ont une symétrie d'ordre 6, et possèdent un multiple de 6 tentacules. Ils comportent entre autres l'ordre des scléactiniaires dans lequel sont regroupés la plupart des coraux, et l'ordre des Actinaires représenté par les anémones de mer (Figure 6).

La reproduction chez les Anthozoaires peut être de type asexuée (clonage par bourgeonnement ou scissiparité), sexuée ou alternée sexuée/asexuée selon les conditions environnementales pour certaines espèces. La reproduction sexuée peut être externe, par l'expulsion de gamètes mâles et femelles dans la colonne d'eau de manière synchrone, qui est le mécanisme le plus répandu chez les Anthozoaires (Harrison et Wallace 1990). Elle peut aussi être interne, par développement interne de la larve avant expulsion (Harrison et Wallace 1990). La Figure 9 présente le cycle de vie des Anthozoaires. Le zygote formé par fécondation est pélagique, il se développe en planula qui se fixe à un substrat pour se développer en polype à l'âge adulte.

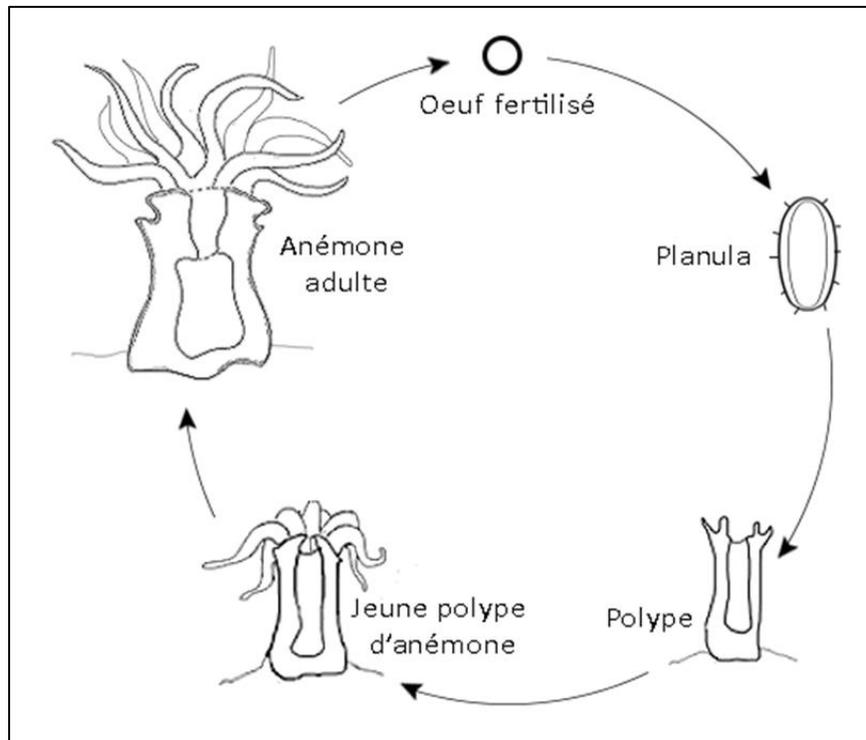


Figure 9 Cycle de vie d'un Anthozoaire, d'après Frazão et al. 2012.

### 3. Les Dinoflagellés et le genre *Symbiodinium*

Les Dinoflagellés (Figure 10) sont des organismes eucaryotes unicellulaires aquatiques de la classe des Dinophyceae, seule classe formant l'embranchement actuel des Dinophytes. Ils sont caractérisés par un noyau cellulaire atypique, appelé dinocaryon, dont les chromosomes sont condensés en hélice de manière permanente, même lors de l'interphase (Rizzo, 1991), ainsi que par la présence de deux flagelles orientés de manière perpendiculaire (transverse et longitudinal), permettant une motilité dans l'espace et de rotation. Le cycle de vie des Dinoflagellés est composé de deux phases : une phase de division, végétative, dépourvue de flagelle et non motile, et une phase de croissance, appelée zoospore, mobile et flagellée (Freudenthal 1962, en revue dans Stat et al. 2006). Parmi les Dinoflagellés, certains sont autotrophes, d'autres hétérotrophes, ou même mixotrophes, c'est-à-dire capables d'autotrophie et d'hétérotrophie.

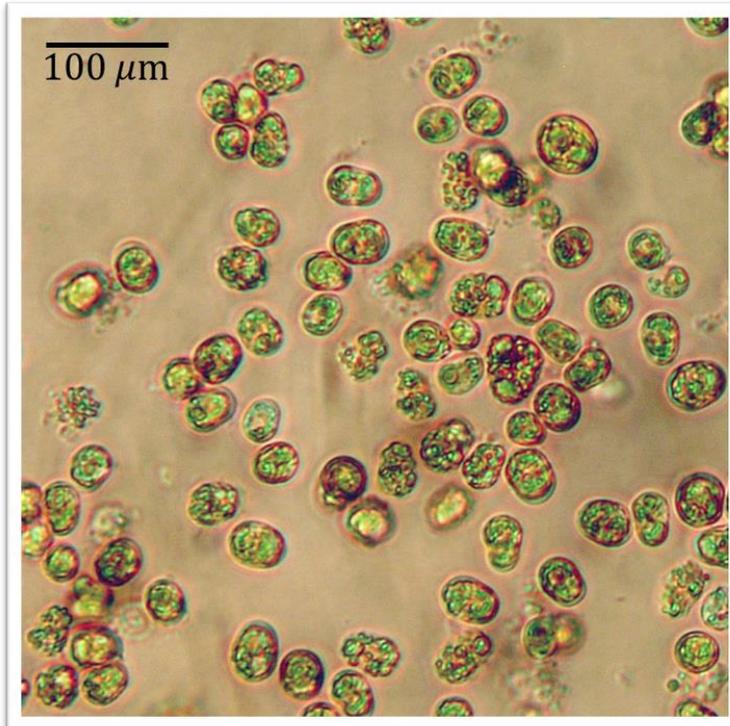


Figure 10 Cultures de *Symbiodinium* spp. (clade A' tempéré) de l'équipe Symbiose Marine.

Le genre *Symbiodinium* a été décrit pour la première fois en 1871 (Cienowski 1871). Ces Dinoflagellés unicellulaires photosynthétiques peuvent vivre libres dans la colonne d'eau ou en symbiose mutualiste avec un grand nombre d'invertébrés marins, tels que des Cnidaires, Platyhelminthes, Mollusques, Porifères ou Foraminifères. Lorsqu'ils sont à l'état symbiotique, leur taille est comprise entre 5 et 15  $\mu\text{m}$  de diamètre, ils perdent leurs flagelles, et sont couramment appelés zooxanthelles. Le premier organisme symbiotique du genre *Symbiodinium* identifié a été isolé d'une méduse *Cassiopeia xamachana* en 1962 (Freudenthal 1962) et a été nommé *Symbiodinium microadriaticum*. L'absence de variation au niveau phénotypique a d'abord conduit à répertorier l'ensemble des Dinoflagellés symbiotiques découverts dans l'espèce *S. microadriaticum*. Les observations ultrastructurales et physiologiques ainsi que l'application de techniques moléculaires pour la classification phylogénétique ont permis plus tard d'identifier 24 groupes taxonomiques référencés à ce jour selon le « World Register of Marine Species ». Le genre *Symbiodinium* compte aujourd'hui 9 clades différents, notés de A à I, renfermant une grande diversité intra-clade (Pochon et Gates 2010 ; Lesser 2013 ; Figure 11). Leur classification, basée sur les zones codantes des sous-unités 18S et 28S de l'ADN ribosomal, puis d'espaces internes transcrits (ITS), est en constante évolution (Pochon et Gates 2010, Pochon et al. 2014).

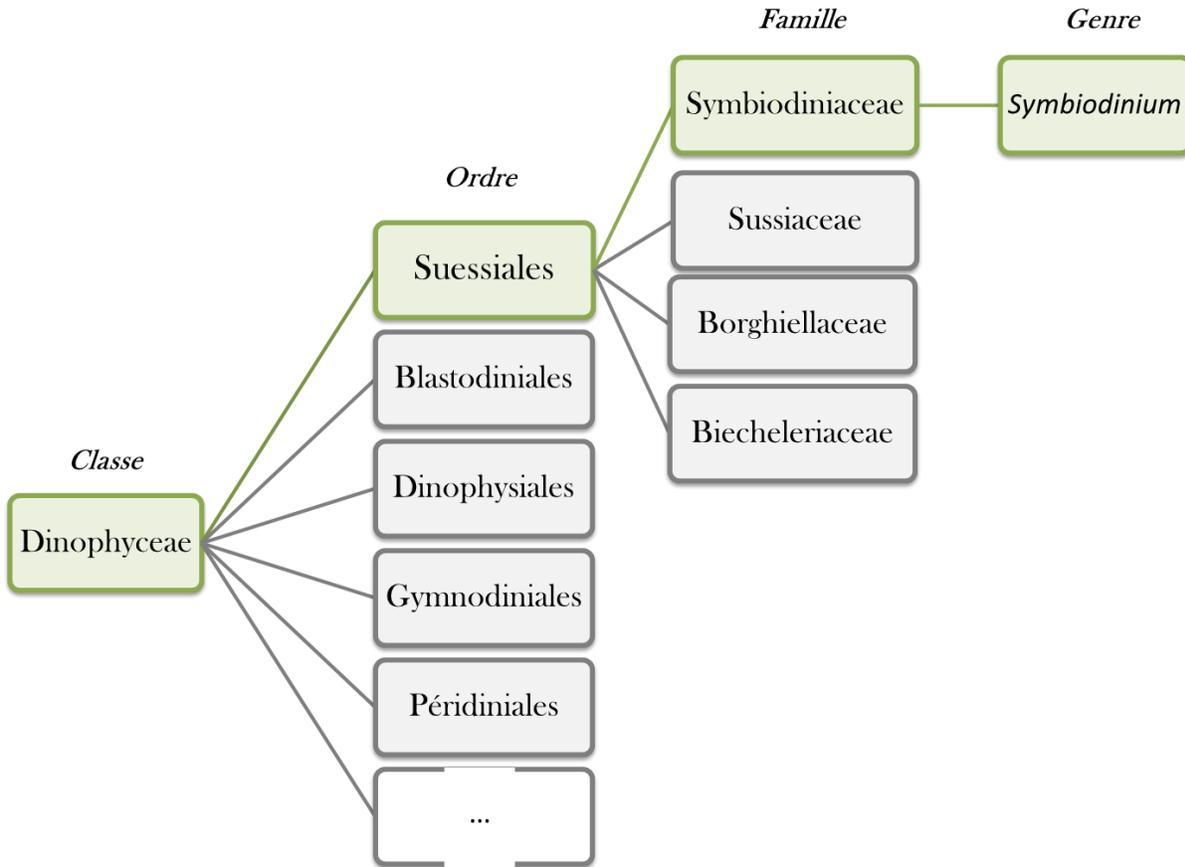


Figure 11 Phylogénie simplifiée de la classe des Dinophyceae. D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>. En vert est indiquée la phylogénie de *Symbiodinium*.

#### 4. La relation symbiotique entre Cnidaire et Dinoflagellés

##### a) Les Cnidares symbiotiques

Parmi les Cnidares, les coraux Scléactiniaires existent depuis le Trias (il y a environ 250 millions d'années), et vivaient déjà en symbiose (Stanley Jr 2003). Des études ont montré qu'au cours de l'évolution chez les Scléactiniaires, la symbiose a été acquise puis perdue au moins trois fois (Barbeitos et al. 2010). Il faut cependant noter que tous les Cnidares sont symbiotiques, mais tous n'abritent pas de Dinoflagellé. On distingue alors les Cnidares symbiotiques de Dinoflagellés, limités à la zone photique, des non symbiotiques (de Dinoflagellés), pouvant être retrouvés jusqu'à 6000 m de profondeur (Pasternak 1977 ; Calder 1996), dans des eaux tropicales, tempérées et polaires. Ces Cnidares profonds sont en fait symbiotiques avec des communautés de protéobactéries (Brück et al. 2007).

La symbiose établie entre Cnidaire et Dinoflagellés est intracellulaire : c'est une endosymbiose. Le symbiote est logé dans une vacuole de phagocytose, entourée d'une membrane pérисymbiotique d'origine animale, dans les cellules du gastroderme de l'animal (Rands et al. 1993). La densité en symbiotes varie selon l'espèce, le lieu et le cycle circadien (Santos et al. 2009 ; Putnam et Edmunds 2011). Les cellules du gastroderme peuvent contenir 1 à 3 symbiotes, et jusqu'à 60 chez certains hydroïdes (Fitt 2000).

Il existe cependant une certaine spécificité entre les Cnidaires et leurs symbiotes. Il existe une spécificité de l'hôte envers ses symbiotes ou des symbiotes envers leur hôte ; ainsi qu'une spécificité de la région géographique dans laquelle ils sont retrouvés. Par exemple, des *Symbiodinium* spp. appartenant au clade C3 pourront être symbiotiques de plusieurs familles de Cnidaires, telles que les *Acroporidae*, *Pocilloporidae*, *Favidae* (LaJeunesse et al. 2003), alors que le clade C17 ne pourra s'associer qu'avec des coraux de la famille des *Potitidae* (LaJeunesse 2005). S'il est connu qu'un même hôte peut recruter différentes populations de symbiotes (Goulet et Coffroth 2003) certains montrent une spécificité pour une population donnée, notamment chez le corail *Fungia scutaria* (Weis et al. 2001). Selon la région géographique, une souche de *Symbiodinium* pourra être spécifique de son hôte, ou bien infecter des Cnidaires issus d'espèces différentes (Pochon et Pawlowski 2006).

La capacité des Cnidaires à acquérir des symbiotes, et à réguler ou modifier leur population repose sur un grand nombre d'échanges entre les partenaires au niveau moléculaire. Ces processus permettent la reconnaissance du symbiote et son internalisation, le maintien durable de la relation hôte-symbiote, mais aussi la rupture de la symbiose lorsque les conditions environnementales ne permettent plus la stabilité de l'association symbiotique.

#### b) *Reconnaissance et mise en place de l'association symbiotique*

L'acquisition de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés peut se faire par plusieurs moyens : le transfert horizontal est l'acquisition à partir du milieu extérieur, par ingestion dans la cavité coelentérique (Hirose et al. 2008), alors que le transfert vertical est une transmission directe à la descendance (Davy et Turner 2003 ; Marlow et Martindale 2007 ; [Figure 12](#)).

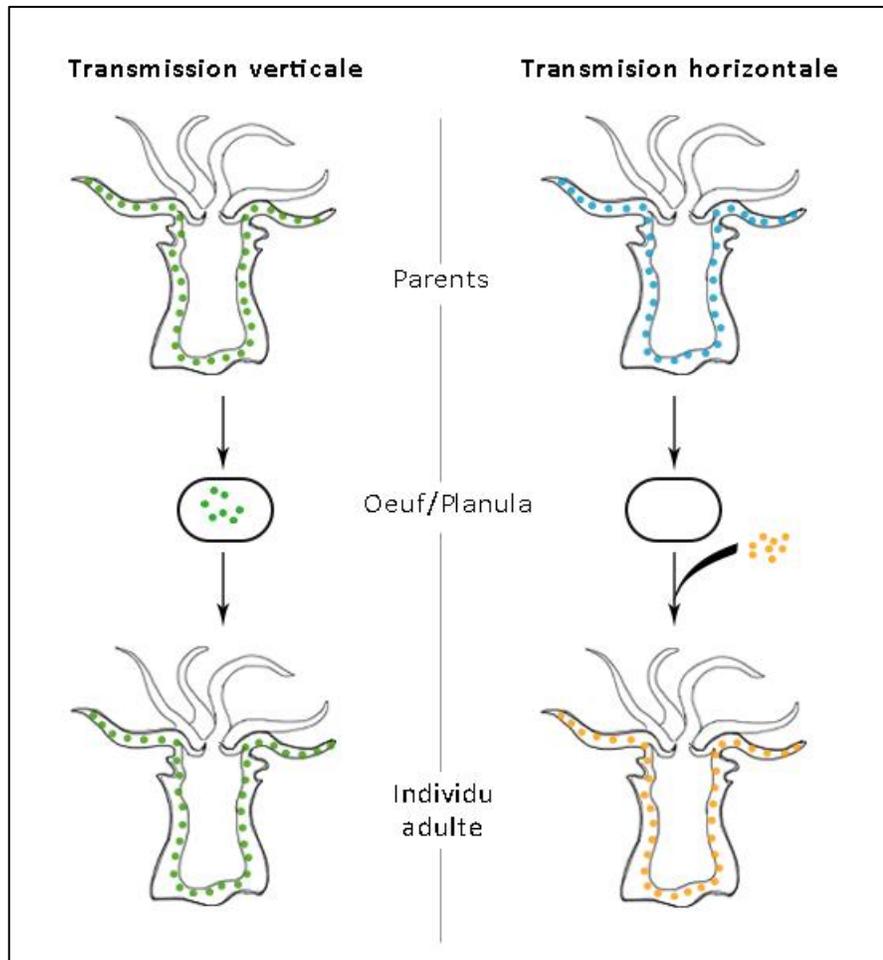


Figure 12 L'acquisition des symbiotes par transmission verticale ou horizontale chez les Anthozoaires.

La mise en place de l'association symbiotique requiert l'instauration d'un certain nombre de processus moléculaires et cellulaires induisant une « tolérance » du symbiote, sans lesquels l'hôte attaquerait et détruirait les *Symbiodinium* par l'activation de leur système immunitaire inné (Gross et al. 2009). L'un des principaux moyens de reconnaissance comme microorganisme non pathogène chez *Symbiodinium* est initié par des métabolites spécifiques présents à leur surface cellulaire, tels que des **glycanes** ou des lipopolysaccharides, appelés « motifs moléculaires associés aux microbes » (en anglais, Microbe-Associated Molecular Pattern, MAMP). Ces MAMPs sont reconnus par des récepteurs spécifiques de ces motifs (en anglais, Pattern Recognition Receptors, PRRs) de l'hôte, tels que des **lectines** de type C (Wood-Charlson et al. 2006, en revue dans Davy et al. 2012). Parmi ces dernières, la protéine Sym32, localisée à l'interface symbiotique, serait impliquée dans cette reconnaissance hôte-symbiote (Schwartz et Weis 2003).

La reconnaissance MAMP/PRR chez les Cnidaires symbiotiques a été démontrée dès 1979 chez une hydre, dont l'inhibition de la production de MAMPs réduisait significativement le recrutement de symbiotes (Pool 1979). De la même manière, l'interaction spécifique lectine/glycane dans l'interaction symbiotique a été mise en évidence chez le corail *Fungia scutaria* : une forte diminution de l'acquisition des symbiotes est observée lorsque les glycanes de surface sont supprimés (Wood-Charlson et al. 2006). De plus, des expériences chez *Hydra viridis* ont montré que des symbiotes morts ne sont pas internalisés (Hohman et al. 1982).

Les mécanismes de reconnaissance décrits ci-dessus induisent l'internalisation par phagocytose des cellules de *Symbiodinium* chez les Cnidaires (Fitt et Trench 1983 ; Marlow et Martindale 2007). Lors du processus normal de phagocytose, le phagosome (la vésicule membranaire d'origine animale) subit une maturation et fusionne au lysosome qui déclenche la digestion ou l'exocytose du contenu du phagosome, par des processus d'acidification et l'action de protéases. Ce mécanisme de l'immunité innée permet la protection contre les pathogènes (Aderem et Underhill 1999). Dans l'interaction Cnidaire-Dinoflagellé, le symbiote peut s'installer durablement dans le gastroderme animal. Pour se faire, il existe des mécanismes qui induisent l'arrêt de la maturation du phagosome et empêchent leur fusion au lysosome (Kodama et Fujishima 2010). A partir de ce stade, le phagosome renfermant le symbiote devient le symbiosome (Roth et al. 1988), et la membrane du phagosome devient la membrane périsymbiotique, véritable interface d'échange entre les deux partenaires. Là encore, ce processus de régulation du trafic vésiculaire fait intervenir des mécanismes de reconnaissance actifs, notamment par l'intermédiaire de protéines de la famille Rab (Chen et al. 2004, Hong et al. 2009).

L'ensemble des adaptations fonctionnelles de chaque espèce à la reconnaissance et l'internalisation des symbiotes sont coûteuses en énergie. Cependant, leur mise en place malgré ces barrières énergétiques appuie les avantages procurés par l'association mutualiste pour chaque espèce.

### c) *Maintien de l'association symbiotique mutualiste*

Le succès d'une association symbiotique repose sur un dialogue moléculaire constant entre les espèces en symbiose. Dans des conditions stables, l'association entre Cnidaires et Dinoflagellés est mutualiste, elle confère de nombreux avantages aux deux espèces. En effet, l'hôte fournit à ses symbiotes un abri contre leurs prédateurs, mais aussi des nutriments inorganiques carbonés (Furla et al. 1998), phosphorés (Muller-Parker et al. 1990) ou azotés (Grover et al. 2002) et une exposition

optimale au soleil, permettant la photosynthèse. En retour, les symbiotes fournissent à leur hôte une partie de leurs photosynthétats, jusqu'à 90% chez certaines espèces tropicales (Falkowski et al. 1984 ; Muscatine 1990 ; Furla et al. 2005), principalement sous forme d'acides aminés (Wang et Douglas 1999), glycérol (Muscatine 1967), glucose (Burriesci et al. 2012) ou lipides (Patton et al. 1977 ; Figure 13).

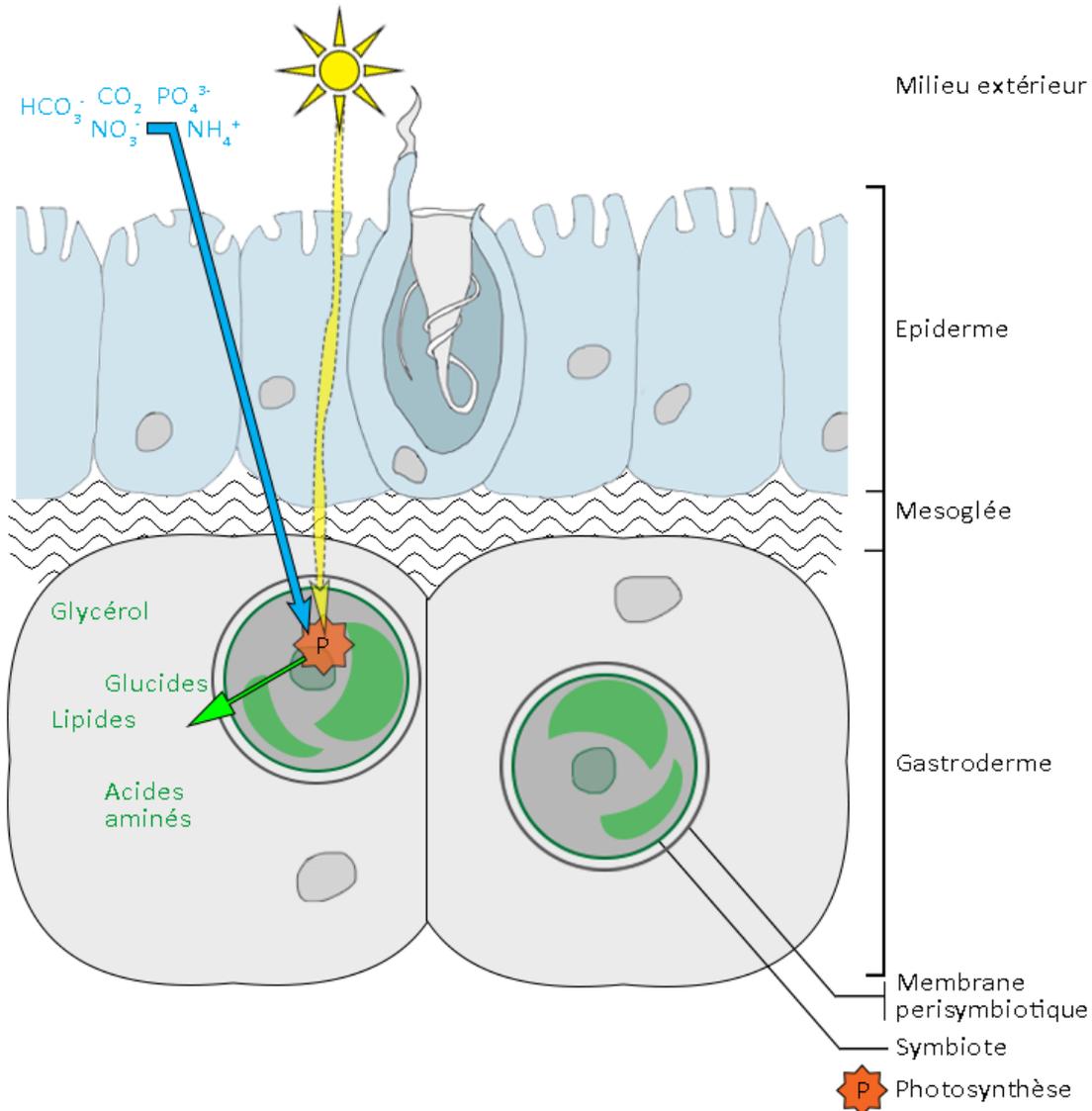


Figure 13 Résumé schématique des apports nutritionnels entre *A. viridis* et *Symbiodinium* spp. D'après Muscatine 1967 ; Patton et al. 1977 ; Falkowski et al. 1984 ; Muller-Parker et al. 1990 ; Muscatine 1990 ; Furla et al. 1998 ; Wang et Douglas 1999 ; Grover et al. 2002 ; Furla et al. 2005 et Burriesci et al. 2012.

Les Cnidaires symbiotiques sont donc **mixotrophes**, à la fois hétérotrophes et autotrophes. Ces apports trophiques pour les Cnidaires symbiotiques sont considérables. Une grande partie des symbioses entre Cnidaire et Dinoflagellés est retrouvée en basses latitudes, où les eaux tropicales

oligotrophes n'apportent que très peu de nutriments (Muscatine et al. 1977, Muscatine et Porter 1977). Cette relation leur donne un avantage compétitif puisqu'au travers de nombreux échanges moléculaires, chaque partenaire disposera de l'ensemble des nutriments nécessaires à sa croissance (la nature des nutriments échangés est exposée plus en détails dans la partie III-3 (La communication moléculaire entre Cnidaires et Dinoflagellés).

Le succès évolutif des Cnidaires repose presque entièrement sur leur association symbiotique. Néanmoins, le maintien de la symbiose repose sur une multitude de régulations moléculaires et cellulaires. Une endosymbiose engendre en effet des contraintes pouvant générer un stress, telle qu'une croissance incontrôlée de la population de symbiotes, par des radiations UV ou le stress oxydant.

- Régulation de la population de symbiotes- Dans le milieu confiné qu'est la cellule gastrodermique, la population de symbiotes doit être optimisée par l'hôte en fonction de la division des symbiotes par rapport à la croissance de l'hôte. En effet, la fréquence de division cellulaire (index mitotique) de cellules de *Symbiodinium* mises en culture est de 2 à 5 jours, alors qu'elle peut excéder 70 jours *in hospite* (Wilkerson et al. 1983 ; Jones et Yellowless 1997). Cette régulation peut être mise en place par trois modes d'action : tout d'abord par inhibition de la division cellulaire, par exemple en limitant le transfert de composés inorganiques dissous tels que les composés azotés (Falowski et al. 1993 ; Goiran et al. 1996), ou phosphorés (Rands et al. 1993). Une seconde stratégie de l'hôte, et probablement la plus commune, consiste à expulser l'excès de symbiotes vivants (Baghdasarian et Muscatine 2000, Dimond et Carrington 2008), dont les exsudats sont visibles à l'œil nu (Steele 1977). La régulation de la population de symbiote peut aussi être effectuée par dégradation de ces derniers par la cellule hôte suivie de leur expulsion (Titlyanov et al. 1996).

- Protection contre les radiations UV- Les radiations lumineuses indispensables à la photosynthèse des symbiotes contraignent l'hôte à synthétiser des composés à rôle protecteur contre les UV (Banaszak et Trench 1995), tels que des acides aminés ressemblant à des mycosporines (Mycosporine like Amino Acids, MAAs), dont la diversité et le rôle sont détaillés dans la [partie III-2](#). Du même chapitre. Des protéines fluorescentes peuvent aussi jouer un rôle dans la protection aux radiations lumineuses. La protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein, GFP), exprimée dans le tissu épidermique des anémones de mer (Leutenegger et al. 2007), absorbe la lumière visible et les UV (Alieva et al. 2008) et est régulée en fonction de la luminosité (Roth et al. 2010). Son action spécifique n'est cependant pas entièrement démontrée : certaines études

suggèrent que les protéines fluorescentes seraient plutôt vouées au contrôle du cycle cellulaire des symbiotes (D'angelo et al. 2008).

- Protection contre le stress oxydant- Pour loger durablement des organismes autotrophes à l'intérieur de ses cellules, l'hôte Cnidaire a dû développer un moyen de réguler les effets induits de l'apport de dioxygène ( $O_2$ ) diurne (issu de la photosynthèse), de dioxyde de carbone nocturne (issu de la respiration) et les variations de pH résultantes. La concentration en oxygène à la surface des tissus est par exemple 100 fois plus élevée la journée par rapport à la nuit (Revsbech 1995). La photosynthèse engendre donc une hyperoxie dont l'hôte doit se protéger (Richier et al. 2005). En effet, l'augmentation de la concentration en dioxygène génère par réduction des radicaux oxygénés tels que l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet}$  ou la formation de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , destructifs pour les cellules. Ces composés sont appelés dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS), et ont une très forte réactivité sur les lipides, protéines et ADN. Pour faire face aux ROS, les Cnidaires possèdent un large répertoire de molécules antioxydantes (Richier et al. 2005), la plus connue étant la superoxide dismutase (SOD), une enzyme capable de convertir  $O_2^{\bullet}$  en  $H_2O_2$ , converti à son tour en  $H_2O$  par des catalases. Chez l'anémone *A. elegantissima*, les SOD semblent régulées par la densité en symbiotes, la concentration en  $O_2$ , et le cycle circadien (Dykens et Shick 1982).

Il existe bien sur un grand nombre d'autres régulations moléculaires permettant le maintien de l'association symbiotique, toutes ne pouvant être détaillées dans ce manuscrit. Il apparaît néanmoins que la communication moléculaire entre hôte et symbiote est basée sur un grand nombre d'adaptations fonctionnelles, compensées par des échanges trophiques avantageux. Ces échanges trophiques entre les partenaires en symbiose passent obligatoirement par la membrane périsymbiotique, par diffusion simple ou transport actif. Par exemple, chez l'anémone de mer *A. viridis*, le symbiosome contrôlerait la disponibilité en composés phosphorés et autres nutriments (Rands et al. 1993). Si certaines études ont été récemment menées en vue de caractériser cette interface d'échange au niveau protéomique (Peng et al. 2010), les connaissances sur les mécanismes de transfert sont très réduites, et une caractérisation de l'interface symbiotique apparaît cruciale pour mieux comprendre la communication entre Cnidaire et Dinoflagellés.

#### d) *Rupture de la symbiose*

L'association symbiotique entre Cnidaire et Dinoflagellés implique une relation intime, mais qui n'en reste pas moins fragile. Divers stress peuvent faire varier le rapport bénéfice/coût de la symbiose qui s'affaiblit voire s'inverse, provoquant un dysfonctionnement de la régulation symbiotique qui peut mener à la rupture de la symbiose (Figure 14 ; Fitt et Warner 1995 ; Brown 1997 ; Douglas 2003 ; Lesser 2011).

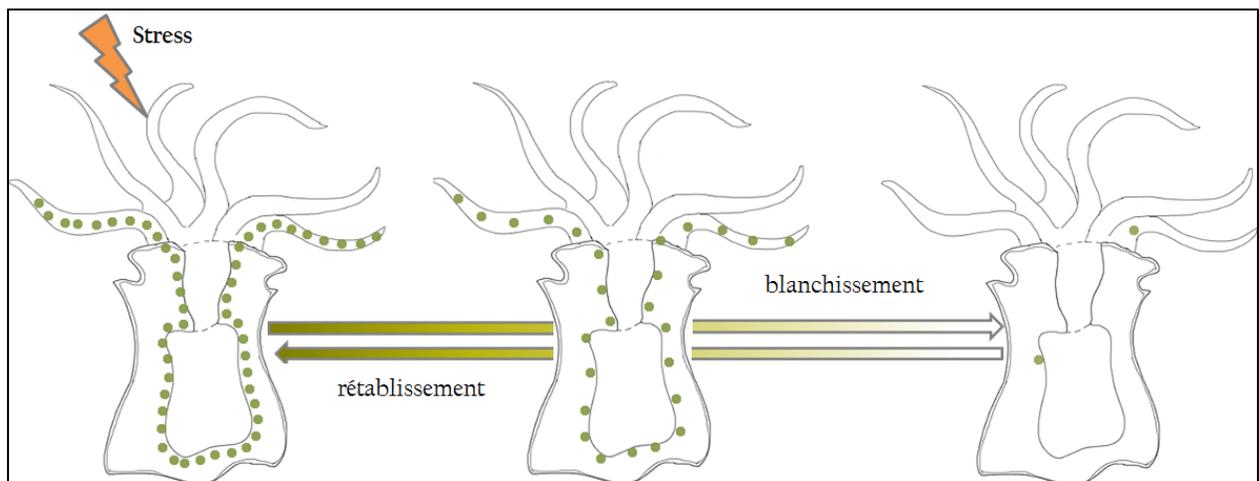


Figure 14 Représentation schématique de la rupture de la symbiose. Les points verts représentent la densité relative en symbiotes.

Le changement climatique global d'origine anthropique en est le principal responsable, à travers le réchauffement global, l'acidification des océans, un rayonnement UV plus important, l'augmentation de la fréquence des tempêtes, ou la pollution chimique.

Plus connue sous le nom de blanchissement des coraux, cette rupture peut être initiée par un certain nombre de mécanismes cellulaires et moléculaires entraînant des perturbations physiologiques. L'identification de ces mécanismes n'est pas clairement définie, et reste aujourd'hui un enjeu scientifique majeur. Le plus souvent, la perte des pigments photosynthétiques du symbiote est observée (généralement à partir de l'endommagement du photosystème II ; Warner et al. 1999 ; Takahashi et al. 2004), suivie par la perte complète des symbiotes (Weis 2008). Mais les ROS responsables du stress oxydant (Lesser et Farrell 2004), la déficience des mécanismes de fixation du CO<sub>2</sub> (Jones et al. 1998) ou encore la dissociation des membranes des thylakoïdes (Tchernov et al. 2004) chez les symbiotes sont tout autant de facteurs favorisant la rupture de la symbiose. Lorsque ces processus sont initiés, la dégradation des symbiotes est suivie par des phénomènes d'apoptose

(Lesser et Farell 2004 ; Richier et al. 2006), d'autophagie (Dunn et al. 2007 ; Downs et al. 2009), de nécrose de la cellule du gastroderme (Dunn et al. 2004), d'exocytose (Steen et Muscatine 1987 ; Wang et al. 2012) ou de simple détachement de cette dernière (Gates et al. 1992 ; Brown et al. 1995). L'ensemble de ces processus est listé dans le [Tableau 2](#).

Tableau 2 Rupture de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés : types de rupture, causes et facteurs, état (viable ou mort) des cellules du gastroderme et des symbiotes et références associées.

Type de rupture	Causes	Facteurs	Cellule du gastroderme	Symbiote	Références
Apoptose	Stress UV, température	Dégradation des membranes du symbiote	viable	mort	Lesser et Farell 2004 Richier et al. 2006
Autophagie	Stress UV, température	Digestion du symbiote	viable	mort	Dunn et al. 2007 Downs et al. 2009
Nécrose cellulaire	Stress sévère	Rupture des membranes cellulaires	mort	mort	Dunn et al. 2004
Détachement cellulaire	Stress température	Expulsion de la cellule du gastroderme	mort	viable	Gates et al. 1992 Brown et al. 1995
Exocytose	Régulation population de symbiotes, stress température	Expulsion des symbiotes dans la cavité coelentérique	viable	viable	Steen et Muscatine 1987 Wang et al. 2012

La rupture de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés n'est pas un phénomène nouveau. L'intensité, la fréquence ainsi que l'extension géographique des phénomènes de blanchissement ont par contre été décuplés depuis la révolution industrielle. Ces épisodes se sont accélérés et sont de plus en plus difficiles à prédire ces dernières décennies (Brown 1997 ; Hoegh-Guldberg 1999 ; Hoegh-Guldberg et al. 2007). Des prévisions estiment un arrêt de la calcification d'ici 2070 (Cantin et al. 2010), ainsi qu'une accélération du processus de blanchissement dans les prochaines décennies (Wilkinson 2008). Les scénarios les plus pessimistes évaluent la survie de certains récifs à seulement 1% d'ici 2100 (Lane et al. 2013).

Cependant, chaque espèce possède sa propre **résilience** (la résilience d'un organisme, d'une population ou d'un écosystème est sa capacité de rétablissement –fonctionnement et développement normaux- à la suite d'une perturbation) face aux stress environnementaux (Brown et Cossins, 2011). En effet, les perturbations sont temporaires et la réponse adaptative propre à chaque espèce diminue la vulnérabilité au stress et donc augmente le seuil de blanchissement. De plus, la réponse au stress dépendra de celle de l'hôte en plus de celle des symbiotes. Lors d'un épisode de blanchissement, l'hôte pourra expulser ses symbiotes et chercher à acquérir une nouvelle population qui augmentera sa valeur sélective. Cela a été montré chez l'anémone *A.*

*pulchella*, initialement symbiotique de *Symbiodinium* appartenant au clade E, qui après une rupture de la symbiose, a pu être réinfectée par des *Symbiodinium* du clade B1 (Davy, communication personnelle). L'hypothèse de « blanchissement adaptatif » pourrait être la raison de cette flexibilité apparente (Buddemeier et Fautin, 1993).

L'intérêt repose donc aujourd'hui sur la compréhension de la relation symbiotique passant d'un état stable à un état de rupture, afin de mieux appréhender les évolutions futures. Pour répondre à ces questions, un ensemble d'outils inscrits dans la lignée des sciences dites « omique », comprenant la génomique, la transcriptomique, la protéomique, et la métabolomique sont mis au point. Pour tout système biologique, la métabolomique constitue le dernier maillon de réponse à son environnement (Figure 15).

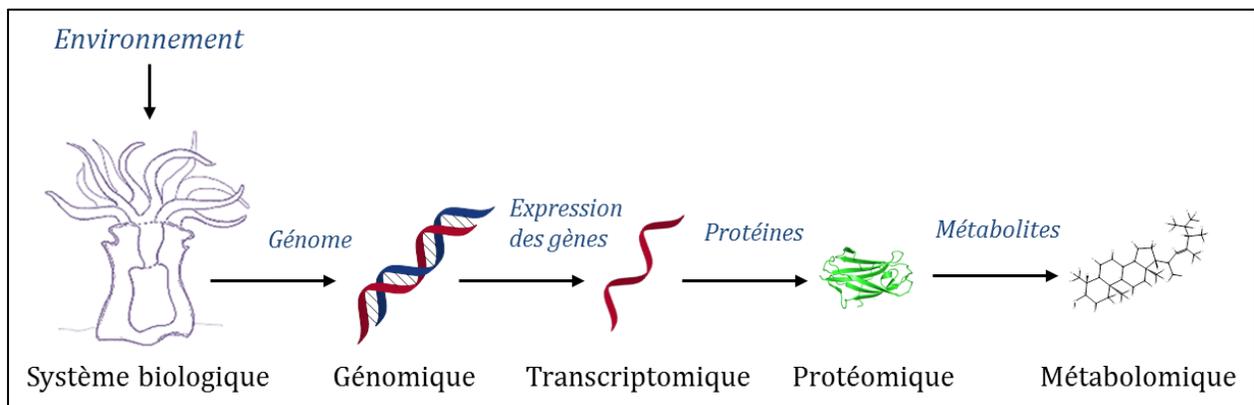


Figure 15 Représentation schématique des sciences « omique » et leurs interactions (les interactions peuvent être bidirectionnelles). Adapté d'après Horgan et Kenny 2011.

### III. La métabolomique pour l'étude des relations symbiotiques

#### 1. Introduction à la métabolomique

##### a) Définition et historique

La métabolomique correspond à l'étude dans des conditions spécifiques du profil de métabolites dans un système biologique (cellule, tissu, organisme ; Rochfort 2005). Il conviendra avant tout de donner une définition au métabolite. Il s'agit d'une molécule organique biosynthétisée de faible poids moléculaire (le plus souvent inférieur à 2000 Da). On distingue les métabolites primaires, indispensables aux fonctions vitales du système étudié (organite, cellule, organisme), tels que les acides aminés, glucides ou lipides ; et les métabolites secondaires qui permettent au système d'acquérir des fonctions supplémentaires : la défense, la communication ou l'attrait sexuel. La difficulté à placer un grand nombre de métabolites dans l'une ou l'autre des deux catégories conduit souvent à l'abandon de cette nomenclature.

D'un point de vue historique, l'étude de produits naturels remonte au XX<sup>ème</sup> siècle, elle portait sur des composés spécifiques, pour des applications dans le domaine thérapeutique. La première étude par approche métabolomique a été réalisée en 2000 sur des extraits de feuilles de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Fiehn et al. 2000). Cette discipline est depuis en pleine expansion, puisqu'en 2015, plus de 18 000 publications sont recensées dans SciFinder pour le seul mot clé « metabolomics » (accès le 28/07/2015). Elle s'est révélée très utile pour décrire l'interaction entre un organisme et son environnement, ainsi qu'entre organismes. L'analyse des produits naturels peut donc être réalisée à plusieurs échelles. Il pourra s'agir de l'analyse d'un métabolite unique, d'une classe de métabolites, du profil métabolique et de l'empreinte métabolique (Trethewey 2004), dont la complexité résulte d'un compromis entre la quantité (en terme de nombre de métabolites étudiés) et la qualité (en terme d'identification, de sensibilité et de quantification).

##### b) La lipidomique

La lipidomique constitue l'étude des profils lipidiques dans un système biologique. Il s'avère qu'il n'existe pas de définition précise du terme lipide. Dans son sens large, un lipide est une substance biosynthétisée non soluble dans l'eau mais soluble dans des solvants organiques, tels que le chloroforme ou l'acétate d'éthyle. Initialement appelés corps gras, la présence d'une fonction

acide dans ces composés a été décrite dès 1673 par Otto Tachenius (*Hippocrates Chymicus*, Paris 1673), plus de 100 ans avant la découverte du glycérol par distillation de l'huile d'olive en présence d'oxyde de plomb par Carl Wilhelm Scheele en 1779. Les premiers essais de classification des lipides remontent au XIX<sup>ème</sup> siècle par Michel Eugène Chevreul (*Encart 1*, Chevreul 1823), et montrent l'intérêt porté aux lipides dès cette époque.

Encart 1 : découverte et classification des lipides

L'intérêt pour l'analyse et la compréhension du rôle des lipides dans le monde vivant n'est pas récent. Initialement appelés corps gras, la présence d'un acide dans ces composés a été reportée dès 1673 par Otto Tachenius (*Hippocrates Chymicus*, Paris 1673), plus de 100 ans avant la découverte du glycérol par distillation de l'huile d'olive en présence d'oxyde de plomb par Carl Wilhelm Scheele en 1779. Les premiers essais de classification des lipides remontent au XIX<sup>ème</sup> siècle par Michel Eugène Chevreul (*Figure 16*, Chevreul 1823), et montrent l'intérêt porté aux lipides dès cette époque. Cette classification est aujourd'hui clairement établie et de nouveaux lipides sont encore très régulièrement découverts.

TABLEAU DES ESPÈCES DE CORPS GRAS.			
	1 <sup>er</sup> GENRE.	ESPÈCES.	
1 <sup>re</sup> DIVISION. Corps gras acides.	Qui ne se volatilisent pas quand on les met dans l'eau bouillante . . . .	Acide stéarique.	
	Fixes relativement aux suivants . . . .	— margarique.	
		— oléique.	
2 <sup>e</sup> DIVISION. Corps gras non acides.	2 <sup>e</sup> GENRE.	Acide phocénique.	
	Qui peuvent distiller avec l'eau . . . .	— butyrique.	
		Volatils . . . . .	— caproïque.
		— caprique.	
		— hircique.	
	3 <sup>e</sup> GENRE.	Cholestérine.	
Non altérables par les alcalis et non susceptibles de s'y unir . . . . .	Éthyl.		
4 <sup>e</sup> GENRE.	Susceptibles d'être convertis par les alcalis en acides gras fixes et en une substance grasse non acide . . .	Cétine.	
		5 <sup>e</sup> GENRE.	Stéarine de mouton.
		Susceptibles d'être convertis par les alcalis en glycérine ( <i>principe doux</i> ) et en acides gras fixes . . . . .	— d'homme.
Oléine.			
6 <sup>e</sup> GENRE.	Susceptibles d'être convertis par les alcalis en glycérine, en acides gras fixes et en acides gras volatils . . .	Phocénine.	
		Butyrine.	
		Hircine.	

Figure 16 Classification des lipides Selon Eugène Chevreul (Chevreul 1823)

Le **Tableau 3** présente la classification et quelques exemples montrant la diversité des lipides. Les acides gras (AGs) sont des acides carboxyliques R-COOH, dont le radical R est une chaîne hydrocarbonée saturée ou non et de longueur variable.

Tableau 3 Classification non-exhaustive des lipides retrouvés dans le monde vivant.

<b>Lipides simples</b>	Acides gras	Saturé
		Insaturé, éicosanoïde
		Acide gras amide
	Glycérides	Monoacylglycérol
		Diacylglycérol
		Triacylglycérol
Stérols*	/	
Prénols*	Isoprénoides	
	Caroténoïdes	
Cérides	Cires	
<b>Lipides complexes</b>	Phospholipides	Phosphatidylcholine
		Phosphatidylsérine
		Phosphatidylinositol
		Phosphatidyléthanolamine
	Sphingolipides	Céramides
		Glycosphingolipides
		Phospho-sphingolipides
	Glycolipides	Monogalactosyldiacylglycérol
		Digalactosyldiacylglycérol
	Autres lipides complexes	Glycophospholipides
Protéolipides		
Bétaïne lipides		

L'ensemble des lipides est synthétisé par l'intermédiaire d'unités kétoacyls, sauf \*, qui sont synthétisés à partir d'unités isoprène

Les acides gras peuvent être désignés par plusieurs nomenclatures définies dans la **Figure 17**. Ils peuvent être présents dans le monde vivant sous forme libre ou estérifiée. Un nombre incalculable de biomolécules dérivent de la combinaison d'un acide gras à une structure de type glycérol ou sphingoïde. Ils sont indispensables au fonctionnement de tout être vivant, et ont de multiples rôles : ils sont une source énergétique majeure et les principaux constituants des

membranes biologiques. Certains stérols sont des précurseurs de vitamines, les phospholipides participent au transport cellulaire (par la formation des membranes d'endosomes) et certains lipides remplissent la fonction de médiateur.

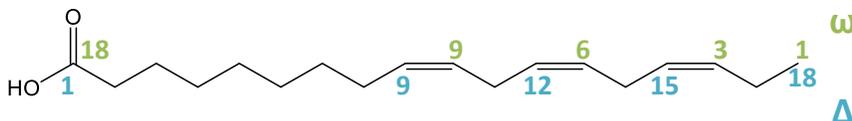


Figure 17 Nomenclatures des acides gras. L'acide gras présenté est l'acide  $\alpha$ -linoléique. Selon la nomenclature en  $\omega$ , il est appelé acide gras 18:3 $\omega$ 3, aussi nommé 18:3n-3 (nomenclature utilisée dans ce manuscrit). Selon la nomenclature en  $\Delta$ , il sera nommé *cis,cis,cis*- $\Delta^{9,12,15}$ -octadécatriénoïque.

Ainsi, les lipides sont souvent utilisés comme marqueurs trophiques (Graeve et al. 1994 ; Dalsgaard et al. 2003 ; Ruchonnet et al. 2006 ; Ramos et González-Solís 2012). Leur importance dans tout système biologique explique la multitude d'investigations par approche lipidomique recensées (en revue dans Wenk 2005).

### c) *Les outils pour l'étude métabolomique*

L'émergence des études par approche métabolomique a été rendue possible par les progrès des techniques analytiques sur lesquelles elles sont basées, telles que la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse. Ces techniques utilisées en routine depuis plusieurs décennies ne cessent de se perfectionner : analyses par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UHPLC), spectromètres de masses à haute résolution (HRMS), ou encore techniques d'imagerie par spectrométrie de masse permettent de réaliser des analyses plus précises, et plus rapidement. En HRMS, les analyseurs Orbitrap (Thermo) ou à temps de vol permettent par exemple d'obtenir des masses exactes à une précision de 2 ppm (Makarov et Scigelova 2010), nécessaires pour la détermination de la formule brute d'un composé. L'imagerie par spectrométrie de masse est un outil qui permet la mesure de l'abondance ainsi que la localisation de composés à partir de surface. Sur un système cartésien (représenté par deux dimensions,  $x$  et  $y$ ), chaque point est représenté par un spectre de masse. Un ratio masse sur charge ( $m/z$ ) donné sera alors déterminé par des coordonnées  $x,y$  ; et son abondance représentée par des couleurs ou niveaux de gris, permettant une analyse complète à 3 dimensions à partir d'une section. Des techniques de désorption/ionisation sont mises au point afin d'acquérir des images par spectrométrie de masse ; les plus connues sont la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS), la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et la désorption/ionisation par

electrospray (DESI). Ces techniques offrent l'avantage d'aboutir à une analyse complète en très peu de temps, et ne requièrent qu'un faible traitement des échantillons. En effet, l'échantillon peut être analysé directement, ou après le dépôt d'une matrice. Ces dernières décennies ont aussi vu l'émergence de bases de données très utiles à l'étude métabolomique, parmi lesquelles nous pouvons citer l'encyclopédie KEGG, ainsi que les bases de données Metlin et Marinlit :

- **KEGG**. L'encyclopédie KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) donne accès depuis 1995 aux génomes, métabolites et voies de biosynthèse d'un ensemble d'espèces.
- **METLIN**. La base de données METLIN, du « Scripps Center for Metabolomics and mass spectrometry », recense plus de 240 000 métabolites, et, pour une partie, leurs spectres de masse MS/MS.
- **MarinLit**. La base de données MarinLit recense tous les métabolites isolés d'organismes marins.

Des bases de données plus spécifiques permettent des recherches plus ciblées sur une classe de molécules, incluant les peptides (ProteinProspector, Mascot) ou les lipides (Lipid Maps, LipidBank, Lipid-Classfier Master, ou Cyberlipid Center) :

- **ProteinProspector**. L'identification de peptides à partir de leur spectre MS/MS est réalisée par la base de données ProteinProspector conçue par l'UCSF (University of California San Fransisco).
- **MASCOT**. La base de données Mascot, moyennant un abonnement, permet l'identification de peptides et protéines.
- **LIPID MAPS**. L'identification de lipides est souvent réalisée par la base de données LIPID MAPS (LIPID Metabolites And Pathways Strategy). Il s'agit d'une base de données gratuite qui offre la possibilité de faire des recherches par structure, sous-structure, par nom et par spectre de masse. En 2012, plus de 37000 structures étaient recensées.
- **LipidBank**. Il s'agit d'une base de données issue du JCBL (Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids) qui donne accès aux propriétés biologiques, physiques et chimiques d'un grand nombre de lipides.
- **Lipid-Classfier Master**. Il s'agit d'un outil de classification du « Prince Laboratory » à Brigham.
- **CyberLipid Center**. Il permet la description et l'analyse d'un grand nombre de lipides.
- **AOCS Lipid Library**. Il s'agit d'une base de données qui référence les lipides, leurs caractéristiques biochimiques ainsi que les méthodes d'analyse en lipidomique

L'ensemble des outils analytiques (instruments d'analyse et bases de données) sont indispensables pour la caractérisation *de novo* de composés, par conséquent très utiles pour l'analyse métabolomique.

## 2. Les métabolites spécifiques chez les Cnidaires

Le rôle fondamental des Cnidaires symbiotiques, notamment dans la construction de récifs appuie l'importance de la compréhension des interactions entre hôte et symbiote. Ces interactions passent par la production et le transfert de métabolites d'un partenaire à l'autre. Dans le contexte des produits naturels marins, un intérêt particulier est porté aux métabolites issus de la symbiose Cnidaire-*Symbiodinium* qui ne sont pas formés par les organismes séparément (Lewis et Smith 1971). L'étude de métabolites chez les Cnidaires a permis de recenser plus de 3000 composés, dont environ 90% proviennent d'études sur la classe des Anthozoaires, et principalement des Octocoralliaires (Kornprobst 2014). Leur relation symbiotique avec des Dinoflagellés soulève une difficulté supplémentaire qui est de déterminer l'origine de ces métabolites. Cette contrainte n'est cependant pas unique, puisqu'une grande majorité d'invertébrés marins vivent en symbiose.

Au sein de la classe des Anthozoaires, les Hexacoralliaires sont caractérisés par la présence d'un grand nombre de venins, toxines et pigments (Salih et al. 2000). Ils sont particulièrement riches en composés azotés, contrairement aux Octocoralliaires (Kornprobst 2014).

### a) *Les venins et toxines*

Les venins sont définis comme étant des « sécrétions complexes composés de plusieurs constituants actifs, incluant une variété de toxines et substances associées qui facilitent le processus d'envenimation » (Turk et Kem 2009). Ce ne sont pas strictement des métabolites mais un grand intérêt a été porté à l'étude de leur composition, particulièrement au sein des cnidocytes, véritables organes de prédation. Les toxines issues de ces venins peuvent être de nature peptidique, ou non.

- **Toxines peptidiques** : elles sont le plus souvent isolées d'anémones de mer. La taille de ces toxines est très variable, puisque certaines neurotoxines par exemple peuvent dépasser 60 kDa (Sánchez-Rodríguez et Cruz-Vazquez 2006). Elles font souvent l'objet d'inventaires (Grimmelikhuijzen et al. 2002). Les plus répandues sont les neurotoxines (Honma et al. 2005 ; Ständker et al. 2006), les neuropeptides (Grimmelikhuijzen et al. 2002), les cardiotoxines (Simpson et al. 1990) ou les cytolysines (Zorec et al. 1990). Ces dernières forment des pores au niveau des membranes cellulaires, perturbant la balance ionique de la cellule (Parker 2003).

- Toxines non-peptidiques** : la plus connue d'entre elles est la palytoxine, découverte chez un zoanthaire du genre *Palythoa* en 1971 (Moore et Sheuer 1971) et dont la structure a été décrite en 1982 (Cha et al. 1982). Il s'agit d'un vasoconstricteur puissant (Deeds et Schwartz 2010), constituant un des métabolites non-peptidiques les plus toxiques connus. En réalité, plusieurs dérivés de palytoxine ont ensuite été décrits, tels que la néopalytoxine ou l'homopalytoxine (Uemera et al. 1985). Leur ressemblance avec d'autres toxines isolées de Dinoflagellés, par exemple les zooxanthellamides (Onodera et al. 2003 ; 2004a) ou les zooxanthellatoxines (Nakamura et al. 1993) isolées de *Symbiodinium*, suggère une origine biosynthétique commune (Gleibs et al. 1995 ; Taniyama et al. 2003). L'origine de ces dernières est encore aujourd'hui non-élucidée. La [Figure 18](#) compare la structure de la palytoxine à celles de zooxanthellamides.

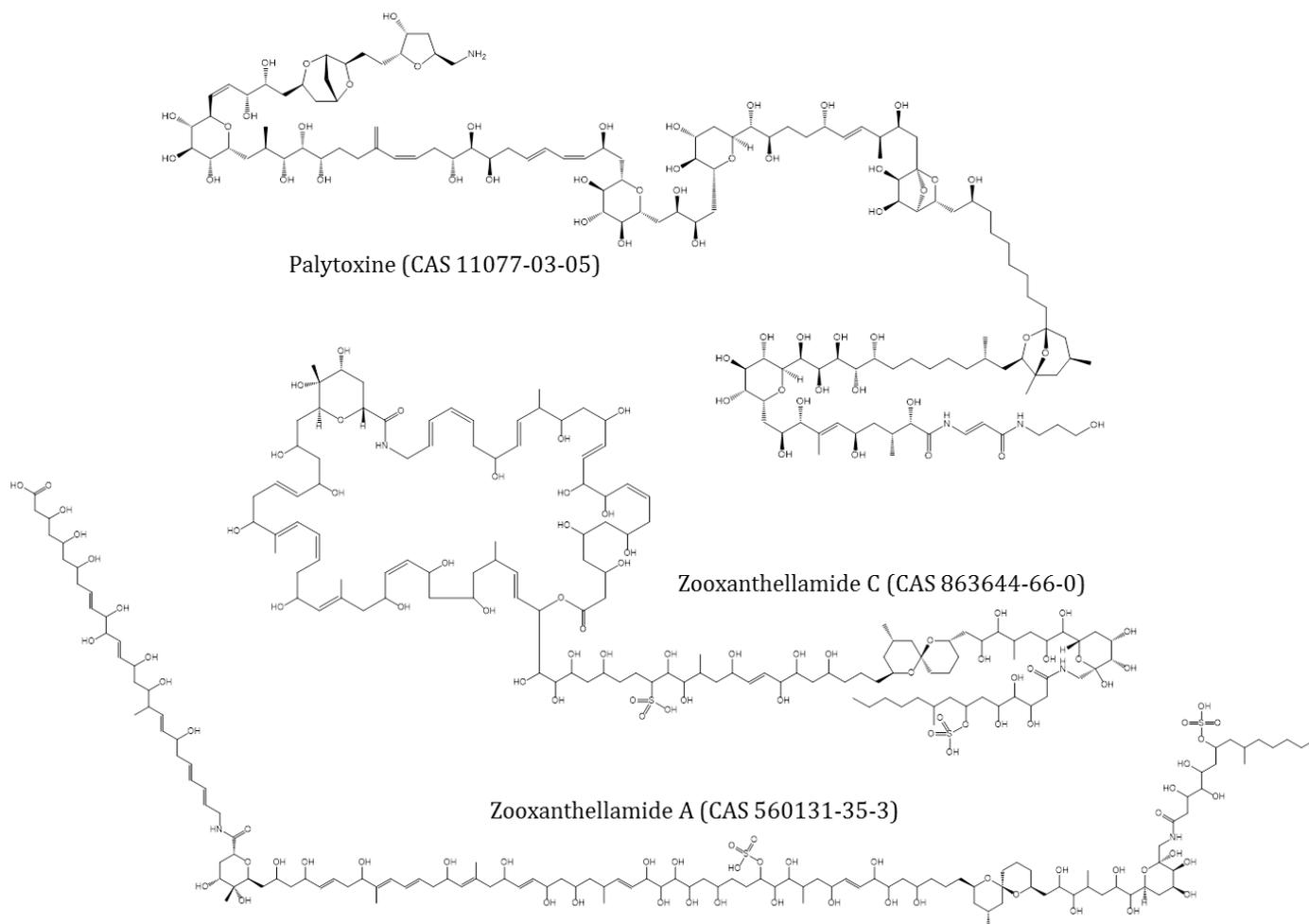


Figure 18 Structures de la palytoxine, la zooxanthellamide C et la zooxanthellamide A, ainsi que leurs références CAS associées.

## b) Pigments

Parmi les pigments, sont distingués les composés fluorescents (alcaloïdes, mycosporines), des pigments accessoires de la photosynthèse, tels que les caroténoïdes. Ces derniers collectent la lumière pour la transférer à la chlorophylle, et ont un rôle photoprotecteur. Les Anthozoaires possèdent des chromoprotéines photoprotectrices, telles que la famille des Green Fluorescent Protein (GFP, D'angelo et al. 2008, Smith et al. 2013).

- **Alcaloïdes** : les Anthozoaires renferment de nombreux alcaloïdes fortement fluorescents. Parmi les dérivés hétéroaromatiques on distingue la zoanthoxanthine, la zoanthamine, la norzoanthamine et la zooxanthellamine. La structure de ces alcaloïdes est présentée dans la Figure 19. A titre d'exemple, la zoanthoxanthine isolée de Zoanthaires en 1974 (Cariello et al. 1974), possède plus d'une douzaine de dérivés connus à ce jour (en revue dans Behenna et al. 2008). Certains sont des inhibiteurs d'enzymes : la succinate déshydrogénase (Cariello et Tota 1974) intervient par exemple dans le cycle de Krebs. La zoanthamine, isolée de *Zoanthus* sp. (Rao et al. 1984), est un composé cytotoxique et antiinflammatoire alors que la norzoanthamine possède des propriétés anti-ostéoporose (Kuramoto et al. 1998). La biosynthèse de ces composés serait initiée par la synthèse des polycétides (Behenna et al. 2008). La zooxanthellamine, isolée de *Symbiodinium* spp. libres dans la colonne d'eau, possède une structure très proche de celle des zoanthamines, suggérant que l'ensemble de ces alcaloïdes présents chez des Cnidaires seraient dérivés des symbiotes.

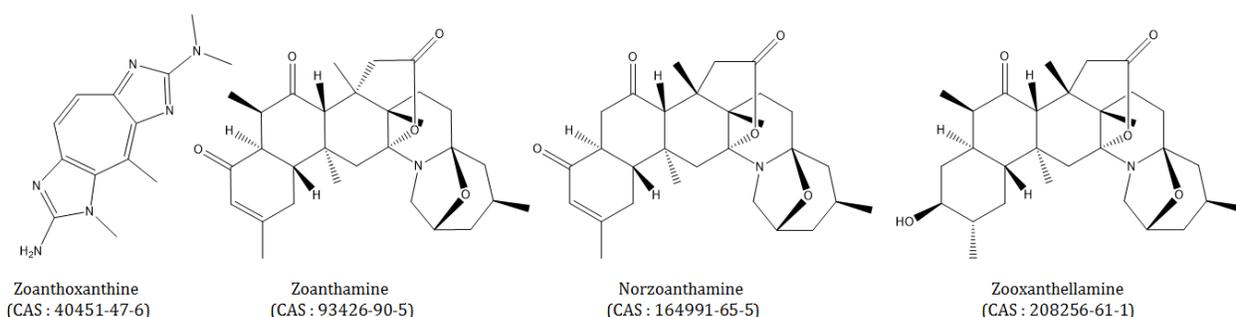


Figure 19 Structures de la zoanthoxanthine, la zoanthamine, la norzoanthamine et la zooxanthellamine, ainsi que leurs références CAS.

- Les MAAs** : les acides aminés ressemblant à des mycosporines (en anglais, Mycosporine like Amino Acids, MAAs) sont des dérivés d'acides aminés caractérisés par un chromophore cyclohexanone ou cyclohexenimine, et seraient synthétisés *via* les voies de synthèse des acides aminés, telles que celle de l'acide shikimique (conduisant à la synthèse de tryptophane, phénylalanine et tyrosine, Dunlap et Shick 1998). Quelques exemples de MAAs sont présentés dans la [Figure 20](#). Ce sont des antioxydants et photoprotecteurs, essentiels pour défendre les Cnidaires contre les radiations UV. Encore une fois, leur origine dans la symbiose n'est pas claire, puisque des MAAs ont été isolés de *Symbiodinium* en culture appartenant au clade A mais pas dans les clades B et C (Banaszak et al. 1995), alors qu'ils ont été retrouvés chez des anémones de mer aposymbiotiques, du genre *Anthopleura* (Shick et al. 2002), ou *Aulactinia marplatensis*, *Oulactis muscosa* et *Anthothoe chilensis* (Arbeola et al. 2010), mais pourraient provenir de la prédation.

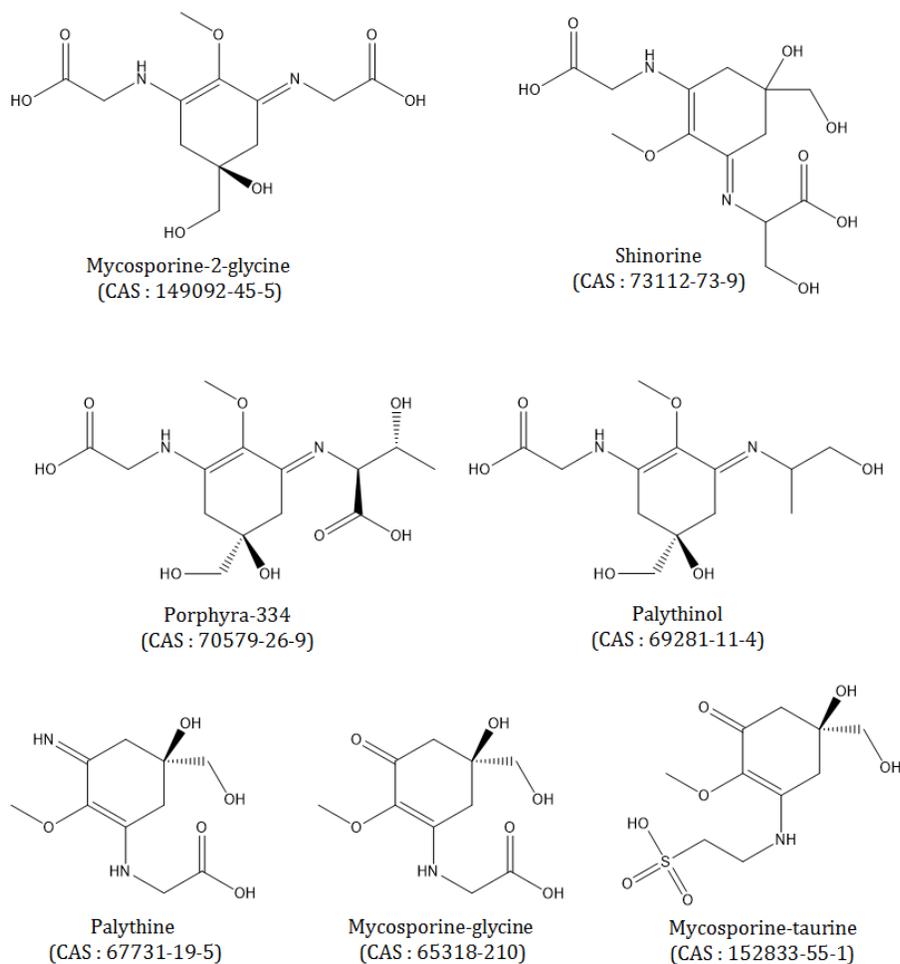


Figure 20 Structures de MAAs isolés d'anémones de mer, ainsi que leurs références CAS associées. D'après Shick et al. 2002 et Arbeola et al. 2010.

- **Les caroténoïdes** : très représentés chez les anémones de mer, on y distingue ceux d'origine animale et ceux spécifiques de Dinoflagellés. L'anémone de mer *Actinia equina*, encore appelée « tomate de mer », est riche en actinioérythrine (Maoka 2011). Ce pigment rouge possède une structure similaire à celle de l'astaxanthine, retrouvé chez des crustacés, mais aussi chez d'autres anémones de mer telles qu'*Anemonia viridis* (Czeczuga 1972). Le pigment majeur chez *A.viridis* est la périдинine, issue de ses symbiotes *Symbiodinium spp.* La structure de ces pigments est présentée dans la Figure 21.

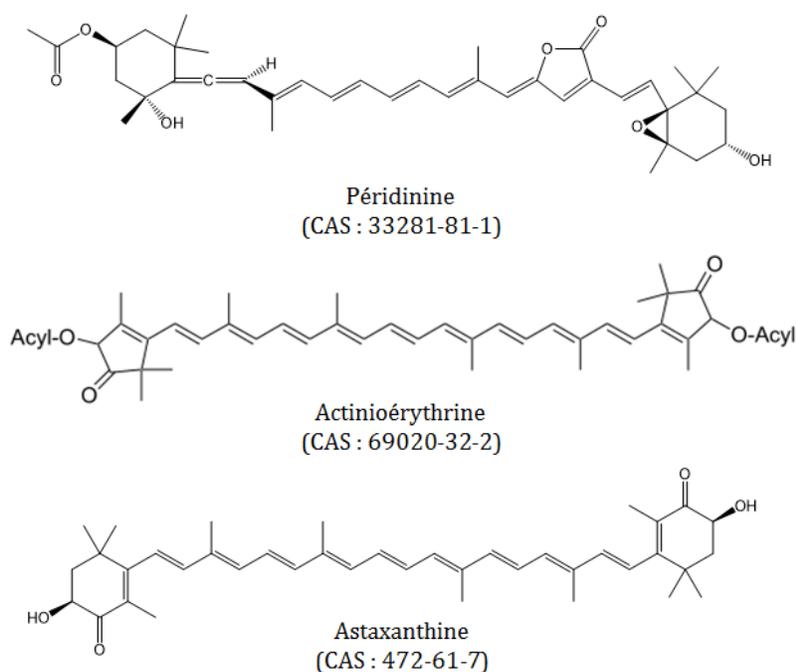


Figure 21 Structures de la périдинine, l'actinioérythrine et l'astaxanthine, ainsi que leurs références CAS associées).

- **Les bétaines** : ce sont des composés synthétisés à partir d'acides aminés, dont quelques exemples sont présentés dans la Figure 22. Ces composés zwitterioniques à pH neutre jouent principalement un rôle dans la régulation de la pression osmotique (Gebser et Pohnert 2013) et sont communs à un grand nombre d'invertébrés marins, tels que les crustacés (Dall 1971), les mollusques (Affeld 2006) ou les éponges (Cafieri et al. 1998). Ils sont polaires, et peuvent donc diffuser librement dans l'eau de mer. Une activité antifouling (Targett et al. 1983) de certains de ces composés a été démontrée. La trigonelline inhibe par exemple la croissance de la balane *Balanus amphitrite* (un crustacé) à une concentration minimale inhibitrice de 2-10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Kawamata et al. 1994).

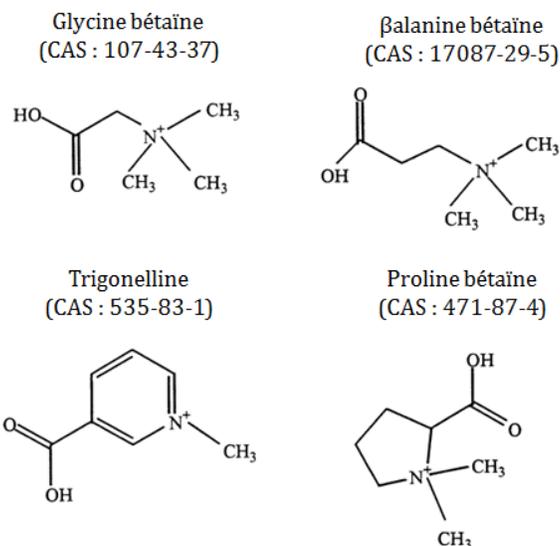


Figure 22 Structure de la glycine bêtaïne, la  $\beta$ -alanine bêtaïne, la trigonelline et la proline bêtaïne, ainsi que leurs références CAS.

Une multitude de composés non azotés ont pu être identifiés chez les Cnidaires symbiotiques. Par exemple, certaines espèces sont caractérisées par une forte diversité en stérols méthylés en position C<sub>4</sub>, les 4 $\alpha$ -méthylstérols, témoins de la présence de Dinoflagellés. Le dinostérol est le plus connu d'entre eux, et souvent majoritaire chez les gorgones (Kokke et al. 1981) ou Dinoflagellés libres dans la colonne d'eau (Leblond et al. 2006). Plus de 200 stérols et stéroïdes ont été isolés de coraux mous (Sarma et al. 2009). Certains stérols, les nébrostéroïdes, possèdent des propriétés antiinflammatoires (une injection de 10  $\mu$ M du nébrostéroïde E inhibe la fixation d'anticorps Cox-2 et iNOS sur des protéines de macrophages de respectivement 26,1% et 100% ; Huang et al. 2008).

L'ensemble des composés cités ci-dessus ne forme qu'une petite partie des métabolites identifiés de Cnidaires. Par une approche métabolomique, l'enjeu est aujourd'hui de définir l'origine de ses composés ainsi que leurs transferts potentiels entre hôte et symbiotes.

### 3. *La communication moléculaire entre Cnidaires et Dinoflagellés*

L'étude de la communication moléculaire entre hôte et symbiotes pose 3 questions majeures, qui sont (i) la nature des composés transférés entre hôte et symbiote ; (ii) le contrôle ces transferts ; et (iii) l'apport de ces transferts pour l'hôte (d'après Davy et al. 2012). Il serait difficile

de se focaliser sur une seule de ces questions, chacune étant liée à l'autre et nécessaire dans la compréhension de la relation symbiotique.

La première mise en évidence de transfert moléculaire entre Cnidaire et Dinoflagellés date de 1958, sur l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima*, à partir de marquage isotopique au  $^{14}\text{C}$  (Muscatine et Hand, 1958). Les auteurs émettent pour la première fois l'hypothèse que l'hôte puisse métaboliser les photosynthétats excédentaires de ses symbiotes. De nombreuses équipes ont ensuite cherché à quantifier les photosynthétats transférés (par exemple, Muscatine et al. 1981 ; Davy et al. 1997 ; Sutton et Hoegh-Guldberg 1990), et ont montré que selon les méthodes appliquées et les modèles utilisés, il existait une grande disparité dans les mesures effectuées. Si chaque étude a pu déterminer qu'il existait bien une part de photosynthétats transférés, leur proportion varie entre 5% (Hofman et Kremer 1981) et 98% (Davy et al. 1996) des produits issus de la photosynthèse. Par exemple, des comptages par autoradiographie montrent qu'elle serait supérieure à 60% chez l'anémone de mer *A. viridis* (Taylor 1969) ; des calculs basés sur le taux de photosynthèse brute l'évaluent entre 19 et 32% les jours de beau temps chez des coraux tropicaux (Davies 1991).

A partir de la fin des années 1960, ces échanges à la base de ce que l'on appelle aujourd'hui communication moléculaire, furent totalement acceptés (par exemple, Von Holt et Von Holt 1968 ; Cernichiari et al. 1969). Un intérêt particulier a porté à cette époque sur le rôle des symbiotes dans le budget énergétique de l'hôte, de par le transfert des produits issus de la photosynthèse, leur devenir chez l'hôte, ainsi que le recyclage des produits du métabolisme. Les travaux de Trench en 1971 basés sur l'incorporation de  $^{14}\text{C}$  chez *Anthopleura elegantissima* et *Palythoa townsendi*, tous deux symbiotiques, ont permis de répondre à certaines de ces questions. Ses travaux ont permis de déterminer que les principaux photosynthétats transférés à l'hôte sont des protéines et des lipides (Trench 1971a). Une seconde étude démontra que des symbiotes isolés cultivés *in vitro* sécrètent plus de métabolites lorsqu'ils sont mis en présence d'un homogénat tissulaire de l'hôte, et inversement, un hôte aposymbiotique augmente sa production de métabolites lorsqu'il est infecté par des symbiotes (Trench 1971b). Enfin, une troisième étude a pu établir que des symbiotes isolés d'hôtes issus d'espèces différentes sécrètent des composés en proportions variables (Trench 1971c). Ces découvertes pointent alors vers deux perspectives de recherche importantes : les *Symbiodinium* constituent un groupe divers non monospécifique, et l'hôte joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme de ses symbiotes, par la libération de molécules appelées facteurs de l'hôte (en anglais, Host Release Factors, HRF). Malgré un nombre important d'études, l'identification

et le recensement des HRFs restent incomplets (Grant et al. 1998 ; Suescún-Bolívar et al. 2012). Des acides aminés libres, tels que la glycine ou l'alanine, ont été proposés comme étant les principaux HRFs chez les Cnidaires (Gates et al. 1995 ; Cook et Davy 2001), mais leur action semble varier selon le groupe taxonomique étudié (Withers et al. 1998).

La nature des composés échangés dans la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés semble correspondre majoritairement à des apports trophiques. La plupart des composés échangés sont des nutriments (Figure 23), sous forme principalement de lipides, sucres et acides aminés (en revue dans Gordon et Leggat 2010). Les Cnidaires symbiotiques sont d'ailleurs connus pour être très riches en lipides (jusqu'à un tiers de la masse sèche du Cnidaire), très probablement grâce à un apport soutenu en lipides ou précurseurs provenant de leurs symbiotes. Un marquage isotopique ( $^{14}\text{C}$ ) a permis de mettre en évidence que la biosynthèse des lipides était très majoritaire dans le compartiment symbiotique chez le corail *Pocillopora capitata*. Un premier transfert sous forme d'acétate de sodium serait effectué de l'hôte vers les *Symbiodinium*, à partir desquels seraient synthétisés les acides gras et lipides plus complexes, dont une grande partie serait transférée vers leur hôte (Patton et al. 1977). Les travaux de Patton et son équipe ont ouvert une nouvelle voie de recherche, considérant que les triglycérides seraient transférés *via* des « lipid bodies » (LBs), des gouttelettes lipidiques, analysées plus en détails quelques années plus tard (Kellogg et Patton, 1983). Ces vésicules sont constituées d'un cœur de lipides neutres apolaires, tels que des triglycérides, diglycérides ou esters d'AG, entourés d'une membrane monocouche de phospholipides, stéroïdes et glycolipides, et de protéines. Ces organelles ne sont pas spécifiques des Cnidaires, elles sont par exemple retrouvées en grand nombre dans les adipocytes ou les tissus graisseux des animaux. En plus de leur rôle de transport, les LBs sont impliquées dans divers processus cellulaires tels que la signalisation cellulaire ou la vision (Imanishi et al. 2004 ; Umlauf et al. 2004).

La sécrétion de ces vésicules *in hospite* par des cellules de *Symbiodinium* a ensuite été formellement démontrée (Muscatine et al. 1994). Leur formation peut donc se faire directement par les *Symbiodinium*, mais aussi par le réticulum endoplasmique (RE) des cellules gastrodermiques de l'hôte (Peng et al. 2011). La spécificité des LBs dans le transport de lipides chez les Cnidaires a été analysée plus en détails, et une corrélation entre la composition des gouttelettes lipidiques et l'état symbiotique (sain ou rendu aposymbiotique) a pu être mise en évidence chez le corail *Euphyllia glabrescens* (Luo et al. 2009). De plus, la densité en LBs semble suivre une rythmicité circadienne (Chen et al. 2012), reflétant une dépendance du statut symbiotique du Cnidaire.

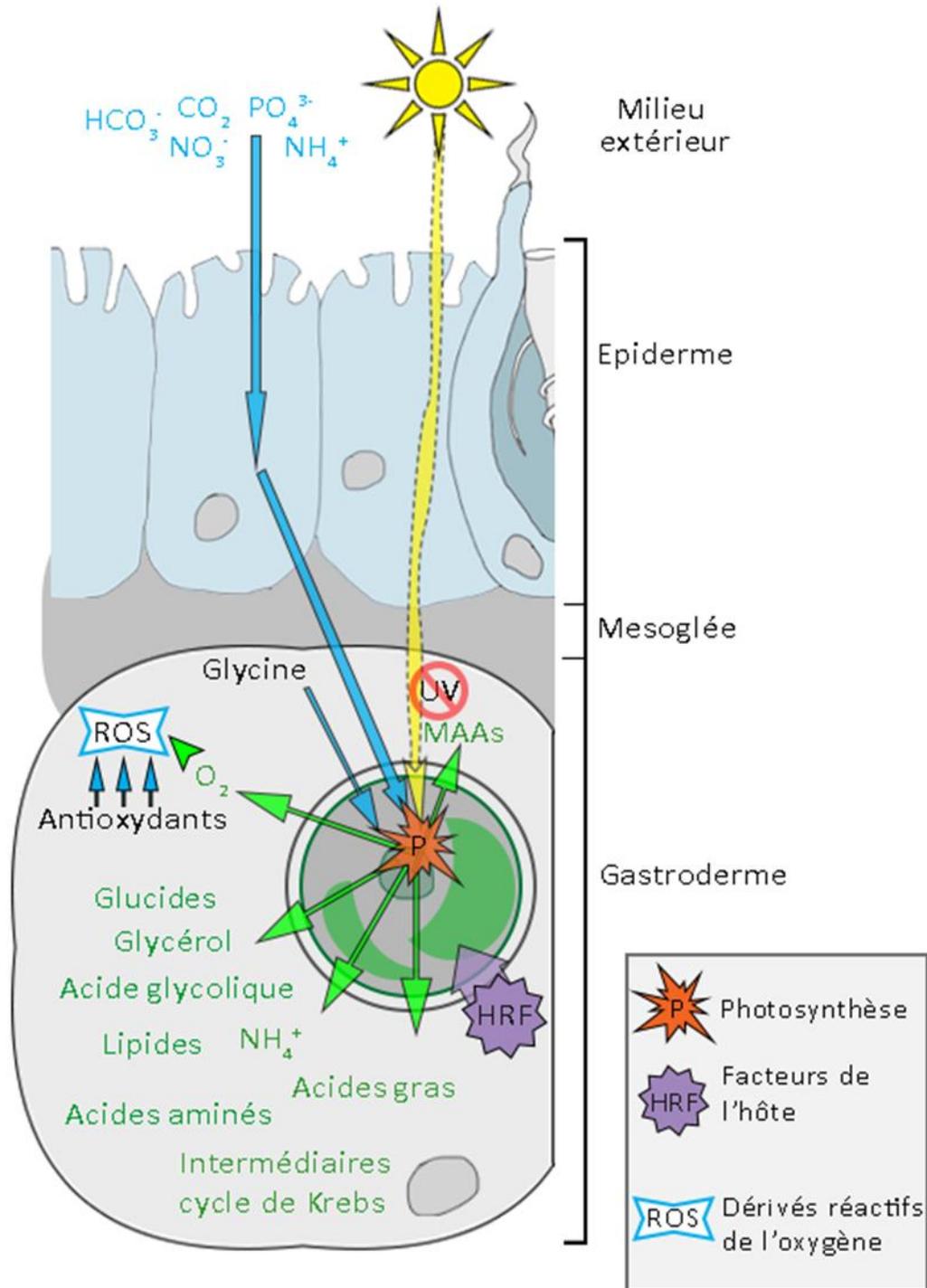


Figure 23 Représentation schématique de la communication entre Cnidaire et Dinoflagellés, ainsi que les moyens mis en œuvre pour maintenir un partenariat stable. MAAs : acides aminés dérivés des mycosporines. Modifié d'après Gordon et Leggat. 2010).

L'importance dans le transfert de lipides entre Cnidaire et Dinoflagellés est expliquée par le fait que la synthèse des AGs, unité des lipides, est différente entre le règne animal et le règne végétal. Les animaux ne possèdent en général pas l'enzyme permettant d'introduire des insaturations au-delà de la position  $\Delta 9$ , nécessaires pour la synthèse des AG essentiels 18:2n-6 et 18:3n-3 (Bachok et al. 2006 ; Dewick 2009) et polyinsaturés à longue chaîne de la série des n-3 et n-6 (Volkman et al. 1989). De la même manière, les animaux ne possèdent pas le squalène, unité de base de la synthèse des stérols. Ils doivent par conséquent obtenir ces composés par la prédation (Sargent et al. 1990 ; Bergé et Barnathan 2005), ou, dans le cas de certains Cnidaires, par la symbiose. La signature en AG et lipides d'espèces marines a souvent été étudiée dans le but de définir des marqueurs trophiques (par exemple, Lee et al. 1971 ; Sargent 1976 ; Mayzaud 1999, Ramos et González-solis 2012). Dans le cas des Cnidaires, l'intérêt est porté vers la compréhension du rôle symbiotique, et de nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'identifier les lipides et AGs transférés du symbiote vers l'hôte. Pour cela, certaines études ont entrepris la comparaison des profils lipidiques de Cnidaires symbiotiques et aposymbiotiques (Bachok 2006 ; Garrett et al. 2013) ou stressés (Zhukova et Titlyanov 2003; Treignier et al. 2008) et ont pu démontrer une altération du contenu lipidique lors d'un stress, donc un apport de la symbiose sur le lipidome de l'hôte. De plus, le contenu lipidique du symbiote est différent de celui de l'hôte (Harland et al. 1993; Ward 1995), ce dernier possédant des AGs considérés comme marqueurs des algues, tel que le 18:5n-3.

La plupart des études sont concentrées sur les transferts symbiotes vers hôte, mais presque rien n'est connu sur l'apport de l'hôte. Pourtant, l'apport trophique de l'hôte passe aussi par l'hétérotrophie. Récemment, un transfert d'AG dans ce sens a été démontré (Imbs et al. 2014). Des études sur l'incorporation de  $^{35}\text{S}$  suggèrent un transport de protéines de l'anémone de mer *Aiptasia* vers ses symbiotes (Cook 1971 ; Steen 1986). De plus, il est connu que l'apport externe de nutriments par la prédation augmente la densité de symbiotes et leur concentration en chlorophylle (Ferrier-Pagès et al. 2003 ; Houlbrèque et al. 2004) et le taux de photosynthèse (Davy et al. 2006).

La diversité de Cnidaires symbiotiques est immense. En effet, certains organismes sont tropicaux, d'autres tempérés ; certains possèdent un squelette calcaire, d'autres non ; mais surtout ils abritent une diversité de Dinoflagellés considérable et spécifique de l'espèce. Il n'y a toujours pas de certitude concernant les composés majeurs échangés dans la symbiose, très peu de connaissances sur les composés mineurs, et les transferts moléculaires de l'hôte vers les symbiotes commencent juste à être élucidés. Le challenge actuel est donc de recenser des points communs à l'ensemble de ces populations, d'étudier leur communication et leur réponse au stress au niveau moléculaire.

## IV. Contexte de l'étude

### 1. L'équipe SYMAR et son modèle d'étude

L'amplification des phénomènes de blanchissement, principalement chez les coraux constructeurs de récifs, n'est plus à prouver. De nombreuses études recensent régulièrement des épisodes de blanchissement massifs chez les Anthozoaires (Hoegh-Guldberg 1999 ; Miller et al. 2009 ; Guest et al. 2012), menacés par les changements climatiques actuels. Malheureusement, les phénomènes physiologiques et moléculaires qui régissent la symbiose et mènent à sa rupture sont encore mal connus. Ces dernières décennies, de nombreuses équipes de recherche ont centré leurs efforts sur l'étude de mécanismes moléculaires responsables de la perte des symbiotes.

Pour comprendre les relations symbiotiques entre Cnidaire et Dinoflagellés, l'équipe SYMBiose MARine (SYMAR) s'attache à étudier les mécanismes d'établissement, de maintien et de rupture de cette association à partir d'un modèle ciblé et d'une manière pluridisciplinaire : du gène à la population. Des travaux sont réalisés afin de mettre au point des marqueurs génétiques de polymorphisme. Des cellules épidermiques et gastrodermiques de Cnidaires ont pu être mises en culture plusieurs semaines, afin d'obtenir des cellules épithéliales indifférenciées (Barney-Verdier et al. 2013). Des stratégies d'adaptation à la vie en symbiose ont été démontrées, et l'implication de processus cellulaires tels que le stress oxydant et des cascades de type apoptotique ont pu être établis dans l'induction d'un stress menant au blanchissement (Richier et al. 2005 ; Richier et al. 2006 ; Merle et al. 2007). Par des approches en transcriptomique (micro-puce à ADN) et protéomique, les travaux de l'équipe SYMAR tentent d'appréhender plus globalement le dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Sabourault et al. 2009 ; Ganot et al. 2011 ; Moya et al. 2012).

Pour l'ensemble de ces études, le modèle d'étude choisi est l'anémone de mer symbiotique de Méditerranée *Anemonia viridis* (Forsk. 1775, [Figure 24](#)). Il s'agit d'un organisme solitaire et non calcifiant, très répandu en Méditerranée, mais aussi dans l'océan Atlantique, la Manche et la mer du Nord. *A. viridis* possède de nombreux avantages pour l'étude de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés. Contrairement aux Anthozoaires symbiotiques tropicaux, *A. viridis* établit une symbiose stable avec des Dinoflagellés *Symbiodinium spp.* appartenant tous au clade A' ou « A tempéré », le clade dominant en mer Méditerranée (Visram et al. 2006). L'homogénéité des symbiotes est un critère indispensable pour une cohérence dans l'interprétation de données physiologiques, cellulaires et moléculaires.



Figure 24 Photo d'un individu *A. viridis* maintenu en aquarium au laboratoire Symbiose Marine

Tandis qu'un polype de corail a une taille de quelques millimètres seulement, *A. viridis* peut atteindre 20 cm de diamètre et possède jusqu'à 200 tentacules pouvant mesurer 20 cm de long (Figure 24). Ces tentacules sont non-rétractiles contrairement à la plupart des Anthozoaires, et peuvent se régénérer. Il est donc possible de réaliser une étude cinétique par prélèvement de tentacules. La quantité de matériel biologique disponible permet de mettre en place des études cellulaires, physiologiques ou moléculaires, difficiles à réaliser chez d'autres Anthozoaires (coraux ou anémone de mer modèle *Nematostella vectensis*) sans rassembler le matériel issu de nombreux individus.

A partir du prélèvement d'un tentacule, il est possible de séparer les deux compartiments cellulaires animaux (épiderme et gastroderme), et d'isoler les symbiotes des cellules du gastroderme facilement et rapidement, sans contamination significative. Ces techniques de séparation ont été validées avec succès dans plusieurs études publiées au laboratoire (Richier et al. 2005 ; Richier et al. 2006; Merle et al. 2007; Ganot et al. 2011; Moya et al. 2012). Les symbiotes isolés peuvent être mis en culture (Figure 25) afin d'étudier l'apport de la symbiose spécifiquement sur le clade A' tempéré de l'espèce *Symbiodinium spp.*

Enfin, il est possible d'induire un blanchissement par différents stress, et de maintenir des individus blanchis en aquarium durant plusieurs années, permettant de comparer l'état symbiotique et aposymbiotique d'un même individu (Richier et al. 2006 ; Moya et al. 2012 ; Dani et al. 2014).



Figure 25 Cultures de *Symbiodinium spp.* au laboratoire Symbiose Marine

La taille des individus, leur capacité à se régénérer, la possibilité de séparer les différents compartiments animaux, l'homogénéité des symbiotes et leur culture, et le maintien d'individus aposymbiotiques sont autant d'avantages offerts par *A. viridis* qui justifient pleinement le choix de ce modèle de laboratoire.

## 2. Etudes préliminaires

Des études de transcriptomique réalisées au sein de l'équipe (Sabourault et al. 2009), ont permis l'identification et la comparaison de l'expression des transcrits chez *A. viridis* entre les cellules des compartiments épidermique et gastrodermique (Ganot et al. 2011), ainsi que dans des conditions symbiotique et aposymbiotique, par l'induction d'un stress par augmentation de la température et/ou des UV (Moya et al. 2012). Les outils développés ont permis d'appréhender un dialogue moléculaire entre hôte et symbiotes, en identifiant des voies de communication contribuant à l'association symbiotique. Ces études démontrent l'implication de protéines clés dans l'interaction hôte-symbiote. Localisées à l'interface symbiotique, ces protéines ont été reconnues comme étant potentiellement engagées dans un dialogue moléculaire hôte-symbiote.

Par exemple, la protéine NPC2 (Nieman-Pick C2) est une protéine qui, chez l'humain a un rôle dans le transport intracellulaire de lipides tels que des stérols (Ko et al. 2003 ; Cheruku et al. 2006). Chez les Cnidaires, le gène NPC2 est dupliqué 3 fois, les copies étant notées de a à d. Parmi ces copies, le gène AvNPC2-d apparait surexprimé dans le compartiment gastrodermique (compartiment symbiotique) par rapport au compartiment épidermique, et réprimé dans des

conditions de stress entraînant une rupture de la symbiose (Dani et al. 2014). Une part des transferts de lipides entre les partenaires symbiotiques semble donc être régulée par un transport actif entre les compartiments cellulaires, mais aussi modifiée par un stress. Il est établi que les lipides chez *A. viridis* sont caractérisés par une grande proportion de lipides membranaires (Harland et al. 1991 ; Capron et al. 2010) en comparaison avec les Cnidaires tropicaux. La concentration de ces lipides semble alors être régulée par l'apport lumineux (Harland et al. 1992), donc par les symbiotes. A partir de l'ensemble de ces résultats, l'hypothèse d'une régulation fine de la synthèse et du transfert de lipides entre les acteurs de la symbiose est formulée.

Afin d'éclaircir ces mécanismes, le projet ANR « inSIDE », pour « Symbiotic Interface of a cnidarian-Dinoflagellate Endosymbiosis », dirigé par le Dr. Cécile Sabourault, a pour but de contribuer à mieux comprendre les mécanismes régulant l'interaction symbiotique chez les Anthozoaires, tant par un aspect physiologique (mécanismes de reconnaissance hôte-symbiote), que moléculaire (communication moléculaire aux niveaux génétique, protéomique et métabolomique).

Dans ce cadre, le projet de recherche s'est articulé sur trois axes principaux : (i) démontrer l'implication de protéines cibles dans le fonctionnement de la symbiose, (ii) caractériser les protéines localisées à l'interface d'échange, et (iii), identifier de nouveaux médiateurs moléculaires, lipides et autres métabolites.

### **3. Description et objectifs du projet de thèse**

Le projet de thèse qui m'a été confié repose sur le troisième axe de l'ANR inSIDE, ayant pour principal objectif la caractérisation et la distribution des médiateurs chimiques impliqués dans le maintien et la rupture de la symbiose. L'ensemble des objectifs du projet de thèse est schématisé dans la Figure 26.

La première partie de cette étude ([Chapitre 2](#)) repose sur la caractérisation des médiateurs chimiques composant *A. viridis*, ainsi que leur distribution entre les compartiments cellulaires d'origine animale (l'épiderme et le gastroderme), et les symbiotes Dinoflagellés fraîchement isolés (FIS). En parallèle, des cellules de *Symbiodinium* mises en culture (CS) ont été traitées de la même manière afin de les comparer à leurs homologues symbiotiques. Le but principal de cette partie est d'établir une base de données constituant une partie du métabolome d'*A. viridis*, mais aussi

d'étudier sa distribution entre les compartiments animaux, FIS et CS. Ce projet a été mené principalement par des techniques classiques de chimie analytique : l'extraction des métabolites et l'analyse de leurs empreintes métabolomiques, mais aussi leur séparation et caractérisation par chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, et/ou de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.

Dans un second temps, les empreintes métabolomiques de l'anémone de mer ont été comparées à celles obtenues lors de modifications de facteurs abiotiques ([Chapitre 3](#)) : une rupture de la symbiose a été induite selon la mise en place de deux stress en parallèle (thermique et chimique), et la réponse à ces différents stress a été comparée. Afin d'étudier la réponse au stress de l'hobionte, une étude métabolomique a été réalisée à partir d'un individu aposymbiotique selon la même méthodologie employée que pour l'étude du métabolome de l'individu symbiotique. Les résultats obtenus seront comparés à la base de données réalisée dans le Chapitre 2. Parallèlement, des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse ont été mises au point sur des coupes transversales de tentacules afin d'obtenir une localisation fine des métabolites caractérisés, qui a pu être suivie lors d'une cinétique de stress menant au blanchissement.

Des hypothèses de transferts de certains composés entre hôte et symbiotes ont été émises sur la base des résultats obtenus ; un effort particulier a été fourni dans la purification et la caractérisation de stérols, dans l'objectif d'étudier leur interaction possible avec la protéine AvNPC2-d par l'intermédiaire d'expériences de modélisation et docking *in silico*, ainsi que des interactions *in situ* par SPR (surface plasmon resonance)

L'ensemble de cette étude a pour objectif principal d'étudier la distribution des médiateurs chimiques de l'anémone de mer symbiotique *A. viridis*, et d'identifier leur réponse face à un stress menant à la rupture de la symbiose.

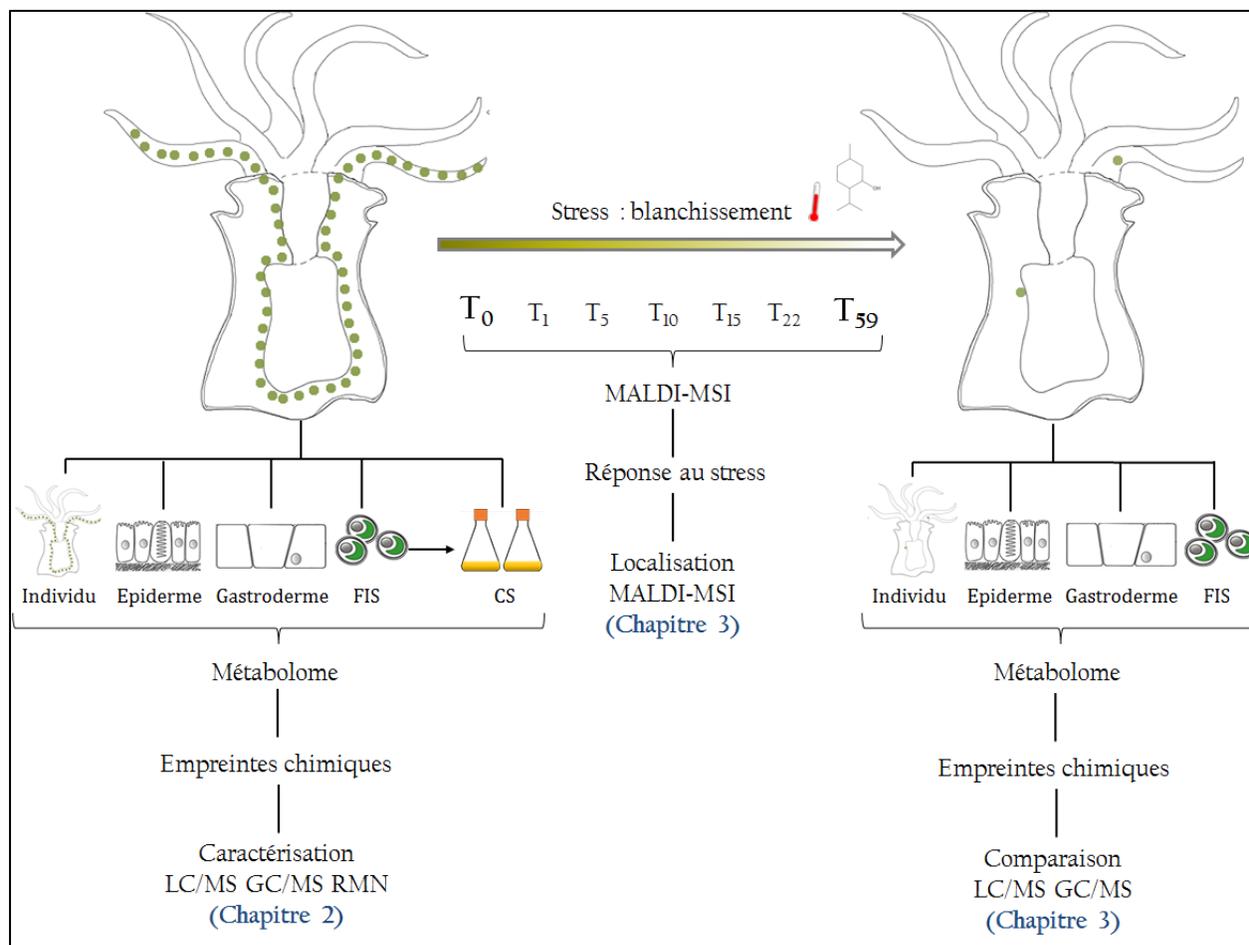


Figure 26 Schéma bilan de la méthodologie mis en place pour l'étude des médiateurs chimiques dans la symbiose entre *A. viridis* et *Symbiodinium* spp. FIS : cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées ; CS : cellules de *Symbiodinium* mises en culture.

## **Chapitre 2 : Caractérisation et distribution des médiateurs chimiques chez *A. viridis***

---



## I. Introduction

Les cnidaires symbiotiques, de par leur importance écologique majeure, ont été largement étudiés. La stabilité de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés est centrée sur les échanges trophiques entre les partenaires et implique une communication moléculaire intime et complexe. Les études récentes se sont plutôt focalisées sur le recyclage des nutriments au sein de la symbiose, leur identification (Whitehead et Douglas 2003 ; Bachar et al. 2007 ; Kopp et al. 2015), ainsi que les modifications engendrées sur ces échanges lors d'un stress menant à la perte de la symbiose (Kneeland et al. 2013 ; Kopp et al. 2013 ; Baumann et al. 2014).

Les outils analytiques sont indispensables pour identifier les composés échangés, et comprendre le fonctionnement de l'holobionte à l'état stable. Ainsi, de nombreux métabolites essentiels au maintien de la symbiose ont pu être caractérisés, tels que des alcaloïdes ou peptides cytotoxiques (Grimmelikhuijzen et al. 2002 ; Onodera et al. 2004b ; Frazão et al. 2012), des composés antioxydants (Yakovleva et al. 2004 ; Merle et al. 2007), photoprotecteurs (Shick et al. 2002 ; Hill et al. 2010) ou des lipides (par exemple, Harland et al. 1991 ; Imbs et al. 2010b ; Dunn et al. 2012 ; Chen et al. 2015). Ces derniers sont primordiaux car ils constituent des réserves d'énergie et sont indispensables à la croissance de tout être vivant. Cependant, la biosynthèse de certains d'entre eux n'est pas possible dans le règne animal. Ainsi, la présence d'acides gras polyinsaturés de la famille des oméga-3, de certains intermédiaires de biosynthèse de stérols ou de lipides membranaires non-phosphorés dans un organisme hétérotrophe contribue à sa signature trophique ou traduit la présence de symbiotes.

Pour ces raisons, l'analyse des lipides de Cnidaires symbiotiques a fait l'objet de nombreuses publications, et leur transfert des symbiotes vers leur hôte est fortement suggéré (Papina et al. 2003 ; Dunn et al. 2012 ; Chen et al. 2015). Malgré les efforts entrepris, les investigations sur les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans ces transferts, ainsi que la nature des échanges entre hôte et symbiotes n'en sont qu'à leur début (Davy et al. 2012).

## II. Problématique scientifique et contexte de l'étude

L'étude des métabolites issus de Cnidaires symbiotiques est souvent réalisée sur une classe précise de composés, mais rarement dans son ensemble. De plus, la plupart de ces études examinent l'holobionte, mais peu intègrent l'analyse de l'hôte et des symbiotes séparément (Zhukova et Titlyanov 2003 ; Treignier et al. 2008 ; Imbs et al. 2014). En effet, les Cnidaires les plus étudiés sont des coraux constructeurs de récifs, sécrétant un squelette calcaire, et dont les polypes sont de petite taille (inférieure à 1 cm). Ces caractéristiques rendent la séparation hôte-symbiotes délicate.

L'anémone de mer *A. viridis* offre un grand nombre d'avantages pour l'étude des médiateurs chimiques dans la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés (Chapitre 1, partie IV.1, p. 57). Elle est proposée ici comme organisme modèle. *A. viridis* possède une forte proportion de lipides au sein de son métabolome, dont une majorité de lipides membranaires (Harland et al. 1991). Elle est connue pour sécréter des peptides neurotoxiques (Béress et al. 1975 ; Sanchez et al. 1996 ; Trapani et al. 2014). Par ailleurs, les pigments de l'holobionte ont été caractérisés (Czeczuga 1972).

Les travaux décrits dans ce chapitre s'attarderont sur la caractérisation des médiateurs chimiques présents chez *A. viridis* ainsi que leur distribution entre les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme) et les symbiotes. Un schéma global du plan expérimental employé est présenté dans la Figure 27.

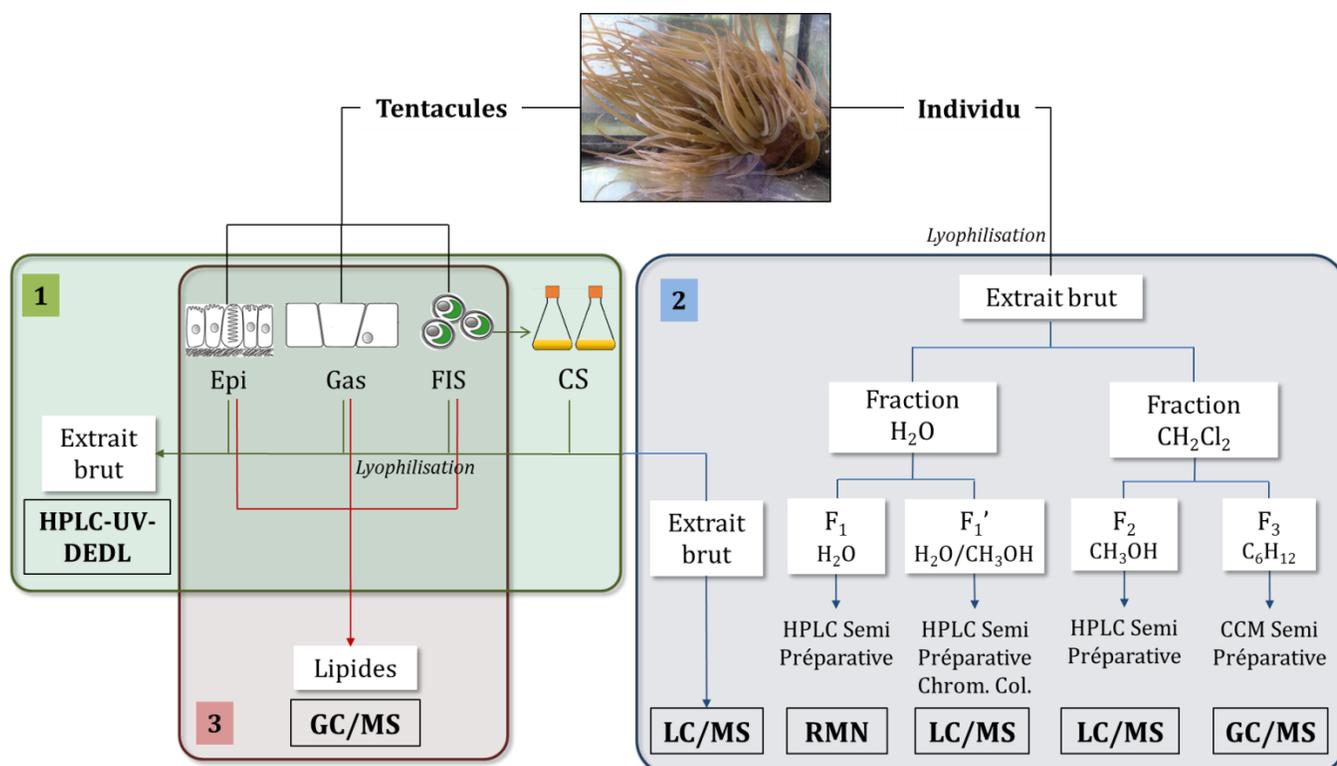


Figure 27 Schéma de la méthodologie générale d'extraction, purification et analyse des métabolites, appliqués à partir du prélèvement de tentacules ou d'individus entiers *A. viridis*. Chrom. Col. : chromatographie sur colonne ouverte

Le but principal de l'étude présentée dans ce chapitre repose donc sur deux questions : (i) quels métabolites sont présents dans l'anémone de mer *A. viridis* ; et (ii) le métabolome diffère-t-il entre les compartiments cellulaires de l'hôte et des symbiotes. Pour cela, des empreintes métabolomiques ont d'abord été réalisées par HPLC-UV-DEDL à partir de l'individu entier puis sur les différents compartiments cellulaires : l'épiderme, le gastroderme et les symbiotes, afin d'évaluer les singularités de chacun. L'empreinte métabolomique a été réalisée de façon identique sur des symbiotes isolés maintenus en culture, afin d'évaluer la modification de leur métabolome en fonction de leur état symbiotique ou libre. En fonction des variations des empreintes obtenues, une méthodologie de purification des métabolites à partir d'individus entiers a été mise en place. La caractérisation des métabolites d'intérêt a été réalisée par LC/MS, GC/MS et/ou RMN. Enfin, la caractérisation du lipidome a été entreprise pour les différents compartiments cellulaires d'*A. viridis* par GC/MS.

### III. Comparaison des profils métabolomiques d'*A. viridis*

La Figure 28 présente la méthodologie employée pour l'acquisition et la comparaison des empreintes chimiques de l'anémone de mer *A. viridis* symbiotique.

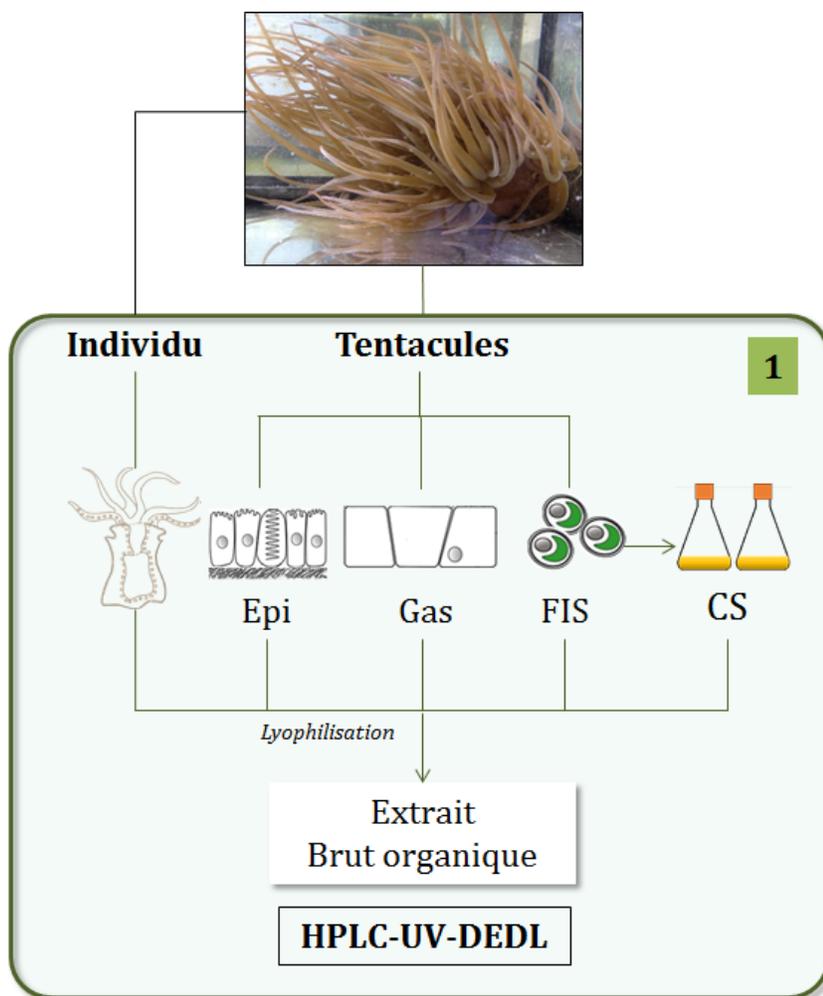


Figure 28 Schéma expérimental global de l'acquisition des empreintes chimiques dans les compartiments animaux (épiderme, Epi et gastroderme, Gas) et les symbiotes fraîchement isolés (FIS) ou mis en culture (CS).

L'ensemble des analyses a été répétée sur 6 individus (40 lots pour les *Symbiodinium* en culture), les prélèvements ont été effectués simultanément et à 10h du matin afin d'éviter les variations dues à la saisonnalité ou au rythme circadien (Crossland et al. 1980). Les empreintes chimiques réalisées révèlent une variabilité intra-spécifique, les profils chromatographiques présentent cependant des caractéristiques identiques. La variabilité ne sera donc pas prise en

compte dans l'analyse des résultats, les composés identifiés seront considérés comme absents, présents ou majoritaires dans une fraction donnée.

Des conditions chromatographiques identiques ont été mises en oeuvre pour l'analyse des extraits bruts organiques par HPLC-UV-DEDL. Pour une phase stationnaire phényl-C<sub>18</sub> et une phase mobile eau/acétonitrile + 0,1% acide formique (90:10 de 0 à 5 min, gradient linéaire de 90:10 à 0:100 de 30 à 35 min), le temps de rétention des composés est caractéristique de leur polarité. On peut ainsi distinguer :

- Les composés très polaires (temps de rétention : 0-5 min) ;
- Les composés polaires (5-20 min) ;
- Les composés de polarité intermédiaire (20-30 min)
- Les composés de faible polarité (30-45 min).

Le dernier signal à 49 min correspond à un retour aux conditions initiales.

## **1. Empreinte métabolomique sur l'individu entier**

La signature chimique des anémones de mer *A. viridis* entières a été acquise par HPLC-UV-DEDL à partir de leur extrait brut organique dichlorométhane/méthanol (Figure 29). Une comparaison des empreintes chimiques issues de différents lots d'anémones est présentée dans l'Annexe 1. L'extrait brut organique contient des composés très polaires élués dans le volume mort de la colonne aboutissant à un signal saturé en début de chromatogramme. L'ensemble de ces composés polaires sera traité dans la partie traitant sur l'analyse de la fraction aqueuse.

L'analyse du chromatogramme DEDL obtenu montre que les composés de polarité moyenne à faible sont majoritaires. Dans ces gammes de polarité, des composés tels que les lipides sont souvent retrouvés de façon prépondérante. Quelques composés polaires sont aussi présents. Chez les invertébrés marins, il est fréquent de retrouver dans cette gamme de polarité des peptides ou alcaloïdes (Chapitre 1, partie III.2.a), p. 47), souvent spécifiques d'une espèce ou famille d'organismes et considérés comme marqueurs taxonomiques. Leur bioactivité potentielle induit un intérêt grandissant dans le domaine thérapeutique.

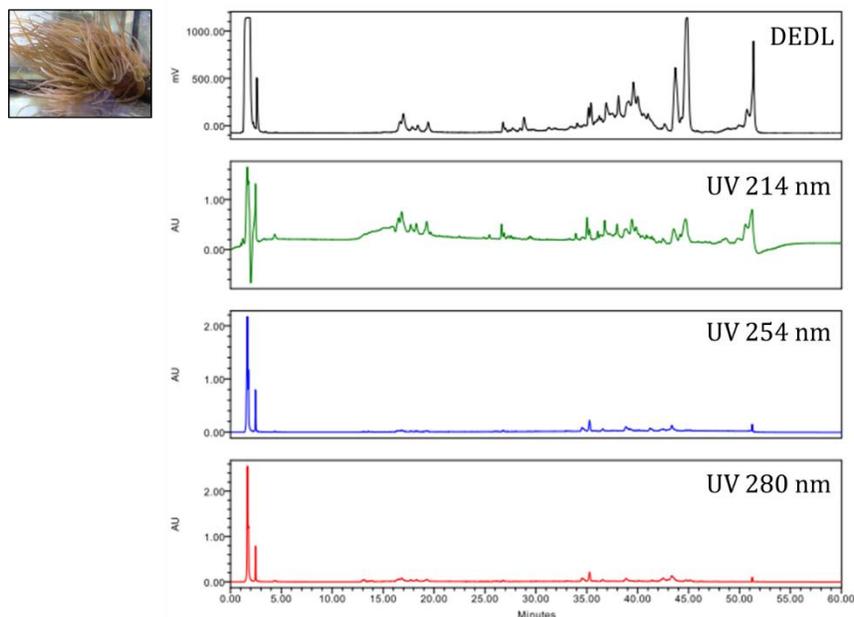


Figure 29 Chromatogramme HPLC-UV-DEDL d'un extrait brut caractéristique d'*A. viridis*. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

## 2. Analyse par compartiment cellulaire

A partir du prélèvement de 10 tentacules, l'épiderme et le gastroderme ont été séparés et la fraction symbiotique a été isolée du gastroderme (cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées, FIS). Afin de comparer leurs signatures chimiques, des empreintes métabolomiques de chaque tissu ont été obtenues par analyse HPLC-UV-DEDL à partir de leur extrait brut organique, et les profils DEDL ont été comparés (Figure 30). Des différences quantitatives sont observées entre l'épiderme et le gastroderme : les composés polaires sont surexprimés dans l'épiderme, alors que le gastroderme semble plus riche en composés moyennement polaires. Les composés peu polaires sont aussi différemment exprimés, ils contiennent un composé très majoritaire dans l'épiderme. Les FIS présentent un profil complètement différent, et ne possèdent presque pas de composés polaires, ni peu apolaires.

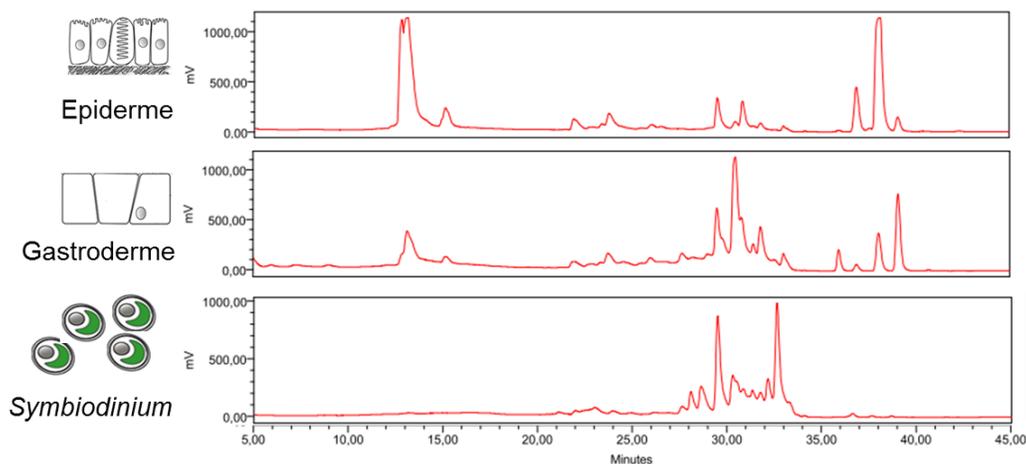


Figure 30 Chromatogrammes HPLC-DEDL des extraits bruts caractéristiques des différents tissus de l'anémone *A. viridis*. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min.

### 3. Empreintes métabolomiques de *Symbiodinium spp. symbiotiques et de culture*

L'empreinte métabolomique de symbiotes libres en culture (CS) a été réalisée (Figure 31) afin de comparer le métabolome de *Symbiodinium spp.* en culture, par rapport à celui son état symbiotique. Les conditions de cultures sont différentes de celles de leur milieu naturel, néanmoins, les paramètres de luminosité, de température, et d'incubation dans l'eau de mer sont définis par rapport aux conditions retrouvées dans le milieu naturel (Démarche expérimentale, partie I.2.c), p. 217). Le contenu de 30 lots de CS a été extrait séparément et des profils métabolomiques ont été réalisés par HPLC-UV-DEDL. Les profils issus des différents lots possèdent des caractéristiques identiques (Annexe 2).

Il s'avère que le profil métabolomique des CS est largement modifié quantitativement et qualitativement à l'état libre par rapport à l'état symbiotique (Figure 31). Les deux profils sont distingués par une grande majorité de composés de faible polarité, les CS ont cependant un profil plus riche que les FIS. Les composés de polarité intermédiaire sont absents des FIS, mais présents, même faiblement, dans les CS.

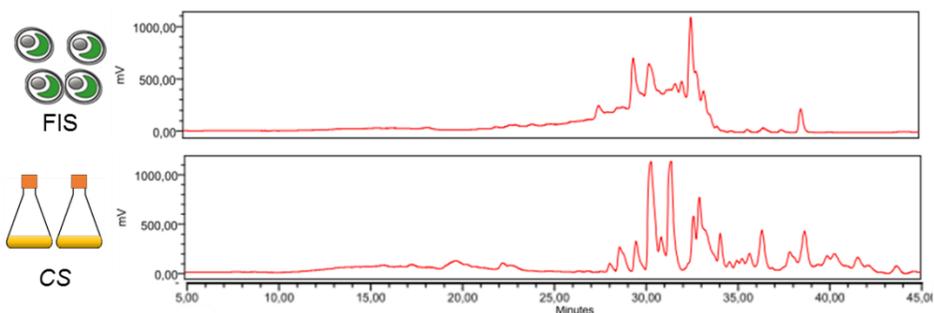


Figure 31 Chromatogrammes HPLC-DEDL des extraits bruts caractéristiques de *Symbiodinium* spp. fraîchement isolés (FIS) et de culture (CS). Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

## IV. Identification des métabolites présents chez *A. viridis*

Une procédure d'extraction et de partitionnement a été réalisée selon le protocole décrit dans la Figure 32 à partir d'un lot d'anémones lyophilisées, ou de tencacules.

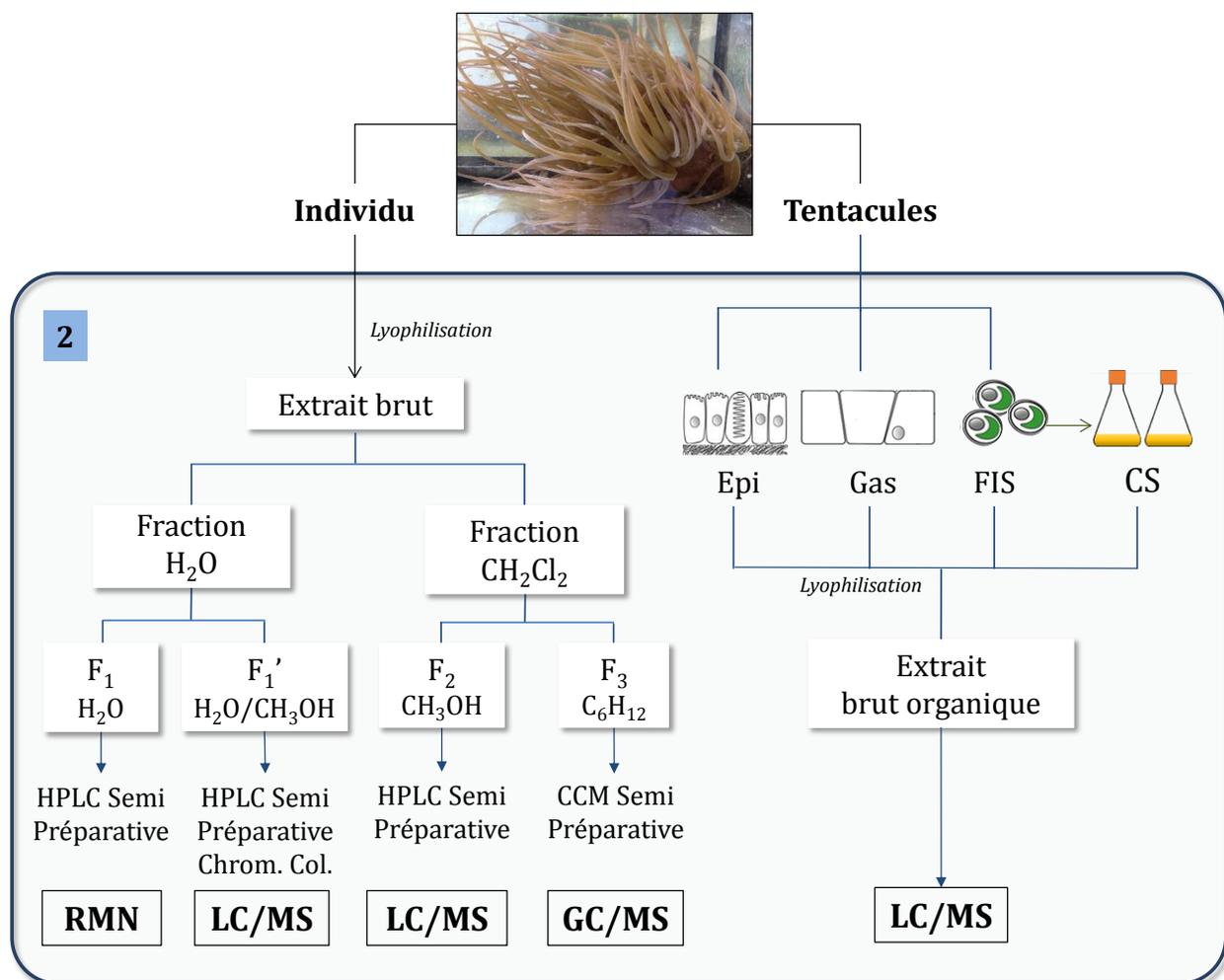


Figure 32 Schéma expérimental global de la méthodologie d'extraction, de séparation, d'isolement et d'analyse des fractions obtenues à partir de l'individu entier, des compartiments animaux (épiderme, Epi et gastroderme, Gas) et des symbiotes fraîchement isolés (FIS) ou mis en culture (CS). Chrom. Col.: chromatographie sur colonne ouverte.

Le partitionnement réalisé a permis de fractionner l'extrait brut organique en 4 parties : une fraction aqueuse (F<sub>1</sub>) qui contient les composés très polaires, une fraction méthanol issue de la fraction aqueuse (F<sub>1</sub>') qui englobe les composés polaires, une fraction méthanol (F<sub>2</sub>) qui renferme les composés moyennement polaires, et une fraction cyclohexane (F<sub>3</sub>) qui contient les composés peu polaires (Figure 33).

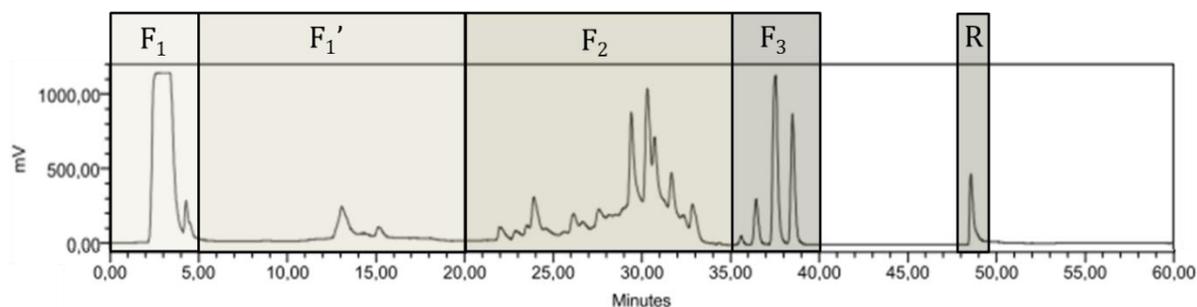


Figure 33 Chromatogramme HPLC-DEDL d'un extrait brut caractéristique d'*A. viridis*. Polarité des composés en fonction de leur temps de rétention sur colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min. R : retour aux conditions initiales

Les métabolites issus de chaque fraction ont été isolés, puis analysés par LC/MS, GC/MS et/ou RMN. Les métabolites minoritaires ont pu être identifiés par UPLC/MS/MS haute résolution à partir d'extraits bruts organiques dessalés des compartiments épidermique, gastrodermique, des FIS et CS. Les analyses UPLC/HR-MS sont présentées dans la Figure 34. Une différence notable est observée entre les profils DEDL, donnant une réponse quantitative, et les profils LC/MS, dont la réponse dépend de l'efficacité d'ionisation.

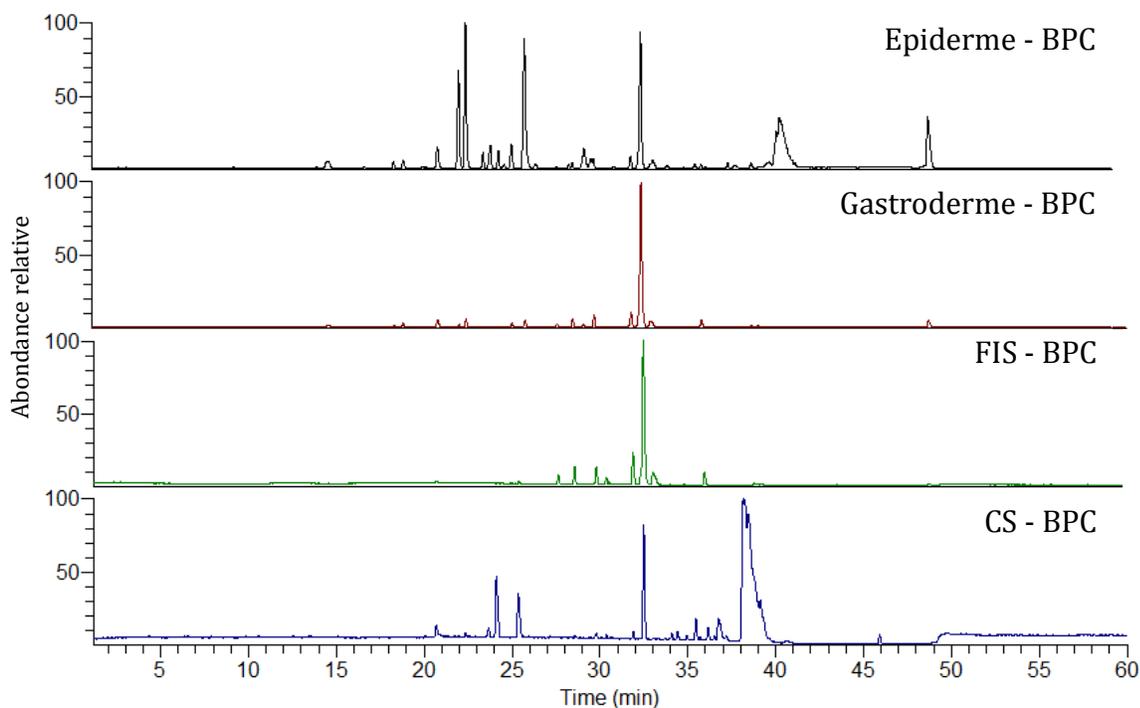


Figure 34 Chromatogrammes UPLC-HRMS des extraits bruts organiques dessalés issus des compartiments animaux (Epiderme et Gastroderme), et symbiotes fraîchement isolés ou mis en culture (FIS et CS) d'*A. viridis*. Colonne Thermo Scientific Accucore C<sub>18</sub> (100x2,1 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH /CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 96:4 à 0:100 en 42 min ; retour aux conditions initiales de 45 à 60 min.

### 1. Fraction F<sub>1</sub> : bétaines

Le profil métabolomique des composés polaires présents dans la fraction F<sub>1</sub> a été obtenu par HPLC-UV-DEDL sur phase HILIC (Figure 35). Trois signaux ont retenu notre attention puisqu'ils possèdent une absorbance forte dans l'UV à 214 nm, en accord avec la présence potentielle de fonctions carbonyles. Deux de ces composés absorbent aussi à 254 et 280 nm, caractéristiques de la présence d'un système aromatique. L'isolement de ces composés issus de la fraction F<sub>1</sub> (282 mg) a donc été entrepris par HPLC-UV semi-préparative sur phase HILIC, à l'aide d'un gradient optimisé de la phase mobile acétonitrile:eau. Trois composés ont pu être caractérisés par l'intermédiaire d'analyses LC/MS et RMN : il s'agit de l'homarine (composé 1), la trigonelline (composé 2) et la zooanémone (composé 3). D'autres composés minoritaires ont été identifiés, et seront isolés en plus grande quantité afin de permettre leur caractérisation par RMN.

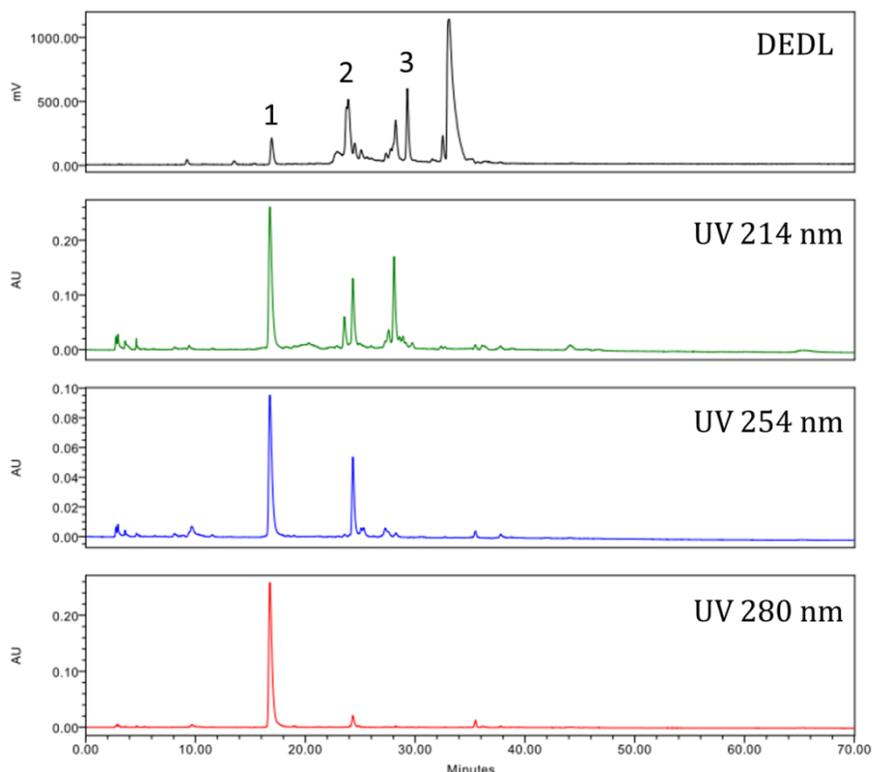


Figure 35 Chromatogramme HPLC-UV-DEDL (HILIC) caractéristique de la F<sub>1</sub>. Colonne Machery-Nagel Nucleodur HILIC (250x10 mm). Elution : phase mobile CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 33:67 en 65 min.

La

Figure 36 présente les caractéristiques obtenues en RMN pour les 3 composés décrits ci-dessous.

Le composé **1** (11,6 mg) a été isolé sous la forme d'un solide incolore et sa formule brute, C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, a été déterminée par une combinaison des données obtenues par spectrométrie de masse (ion quasi-moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z = 138,1$ ) et RMN (1D et 2D, Annexe 3). L'ensemble de ces données sont identiques à celles reportées pour l'homarine (Quast et al. 1970 ;

Figure 36 a).

Ainsi, les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>) du composé **1** indiquent la présence de quatre méthines sp<sup>2</sup>, d'un groupement méthyle lié à un azote quaternaire et de deux carbones quaternaires dont une fonction acide carboxylique (

Figure 36 b).

Le composé **2** (5,1 mg) a été isolé sous la forme d'un solide incolore et sa formule brute, C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, a été déterminée par une combinaison des données obtenues par spectrométrie de masse

(ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 138,1$ ) et RMN (1D et 2D, Annexe 4). L'ensemble de ces données sont identiques à celles reportées pour la trigonelline (Ghosal et Dutta 1971 ;

Figure 36 c).

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ ) du composé **2** indiquent la présence de quatre méthines  $sp^2$ , d'un groupement méthyle lié à un azote quaternaire, et de deux carbones quaternaires dont une fonction acide carboxylique (

Figure 36 d).

Le composé **3** (7,4mg) a été isolé sous la forme d'une huile incolore et sa formule brute,  $C_7H_{10}O_2N_2$ , a été déterminée sur la base des analyses par spectrométrie de masse ( $m/z = 154,7$   $[M+H]^+$ ) et RMN (1D et 2D, Annexe 5). L'ensemble des données obtenues sont en accord avec celles reportées pour la zooanémonine (Ackermann et al. 1960a ;

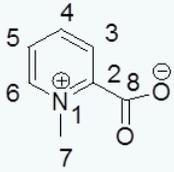
Figure 36 e).

Les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ ) du composé **3** indiquent la présence de deux groupements méthyles liés à un azote dont un quaternaire, d'un méthylène, et deux carbones quaternaires dont une fonction acide carboxylique (

Figure 36 f).

L'homarine et la trigonelline sont biosynthétisées à partir de la glycine (Netherton et Gurin 1982). Ces composés ont été isolés de nombreux invertébrés marins (Welsh et Prock 1958) tels que les anémones de mer (Mathias et al. 1960), mais aussi de Dinoflagellés (Gebser et Pohnert 2013). La zooanémonine appartient à la famille des bétaines imidazoliques. Elle a été isolée en 1960 de l'éponge *Hippospongia equina*, (Ackermann et al. 1960b). Elle est présente dans de nombreuses espèces marines, telles que des éponges (Paul et Puglisi 2004) ou mollusques (Fahey et Carroll 2007).

a

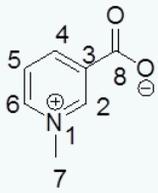


Composé 1

b

N°	$\delta_C$ (ppm)/	mult.	$\delta_H$ (ppm)/ J (Hz)/		mult.
1	-	-	-	-	-
2	155,9	qC	-	-	-
3	125,4	CH	7,90	7,8 ; 1,0	dd
4	145,0	CH	8,43	7,8 ; 1,0	td
5	124,9	CH	7,86	7,8 ; 1,0	td
6	144,4	CH	8,77	6,0	d
7	45,8	CH <sub>3</sub>	4,29	-	s
8	161,2	qC	-	-	-

c

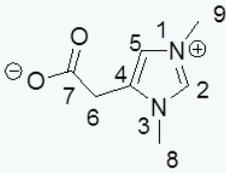


Composé 2

d

N°	$\delta_C$ (ppm)/	mult.	$\delta_H$ (ppm)/ J (Hz)/		mult.
1	-	-	-	-	-
2	145,9	CH	9,19	-	s
3	162,3	qC	-	-	-
4	143,9	CH	8,74	7,8	d
5	126,6	CH	8,01	6,0 ; 7,8	dd
6	144,5	CH	8,87	6,0	d
7	47,5	CH <sub>3</sub>	4,35	-	s
8	164,3	qC	-	-	-

e



Composé 3

f

N°	$\delta_C$ (ppm)/	mult.	$\delta_H$ (ppm)/ J (Hz)/		mult.
1	-	-	-	-	-
2	135,9	CH	8,90	-	s
3	-	-	-	-	-
4	133,1	qC	-	-	-
5	120,3	CH	7,40	-	s
6	62,8	CH	3,38	-	s
7	169,4	qC	-	-	-
8	33,2	CH <sub>3</sub>	3,74	-	s
9	35,3	CH <sub>3</sub>	3,79	-	s

Figure 36 Structure des bétaines isolées de l'anémone *A. viridis*. a,c,e : structure des composés 1 (Homarine), 2 (trigonelline), et 3 (zooanémone). b,d,f : tableaux RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des composés 1, 2 et 3.

Quelques analogues de la zooanémone ont pu être isolés. On peut citer par exemple la norzooanémone, la (+)-echinobétaine B ou l'aminoanémone (Figure 37). La norzooanémone a été décrite pour la première fois en 1973 à partir de la gorgone *Pseudopterogorgia americana* (Weinheimer et al. 1973) puis à partir du ver plat *Tubularia larynx* (Gupta et al. 1977).

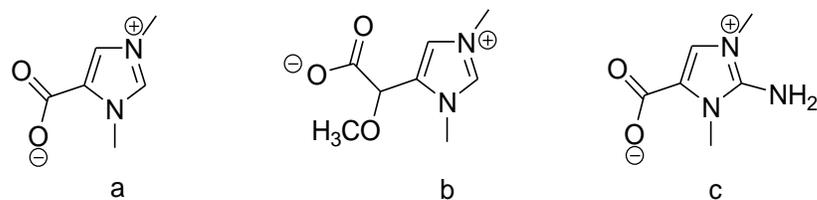


Figure 37 Structures de la norzooanémonine (a), la(+)-echinobétaïne B (b) et l'aminozooanémonine (c).

De façon générale, les bétaines sont recensées dans les organismes photosynthétiques et les invertébrés marins. Il s'agit de composés amphotères dont le rôle a longtemps été débattu. Ces composés zwitterioniques pourraient jouer un important rôle dans l'activité osmotique, puisqu'ils sont présents dans un grand nombre d'invertébrés marins, mais absents des organismes d'eau douce (Gasteiger et al. 1955, 1960). Ils ont aussi un rôle dans la photoprotection des invertébrés marins (Hill et al. 2010), en protégeant les structures cellulaires des dégradations induites par l'oxydation (Chen et Murata 2002 ; Ganesan et al. 2011). De nombreuses propriétés bioactives ont été recensées pour ces composés. L'homarine possède une activité antimicrobienne (une inhibition de la croissance de la bactérie Gram-positif *Micrococcus luteus* et des bactéries Gram-négatif *Escherichia coli* et *Vibrio harveyi* a été reportée mais l'IC<sub>50</sub> n'a pas été publiée, Shapo et al. 2007), ainsi que des propriétés antifouling (contre les diatomées *Navicula salinicola*, Targett et al. 1983). De la même manière, des propriétés antifouling ont été démontrées contre la balane *Balanus amphitrite* pour la zooanémonine et la trigonelline (zooanémonine, IC<sub>50</sub> : 7,5 µg.mL<sup>-1</sup> à 24h, Hattori et al. 2001 ; trigonelline, concentration minimale inhibitrice : 2-10 µg.mL<sup>-1</sup>, Kawamata et al. 1994).

En parallèle, l'analyse LC-HRMS de l'extrait brut organique de CS révèle la présence en début de chromatogramme d'un ion quasi-moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z = 179,074$  (composé **4**, Figure 38). Le spectre MS/MS est présenté dans la Figure 38 a. La répartition isotopique observée à M+1 et M+2 est caractéristique de la présence d'un soufre (Figure 38 b). La formule brute C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>S a été déduite de sa masse exacte. Les fragments observés sur le spectre de fragmentation obtenu après CID sont en accord avec la structure du gonyol (Figure 38 c et d).

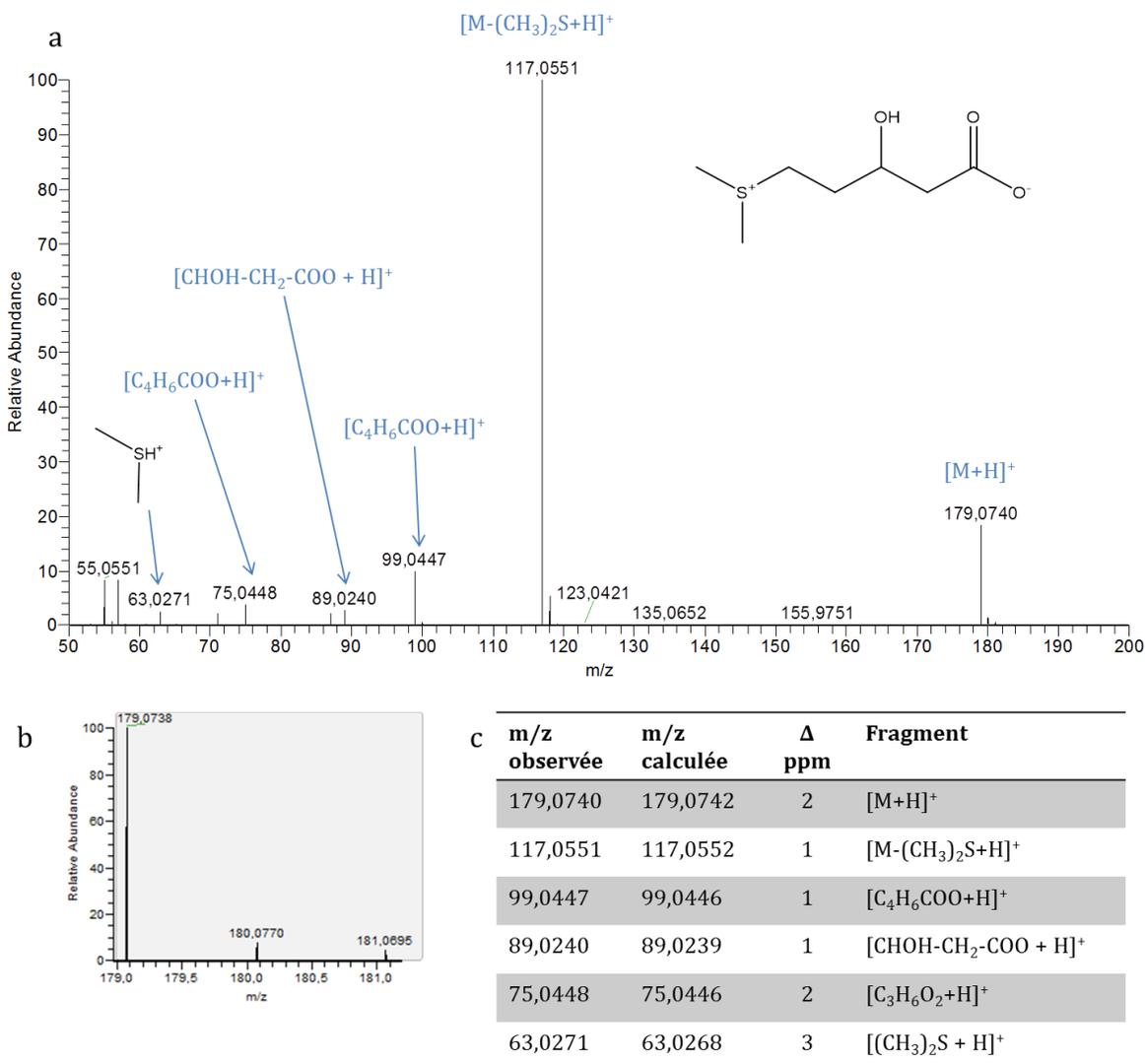


Figure 38 Caractérisation du composé 4 : a, spectre MS/MS et structure du gonyol ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire à  $m/z = 179,0740$  ; c, fragments caractéristiques proposés.

Le gonyol a été découvert en 1993 lors de l'étude du Dinoflagellé *Gonyaulax polyedra* (Nakamura et al. 1993). Ce n'est pas une bétaine *stricto sensu*, car il possède un groupement sulfonium tertiaire à la place d'un ammonium quaternaire ; mais les propriétés physiques et chimiques du gonyol sont similaires à celles des bétaines. Ce composé a été très peu étudié. Le gonyol semble jouer un rôle dans l'osmo-adaptation chez le coccolithophore *Emiliana huxleyi*, mais cette fonction n'a pas été confirmée chez le Dinoflagellé *Prorocentrum minimum* (Gebser et Pohnert 2013). Il est accumulé dans les cellules dont le milieu est enrichi en méthionine (Nakamura et al. 1993), et serait donc biosynthétisé à partir de la méthionine. Son précurseur est le diméthylsulfonylpropionate (DMSP, Figure 39) (Nakamura et al. 1997).

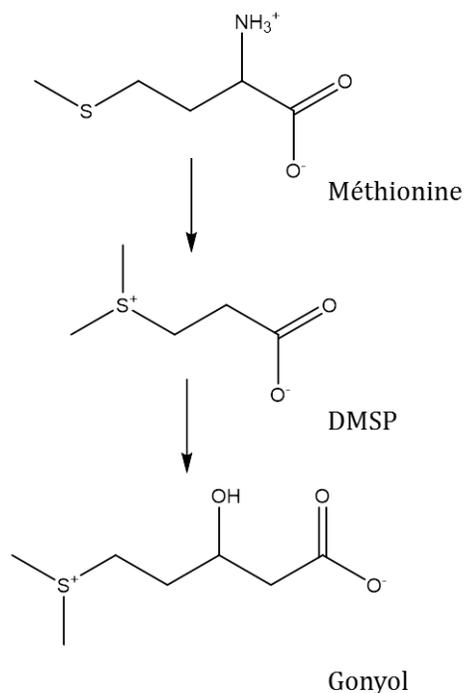


Figure 39 Synthèse du gonyol à partir de la méthionine, d'après Nakamura et al. 1997. DSMP : diméthylsulfoniopropionate.

## 2. Fraction F<sub>1</sub>' : peptides et pseudopeptides

L'analyse des chromatogrammes DEDL obtenus à partir de l'extrait brut organique d'*A. viridis* (Figure 29) a révélé la présence d'un signal prometteur aux temps de rétention 12 à 14 min. En effet, ce signal est majoritaire dans l'empreinte de l'épiderme, mais absent des FIS. De plus la gamme de polarité de ces composés correspond à celle de nombreuses toxines, fréquemment retrouvées dans le métabolome des Cnidaires (Bruhn et al. 2001 ; Grimmelikhuijzen et al. 2002 ; Frazão et al. 2012). Ces composés polaires n'ont pourtant pas été retrouvés dans la fraction F<sub>1</sub>, ni dans la fraction F<sub>3</sub> en quantités suffisantes pour permettre leur détection. Leur concentration a été effectuée par solubilisation des composés de la fraction aqueuse dans du méthanol (Démarche expérimentale, partie II.3.b), p. 222). Cette fraction a été nommée F<sub>1</sub>' ; son empreinte chimique a été acquise par HPLC-UV-DEDL en phase phényl-C<sub>18</sub> (Figure 40 a), puis le chromatogramme DEDL a été comparé à celui obtenu à partir d'un extrait brut organique (Figure 40 b). Une purification de cette fraction a ensuite été entreprise par HPLC-UV sur colonne semi-préparative (C<sub>18</sub>), suivie d'une chromatographie sur colonne ouverte par exclusion stérique (LH<sub>20</sub>).

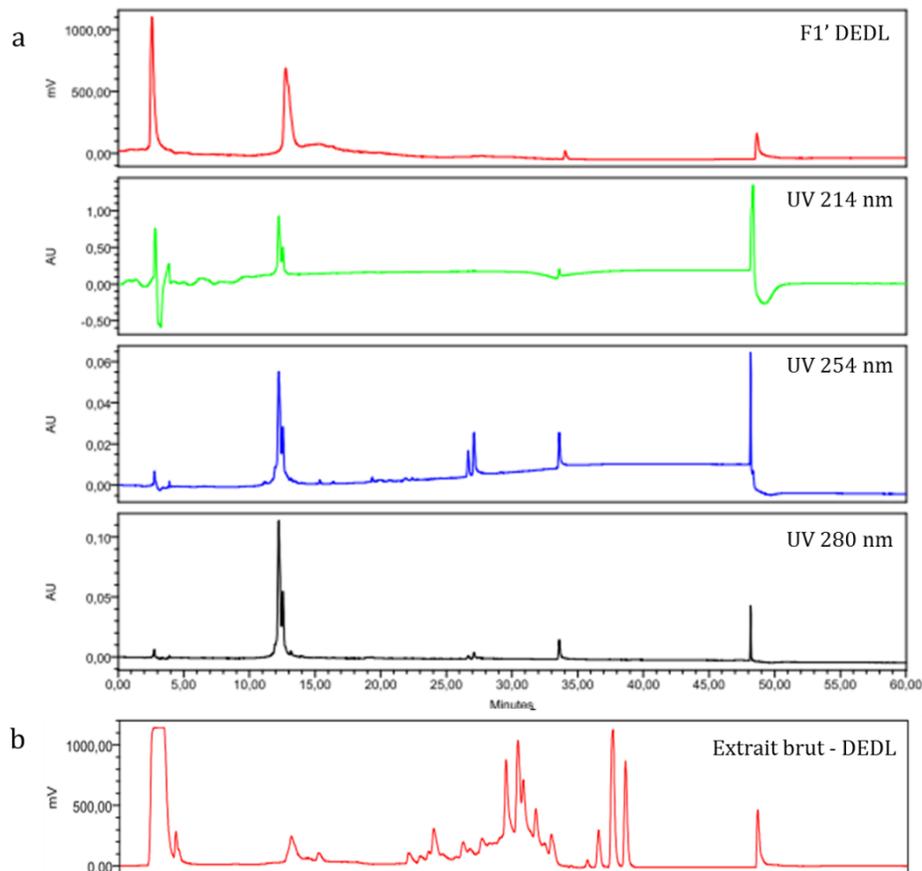


Figure 40 a, chromatogramme HPLC-UV-DEDL caractéristique de la F<sub>1</sub>' ; b, chromatogramme HPLC-DEDL d'un extrait brut organique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C18, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

Deux composés ont pu être isolés par HPLC sur colonne semi-préparative, trois autres par chromatographie sur colonne sur phase LH<sub>20</sub>, et leur caractérisation a été réalisée pour 3 d'entre eux par ESI-MS/MS et MS/MS haute résolution. Tous sont des peptides modifiés à leur extrémité C-terminale. Leur identification est basée sur la présence de fragments caractéristiques (Figure 41). Ainsi, les fragments « y » et « b » sont les plus intenses en CID (dissociation induite par collision) ou HCD. Les composés caractérisés ainsi que leurs ions produits sont confirmés par confrontation avec la base de données en ligne proteinprospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>, Chapitre 1, partie III.1.c), p. 45 ).

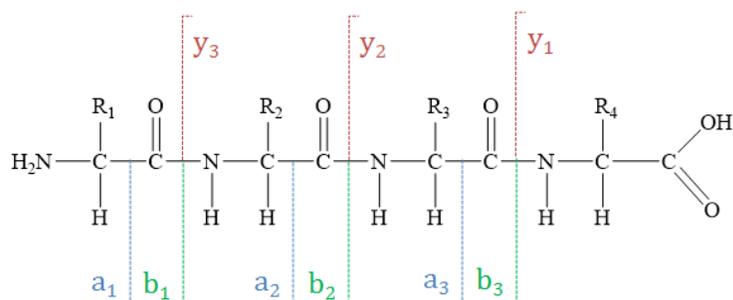


Figure 41 Fragmentation MS/MS (ESI CID/HCD) des peptides.

Un 4<sup>ème</sup> peptide (composé **5**) a été identifié, possédant un signal à  $m/z = 942,0166$   $[M+5H]^{5+}$ , ainsi que les signaux à  $[M+4H]^{4+}$  et  $[M+3H]^{3+}$  associés (Figure 42), de masse 4705,1 Da. 5,8 mg de ce peptide a pu être isolé, sa caractérisation a été entreprise par MS/MS mais n'a pas permis d'élucider complètement la structure de ce peptide.

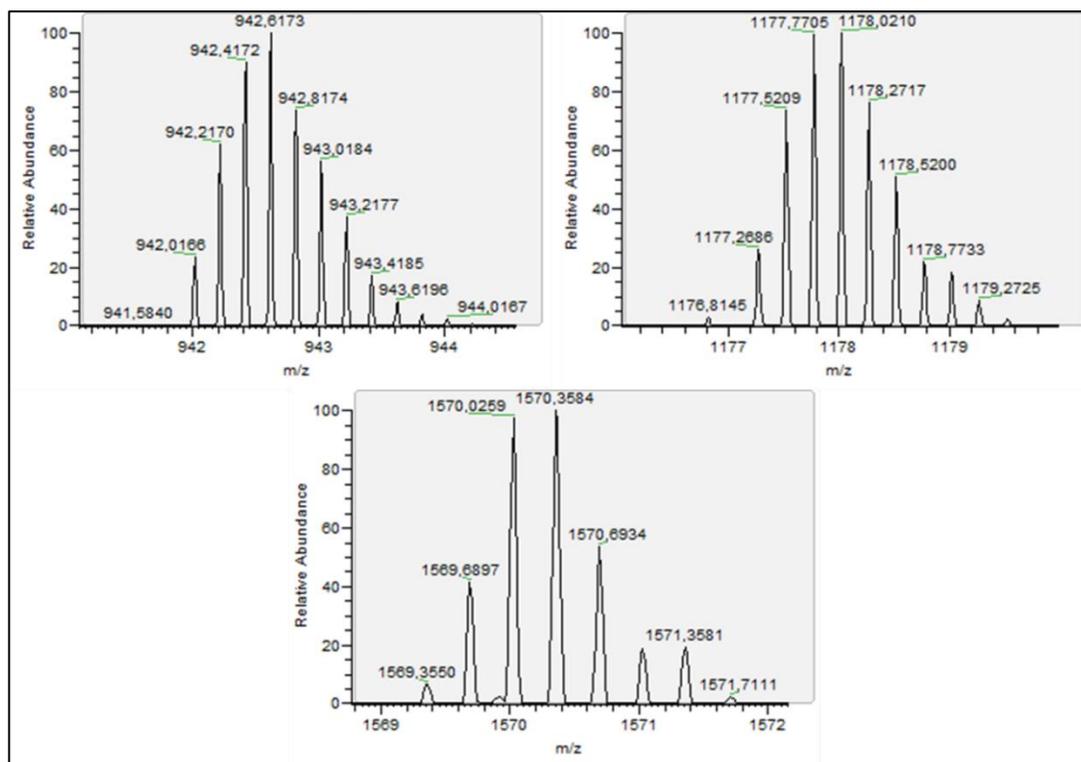


Figure 42 Massifs isotopiques des ions quasi-moléculaires  $[M+5H]^{5+}$ ,  $[M+4H]^{4+}$  et  $[M+3H]^{3+}$  du composé **5**.

Le composé **6** possède un ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 549,3145$ . Ses caractéristiques de fragmentation sont présentées dans la Figure 43. De formule brute  $C_{25}H_{40}N_8O_6$ , ce peptide a été identifié et présente la séquence Phenyllactyl-Leu/Ile-Arg-Asn-CONH<sub>2</sub>. Il est modifié

en position *N*-terminale par la présence d'un acide phényllactique et *C*-terminale par une fonction amide.

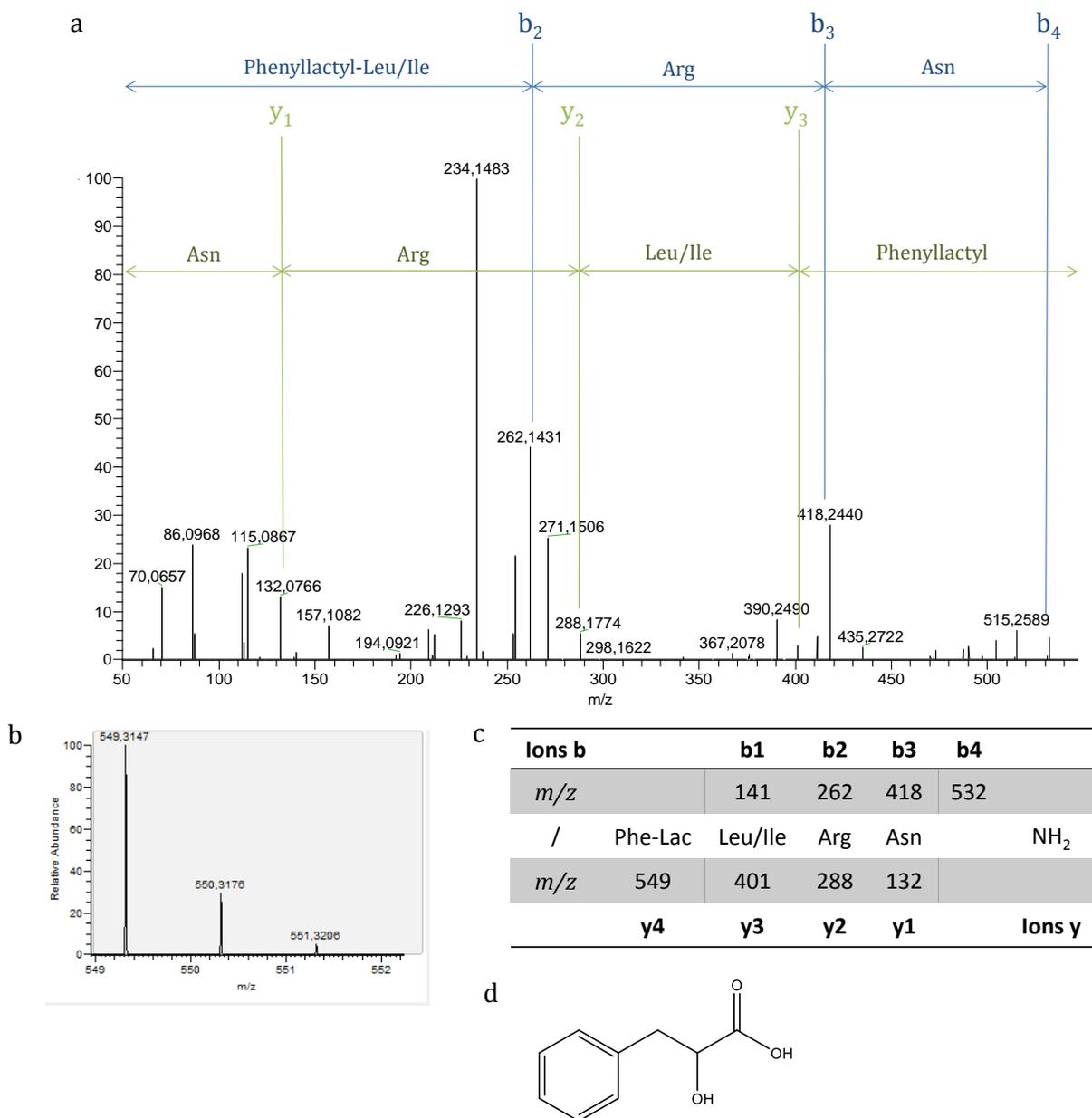


Figure 43 Caractérisation du composé 6 : a, spectre MS/MS du peptide Phenyllactyl-Leu/Ile-Arg-Asn-CONH<sub>2</sub>; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à *m/z* = 549,3147; c, fragments caractéristiques proposés; d structure de l'acide phényllactique.

Ce peptide a été caractérisé chez l'anémone *A. elegantissima* (Grimmelikhuijzen et al. 1990). L'acide phényllactique est dérivé de la phénylalanine, par l'intermédiaire d'enzymes déshydrogénase et transaminase (Figure 44; Grimmelikhuijzen et al. 1990).

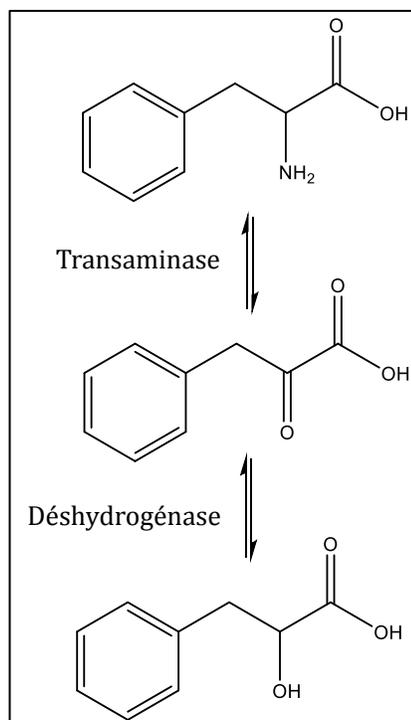


Figure 44 Biosynthèse de l'acide phényllactique à partir de la phénylalanine.

Le composé **7** présente un ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 671,3620$ . Le spectre MS/MS et ses fragments caractéristiques sont présentés dans la [Figure 45 a](#) et [b](#). Ce peptide a pour formule brute  $C_{31}H_{47}N_{10}O_7$  et est modifié en position *N*- et *C*- terminale. Il comporte 5 acides aminés de séquence pyro-Glu-Ser-Leu/Ile-Arg-Trp-CONH<sub>2</sub>. Initialement isolé de l'anémone *A. elegantissima* (Graff et Grimmelikhuijzen 1988), ce peptide présente un acide pyroglutamique ([Figure 45 c](#)) en position *N*-terminale. Il est produit par cyclisation de la glutamine, spontanément ou par l'intermédiaire de la glutaminyl cyclase (Pohl et al. 1991).

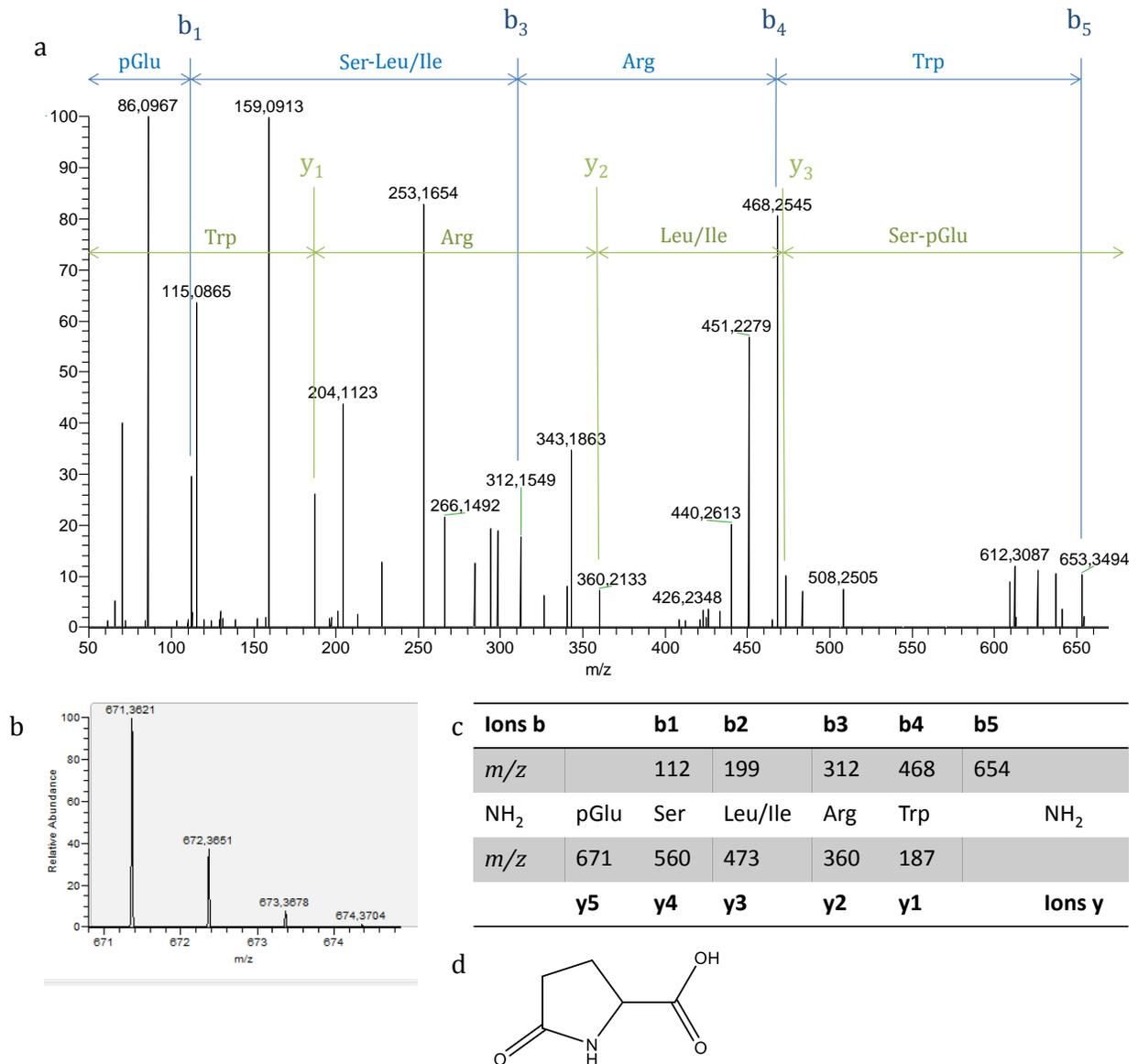


Figure 45 Caractérisation du composé **7** : a, spectre MS/MS du peptide pyro-Glu-Ser-Leu/Ile-Arg-Trp-CONH<sub>2</sub>; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire à  $m/z = 671,3620$  ; c, fragments caractéristiques proposés ; d structure de l'acide pyroglutamique.

Le composé **8** présente deux ions quasi-moléculaires  $[M+H]^+$  à  $m/z = 942,5881$  et  $[M+2H]^{2+}$  à  $m/z = 471,7980$ . Les caractéristiques de fragmentation sont présentées dans la Figure 46 pour l'ion quasi-moléculaire  $[M+2H]^{2+}$ . De formule brute C<sub>45</sub>H<sub>76</sub>N<sub>13</sub>O<sub>9</sub>, ce peptide a été identifié et présente la séquence H<sub>2</sub>N-Leu/Ile-Pro-Pro-Gly-Pro-Leu/Ile-Arg-Pro-Pro-CONH<sub>2</sub> modifiée en position C-terminale.

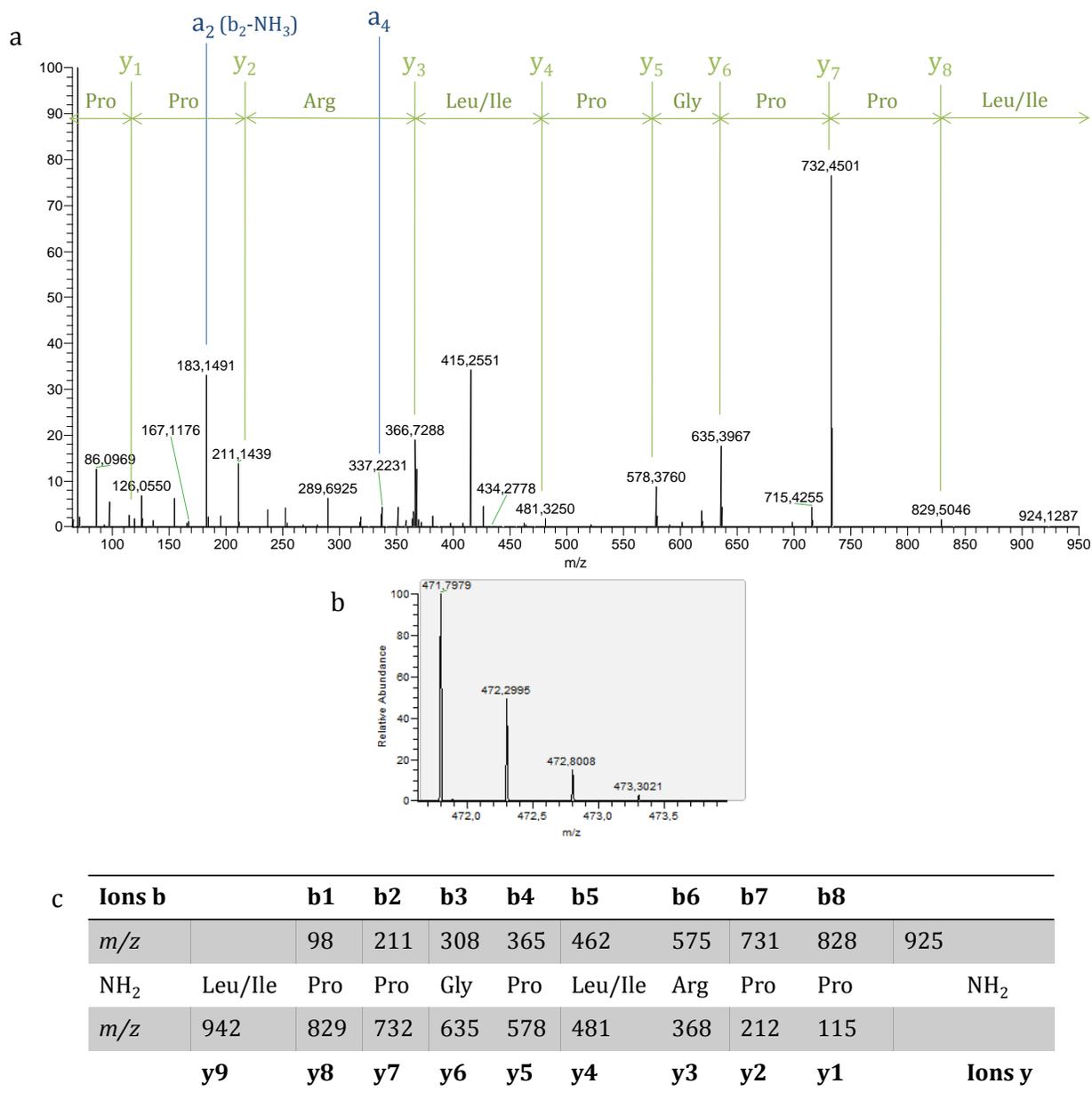


Figure 46 Caractérisation du composé **8** : a, spectre MS/MS du peptide H<sub>2</sub>N-Leu/Ile-Pro-Pro-Gly-Pro-Leu/Ile-Arg-Pro-Pro-CONH<sub>2</sub>; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire [M+2H]<sup>2+</sup> à *m/z* = 471.7979 ; c, fragments caractéristiques proposés.

Ce peptide n'a jamais été recensé, mais un peptide semblable a été isolé de l'anémone *A. elegantissima* (Carstensen et al. 1992). La séquence de ce dernier diffère par la position de l'arginine (Figure 47). Le composé **8** ne possède pas de modification en position *N*-terminale, mais sa structure X-Pro-Pro est connue pour être résistante aux clivages par les aminopeptidases (Vanhoof et al. 1995).

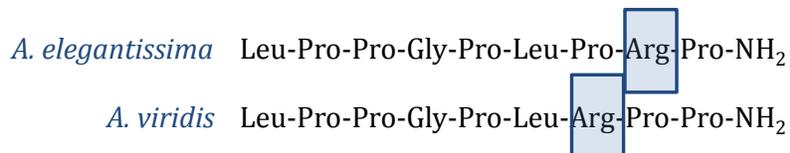


Figure 47 Comparaison des séquences du peptide isolé d'*A. elegantissima* (Carstensen et al. 1992) et du peptide isolé d'*A. viridis*.

Les trois peptides identifiés ont subi une modification post-traductionnelle au niveau de leur position C-terminale. Cette modification augmente leur stabilité, ainsi que leur capacité à résister à la dégradation enzymatique, par exemple par les carboxypeptidases ou exopeptidases (Wollack et al. 2009). Souvent portée par des hormones, la fonction amide en position C-terminale stabilise leur structure secondaire (In et al. 2001). L'extrémité C-terminale des peptides possédant une forme GlyXX (où X peut être n'importe quel acide aminé) peut être convertie par des enzymes telles que l'enzyme PAM (peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase ; Grimmelikhuijzen et al. 2002). L'enzyme PAM est conservée aussi bien chez les Cnidaires que les mammifères (Eipper et al. 1993), et fortement exprimée dans les tissus nerveux. De nombreux peptides possèdent des modifications post-traductionnelles, dont certains ont été isolés de l'anémone *A. elegantissima*, ainsi que les 3 peptides cités ci-dessus. Tous s'avèrent être des neuropeptides, et ont montré une activité excitatrice ou inhibitrice des cellules musculaires d'anémones de mer (Grimmelikhuijzen et al. 1996). Par exemple, l'injection de 10  $\mu$ M du peptide de séquence H<sub>2</sub>N-Leu/Ile-Pro-Pro-Gly-Pro-Leu/Ile-Pro-Arg-Pro-CONH<sub>2</sub> sur un tentacule isolé de l'anémone *Actinia equinata* augmente la fréquence et la durée des contractions spontanées (Carstensen et al. 1992). Le système nerveux des Cnidaires est considéré comme basal dans l'évolution (Mackie 1990), mais très riche en peptides amide (en revue dans Grimmelikhuijzen et al. 2002). Les neuropeptides des Cnidaires peuvent jouer un rôle de neurotransmetteurs aussi bien que de neurohormones, impliquées dans la différenciation cellulaire, ou la métamorphose (Leitz et al. 1994 ; Takahashi et Takeda 2015).

Dans ce cadre, des tests préliminaires de bioactivité ont été entrepris à partir de ces peptides dans le laboratoire Biologie des Canaux Ioniques de l'Institut de Biologie de Valrose (équipe du Dr Guillaume Sandoz). Ces peptides ont été incubés à la surface d'œufs de xénope traités pour exprimer des canaux TREK au niveau leur membrane cellulaire. Les canaux TREK sont des canaux potassiques sensibles à la température et aux variations osmotiques jouent un rôle dans le contrôle de l'excitabilité neuronale (Heurteaux et al. 2004) et la perception de la douleur (Alloui et al. 2006). Lors de ces travaux préliminaires, aucune activation n'a été détectée lors de l'incubation de 10  $\mu$ g et 30  $\mu$ g des composés **6** à **8**.

### 3. Fraction F<sub>2</sub> : lipides membranaires

#### a) Empreinte chimique de la fraction F<sub>2</sub>

La signature chimique des composés présents dans la F<sub>2</sub> (Figure 28 ; Figure 29) issue de l'extrait brut organique a été analysée par HPLC-UV-DEDL (Figure 48). Les signaux obtenus permettent de distinguer 4 groupes de composés, basés en fonction de leur temps de rétention.

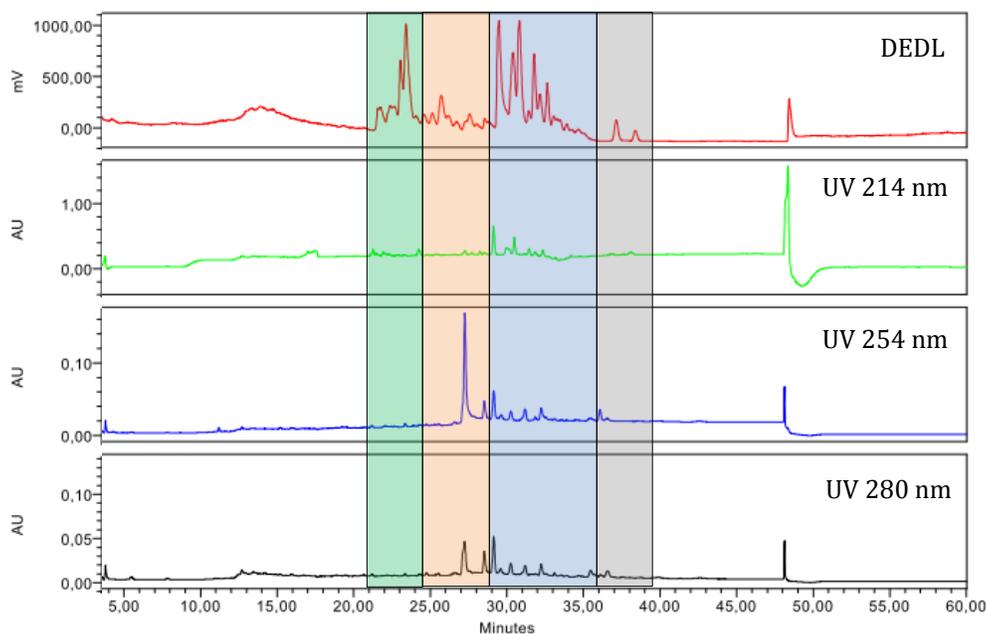


Figure 48 Empreinte chimique caractéristique de la F<sub>2</sub>. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

La purification de cette fraction a été entreprise par HPLC-UV sur colonne semi-préparative (phase stationnaire phényl-C<sub>18</sub>) selon un gradient optimisé de la phase mobile (Démarche expérimentale, Tableau 17, p. 220), 34 composés ont été isolés (Figure 49).

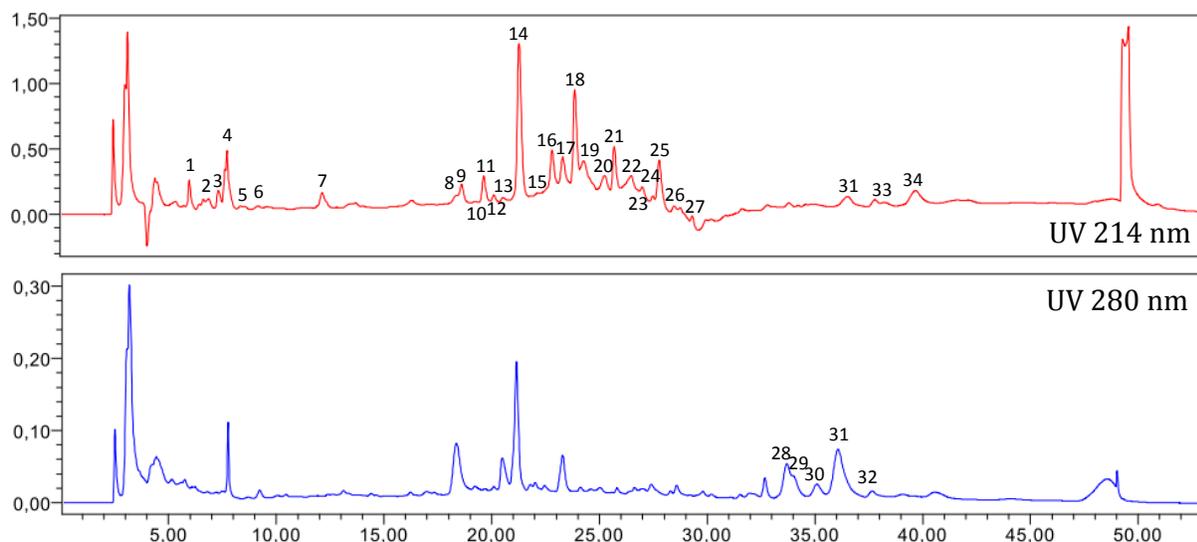


Figure 49 Chromatogramme HPLC-UV caractéristique de la F<sub>2</sub>, Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx semi-préparative (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x10 mm). Elution : gradient optimisé de la phase mobile, H<sub>2</sub>O+0,1%*HCOOH*/CH<sub>3</sub>CN+0,1%*HCOOH*, 35:65 de 0 à 10 min puis 35:65 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

Des analyses par LC/MS, MS/MS et RMN des composés purifiés issus de la fraction F<sub>2</sub> ont été réalisées. Il s'avère que chaque signal englobe une famille de composés avec des structures très proches. L'interprétation des spectres obtenus montre qu'ils appartiennent tous à la famille des lipides. Il s'agit de lipides polaires pour les 3 premiers groupes de composés. L'ensemble de ces lipides possède une tête polaire liée à un glycérol acylé en position *Sn*-1 et/ou *Sn*-2 (Figure 50). Ce sont des lipides de bétaine et phosphatidylcholines (PC) pour le premier groupe (en vert sur la Figure 48), phosphatylethanolamines (PE) et céramides aminoéthylphosphonates (CAEP) pour le second (en orange). Le troisième groupe est composé d'amides gras et galactolipides (en bleu), et le quatrième est composé de stérols (en gris). Ces derniers ont été analysés à partir de la fraction F<sub>3</sub>.

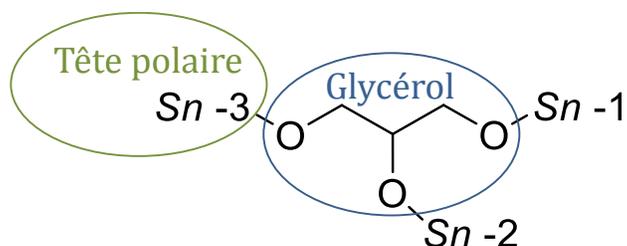


Figure 50 Structure générale d'un lipide polaire.

Les lipides polaires sont d'une importance cruciale pour le fonctionnement et la croissance de tout être vivant, puisqu'ils sont les principaux constituants des membranes biologiques. Les monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) sont par ailleurs les lipides polaires les plus abondants sur

Terre (Gounaris et Barber 1983 ; Mongrand et al. 2000). Les MGDG et digalactosyldiacylglycérol (DGDG) sont prédominants dans les membranes photosynthétiques des thylakoïdes, siège de la photosynthèse chez les algues (Harwood et Gushina 2009), où ils ont un rôle structural mais aussi fonctionnel (Siegenthaler 1998). Les membranes extrachloroplastiques sont quant à elles principalement constituées de phospholipides et lipides de bétaines.

#### b) *Lipides de bétaine et Phosphatidylcholines*

Les composés P<sub>1</sub> à P<sub>6</sub> isolés de la fraction F<sub>2</sub> ont été caractérisés sur la base de données obtenues en MS/MS.

- *Lipides de bétaine* : les spectres MS/MS correspondants présentent une fragmentation commune à  $m/z = 104,1074$  et  $m/z = 132,1020$ . D'après leur masse exacte, les ions produits correspondent à une choline de formule brute  $[C_5H_{13}NO+H]^+$  pour le premier, et un formiate de (triméthylammonium)éthyle de formule brute  $[C_6H_{13}NO_2+H]^+$  pour le second. D'après leur masse exacte et le spectre de fragmentation obtenu en MS/MS, ces composés ont pu être identifiés. Ils appartiennent à la famille des lipides de bétaines, plus précisément des diacylglycérylcarboxyhydroxyméthylcholines (DGCC). 20 lyso-DGCC ont été caractérisés (composés **9-28**) ; ces lipides ne possèdent qu'un groupement acyle en position *Sn*-1 ou *Sn*-2 du glycérol. Les 1-lyso-2-acyl- éluent avant leurs isomères 1-acyl-2-lyso- correspondants lors de l'analyse HPLC en phase inverse (Polette et al. 1999), ce qui a permis de les différencier les uns des autres. Un exemple de fragmentation observée en ESI-MS/MS est donné pour l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 562,3747$  (lyso-DGCC 22:6, [Figure 51](#)).

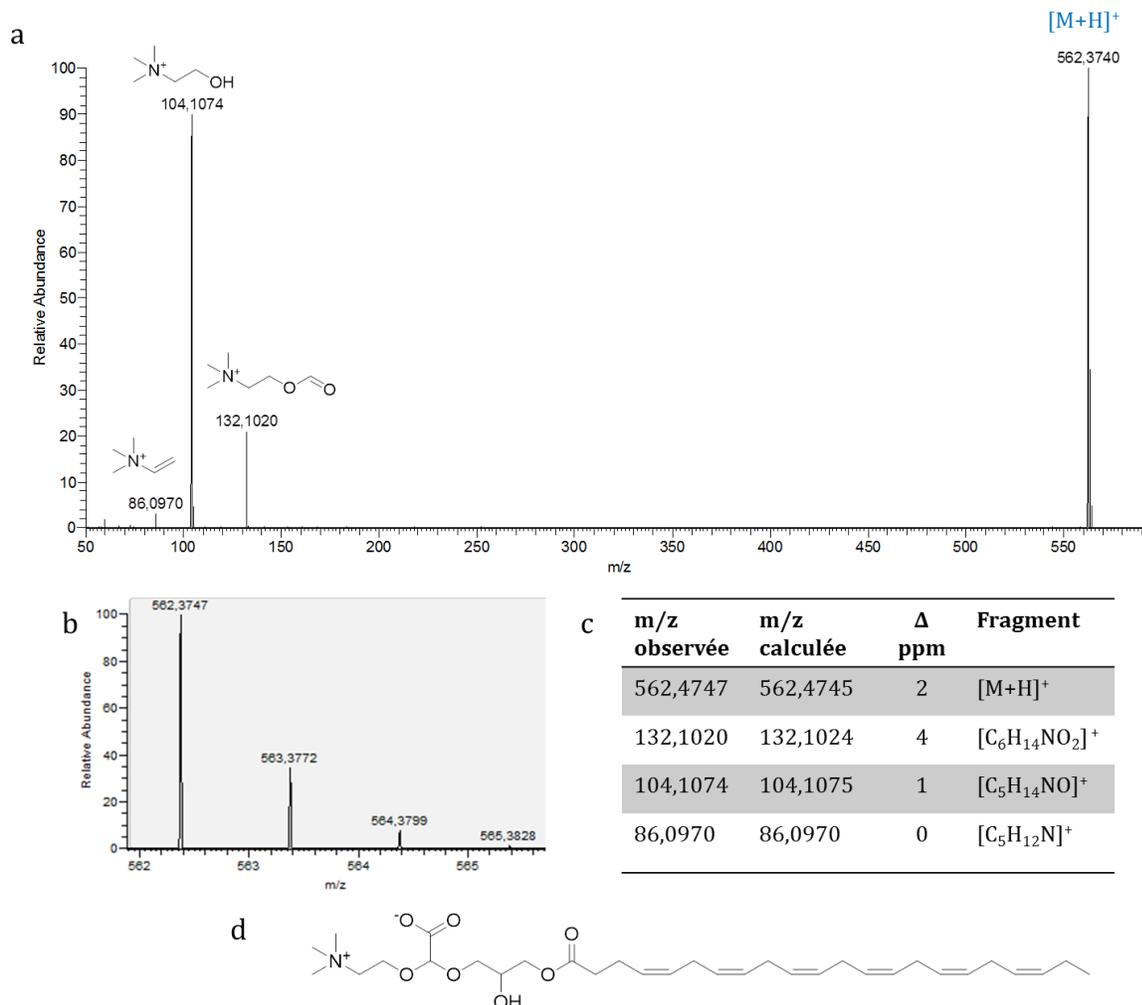


Figure 51 Caractérisation du 1-acyl-2-lyso-DGCC C22:6 (composé 24). a, spectre MS/MS ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de m/z 562,4747; c, fragments caractéristiques proposés; d, structure du composé.

En parallèle, 17 autres DGCC acylés en positions *Sn-1* et *Sn-2* ont été caractérisés (composés **29-45**). Un exemple de fragmentation par ESI-MS/MS est donné pour l'ion quasi-moléculaire de m/z = 800,6038 (DGCC, Figure 52).

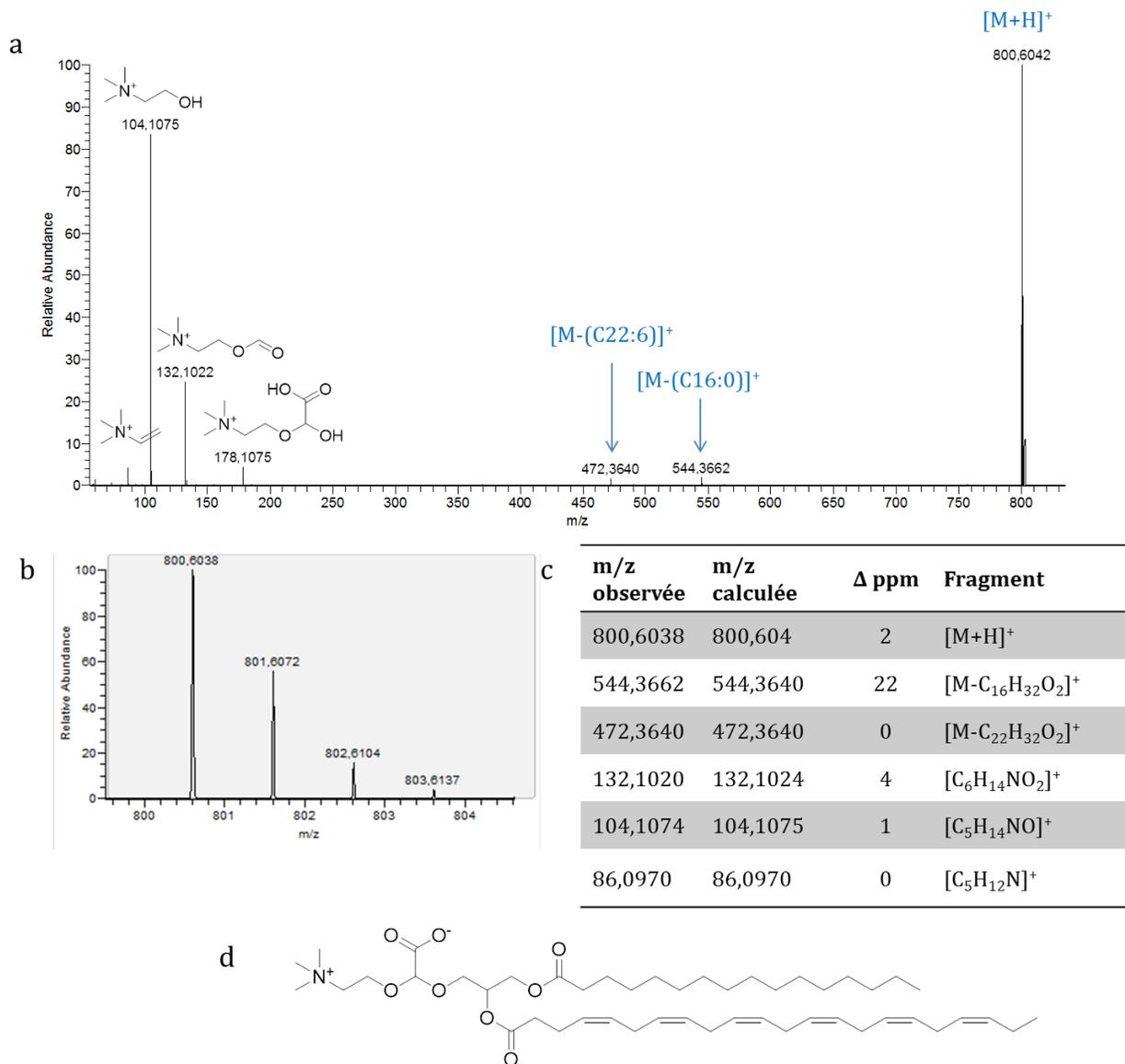


Figure 52 Caractérisation du DGCC C16:0/C22:6 (composé 38). a, spectre MS/MS ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z$  800,6038 ; c, fragments caractéristiques proposés; d, structure du composé.

38 composés ont ainsi été décrits, les structures moléculaires de ces composés ainsi que leur distribution dans les différentes fractions Epi/Gas/FIS/CS sont présentées dans le [Tableau 4](#). Ces lipides possèdent tous une tête polaire formée par un groupement triméthylammonium lié à un acétal par l'intermédiaire d'un groupement éthylène. Le second oxygène de l'acétal lie la tête polaire du DGCC à un glycérolipide.

Tableau 4 Distribution et structure des (a) Lyso-DGCC et (b) DGCC isolées d'*A. viridis*. Epi : épiderme, Gas : Gastroderme, FIS : *Symbiodinium* fraîchement isolés, CS : *Symbiodinium* en culture. Souligné : majoritaire

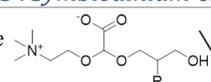
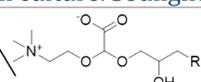
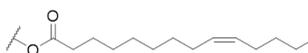
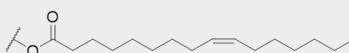
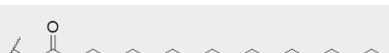
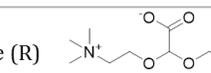
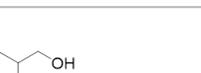
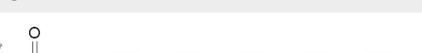
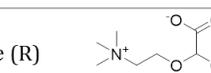
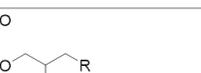
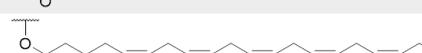
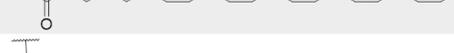
a	n°	lyso-DGCC	distribution	Structure (R)	Structure	
						
	9	14:0	CS/FIS			
	10	14:1n-5	FIS			
	11	16:1n-7	CS/FIS			
	12	16:2n-4	FIS			
	13	18:0	CS/FIS			
	14	18:1n-9	CS/FIS			
	15	18:2n-6	CS/FIS			
	16	18:3n-6	CS/FIS			
	17	18:4n-3	CS			
	18	18:5n-3	CS			
	19	20:0	CS/FIS			
	20	20:4n-6	FIS			
	n°	1-lyso-2-acyl-DGCC	distribution	Structure (R)	Structure	
						
	21	16:0	CS/FIS			
	22	20:5n-3	CS/FIS			
	23	22:5n-3	FIS			
	24	22:6n-3	Gas/FIS			
	n°	1-acyl-2-lyso-DGCC	distribution	Structure (R)	Structure	
						
	25	16:0	Epi/Gas/ CS/FIS			
	26	20:5n-3	CS/FIS			
	27	22:5n-3	Gas/FIS			
	28	22:6n-3	Epi/Gas/ FIS/CS			

Tableau 4 suite

b	n°	DGCC	distribution	Sn-1	Sn-2	Chemical structure	
						Structure 1	Structure 2
	29	C34:6	Gas/FIS/CS	C16:1	C18:5		
	30	C34:5	Gas/FIS/CS	C18:5	C16:0		
	31	C36:7	FIS	C14:1	C22:6		
	32	C36:6	Gas/FIS	C16:1	C20:5		
	33	C36:6	Gas/FIS	C14:0	C22:6		
	34	C36:5	Gas/CS/FIS	C16:0	C20:5		
	35	C37:6	Gas/CS	C15:0	C22:6		
	36	C38:8	Epi/FIS	C20:5	C18:3		
	37	C38:6	Epi/Gas/ <u>FIS</u> / <u>CS</u>	C16:0	C22:6		
	38	C39:7	FIS/CS	C17:1	C22:6		
	39	C40:10	Epi/Gas/FIS/ CS	C18:4	C22:6		
	40	C40:8	FIS	C18:3	C22:5		
	41	C40:6	Epi/Gas/FIS/ CS	C18:0	C22:6		
	42	C40:11	Gas/FIS/CS	C18:5	C22:6		
	43	C44:12	<u>Gas/FIS/CS</u>	C22:6	C22:6		
	44	C44:11	Epi/FIS/ CS	C22:6	C22:5		
	45	C46:7	Epi/FIS/ CS	C24:1	C22:6		

• *Phosphatidylcholines*: 15 signaux observés en LC/MS/MS présentent un fragment caractéristique à  $m/z = 184$ . Ce fragment correspond à la phosphocholine, de formule brute  $[C_5H_{14}NO_4P+H]^+$ . La masse exacte des composés concernés combinée à leurs caractéristiques de fragmentation a permis de les attribuer à la famille des phosphatidylcholines (PC). Des

phosphatidylcholines (PC), ou lyso-PC (composés **46-60**) ont ainsi été caractérisées. Un exemple de fragmentation obtenue par ESI-MS/MS est donné pour l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 496,3401$  (lyso-PC alkyl-C17:0, **Figure 53**).

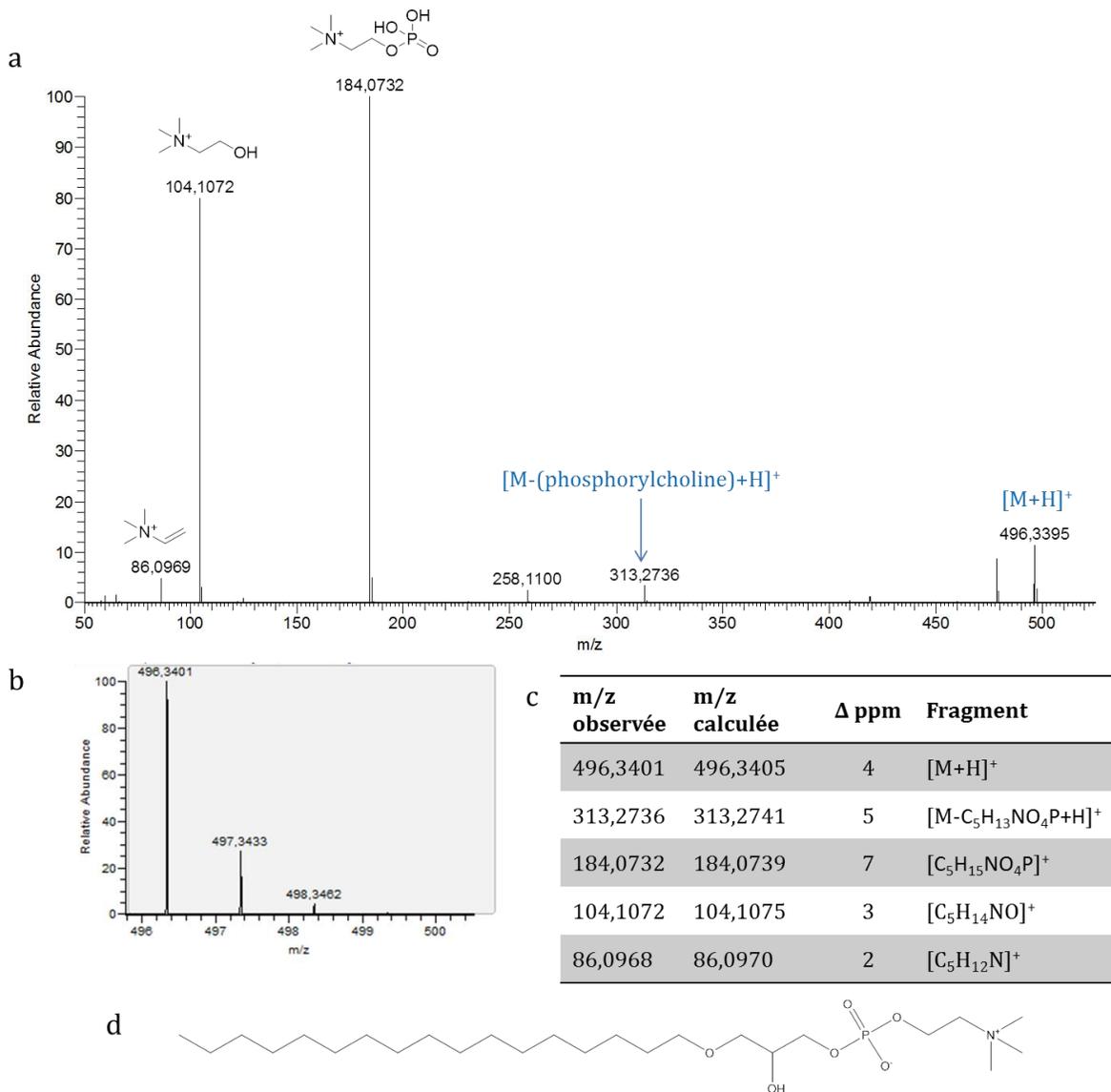


Figure 53 Caractérisation de la lyso-PC alkyl-17:0. a, spectre MS/MS ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z$  496,3401; c, fragments caractéristiques proposés; d, structure du composé.

Leur structure et leur composition en acides gras, ainsi que leur distribution dans l'anémone *A. viridis* sont présentées dans le **Tableau 5**. Sur les 15 lyso-PC, 11 possèdent un alcool gras en position *Sn*-1 ou *Sn*-2 du glycérol (plasmalogène-lyso-PC), les 4 autres possèdent un acide gras.

Tableau 5 Distribution et structure des (a) Lyso-phosphatidylcholines (Lyso-PC) et (b) phosphatidylcholines (PC) isolées d'*A. viridis*. Epi: épiderme, Gas: Gastroderme, FIS: *Symbiodinium* fraîchement isolés, CS : *Symbiodinium* en culture. Souligné : majoritaire

a	n°	Lyso-PC	distribution	Structure
				(R)
	46	PC Alkyl-16:0	<u>Epi/Gas</u>	
	47	PC Alkyl-17:0	<u>Epi/Gas</u>	
	48	PC Alkyl-18:1	<u>Epi/Gas</u>	
	49	PC Alkyl-18:0	<u>Epi/Gas</u>	
	50	PC Alkyl-19:0	<u>Epi</u>	
	51	PC Alkyl-20:1	<u>Epi/Gas</u>	
	52	PC Alkyl-20:0	<u>FIS</u>	
	53	PC C20:5	<u>FIS</u>	
	54	PC C22:6	<u>FIS/CS</u>	
	55	PC C22:5	<u>Epi</u>	
	56	PC C22:4	<u>Epi</u>	

Tableau 5 suite

b	n°	PC	Distribution	Sn-1	Sn-2
	57	PC C16:1/C22:6	Epi		
	58	PC C16:0/C22:6	Epi		
	59	PC C18:0/C22:6	Epi		
	60	PC C22:6/C22:6	FIZ/CS		

Les lipides de bétaïne possèdent des propriétés biochimiques semblables aux phosphatidylcholines et permettent la formation de membranes biologiques : ils sont zwitterioniques à pH neutre et possèdent une ou deux chaîne(s) grasse(s) hydrophobe(s). Les diacylglyceryl-*N,N,N*-triméthylhomosérine (DGTS), leurs isomères diacylglycérilhydroxyméthyl-*N,N,N*-triméthyl- $\beta$ -alanine (DGTA) et les DGCC sont les lipides de bétaïne les plus communs (Figure 54).

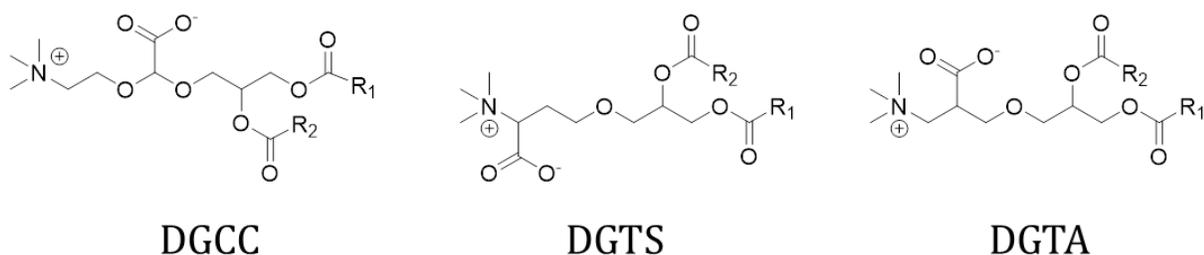


Figure 54 Structures des diacylglycérilcarboxyhydroxyméthylcholines (DGCC), diacylglyceryl-*N,N,N*-triméthylhomosérine (DGTS), leurs isomères diacylglycérilhydroxyméthyl-*N,N,N*-triméthyl- $\beta$ -alanine (DGTA).

Des lipides de bétaïne sont retrouvés dans les organismes photosynthétiques à l'exception des Spermaphytes (plantes à graines), ainsi que les champignons (Künzler et Eichenberger 1997) et les bactéries (Klug et Benning 2001 ; Sohlenkamp et al. 2003). Dans le règne animal, l'apport en phosphore est vital pour la croissance des organismes, notamment la constitution des membranes cellulaires (par les phospholipides), de l'ADN et l'ARN (par des nucléotides) et des protéines (par

des acides aminés). Cependant, certains organismes ont acquis la capacité de diminuer leur propre demande en phosphore, par une substitution de leurs phospholipides en lipides membranaires non phosphorés tels que les lipides de bétaïne (Van Mooy et al. 2009 ; Martin et al. 2011 ; Okazaki et al. 2013). Les algues produisent des lipides de bétaïne plutôt que la phosphatidylcholine lorsque la disponibilité en phosphore du milieu est réduite (Van Mooy et al. 2009). Cette forme d'adaptation augmente leur taux de survie dans des milieux appauvris en phosphore (López-Lara et al. 2005). L'abondance relative des lipides de bétaines par rapport à la phosphatidylcholine est d'ailleurs proposée en tant que marqueur de stress (Van Mooy et al. 2010). Les Dinoflagellés possèdent de manière prédominante les DGCC, par rapport aux DGTS et DGTA (Kato et al. 1996 ; Flaim et al. 2014 ; Leblond et al. 2015). Les résultats obtenus à partir de l'anémone *A. viridis* montrent une dominance des DGCC possédant des acides gras en C16:0 et C22:6. De manière intéressante, ces DGCC sont non-seulement retrouvés en abondance dans les cellules de *Symbiodinium*, mais sont aussi présents dans les compartiments animaux, et particulièrement le gastroderme. Ces résultats apportent la preuve d'un transfert de DGCC des symbiotes vers leur hôte, et d'une répartition de ces DGCC entre les compartiments animaux.

### c) *Phosphatidyléthanolamines et CAEP*

Les composés P<sub>7</sub> à P<sub>10</sub> isolés à partir de la fraction F<sub>2</sub> ont été caractérisés par MS/MS.

- *Phosphatidyléthanolamines* : 4 signaux chromatographiques observés en LC/MS/MS et présentent un ion produit correspondant à une perte de neutre de 141 unités de masse. Le fragment [M-C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>P+H]<sup>+</sup> obtenu correspond à une phosphoéthanolamine caractéristique des phosphatidyléthanolamines (PE). La masse exacte des composés concernés ainsi que leur fragmentation a permis de les caractériser. Ils appartiennent à la famille des lyso-PE, dont un exemple est montré pour l'ion quasi-moléculaire de *m/z* 500,2776 dans la [Figure 55](#).

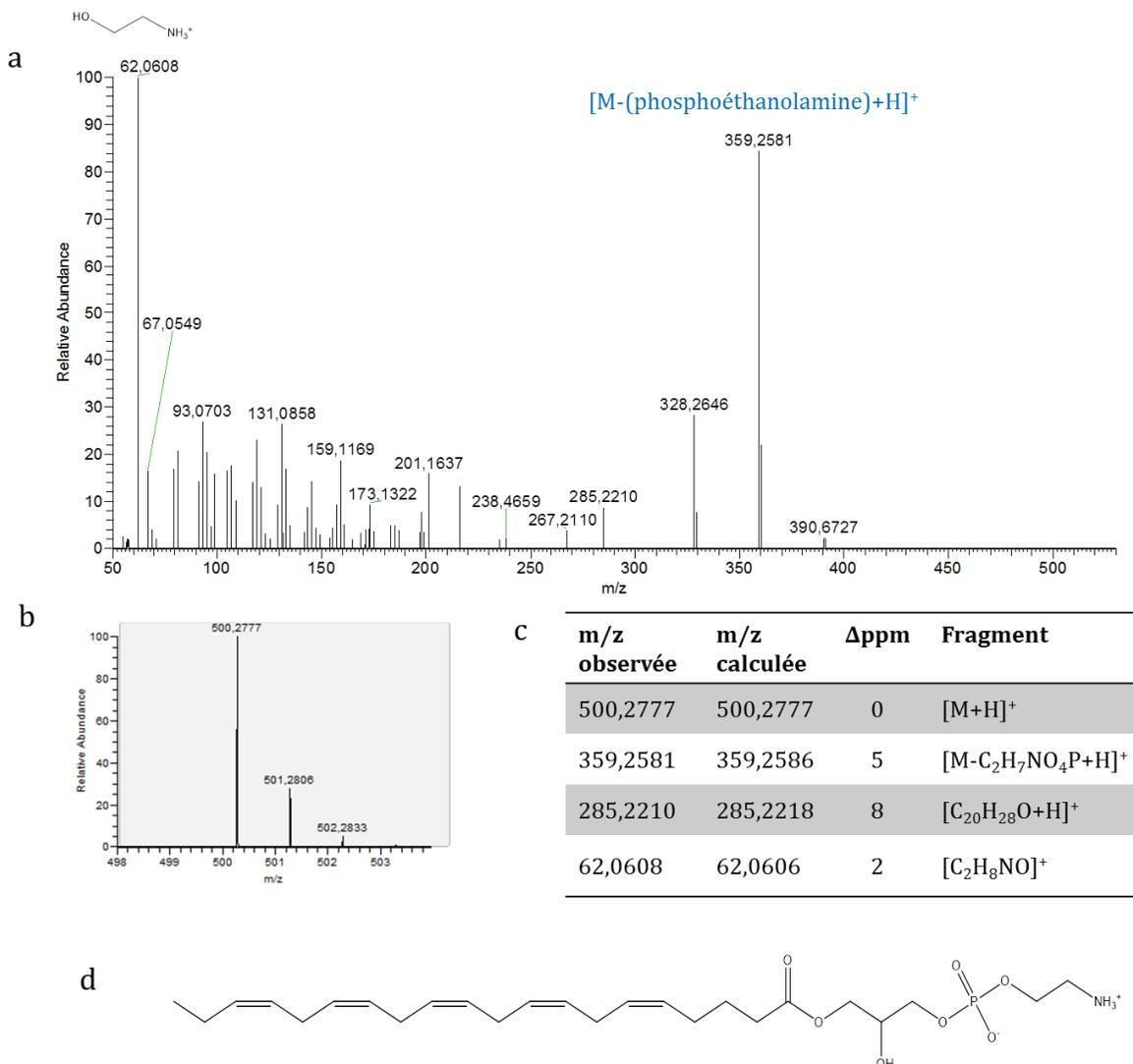


Figure 55 Caractérisation de la lyso-PE C20:5 (composé 64). a, spectre MS/MS ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z$  500,2777 ; c, fragments caractéristiques proposés; d, structure du composé

Quatre lyso-PE ont pu être caractérisées (composés **61-64**), les différences d'ions produits sont attribuées aux différentes chaînes grasses composant les PE. Leur structure, composition en AGs ainsi que leur distribution sont présentées dans le **Tableau 6**. Les phosphatidyléthanolamines sont, avec les phosphatidylcholines, des phospholipides zwitterioniques à pH neutre. Ils sont constituants principaux des membranes, pour lesquelles ils stabilisent les protéines membranaires. En effet, leur groupement polaire est plus petit et leur topologie permet la formation de liaisons hydrogène entre leur amine terminale et les protéines (Bogdanov et Dowhan 1999).

Tableau 6 Distribution et structure des Lyso-phosphatidyléthanolamines isolées d'*A. viridis*. Epi : épiderme, Gas : Gastroderme. Souligné : majoritaire.

n°	Lyso-PE	Distribut- ion	Structure (R)
61	PE C17:1	Epi	
62	PE C18:2	Epi	
63	PE C20:4	Epi	
64	PE C20:5	Epi/Gas	

- Céramide aminoéthylphosphonate (composé 65) : le profil chromatographique LC/HRMS issu de l'extrait organique de l'épiderme présente un signal intense à 40 min (Figure 34). Le composé correspondant présente un spectre MS/MS contenant 4 ions produits majoritaires (Figure 56). Le premier correspond à la perte d'un aminoéthylphosphonate (fragment a), le second ion produit correspond à la perte du fragment a et d'une déshydratation. Les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ions correspondent à la perte des fragments a et c (amide gras en position Sn-2 du glycérol), avec ou sans déshydratation. La masse exacte de cet ion ainsi que ses caractéristiques de fragmentation ont permis de caractériser ce composé (Jayasimhulu et al. 2007 ; Garret et al. 2013) ; il s'agit d'un CAEP (Figure 56 d).

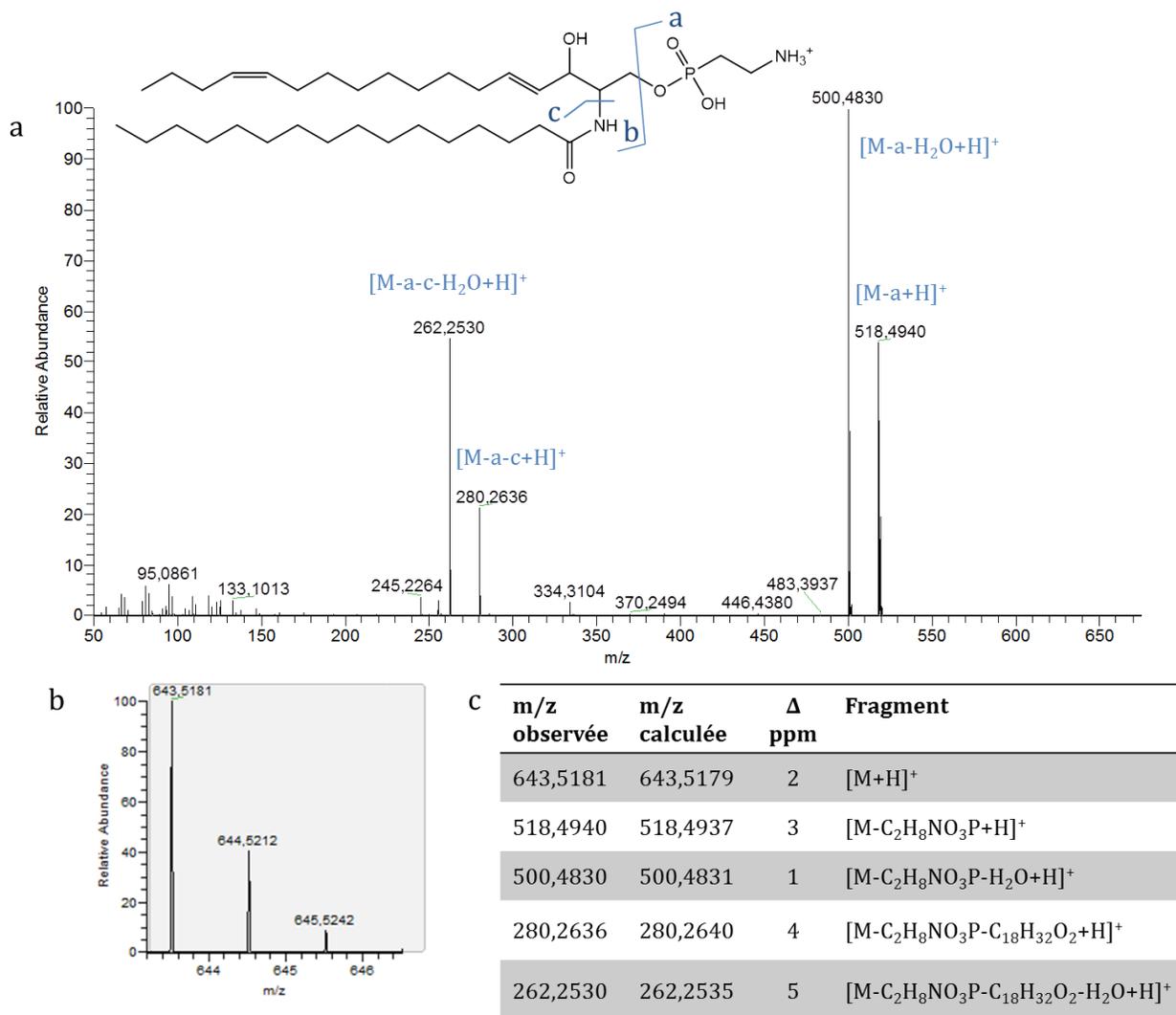


Figure 56 Caractérisation du CAEP C16:0/C15:2 (composé 65). a, spectre MS/MS et structure du composé ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z$  643,5181 ; c, fragments caractéristiques proposés.

Les CAEP ont été mis en évidence dans de nombreux invertébrés marins, tels que les Cnidaires (Garrett et al. 2013 ; en revue dans Imbs 2013), les crustacés (De Koning 1970) ou les mollusques (Chelomin et Zhukova 1981), et ont aussi été recensés chez des protozoaires (Landis et al. 1989). Ils ont été caractérisés pour la première fois à partir d'extrait organique de l'anémone de mer *A. elegantissima* (Rouser et al. 1963), et sont communs chez les Cnidaires. Ils constituent par exemple 8 à 15% des phospholipides des coraux mous (Imbs 2013). La liaison C-P du phosphonate est plus résistante à l'hydrolyse que la liaison O-P du groupement phosphate des phospholipides (Kittredge et al. 1962 ; Henderson et al. 1972). Il a été suggéré que ces lipides stabilisent les membranes exposées à des enzymes hydrolytiques, telles que des phospholipases ou phosphatases (Stillway 1974 ; Imbs et al. 2006). Les cnidocytes des Cnidaires contiennent un mélange liquide

complexe contenant des toxines (Chapitre 1, partie II.2. p. 26), mais aussi des phospholipases, telle que la phospholipase A2, qui clive la chaîne grasse en position *Sn*-2 du glycérol des phospholipides, libérant un 2-lysophospholipide (Nevalainen et al. 2004). La présence de CAEP dans le compartiment épidermique d'*A. viridis* pourrait donc avoir un rôle dans la protection des membranes contre les phospholipases présentes dans l'épiderme.

#### d) *Galactolipides et amides gras*

L'analyse des spectres MS/MS obtenus à partir des composés P<sub>11</sub> à P<sub>16</sub> isolés de la F<sub>2</sub> (Figure 49) a été réalisée.

- *Galactolipides*: certains composés présentent en MS/MS des pertes de neutres caractéristiques. Pour l'ensemble de ces composés, deux pertes de neutres d'intensité relative différentes sont observées, et correspondent à des chaînes grasses de degré d'insaturation variable. Le fragment correspondant à la chaîne grasse en position *Sn*-1 aura une intensité relative moins forte que pour la position *Sn*-2 (Guella et al. 2003 ; Welti et Wang 2004). Pour 5 de ces composés, une fragmentation commune correspondant à une perte de neutre de masse exacte 162,0528 est observée. Ce fragment caractéristique correspond à un hexose de formule brute C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>. Un exemple de fragmentation par ESI-MS/MS est montré pour l'ion quasi-moléculaire de *m/z* 979,5391 (Figure 57).

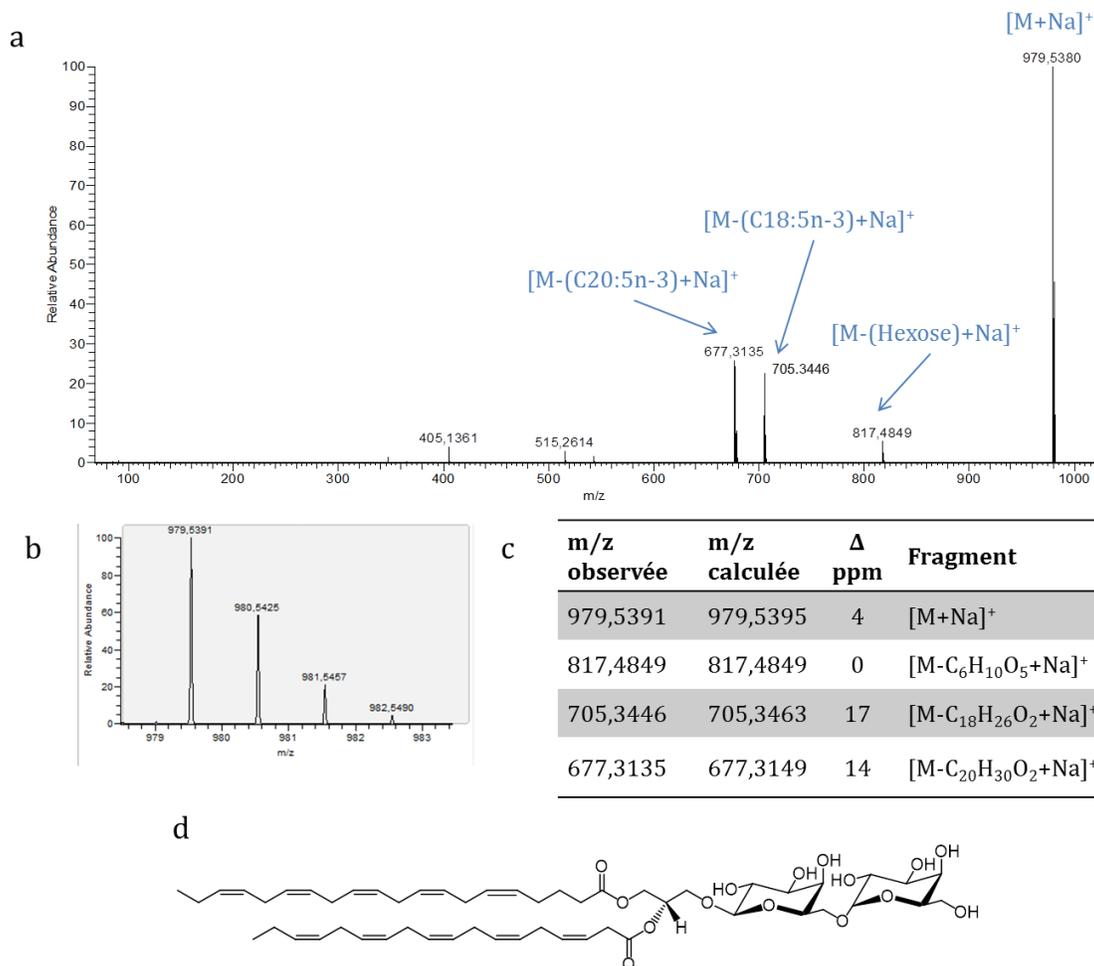
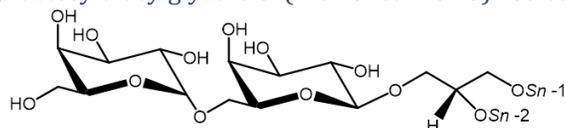


Figure 57 Caractérisation du DGDC C18:5/C20:5 (composé 70). a, spectre MS/MS; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z$  979,5391; c, fragments caractéristiques proposés; d, structure du composé.

L'ensemble de ces fragments a permis de caractériser 6 mono- ou di-galactosyldiacylglycérols (composés **66-71**), listés dans le [Tableau 7](#).

Les MGDG et DGDC sont connus pour être des composants structurels des membranes photosynthétiques (Jones 2007). Néanmoins, seuls les DGDC sont capables de former des bicouches lipidiques stables (Lee 2000). Tous les composés présentés ici possèdent des chaînes grasses  $n-3$  polyinsaturées en positions  $Sn-1$  et  $Sn-2$ , principalement C18:4 $n-3$  et C18:5 $n-3$ . Ce type d'AG est fréquemment retrouvé pour les Dinoflagellés contenant de la péricidine (Gray et al. 2009 ; Leblond et al. 2010), alors que les MGDG/DGDC présents dans les organismes photosynthétiques terrestres possèdent des AG dont le degré d'insaturation est moindre (Napolitano et al. 2007). De la même manière que les DGCC, les DGDC peuvent remplacer les phospholipides lorsque le milieu est appauvri en phosphore chez *Arabidopsis thaliana* (Kelly et al. 2003 ; Okazaki et al. 2013).

Tableau 7 Mono- et Di-galactosyldiacylglycerols (MGDG et DGDG) isolés et caractérisés d'*A. viridis*.



n°	MGDG/ DGDG	Sn-1	Sn-2
66	18:4/18:5 MGDG		
67	18:5/18:5 DGDG		
68	18:5/18:4 DGDG		
69	18:4/18:4 DGDG		
70	18:5/20:5 DGDG		
71	18:4/22:6 DGDG		

Il existe deux voies principales de biosynthèse des galactolipides : la voie eucaryote ou la voie des cyanobactéries (en revue dans Petroutsos et al. 2014). Chez les Dinoflagellés, elle est considérée comme identique à celle des cyanobactéries (Maréchal et al. 1997), qui fait intervenir le diacylglycérol (DAG). Selon une hypothèse récente, les Dinoflagellés du genre *Symbiodinium* peuvent aussi synthétiser les galactolipides par la voie eucaryote (Leblond et al. 2015). Cette voie passe par la production de phosphatidylcholine (Browse et Somerville 1991), mais aussi de DGCC (Leblond et al. 2015). Une troisième voie de biosynthèse possible des galactolipides passe par des intermédiaires phosphatidyléthanolamine ou DGTS. Cette voie a été montrée chez une algue eustigmatophyte (Khozin-Goldberg et Cohan 2006).

En parallèle à leur contribution à l'architecture membranaire, certains MGDG/DGDG peuvent posséder des propriétés bioactives (en revue dans Cortés-Sánchez et al. 2013). Par exemple, les Dinoflagellés *Heterocapsa circularisquama* (Higara et al. 2008) et *Amphidinium carterae*

(Wu et al. 2005) contiennent des MGDG constitués d'AG de type C18:5n-3 et C18:4n-3. Ces MGDG ont montré une certaine cytotoxicité vis-à-vis des huîtres, alors qu'une activité hémolytique ciblée a été observée pour *Gymnodinium* (Parrish et al. 1998).

- Amides gras: certains composés présentent en MS/MS un profil de fragmentation caractéristique des amides gras. En particulier, les amides gras insaturés subissent deux pertes de neutre successives. On observe deux fragments principaux : le premier correspond à la perte d'une molécule d'ammoniac à  $m/z = [M-NH_3+H]^+$  et un second correspondant à la perte d'une molécule d'eau à  $m/z = [M-NH_3+H_2O+H]^+$ . Leurs homologues saturés possèdent, par contre, un profil de fragmentation différent, marqué par deux fragments caractéristiques :  $[C_4H_9NO+H]^+$  à  $m/z = 88,0761$  et  $[C_5H_{11}NO+H]^+$  à  $m/z = 102,0917$ . La fragmentation de la chaîne grasse ainsi qu'une confrontation avec les spectres MS/MS à la base de données METLIN ([Chapitre I, partie III.1.c](#)), p. 45) ont permis de proposer une structure avec un positionnement des doubles liaisons. Un exemple de fragmentation par ESI-MS/MS est donné pour l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 254,2481$  ([Figure 58](#)).

Six composés ont pu être caractérisés (composés **72-77**), leur structure et leur distribution dans l'anémone de mer *A. viridis* sont présentées dans le [Tableau 8](#). Les amides gras sont biosynthétisés par l'intermédiaire d'acides gras et de l'amine correspondante ; ils peuvent être incorporés dans des céramides, sphingolipides ou lipides de bétaine (Bezuglov et al. 1998). Ils sont courants dans la nature (Hannun et al. 1997), et ont de nombreuses fonctions, telles que la modulation des jonctions GAP qui permettent la communication entre cellules (Boitano et Evans 2000 ; Ehrlich et al. 2006). Ils ont par exemple été identifiés chez les mammifères (Nichols et al. 2007), pour lesquels ils contribuent à l'endormissement (Cravatt et al. 1995 ; Stewart et al. 2002).

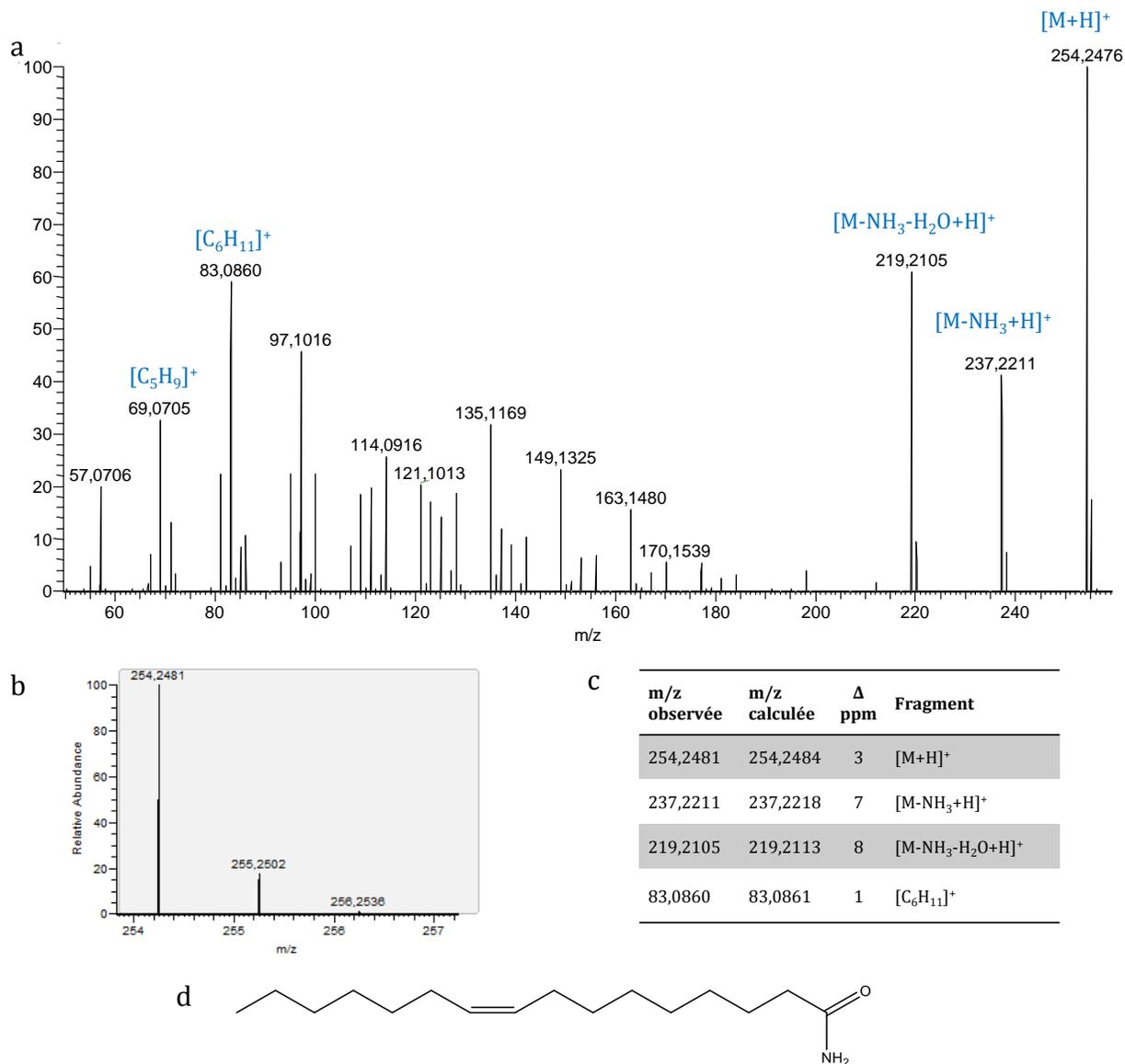
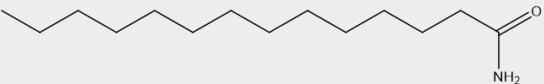
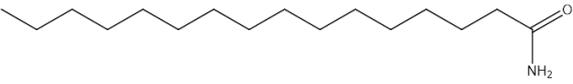
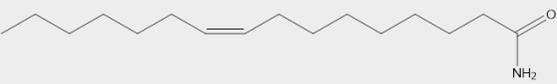
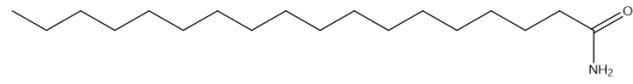
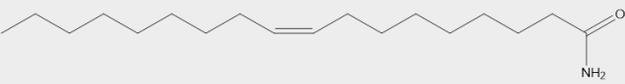
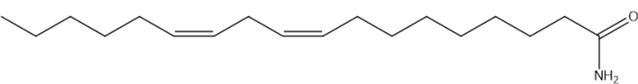


Figure 58 Caractérisation structurale de l'amide gras C16:1. a, spectre MS/MS ; b, massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z$  254,2481 ; c, fragments caractéristiques proposés; d, structure du composé

Cependant, les amides gras sont aussi représentés chez les microorganismes marins (Dembitsky et al. 2000 ; Bertin et al. 2012). Ils sont surexprimés chez le Dinoflagellé *Prymnesium parvum* lorsque le milieu est appauvri en phosphore et en azote, et une partie est relarguée dans le milieu (Bertin et al. 2012). La même étude a évalué la toxicité d'un mélange d'amides gras, et a montré que 100 ppm d'extrait induit 100 % de mortalité chez des larves du poisson *Sciaenops ocellatus*. Les amides gras présents chez *A. viridis* pourraient ainsi contribuer à la défense contre les prédateurs.

Tableau 8 Distribution et structure des Amides gras isolées d'*A. viridis*. Epi : épiderme, Gas : Gastroderme, FIS : *Symbiodinium* fraîchement isolés, CS : *Symbiodinium* en culture. Souligné : majoritaire

n°	Amide gras	Distribution	Structure
72	C14:0-amide Myristamide	Epi/Gas/ FIS/CS	
73	C16:0-amide Palmitamide	<u>Epi/Gas/</u> <u>FIS/CS</u>	
74	C16:1-amide Palmitoléamide	Epi/Gas/ FIS/CS	
75	C18:0-amide Stéaramide	<u>Epi/Gas/</u> <u>FIS/CS</u>	
76	C18:1-amide Elaidamide	Epi/Gas/ FIS	
77	C18:2-amide Linoléamide	Epi/Gas/ FIS	

#### 4. Fraction F<sub>3</sub> : stérols et cérides

La signature chimique de la fraction F<sub>3</sub> a été acquise par HPLC-UV-DEDL. Elle comporte un ensemble de composés de faible polarité (Figure 59). Leur absorbance à l'UV est très faible, hormis quelques composés ayant une absorbance modérée à 280 nm, laissant penser à la présence de doubles liaisons conjuguées.

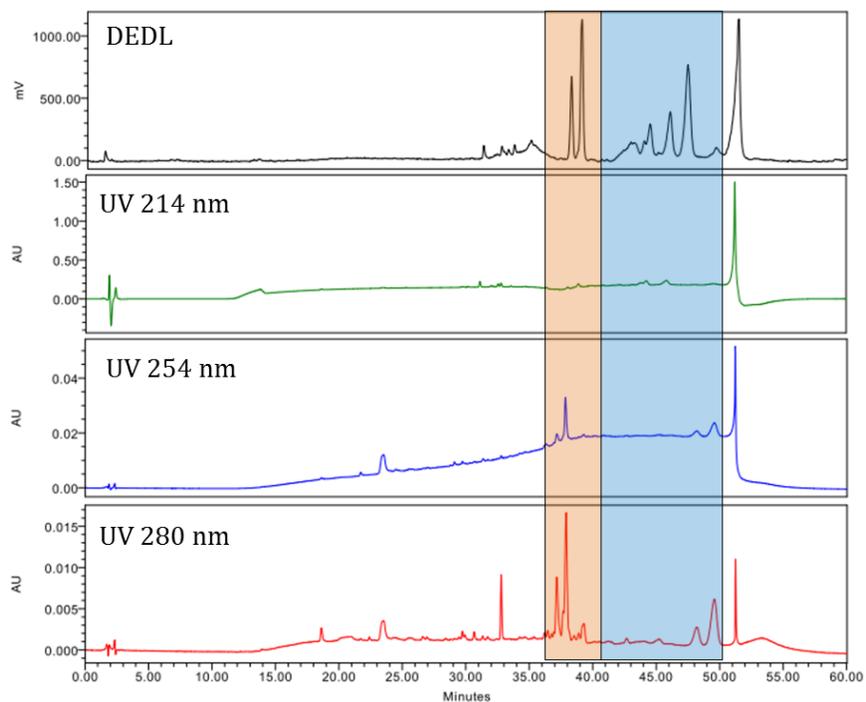


Figure 59 Empreinte chimique caractéristique de la F<sub>3</sub>. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 0:100 en 30 min. Les signaux correspondant aux stérols sont encadrés en orange, ceux correspondant aux cécides en bleu.

Après séparation des composés identifiés comme pigments par chromatographie sur colonne ouverte sur phase Diol, la fraction F<sub>3</sub>' obtenue est analysée par GC/MS (Figure 60). Deux classes de lipides sont représentées, les stérols (en orange) et les cires (en bleu). Elles ont été isolées par CCM préparative (silice), les composés ont été caractérisés par GC/MS sur la base de leur profil chromatographique et de leur spectre de masse.

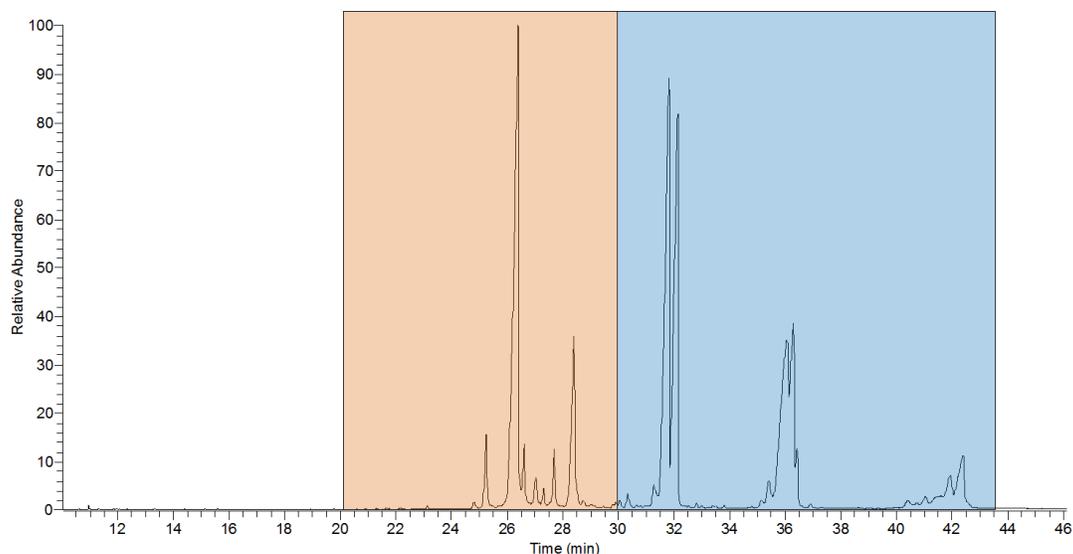
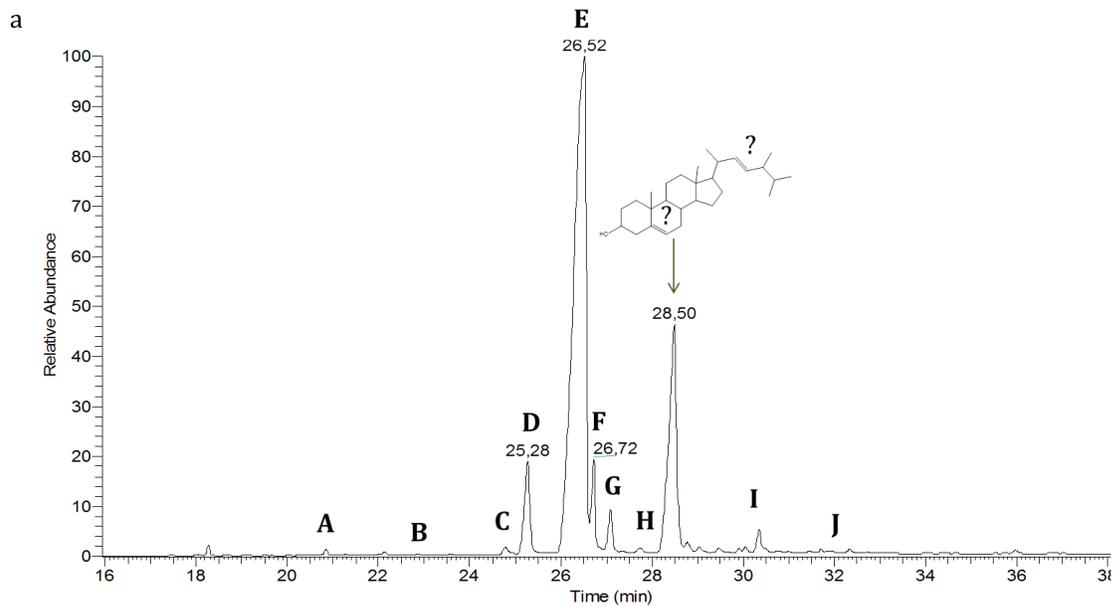


Figure 60 Chromatogramme GC/MS caractéristique de la fraction F<sub>3</sub> (instrument A, colonne Zebron ZB-5MS 30 × 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 μm). Gradient de température : 100-230°C à 25°C.min<sup>-1</sup> ; 230-290°C à 2,5°C.min<sup>-1</sup> 290-300°C à 11°C.min<sup>-1</sup>. Ionisation électronique (70 eV).

#### a) *Stérols*

Après dérivatisation au *N,O*-bis-triméthylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA), 11 composés présentent une empreinte spectrale caractéristique de la famille des stérols (composés **78** à **87** ; Figure 61 a). L'interprétation des spectres de masse a permis de caractériser 10 stérols, sur la base d'ions diagnostiques (Figure 61 b).



n°	Stérol identifié	Structure	n°	Stérol identifié	Structure
78	A Cholesta4,6dien-3 $\beta$ -ol		83	F Stellastérol	
79	B 24-norcholesta5,22-dien-3 $\beta$ -ol		84	G Brassicastérol	
80	C Dehydroergostérol		85	H Cholesta3,5dien-7 $\beta$ -one	
81	D Cholesta5,22-dien-3 $\beta$ -ol		86	I $\beta$ -sitostérol	
82	E Cholestérol		87	J 7-cétocholestérol	

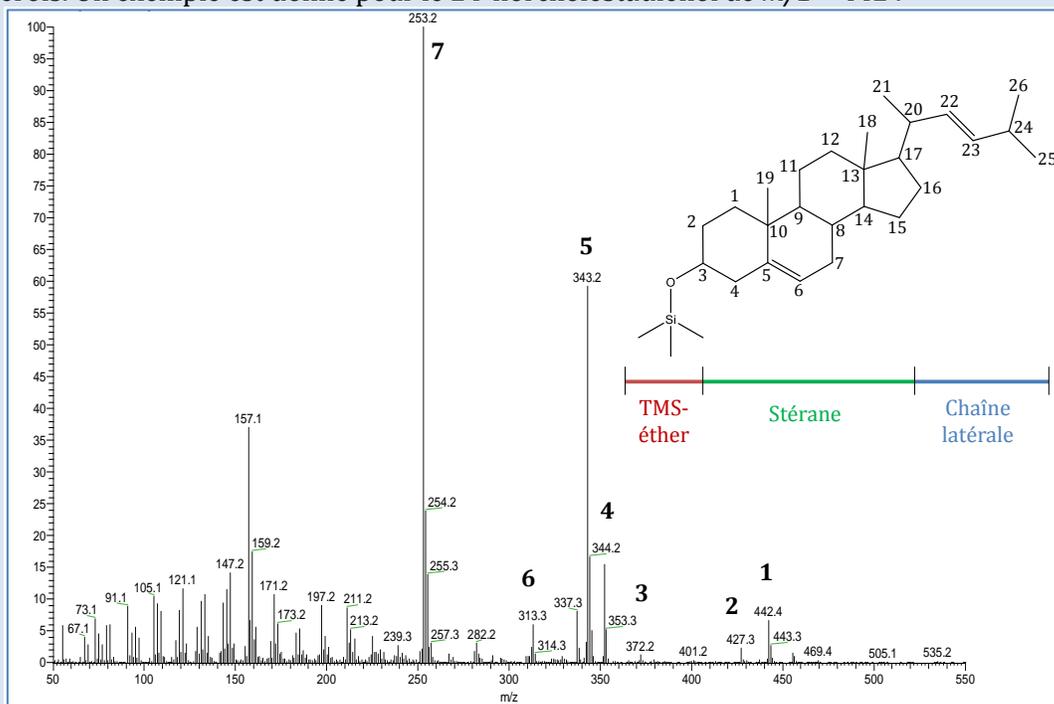
Figure 61 Stérols identifiés et caractérisés d'*A. viridis* (composés 78-87). a, chromatogramme GC/MS de la fraction contenant les stérols et numérotation des composés identifiés (instrument A, colonne Zebron ZB-5MS 30  $\times$  0,25 mm, épaisseur de film 0,25 $\mu$ m). Gradient de température : 100-230 $^{\circ}$ C à 25 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$ ; 230-290 $^{\circ}$ C à 2,5 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$  290-300 $^{\circ}$ C à 11 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$ ); b, identification et structure des stérols caractérisés.

Un exemple de fragmentation est présenté pour le 24-norcholestadienol (Encart 2). La distribution des stérols au sein des tissus de l'anémone et de ses symbiotes est présentée en détails dans la Partie V.4. de ce chapitre.

## Encart 2 : fragmentation des stérols – exemple du 24-norcholestadienol

Les stérols sont généralement analysés par GC/MS (en ionisation électronique et en mode positif) sous leur forme triméthylsilyl (TMS) éther, permettant d'augmenter leur volatilité et leur facteur de réponse. L'ordre d'éluion est complexe, car la position des doubles liaisons et des groupements méthyles est très variable.

Les spectres de masse des stérols TMS-éthers donnent l'ion moléculaire, ainsi que des fragments caractéristiques liés à la perte du groupement TMS-éther, de la chaîne latérale ainsi que du noyau de stérane. Les travaux de Knights et al. 1967 ; Brooks et al. 1968 ; Ballantine et al. 1976 ; Pizzoferrato et al. 1993 ; Gerst et al. 1997 ou encore Bortolomeazzi et al. 1999 ont largement contribué à la compréhension du mode de fragmentation des stérols. Un exemple est donné pour le 24-norcholestadienol de  $m/z = 442$  :



### Interprétation des ions produits :

n°	$m/z$	ion	caractéristique
1	442	$M^{+\bullet}$	Stérol. Possède 26 carbones et 2 insaturations
2	427	$M-CH_3$	Groupement méthyle
3	372	$M-C_5H_9$	Pic pair : réarrangement (double liaison en $\Delta 22$ )
4	352	$M-TMSOH$	
5	343	$M-CL-2H$	Perte chaîne latérale (CL) + 2H (CL monoinsaturée de $C_7H_{13}$ )
6	313	$M-TMS-O-CH^*-CH=CH_2$	Présence d'un M-129 : double liaison en $\Delta 5$
7	253	$M-CL-2H-TMSOH$	Pic de base

Les stérols sont impliqués dans de nombreuses fonctions, telles que la rigidité des membranes cellulaires, pour lesquelles ils sont indispensables. Ils participent à la signalisation endocrine des Cnidaires (Tarrant et al. 2005) et sont des précurseurs de vitamines et hormones. Présent dans la fraction contenant les stérols, l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) a également été isolé et caractérisé.

Parmi les stérols dérivés du cholestérol, on distingue dans l'anémone *A. viridis* les cholesta-4,6-dien-3-ol, les cétones 7-cétocholestérol et cholesta-3,5-dien-one. Le cholestérol est néanmoins très majoritaire. Un fort taux de cholestérol a d'ailleurs été reporté chez des Dinoflagellés (Mansour et al. 1999a ; Volkman 2003). Dans les liposomes, le cholestérol associé à la Vitamine E protège les acides gras polyinsaturés des dommages oxydatifs (Samuni et al. 2000). En effet, les acides gras polyinsaturés sont les lipides les plus sensibles à l'oxydation. Mais l'oxydation des stérols par les rayons UV ou les ROS peut produire des cétones, telles que le 7-cétocholestérol ou le cholesta-3,5-dien-one (Smith et al. 1978). De plus, il a été montré que l'apport de ROS *in vitro* dans des érythrocytes humains induit un fort taux d'oxydation du cholestérol en cholesta-4,6-dien-3 $\beta$ -ol ou en cétostérols. Il a également été montré dans cette étude que les acides gras polyinsaturés n'étaient dans ce cas pas sensibles à l'apport de ROS (Liu et Shan 2006). Par extension, le cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol pourrait provenir lui aussi de l'oxydation de son précurseur, le cholestérol. Parmi les phytostérols présentés, on distingue les 24-norcholesta-5,22-dien-ol, brassicastérol et  $\beta$ -sitostérol. Aucun 4 $\alpha$ -méthyl stérol (famille des dinostérols) ou 23-méthyl stérol (famille des gorgostérols) n'a été identifié. Ces structures sont très représentées dans les Dinoflagellés dont le genre *Symbiodinium* (Kokke et al. 1981 ; Withers 1983), et ont été considérées comme marqueurs de Dinoflagellés. Cependant leur présence n'est pas systématique (Leblond et Chapman 2002), et peut être associée à d'autres organismes, tels que les diatomées (Giner et Wikfors 2011).

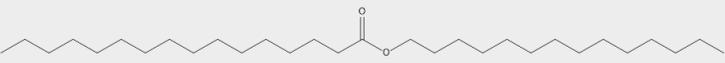
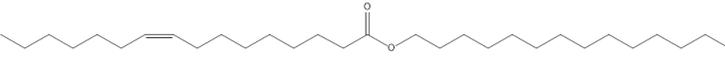
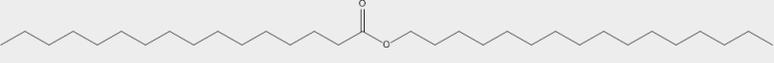
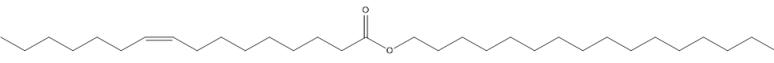
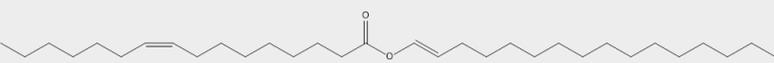
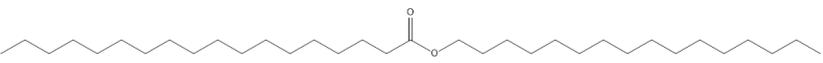
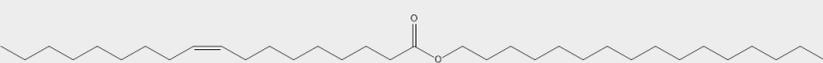
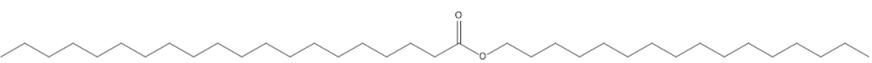
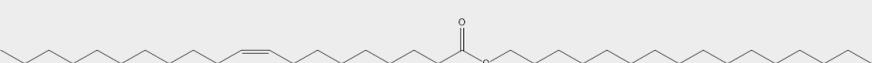
Les transferts de lipides peuvent se faire entre l'hôte et les symbiotes par transport actif *via* des protéines. Par exemples, des protéines de la famille Nieman-Pick ou protéines NPC2 sont impliquées dans le métabolisme lipidique, jouent potentiellement un rôle dans le transport de lipides, et notamment de stérols (Chapitre 1, partie IV.2. p. 59). Ce rôle a été avéré chez l'Homme (Storch et Xu 2009). L'anémone de mer *A. viridis* possède un gène NPC2 dupliqué et la copie NPC2-d est surexprimée dans le gastroderme à l'état symbiotique (Dani et al. 2014). Une hypothèse a été avancée concernant le rôle de la protéine NPC2 dans le transport de lipides. Dans ce cadre, des expériences de modélisation et docking *in silico* ont débuté (en collaboration avec le Pr Antonczak et

le Dr Diharce de l'équipe Arômes, Parfums, Synthèse et Modélisation de l'Institut de Chimie de Nice) afin d'étudier les cibles potentielles de la protéine. La protéine avNPC2-d a pu être modélisée à partir de ses analogues bovine (Friedland et al. 2003) et fourmi (*Camponotus japonicus*, Ishida et al. 2014), et des tests de docking *in silico* ont été entrepris avec différents stéroïdes (cholestérol,  $\beta$ -sitostérol et 22-déhydrocholestérol). Afin de comparer *in situ* les résultats apportés par les expériences de modélisation, des expériences d'interaction ligand-récepteur et de spécificité de substrats seront réalisées par SPR (Surface Plasmon Resonance) à l'aide du Biacore (plateau technique de biochimie analytique, INRA Agrobiotech).

#### b) *Cérides*

Neuf cérides ont pu être identifiés par GC/MS (Tableau 9). Ces composés sont des esters d'alcools gras et d'acides gras, leur caractérisation est basée sur des ions diagnostiques liés à la perte d'une chaîne grasse ou d'un acide gras (Moldovan et al. 2002 ; Fitzgerald et Murphy 2007 ; Urbanová et al. 2012), ou issue d'une rupture allylique dans le cas de chaînes grasses insaturées. Les spectres de masse produits sont comparés à ceux disponibles dans la base de données NIST (Chapitre 1, partie III.1.c), p. 45).

Tableau 9 Cérides isolés et caractérisés d'*A. viridis*, et composition relative (% des cérides totaux).

n°	Céride	Quantité relative (% cérides totales)	Structure
88	C30:0	1%	
89	C30:1	<0,5%	
90	C32:0	21%	
91	C32:1	26%	
92	C32:2	1%	
93	C34:0	3%	
94	C34:1	35%	
95	C36:0	<0,5%	
96	C36:1	12%	

Un exemple de caractérisation (cire C32:1) est exposé (Figure 62). L'ensemble des cérides présentés possèdent des chaînes grasses saturées ou mono-insaturées, les plus abondants sont les cérides en C32:1 et C34:1, qui représentent 61% des cérides totaux.

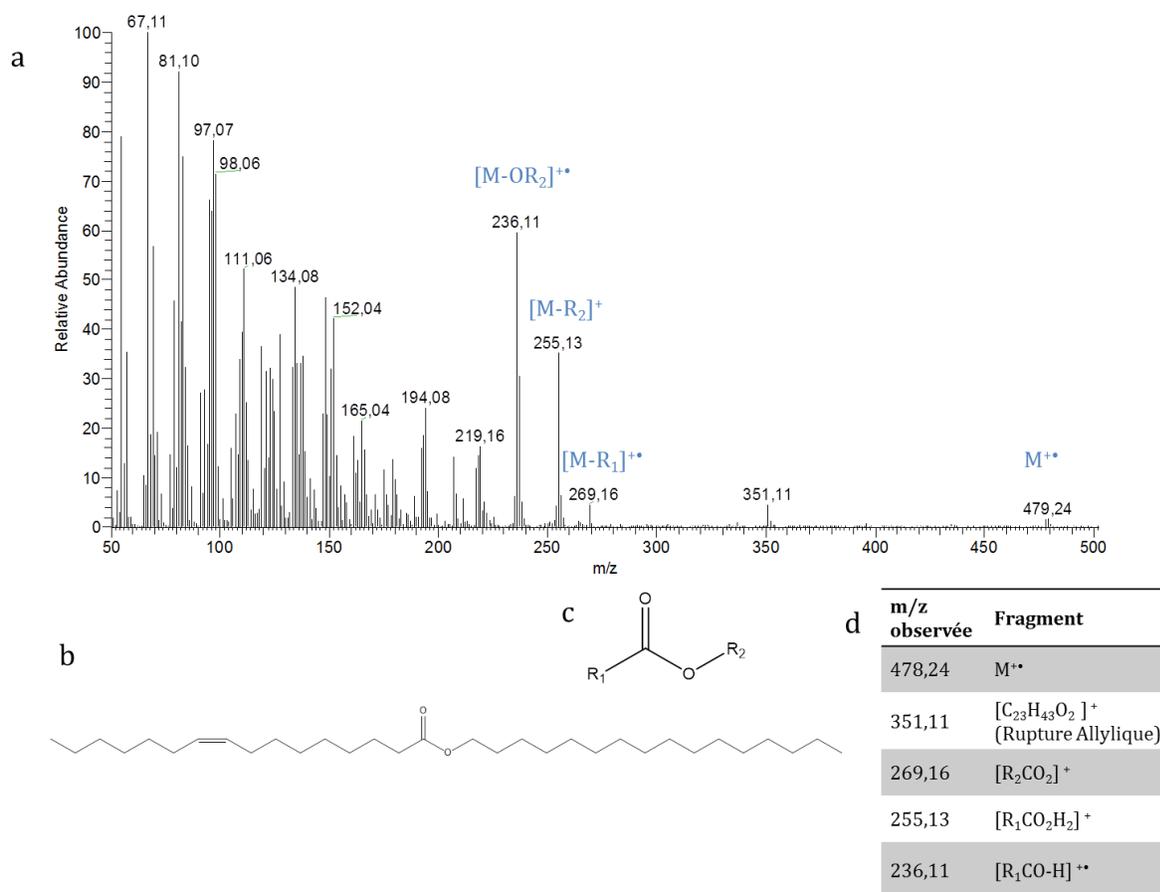


Figure 62 Caractérisation structurale du céride C16:1/C16:0 (composé 96) a, spectre de masse ; b, structure du composé ; c, structure caractéristique d'un céride ; d, fragments caractéristiques proposés.

Les cérides sont les principaux constituants des cires, substances grasses formant une couche mince à la surface des feuilles de végétaux terrestres, de la cuticule des insectes ou de l'épiderme animal. Leur rôle principal est donc la protection de surface (Gunstone et al. 2007 ; Riederer et Muller 2008). Cependant, les cérides forment aussi des réserves de lipides (Lee et al. 2006), qui peuvent permettre l'ajustement de la flottabilité de certains organismes marins tels que des crustacés (Pond et Tarling 2011) ou des poissons (Phleger 1998). Leur formation implique la voie de biosynthèse des acides gras : la formation d'un ester d'alcool gras est induite par  $\beta$ -oxydation d'une part, et réduction par une acyl CoA réductase d'autre part (Figure 63).

Leur fonction chez les Cnidaires n'est cependant pas claire. Les cérides sont secrétés dans le mucus, formé d'un mélange complexe de protéines, polysaccharides et lipides exsudés à la surface de l'épiderme des Cnidaires (Galois et Thomassin 1982). Le mucus aide à la prédation, protège des pathogènes et de la sécheresse (en revue dans Brown et Bythell 2005). Les cérides sont aussi retrouvés en abondance dans les gouttelettes lipidiques (Chen et al. 2015). Au niveau intracellulaire,

les cérides sont localisés au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, de la même manière que chez les mammifères (Cheng et Russel, 2004). Ils sont considérés comme lipides de réserve lente (Lee et al. 1971 ; Lee et Patton 1989).

Leur distribution chez *A. viridis* est principalement restreinte aux compartiments animaux, et ils sont majoritaires dans l'épiderme. Cette distribution confirme leur apport dans le mucus de l'anémone de mer. La présence de chaînes grasses saturées et mono-insaturées dans les cérides caractérisées d'*A. viridis* pointe aussi leur rôle de réserve d'énergie. Le corail *Euphyllia glabrescens* présente une distribution similaire : les cérides sont présents chez l'hôte mais absents des FIS et des CS (Chen et al. 2015). Leur composition en acide gras et alcool gras est en accord avec les résultats obtenus sur des anémones *A. viridis* prélevées au large de l'Ecosse (Harland et al. 1991).

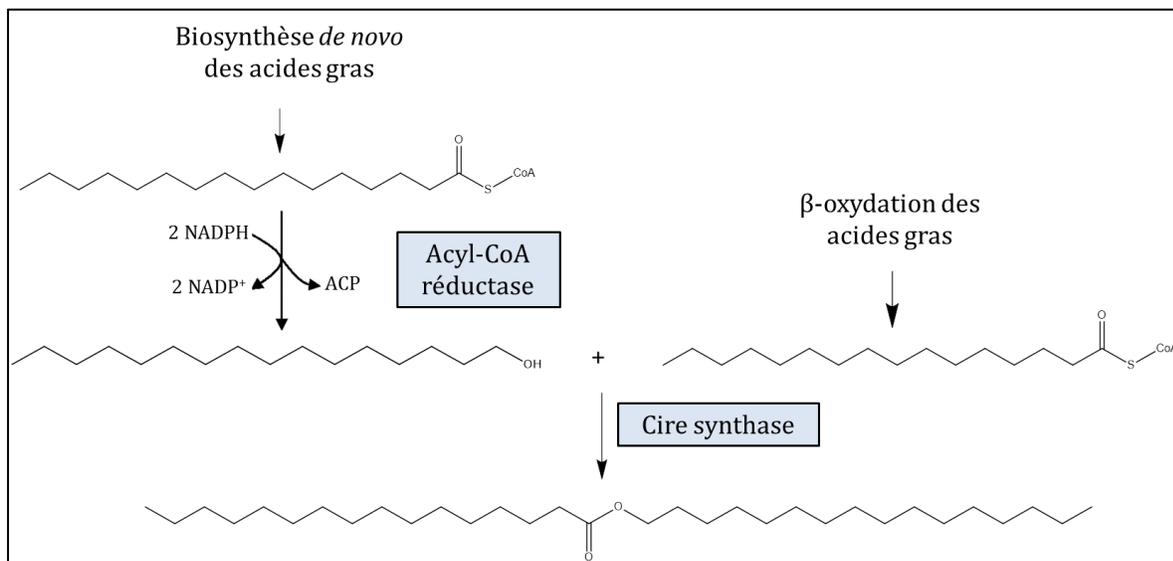


Figure 63 Schéma de biosynthèse des cires (cérides), modifié d'après Kalscheuer et al. 2006

L'extraction, l'isolement et l'analyse du métabolome d'*A. viridis* a permis de caractériser 96 composés dont 88 sont des lipides. La majorité des lipides identifiés sont des lipides de structure, principaux composants des membranes. Ils possèdent une forte proportion d'acides gras saturés C16:0 et d'acides gras polyinsaturés en C18, C20 et C22. De plus, un transfert d'une part de ces lipides ou de leurs intermédiaires de biosynthèse des symbiotes vers leur hôte a été démontré. Afin d'identifier au mieux la diversité ainsi que la distribution des lipides chez *A. viridis*, une étude par approche lipidomique a été réalisée.

## V. Caractérisation du lipidome d'*A. viridis*

L'analyse du métabolome de l'anémone de mer *A. viridis* a montré une dominance de lipides. Une étude par approche lipidomique a été entreprise à partir des extraits lipidiques de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolés de tentacules d'anémones, afin de mieux appréhender la diversité et la distribution des lipides. L'analyse et la caractérisation des classes de lipides, acides gras (AG) issus de lipides neutres et de lipides polaires ainsi que des stérols ont été réalisées selon un protocole opératoire adapté (*Démarche expérimentale, partie IV.2, p. 227, schématisé dans la Figure 64*). Cette analyse permet également de confirmer la structure des acides gras proposée dans la partie précédente.

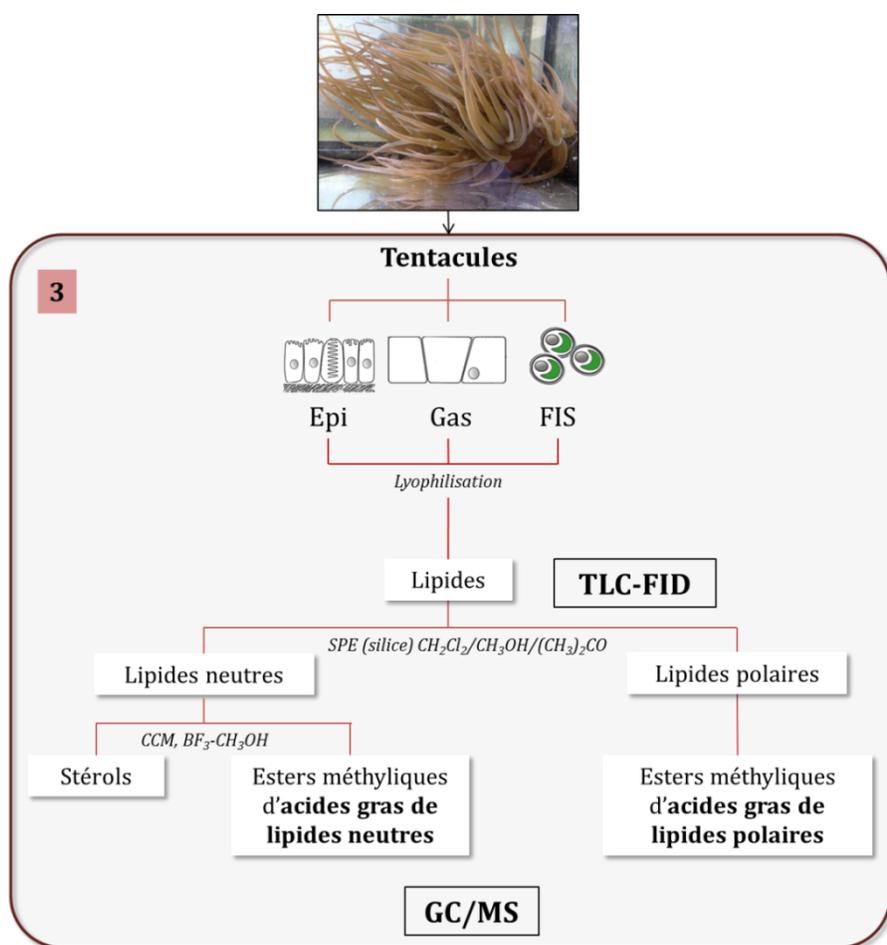


Figure 64 Schéma expérimental global de la méthodologie d'extraction, séparation, dérivatisation et analyse des fractions lipidiques obtenues à partir des compartiments animaux (épiderme, Epi et gastroderme, Gas) et des symbiotes fraîchement isolés (FIS).

## 1. Lipides totaux

Les lipides comptent pour  $17 \pm 2\%$  de la masse sèche de tentacules d'*A. viridis* (Capron et al. 2010). Le [Tableau 10](#) présente la distribution des lipides dans les compartiments animaux (épiderme et gastroderme) et les symbiotes. Cette répartition n'est pas uniforme, les cellules de *Symbiodinium* sont plus riches en lipides que les compartiments animaux (les lipides comptent pour  $23,5 \pm 1,0\%$  de la masse sèche des symbiotes, contre  $14,1 \pm 1,4\%$  de l'épiderme et  $16,9 \pm 1,2\%$  et du gastroderme).

Tableau 10 Poids sec et teneur en lipides dans les compartiments animaux (épiderme et gastroderme) et les cellules de *Symbiodinium* issus de tentacules d'*A. viridis*.

	Epiderme	Gastroderme	<i>Symbiodinium</i>
poids sec de tissu (% du poids sec de tentacules)	$52,0 \pm 4,1$	$23,9 \pm 2,7$	$24,1 \pm 3,8$
quantité de lipides (% du poids sec)	$14,1 \pm 1,4$	$16,9 \pm 1,2$	$23,5 \pm 1,0$

## 2. Répartition en classes de lipides

Les lipides totaux extraits des compartiments d'*A. viridis* ont été analysés par TLC-FID permettant de caractériser et quantifier 6 classes de lipides ([Tableau 11](#)). Sont distingués les cires/esters de stérols, les acides gras libres, les triacylglycérols (TAG), les diacylglycérols (DAG), les stérols et les lipides polaires. Les lipides polaires sont largement majoritaires puisqu'ils représentent plus de 80% des lipides totaux dans tous les compartiments (respectivement,  $81,9 \pm 0,8\%$ ,  $83,8 \pm 0,8\%$  et  $86,5\%$  des lipides de l'épiderme, du gastroderme et des symbiotes). De plus, la fraction symbiotique est significativement plus riche en lipides polaires que les compartiments animaux (test Oneway,  $P = 0,027$  ; test post-hoc de Tukey,  $P < 0,05$ ). Cette classe de lipides inclut les phospholipides, lipides de bêtaïnes, galactolipides et céramide aminoéthylphosphonate caractérisés à partir de la fraction  $F_2$  issue de l'extrait brut organique ([partie IV.3, p. 89 de ce chapitre](#)).

La classe des stérols est présente en proportion non-négligeable, puisqu'elle représente 8,4 à 15,5% des lipides totaux. L'épiderme est significativement plus riche en stérols que les compartiments symbiotiques (test Oneway,  $P = 0,019$ ; test post-hoc de Tukey,  $P < 0,05$ ). Les cires/esters de stérols, AG libres, DAG et TAG sont considérés comme lipides de réserve, et représentent moins de 5% des lipides totaux des tissus d'*A. viridis*.

Tableau 11 Distribution des classes de lipides (% de lipides totaux) dans l'épiderme et le gastroderme d'*A. viridis*, et les cellules de *Symbiodinium*. Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

Classe de lipide (% lipides totaux)	Epiderme	Gastroderme	<i>Symbiodinium</i>
Cires/esters de stérol	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4
Acides gras libres	0,6 $\pm$ 0,1*	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,4
Triacylglycérols	0,5 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,4
Diacylglycérols	0,7 $\pm$ 0,0*	1,5 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
Stérols	15,5 $\pm$ 0,9*	11,5 $\pm$ 0,6*	8,4 $\pm$ 1,0*
Lipides polaires	81,9 $\pm$ 0,8	83,8 $\pm$ 0,8	86,5* $\pm$ 0,8

\* :  $P < 0,05$ , test « oneway » suivi du test post hoc de Tukey

### 3. Distribution des acides gras issus des lipides de réserve et de structure

Les lipides totaux ont été séparés entre lipides neutres (de réserve) et lipides polaires (de structure). Ils ont été transestérifiés afin d'obtenir des esters méthyliques d'acides gras (Fatty Acid Methyl Ester, FAMES) de lipides neutres et de lipides polaires, selon le protocole décrit dans la Figure 64 et détaillé dans la Démarche expérimentale, partie III.1, p. 225). Leur caractérisation est basée sur (i) leur temps de rétention comparé à ceux de standards analytiques (mix de FAMES no. 47885-U, Sigma-Aldrich et huile de Menhaden:Capelin) et leur équivalent en longueur de chaîne (Equivalent Chain Length, Encart 3) ; et (ii) leur spectre de masse à partir de l'interprétation d'ions produits caractéristiques et de la base de données spectrale NIST (NIST 2008).

### Encart 3 : calcul des ECLs pour l'identification de FAMEs

La dérivation des acides gras en leurs FAMEs correspondants est très employée pour l'étude structurale par GC/MS : leur structure reste simple (addition d'un groupement méthyle), ils sont volatiles, et les spectres de masse de nombreux FAMEs sont disponibles dans les bibliothèques. L'interprétation des spectres de masse issus de FAMEs peut néanmoins être problématique car l'identification de la position de doubles liaisons ou de méthyles est basée sur des ions diagnostiques de très faible intensité (Dobson et Christie 2002 ; Dubois et al. 2009).

Le temps de rétention des FAMEs augmente avec la taille de leur chaîne grasse et leur nombre d'insaturations.

L'Equivalent Chain Length (ECL) est basée sur l'équation de Dubois et al. 2009 (1) calculée à partir de l'indice de Kovats (Kovats 1958). L'ECL décrit le calcul de la rétention chromatographique d'un composé relatif aux temps de rétention d'une série d'homologues connus. Les composés de référence sont en général les acides gras saturés correspondants.

$$(1) ECL_{(x)} = n \frac{tR_{(x)} - tR_{(z)}}{tR_{(z')} - tR_{(z)}} + z$$

x = est le composé d'intérêt

z = le nombre d'atomes de carbone du composé de référence éluant avant x

z' = le nombre d'atomes de carbone du composé de référence éluant après x

t<sub>R</sub> = temps de rétention du composé

Les ECLs sont dépendantes de la phase stationnaire de la colonne de chromatographie utilisée et du gradient de température appliqué. Pour les analyses décrites ci-dessous, les paramètres employés sont identiques à ceux décrits dans les travaux de Dubois et al. 2009.

Les analyses par GC/MS ont permis de caractériser 70 FAMEs, dont la longueur de chaîne varie entre 14 et 24 carbones, le nombre d'insaturations entre 0 et 6, et possédant 0 à 4 groupements méthyles (Tableau 12).

Tableau 12 Equivalent Chain Lengths (ECL) calculées à partir des acides gras caractérisés d'*A. viridis*.

Acide gras	ECL	Acide gras	ECL	Acide gras	ECL	Acide gras	ECL	Acide gras	ECL
12:0	12	16:1n-4	16,41	18:1n-9	18,18	20:0	20	20:5n-3	21,76
Iso 14:0	13,5	Iso 17:0	16,47	18:1n-7	18,24	20:1n-11	20,12	22:0	22
14:0	14	Iso 17:1	16,51	18:2n-9	18,36	18:5n-3	20,12	22:1n-11	22,1
14:1n-5	14,36	16:2n-6	16,6	18:2n-7	18,5	20:1	20,15	22:1n-9	22,16
Iso 15:0	14,47	Aiso 17:0	16,64	Iso 19:0	18,56	20:1n-9	20,16	22:1n-7	22,25
Aiso 15:0	14,64	16:2n-4	16,87	18:2n-6	18,63	20:1n-7	20,25	22:2	22,28
15:0	15	17:1n-7	16,88	Iso 18:2n-6	18,67	20:2n-9	20,3	22:2	22,55
15:1n-6	15,21	iso 17:1	16,89	18:2n-4	18,85	20:2	20,55	22:2	22,59
Iso 16:0	15,48	17:0	17	18:3n-9	18,88	20:2n-6	20,62	22:3n-9	22,91
20:0 4-methyl	15,71	16:3n-4	17,19	18:3n-6	18,97	20:3n-6	20,91	22:4n-6	23,12
16:0	16	17:1	17,25	19:0	19	21:0	21	22:5n-6	23,37
16:1n-9	16,22	Iso 18:0	17,47	19:1n-7	19,24	20:4n-6	21,12	22:5n-3	23,75
16:1n-7	16,25	16:4n-1	17,75	18:3n-3	19,27	20:2n-3	21,3	22:6n-3	24,05
16:1n-6	16,36	18:0	18	18:4n-3	19,59	20:4n-3	21,53	24:1n-9	24,15

Les acides gras issus des lipides neutres et des lipides polaires ont été répertoriés dans l'épiderme, le gastroderme et les cellules de *Symbiodinium* spp. fraîchement isolées (Tableau 13). Pour l'ensemble des acides gras caractérisés, des tests « oneway » par permutation ont été réalisés, suivis du test post hoc de Tukey lorsque le test « oneway » se révèle significatif.

Tableau 13 Composition en acides gras de lipides neutres et de lipides polaires (% d'acides gras totaux) et distribution dans les compartiments d'*A. viridis* (épiderme et gastroderme) et les cellules de *Symbiodinium*. Moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne) ; n=3. Les acides gras majoritaires (>5%) sont représentés en bleu.

Acide Gras	Acides gras de lipides neutres (%)			Acides gras de lipides polaires (%)		
	Epiderme	Gastroderme	<i>Symbiodinium</i>	Epiderme	Gastroderme	<i>Symbiodinium</i>
14:0	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	tr	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
<b>16:0</b>	<b>20,1 <math>\pm</math> 4,9</b>	<b>14,9 <math>\pm</math> 3,0</b>	<b>23,6 <math>\pm</math> 2,9</b>	<b>13,7 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>19,9 <math>\pm</math> 3,0</b>	<b>22,9 <math>\pm</math> 1,6</b>
<b>18:0</b>	<b>18,7 <math>\pm</math> 7,5</b>	<b>18,5 <math>\pm</math> 5,5</b>	4,8 $\pm$ 0,9	<b>9,1 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>8,5 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>6,9 <math>\pm</math> 1,0</b>
19:0	0,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	tr	0,3 $\pm$ 0,1	tr	tr
20:0	0,9 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
<b><math>\Sigma</math> Saturés</b>	<b>42,9 <math>\pm</math> 11,2</b>	<b>36,6 <math>\pm</math> 3,4</b>	<b>29,3 <math>\pm</math> 3,4</b>	<b>23,8 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>29,2 <math>\pm</math> 3,4</b>	<b>31,1 <math>\pm</math> 2,3</b>
16:1n-9	0,8 $\pm$ 0,3					tr
<b>16:1n-7</b>	2,4 $\pm$ 1,0	3,8 $\pm$ 2,0	<b>12,7 <math>\pm</math> 2,1*</b>	0,5 $\pm$ 0,1*	1,7 $\pm$ 0,2*	4,7 $\pm$ 0,6*
Iso 17:1	0,8 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2
<b>18:1n-9</b>	<b>5,5 <math>\pm</math> 0,8*</b>	<b>10,1 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>10,6 <math>\pm</math> 2,2</b>	1,4 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2
<b>18:1n-7</b>	4,0 $\pm$ 0,1	<b>6,8 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>5,1 <math>\pm</math> 0,4</b>	1,1 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3
20:1n-11	0,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1		tr		
20:1n-9	1,7 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,3			
<b>20:1n-7</b>	<b>9,6 <math>\pm</math> 1,2*</b>	<b>12,6 <math>\pm</math> 0,9*</b>	4,8 $\pm$ 1,4*	3,6 $\pm$ 0,6	4,0 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,4
<b>22:1n-9</b>	<b>7,1 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 0,8</b>	2,5 $\pm$ 0,9	<b>6,4 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>6,5 <math>\pm</math> 0,3</b>	3,1 $\pm$ 0,5*
22:1n-7	1,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2*	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
<b><math>\Sigma</math> monoinsaturés</b>	<b>33,6 <math>\pm</math> 2,0</b>	<b>43,7 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>37,9 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>16,3 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>16,2 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>14,1 <math>\pm</math> 1,9</b>
18:2n-9	0,5 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
18:2n-6	0,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2
18:3n-6	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 1,4		0,8 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,9
<b>18:4n-3</b>	tr	0,3 $\pm$ 0,1*	<b>5,3 <math>\pm</math> 0,9*</b>	tr	1,4 $\pm$ 0,1*	<b>5,6 <math>\pm</math> 0,4*</b>
18:5n-3			1,5 $\pm$ 0,6*	tr	0,6 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1
20:2n-9	0,4 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
<b>20:4n-6</b>	1,3 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,6</b>	4,0 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,1
<b>20:5n-3</b>	<b>6,2 <math>\pm</math> 2,6</b>	4,4 $\pm$ 0,7	<b>6,3 <math>\pm</math> 1,7</b>	<b>28,7 <math>\pm</math> 0,7*</b>	<b>24,0 <math>\pm</math> 1,9</b>	<b>20,5 <math>\pm</math> 2,1</b>
22:2	0,9 $\pm$ 0,5		0,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1
<b>22:4n-6</b>	3,8 $\pm$ 1,8	1,3 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,5	<b>8,1 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>7,2 <math>\pm</math> 0,7</b>	2,8 $\pm$ 0,4*
<b>22:5n-3</b>	<b>8,1 <math>\pm</math> 3,4</b>	<b>7,6 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 1,7</b>	<b>12,3 <math>\pm</math> 0,4*</b>	<b>7,5 <math>\pm</math> 1,2</b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 1,2</b>
<b>22:6n-3</b>	0,5 $\pm$ 0,3*	1,9 $\pm$ 0,6*	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,4*</b>	0,3 $\pm$ 0,1*	<b>5,0 <math>\pm</math> 1,2*</b>	<b>11,1 <math>\pm</math> 2,1*</b>
<b><math>\Sigma</math> polyinsaturés</b>	<b>23,1 <math>\pm</math> 9,2</b>	<b>18,6 <math>\pm</math> 3,3</b>	<b>32,2 <math>\pm</math> 4,1</b>	<b>59,0 <math>\pm</math> 4,1</b>	<b>54,0 <math>\pm</math> 4,0</b>	<b>54,3 <math>\pm</math> 4,2</b>
<b>Polyinsaturés/ monoinsaturés</b>	<b>0,7 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>3,6 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>3,3 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>3,9 <math>\pm</math> 0,7</b>
<b><math>\Sigma</math> n-6</b>	<b>6,4 <math>\pm</math> 2,4</b>	<b>3,8 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>6,3 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>15,0 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>13,0 <math>\pm</math> 1,0</b>	<b>9,3 <math>\pm</math> 1,3</b>
<b><math>\Sigma</math> n-3</b>	<b>14,9 <math>\pm</math> 6,3</b>	<b>14,5 <math>\pm</math> 1,8</b>	<b>25,0 <math>\pm</math> 4,5</b>	<b>41,7 <math>\pm</math> 1,0</b>	<b>38,7 <math>\pm</math> 3,2</b>	<b>43,9 <math>\pm</math> 3,9</b>
<b>n-6/n-3</b>	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,1</b>

tr : trace (<0,1%) ; les acides gras mineurs (<0,5% des acides gras totaux dans tous les compartiments) ne sont pas listés

\* : différence significative entre les compartiments ( $P < 0,05$ , test « oneway » suivi du test post hoc de Tukey)

La composition en acides gras est similaire entre les lipides neutres et les lipides polaires, mais leur distribution relative diffère fortement. Par exemple, les lipides neutres sont caractérisés par une forte proportion d'acides gras monoinsaturés et un faible rapport d'acides gras polyinsaturés/monoinsaturés en comparaison des lipides polaires (Figure 65). Ces résultats sont en adéquation avec les caractérisations des lipides isolés de l'extrait brut organique d'*A. viridis* (F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub>, parties IV.3 p. 89 et IV.4 p. 108 de ce chapitre).

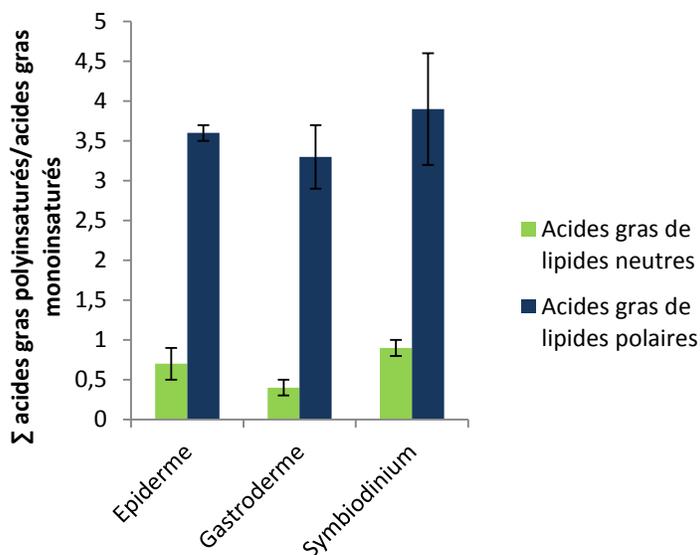


Figure 65 Rapport  $\Sigma$  acides gras polyinsaturés/acides gras monoinsaturés issus de lipides neutres et polaires dans l'épiderme, le gastroderme et les cellules de *Symbiodinium*.

Les lipides neutres sont largement dominés par des AG saturés C16:0, C18:0, et les AG monoinsaturés 16:1n-7, 18:1n-9 et 20:1n-7. Les lipides polaires sont surtout caractérisés par l'AG polyinsaturé 20:5n-3, mais aussi par les AG 22:5n-3 et 22:6n-3, ainsi que les AG saturés C16:0 et C18:0. La distribution des acides gras entre les compartiments n'est pas équitable (Figure 66).

- Acides gras de lipides neutres : les AG 18:5n-3, 18:4n-3, 22:6n-3 et 16:1n-7 sont prédominants dans les cellules de *Symbiodinium* (respectivement,  $P = 0,043$  ;  $0,026$  ;  $0,031$  et  $0,033$  ; test oneway), alors que les AG 20:1n-7 et 22:1n-9 sont concentrés dans les tissus animaux ( $P = 0,041$ , et  $0,072$  ; test oneway ; Figure 66 a).

- Acides gras de lipides polaires : les AG, 16:1n-7 18:4n-3, et 22:6n-3 sont majoritaires dans les cellules de *Symbiodinium* (respectivement,  $P = 0,032$ ,  $0,027$  et  $0,048$  ; test oneway). Ces AG, avec les 18:3n-6 et 18:5n-3, ne sont retrouvés dans l'épiderme qu'en très faible quantité ( $\leq 0,5\%$ ), et suivent un gradient de concentration des symbiotes vers l'épiderme.

Par contraste, les AG 22:1n-9, 22:4n-6 et 22:5n-3 sont prédominants dans les tissus animaux ( $P = 0,034 ; 0,026$  et  $0,040$  ; test oneway ; Figure 66 b).

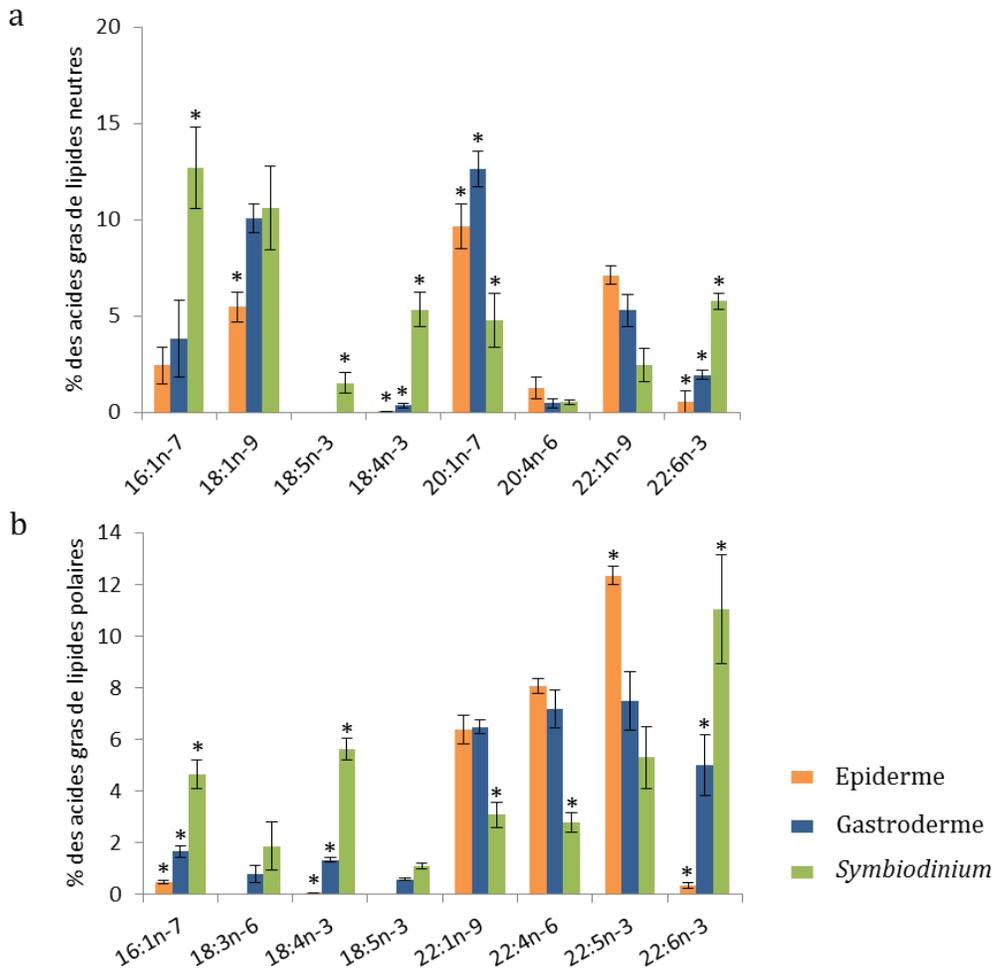


Figure 66 Contribution relative en acides gras issus de lipides neutres (a), et de lipides polaires (b) dans l'épiderme, le gastroderme et les symbiotes d'*A. viridis*. Moyenne  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \*: significativement différent,  $P < 0,05$ . Test oneway suivi du test post hoc de Tukey.

La composition globale en acides gras issus de lipides neutres et polaires entre les compartiments d'*A. viridis* a été testée par ANOSIM (analyse de similarités, Tableau 14), un équivalent non-paramétrique de l'analyse MANOVA. Les comparaisons deux à deux de l'ANOSIM permettent d'identifier les compartiments dans lesquels la composition est différente. Les sorties donnent une valeur de  $P$  ainsi qu'une valeur de  $R$  qui évalue la signification statistique entre 0 et 1 (Clarke et Gorley 2005). Aucune différence significative n'est observée entre les compartiments pour les acides gras de lipides neutres ( $R$  global = 0,564,  $P > 0,05$ ), mais les acides gras de lipides polaires sont différemment exprimés ( $R$  global = 0,86,  $P = 0,04$ ). Les comparaisons deux à deux

obtiennent des R proches de 1 mais des  $P > 0,05$  :  $R = 1$  et  $P = 0,1$  entre l'épiderme et les symbiotes ;  $R = 0,963$  et  $P = 0,1$  entre le gastroderme et les symbiotes ;  $R = 0,741$  et  $P = 0,1$  entre les compartiments de l'hôte.

Tableau 14 Test ANOSIM réalisé sur la distribution des acides gras issus de lipides neutres et de lipides polaires entre l'épiderme, le gastroderme et les cellules de *Symbiodinium* (n=3).

a	Acides gras de lipides <b>neutres</b>	R	Significativité (P)	Permutations possibles	Permutations réalisées	Nombre $\geq$ observé
	Test global	0,564	0,014	280	280	4
	Epiderme, Gastroderme	0,185	0,3	10	10	3
	Comparaisons 2 à 2					
	Epiderme, <i>Symbiodinium</i>	0,667	0,1	10	10	1
	Gastroderme, <i>Symbiodinium</i>	0,778	0,1	10	10	1
b	Acides gras de lipides <b>polaires</b>	R	Significativité (P)	Permutations possibles	Permutations réalisées	Nombre $\geq$ observé
	Test global	<b>0,86</b>	0,004	280	280	1
	Epiderme, Gastroderme	<b>0,741</b>	0,1	10	10	1
	Comparaisons 2 à 2					
	Epiderme, <i>Symbiodinium</i>	<b>1</b>	0,1	10	10	1
	Gastroderme, <i>Symbiodinium</i>	<b>0,963</b>	0,1	10	10	1

Les résultats obtenus en ANOSIM ont été confirmés par une analyse de classification hiérarchique ascendante sur les acides gras issus de lipides polaires (Figure 67). Le dendrogramme sépare totalement les symbiotes des compartiments animaux ; l'épiderme et le gastroderme sont eux séparés à 40% de la hauteur du dendrogramme.

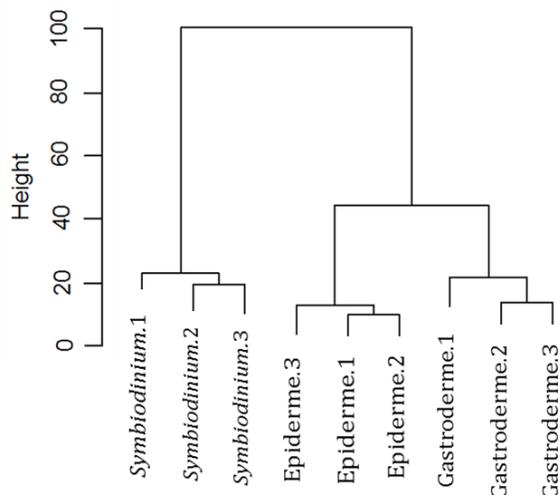


Figure 67 Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante réalisée sur les acides gras issus de lipides polaires dans les compartiments animaux d'*A. viridis* (épiderme et gastroderme), et les cellules de *Symbiodinium*.

Il y a donc une variabilité significative dans la répartition des AG entre les compartiments animaux d'*A. viridis* et les symbiotes. Une Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) a ensuite été réalisée (Figure 68) dans le but d'obtenir des informations sur les acides gras responsables de la séparation observée dans le dendrogramme. L'AFC permet d'analyser la covariation entre des variables et des observations. Dans ce cas les acides gras ont été utilisés comme variables, et les compartiments animaux comme observations. Afin d'étudier précisément les spécificités des compartiments animaux, les symbiotes sont présents comme observations supplémentaires, c'est-à-dire qu'ils sont projetés sur le graphique, mais n'influent pas sur les calculs d'axes factoriels. Les deux premiers axes représentent 90,59% de la variance totale. L'axe 1 distingue les observations (épiderme, gastroderme et *Symbiodinium*), alors que l'axe 2 sépare les AG saturés et monoinsaturés (C16:0, 22:1n-7, 18:1n-9, 16:1n-7) des polyinsaturés (18:3n-6, 22:6n-3, 18:5n-3).

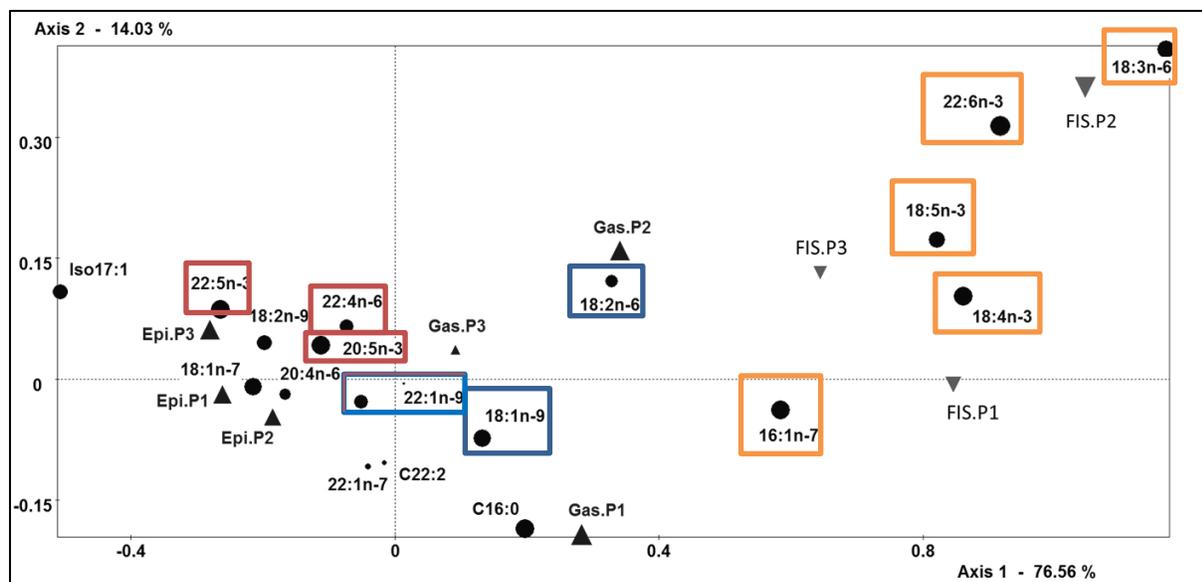


Figure 68 Analyse factorielle des correspondances : répartition graphique des acides gras de lipides polaires (●, variables) et des compartiments animaux (▲, observations : épiderme, Epi ; Gastroderme, Gas) selon les deux premiers axes factoriels. Les *Symbiodinium* fraîchement isolés (FIS) sont projetés comme observations supplémentaires, ▼. La taille des symboles est proportionnelle à leur contribution aux axes factoriels projetés. n=3

La répartition des acides gras les associe à un compartiment donné. Par exemple, les AG 18:1n-9 et 18:2n-6 (encadrés en bleu dans la Figure 68) sont associés au gastroderme, les 20:5n-3, 22:4n-6 et 22:5n-3 (en orange) à l'épiderme, et les 18:3n-6, 18:4n-3, 15:5n-3, 22:6n-3 et 16:1n-7 (en vert) aux symbiotes. Cette répartition observée corrèle pour la plupart des AG avec la distribution observée dans la Figure 66.

#### 4. Distribution des stérols

L'ensemble des stérols recensés (partie IV.4.a), p. 110 de ce chapitre) sont retrouvés dans les compartiments animaux et les cellules de *Symbiodinium*, hormis le cholestanol qui n'a pas été retrouvé dans le tissu gastrodermique (Tableau 15). Dans tous les cas, le cholestérol est très majoritaire (65,8±2,3 à 74,9±5,4% des stérols totaux).

Tableau 15 Composition stérols (% de stérols totaux) et distribution dans les compartiments d'*A. viridis* (épiderme et gastroderme) et les cellules de *Symbiodinium*. Moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne) ; n=3.

Stérol	Epiderme	Gastroderme	<i>Symbiodinium</i>
Cholesta-4,6-dien-3 $\beta$ -ol	0.1 $\pm$ 0.1	tr	0.1 $\pm$ 0.1
24-norcholestadienol	0.8 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Dehydroergostérol	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
Cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol	7.1 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 1.3	6.0 $\pm$ 0.9
Cholestérol	65.8 $\pm$ 2.3	74.9 $\pm$ 5.4	70.2 $\pm$ 5.3
Cholestanol	0.2 $\pm$ 0.1		0.3 $\pm$ 0.1
Stellastérol	3.3 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 1.0	6.8 $\pm$ 1.4
Brassicastérol	3.3 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 1.8
Stérol C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	6.7 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 1.4	3.8 $\pm$ 1.8
$\beta$ -sitostérol	0.9 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3
Autres stérols	8.7 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 3.9

tr : trace (<0,1%)

## 5. Discussion

Les Cnidaires sont en général riches en lipides (Harland et al. 1993 ; Yamashiro et al. 1999 ; Imbs et al. 2010b). La proportion de lipides retrouvée dans les tentacules d'*A. viridis* (17 $\pm$ 2%) est en accord les quantifications observées pour d'autres Cnidaires tempérés (Harland et al. 1991). Les lipides sont les principaux constituants des membranes et la principale source de réserves. Les symbiotes de coraux sont connus pour transférer une partie de leurs lipides à leur hôte. Pour l'anémone de mer *A. viridis*, les symbiotes ont une plus grande concentration en lipides (23,5 $\pm$ 1%) que leur hôte (14,1 $\pm$ 1,4% pour l'épiderme, 16,9 $\pm$ 1,2% pour le gastroderme). Cela indique que les cellules de *Symbiodinium* pourraient être le site principal de biosynthèse des lipides au sein de l'holobionte.

La discussion sur les AG dans cette section est appuyée par la [Figure 69](#), qui décrit les voies de biosynthèse et de transferts possibles entre les cellules de *Symbiodinium* spp. et les compartiments animaux d'*A. viridis*. La voie de biosynthèse proposée repose sur les voies précédemment publiées (Imbs et al. 2010a ; Dunn et al. 2012).

### a) *Lipides neutres*

*A. viridis* possède très peu de lipides neutres (entre 2,6 et 5,1% de cires, TAG, DAG et AG libres), en contraste avec la majorité des Cnidaires symbiotiques (50 à 65% des lipides totaux, Yamashiro et al. 1999 ; Imbs et al. 2006). Les lipides neutres ont surtout un rôle de réserves énergétiques, et peuvent aussi être en partie stockés dans des gouttelettes lipidiques (Kellogg et Patton 1983; Luo et al. 2009; Peng et al. 2011). Il a récemment été démontré que ces gouttelettes lipidiques sont accumulées dans les cellules des symbiotes, et seraient transférées dans les cellules du gastroderme (Luo et al. 2009; Peng et al. 2011; Weng et al. 2014). Ces structures n'ont été rencontrées que rarement chez *A. viridis*. Leur faible présence peut être expliquée par le fait que la mer Méditerranée offre, contrairement aux eaux tropicales, une disponibilité en nutriments importante et constante, il n'est donc pas nécessaire de stocker des quantités importantes de réserves énergétiques.

La composition et la distribution en acides gras issus des lipides neutres révèle une forte dominance de lipides saturés et monoinsaturés. Ces particularités ont par exemple été répertoriées pour les AG des cérides ([partie IV.4.b](#)), [p. 114 de ce chapitre](#)). Les acides gras des séries n-7 et n-9 peuvent être synthétisés *de novo* à partir de l'acide palmitique (C16:0) par élongation et désaturation de ce dernier (Miyazaki et Ntambi 2008). Les AG 20:1n-7, 20:1n-9 et 22:1n-9 sont prédominants dans les compartiments animaux, mais sont aussi présents dans les cellules de *Symbiodinium*. Les Dinoflagellés ne possèdent en général pas d'AG monoinsaturés à longue chaîne ( $\geq 20$  carbones, Mansour et al. 1999b). Leur présence peut alors résulter d'un transfert de l'hôte vers ses symbiotes. Ces AG monoinsaturés à longue chaîne peuvent être désaturés et/ou incorporés à des lipides complexes, mais jouent aussi des rôles importants dans la différenciation cellulaire ou l'homéostasie. Par exemple, l'AG 20:1n-9 incorporé aux DAG joue le rôle de lubrifiant et prévient l'évaporation à la surface de la peau et des yeux des rongeurs (Miyazaki et al. 2001). Ces lipides peuvent jouer le même rôle chez les anémones de mer : secrétés dans le mucus, ils protègent contre la dessiccation durant les marées basses (Bythell et Wild 2011).

Si la majorité des AG issus de lipides neutres sont saturés ou mono-insaturés, entre 18,6 et 32,2% d'entre eux sont polyinsaturés. Ces AG pourraient participer à la synthèse de lipides complexes. Certaines espèces peuvent renfermer des TAG possédant des AG polyinsaturés. Par exemple, l'acide arachidonique (20:4n-6) peut être accumulé dans les TAGs de l'algue *Parietochloris insica* sous certaines conditions de limitations en azote (Khozin-Goldberg et al. 2002), puis réincorporé dans des lipides membranaires en situation de stress (Cohen et al. 2010).

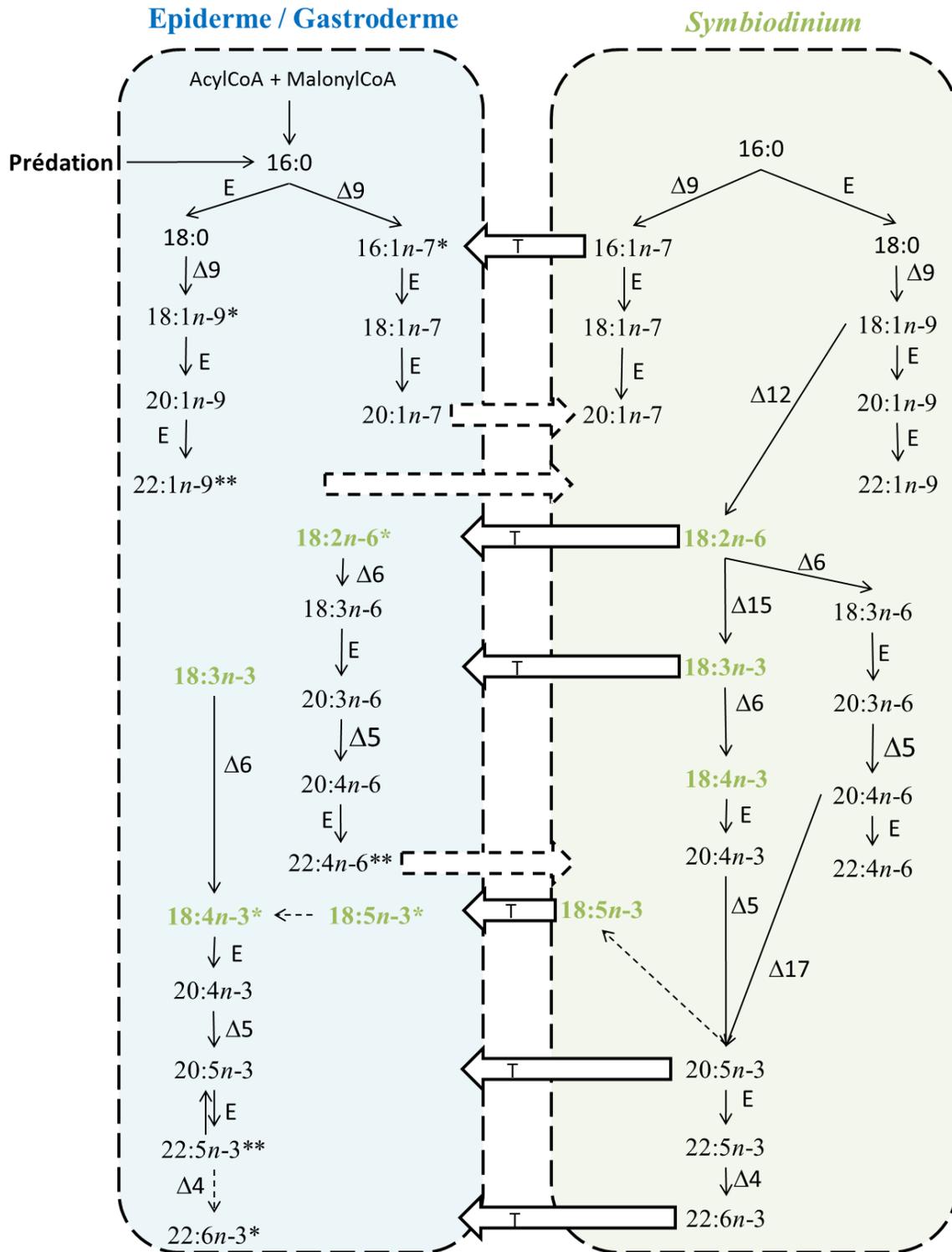


Figure 69 Voie de biosynthèse et transferts possibles des acides gras dans les compartiments de l'hôte (épiderme et gastroderme), et les symbiotes *Symbiodinium* spp. Δ : désaturase, E : élongase, T : transferts documentés (flèches continues, Imbs et al. 2010a ; Dunn et al. 2012) ou potentiels (flèches pointillées), \* : plus concentré dans l'épiderme que le gastroderme ; \*\* : plus concentré dans les tissus de l'hôte que dans les symbiotes.

## b) *Lipides polaires*

Les lipides polaires sont caractérisés par une forte proportion d'AG polyinsaturés, avec une dominance de l'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3) dans les trois compartiments étudiés (20,5 à 28,7%). Cet AG peut provenir de l'élongation du 18:5n-3, la désaturation du 20:4n-6 ou la rétroconversion du 22:5n-3 (Kaur et al. 2011). Il est essentiel pour la maturation des gamètes des Cnidaires (Bishop et Kenrick 1980; Pernet et al. 2002). L'AG 22:6n-3 compte pour 11,1±2,1% des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées d'*A. viridis*. Les Dinoflagellés sont normalement caractérisés par de fortes proportions de 22:6n-3 comparé à 20:5n-3 (Mansour et al. 1999a, 2003 ; Leblond et Chapman 2000), mais leur état symbiotique peut participer à l'inversion de ce ratio (Zhukova et Titlyanov 2003; Treignier et al. 2008). Ces AG sont majoritaires dans les lipides du corail *Goniastrea retiformis*, et seraient impliqués dans la reproduction ainsi que la dispersion des larves et seraient acquis de leurs symbiotes (Figueiredo et al. 2012). De plus, les animaux ont une capacité limitée à synthétiser les AG polyinsaturés à longue chaîne de la famille des n-3 (Bachok et al. 2006), suggérant que la présence de ces AG en grande proportion dans les compartiments animaux provient d'un transfert des symbiotes vers leur hôte (Papina et al. 2003 ; Treignier et al. 2008 ; Imbs et al. 2010a ; Imbs et al. 2014).

Les animaux sont complètement dépendants des végétaux pour l'acquisition des deux acides gras essentiels: les AG 18:2n-6 et 18:3n-3 (Papina et al. 2003; Bachok et al. 2006; Dunn et al. 2012). Ces AG sont précurseurs des AG polyinsaturés de la famille des n-3 et des n-6. L'AFC (Figure 68) associe des compartiments à des acides gras. Par exemple, l'AG 18:2n-6 est fortement associé au gastroderme, suggérant un transfert de cet AG essentiel des symbiotes vers les cellules du gastroderme de l'hôte. Les acides gras 18:3n-6, 18:4n-3 et 18:5n-3 sont associés aux symbiotes ; ces AG sont considérés comme des marqueurs de Dinoflagellés symbiotiques de coraux (Papina et al. 2003; Imbs et al. 2010b).

Les AG 20:4n-6 et 22:4n-6 sont fortement associés à l'épiderme par l'analyse AFC, mais sont aussi retrouvés dans les cellules de *Symbiodinium*. Ces AG ne sont généralement pas retrouvés dans les Dinoflagellés libres dans la colonne d'eau, ni les *Symbiodinium* en culture (Suzuki et al. 2003). Ces résultats suggèrent que les AG 20:4n-6 et 22:4n-6 sont transférés de l'hôte vers les symbiotes.

### c) *Stérols*

Les stérols sont retrouvés en proportions plus importantes dans les compartiments animaux ( $15,5\pm 0,9\%$  des lipides totaux dans l'épiderme,  $11,5\pm 0,6\%$  dans le gastroderme) que dans les symbiotes ( $8,4\pm 1\%$ ). Le cholestérol est dominant parmi l'ensemble des stérols identifiés dans tous les compartiments. Sa présence en forte proportion dans les cellules de *Symbiodinium* a précédemment été observée chez des Dinoflagellés (Mansour et al. 1999, Volkman 2003). Les Cnidaires ne peuvent pas synthétiser les stérols *de novo*, leur génome ne possède pas le gène codant pour les enzymes qui permettent la synthèse de l'intermédiaire glycolytique (Yamashiro et al. 1999 ; Tarrant et al. 2009 ; Baumgarten et al. 2015). Leur présence dans les compartiments animaux résulte donc d'un transfert des symbiotes des stérols, ou bien de leurs intermédiaires de biosynthèse.

Dans tous les cas, les transferts de lipides et/ou d'AG entre hôte et symbiotes ne peuvent se faire de manière passive. Un transport actif est nécessaire, par des gouttelettes lipidiques (Peng et al. 2011) ou par un transport actif *via* des protéines (Dani et al. 2014). Par exemple, un transporteur potentiel de lipides/stérols a récemment été identifié dans les anémones *A. pulchella* et *A. viridis* (Dani et al. 2014 ; Lehnert et al. 2014).

## VI. Conclusions et perspectives

L'étude entreprise dans ce chapitre est basée sur la caractérisation du métabolome de l'anémone de mer de Méditerranée *A. viridis*, ainsi que sa distribution dans les tissus cellulaires de l'hôte (épiderme et gastroderme) ainsi que de leurs symbiotes. La méthodologie mise au point d'extraction, de fractionnement et d'isolement des métabolites, ainsi que de caractérisation par RMN, LC/MS/MS et GC/MS a permis d'identifier 96 composés, des bêtaïnes, des pseudopeptides ainsi que des lipides.

Les bêtaïnes sont des composés zwitterioniques jouant un rôle dans l'osmoadaptation ainsi que la photoprotection, deux paramètres importants à la survie des Cnidaires. Quatre bêtaïnes ont été identifiées à partir de la fraction F<sub>1</sub>, d'autres composés zwitterioniques ont été observés mais n'ont pas pu être identifiés à ce jour. Leur faible quantité dans le métabolome de l'anémone ainsi que leur caractère polaire les rend plus complexes à analyser en spectrométrie de masse.

Trois pseudopeptides ont été caractérisés à partir de la fraction F<sub>1</sub>', tous sont modifiés de manière post-traductionnelle par une fonction amide en position C-terminale. Ils ont été identifiés comme des neuropeptides chez d'autres anémones de mer, *A. elegantissima* ou *A. equinata* par exemple. Ils sont localisés dans les neurones au niveau de la mésogée, et jouent un rôle de neurotransmetteurs aussi bien que de neurohormones, impliquées dans la différenciation cellulaire, ou la métamorphose de l'hôte Cnidaire. Des tests préliminaires de bioactivité ont été entrepris sur l'activation de canaux TREK exprimés sur la membrane cellulaire d'œufs de xénope, et devront être poursuivis pour l'ensemble des composés de la fraction F<sub>1</sub>'. Un quatrième peptide de masse moléculaire égale à 4705,1 Da devra être isolé en plus grande quantité et caractérisé par RMN et/ou spectrométrie de masse à large gamme spectrale (de type temps de vol par exemple).

La grande majorité des composés caractérisés chez *A. viridis* s'avère être des lipides. Les lipides polaires sont les plus abondants et les plus diversifiés. *A. viridis* est caractérisée par des phospholipides (phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines), des lipides de bêtaïne (DGCC), et des galactolipides (MGDG et DGDG), un CAEP, des amides gras et amino-alcools, des stérols et des cérides.

Les DGCC, MGDG et DGDG sont des composants structurels des membranes et sont retrouvés en grande proportion chez les organismes photosynthétiques, les champignons ou les bactéries. Ces lipides polaires peuvent se substituer aux phospholipides lorsque le milieu est

appauvri en phosphore. Leur distribution chez *A. viridis* montre que ces composés sont transférés des symbiotes vers l'hôte, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant. Les CAEP sont des composants des membranes retrouvés chez un grand nombre d'invertébrés marins, dont les Cnidaires, mais n'avaient jamais été identifiés chez l'anémone de mer *A. viridis*. De manière intéressante, ce composé n'est retrouvé que dans les cellules de l'épiderme de l'hôte. Leur structure est plus résistante aux enzymes hydrolytiques que les phospholipides, permettant de préserver l'intégrité membranaire du compartiment épidermique face aux enzymes présentes dans les cnidocytes.

Afin de mieux appréhender la diversité et la distribution des lipides chez *A. viridis*, une étude par approche lipidomique a été entreprise à partir des extraits lipidiques de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées de tentacules d'anémones. Les lipides totaux ont été divisés en classes de lipides et leur distribution a été évaluée par des analyses statistiques. Ces analyses ont confirmé la dominance de lipides de structure dans tous les compartiments d'*A. viridis*. L'analyse des acides gras issus de lipides polaires et de lipides neutres a été réalisée, 70 acides gras ont été caractérisés par GC/MS, et l'étude statistique de leur distribution dans les tissus d'*A. viridis* a montré (1) que la composition en acides gras diffère entre les tissus, (2) qu'un ensemble d'acides gras d'origine photosynthétique sont présents dans les compartiments cellulaires animaux, et (3) que les symbiotes possèdent en forte proportion certains acides gras habituellement présents en faibles quantités lorsqu'ils vivent libres dans la colonne d'eau. A partir de ces résultats, des hypothèses de transfert d'acides gras des symbiotes vers leur hôte, mais aussi de l'hôte vers les symbiotes ont été avancées.

La protéine NPC2d joue potentiellement chez *A. viridis* un rôle dans le transport de lipides, et notamment de stérols (Chapitre 1, partie IV.2. p. 59). Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de modélisation et docking *in silico* ont débuté (en collaboration avec le Pr Antonczak et le Dr Diharce de l'équipe Arômes, Parfums, Synthèse et Modélisation de l'Institut de Chimie de Nice). Afin de comparer *in situ* les résultats apportés par les expériences de modélisation, des expériences d'interaction ligand-récepteur et de spécificité de substrats seront réalisées par SPR à l'aide du Biacore (plateau technique de biochimie analytique, INRA Agrobiotech).

## **Chapitre 3 : étude de la réponse au stress chez *A. viridis***

---

## I. Introduction

Le maintien de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés requiert des conditions environnementales stables. En effet, des conditions environnementales défavorables peuvent engendrer un stress menant à la rupture de la symbiose, et à terme un blanchissement de l'hôte Cnidaire (Figure 70). Depuis l'ère industrielle, les activités d'origine anthropique induisent des modifications globales : réchauffement climatique, pollution chimique, acidification des eaux par l'augmentation de la  $pCO_2$  (Chapitre 1, partie II.4.d), p. 39 ; Douglas 2003 ; Lesser 2011) sont autant de facteurs favorisant la rupture de la symbiose. Les symbiotes sont expulsés et le Cnidaire blanchit : il devient aposymbiotique.

Cette situation peut être réversible, mais peut aussi mener à la mort de l'hôte (Hoegh-Guldberg et al. 2007). Ce phénomène de grande ampleur s'accroît et les retombées écologiques (par l'érosion des littoraux ou la perte de biodiversité) comme économiques (par la diminution de la pêche locale ou de l'attrait touristique) sont aujourd'hui considérables (Hoegh-Guldberg 1999).

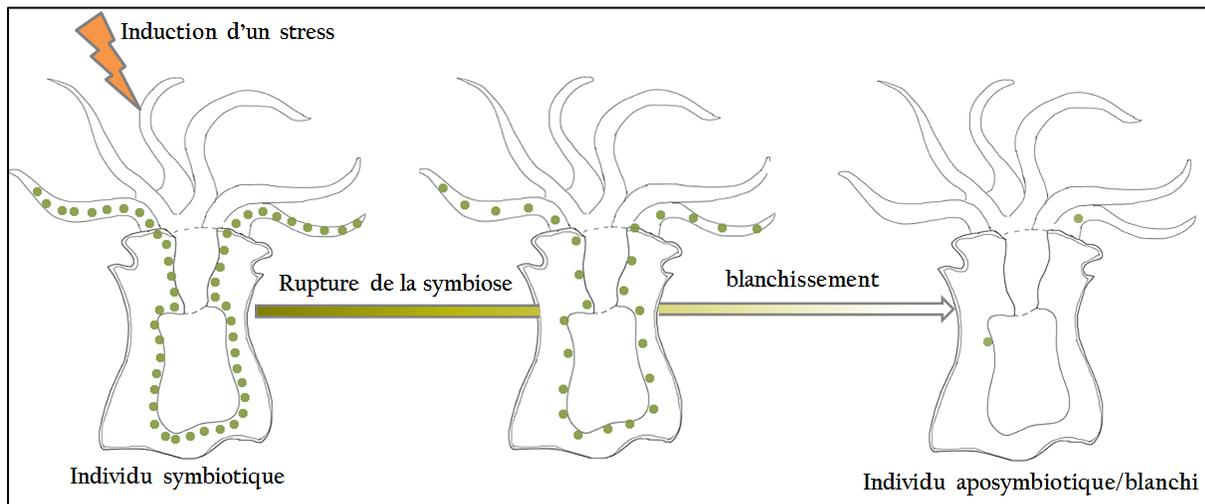


Figure 70 Représentation schématique de l'évolution de la rupture de la symbiose provoquant le blanchissement à la suite d'un stress.

La rupture de la symbiose chez les Cnidaire est initiée par un certain nombre de perturbations aux niveaux cellulaires et moléculaires. Elles concernent souvent les chloroplastes (Takahashi et al. 2004), et plus précisément le photosystème II et les membranes des thylakoïdes (Warner et al. 1999 ; Tchernov et al. 2004). Les dérèglements de la machinerie photosynthétique peuvent induire une augmentation de la production de dérivés actifs de l'oxygène, les ROS (Lesser et

al. 1996 ; Downs et al. 2002), responsables de l'accroissement du stress oxydant dans les cellules de l'hôte (Chapitre I, partie II.4.b), p. 33). Ces facteurs favorisent la rupture de la symbiose : les ROS ont un effet direct sur le génome, le protéome et le métabolome de l'hôte ainsi que sur les symbiotes, et l'intégrité des membranes cellulaires est particulièrement touchée (Tchernov et al. 2004). En conséquence, la perte des symbiotes diminue de manière directe les apports de photosynthétats transférés à l'hôte (Chapitre I, partie II.4.b), p. 33).

La quantité de lipides par exemple agit directement sur la résistance au stress ainsi que sur la récupération de l'hôte à la suite d'un blanchissement (Antony et al. 2009). Par ailleurs, des marqueurs de stress ont pu être déterminés chez des *Symbiodinium* en culture (Tchernov et al. 2004, Kneeland et al. 2013). Cependant, l'identification de l'ensemble de ces mécanismes n'est pas clairement définie, et reste aujourd'hui un enjeu scientifique majeur.

## II. Problématique scientifique et contexte de l'étude

Au cours d'un stress, des modifications du métabolome de l'holobionte ont été recensées. Certains MAAs (acides aminés ressemblant à des mycosporines, [Chapitre 1, partie III.2.b](#)), p. 49) diminuent significativement après 6h de stress thermique appliqué aux coraux scléactiniaires *Platygyra ryukyuensis* et *Stylophora pistillata* (Yakovleva et al. 2004). Des résultats similaires ont été observés pour les acides gras polyinsaturés issus de cellules de *Symbiodinium* de culture (Tchernov et al. 2004) ou du corail *Turbinaria reniformis* (Tolosa et al. 2011). A l'opposé, la concentration en diméthylsulfonylepropionate (DMSP) du corail *Acropora millepora* est doublée après 10 jours de stress thermique (Raina et al. 2013).

L'étude de la réponse au stress chez les Cnidaires implique des prélèvements d'individus dans leur milieu naturel à la suite de perturbations environnementales (Bachok et al. 2006 ; Leutenegger et al. 2007), ou des expériences en laboratoire dans des conditions contrôlées (Dunn et al. 2007 ; Treigner et al. 2009 ; Leggat et al. 2011 ; Ziegler et al. 2014). Le plus souvent, ces conditions simulent les sources de stress naturellement rencontrées ([Chapitre 1, partie II.4.d](#)), p. 39) : l'augmentation de la température de l'eau (Gates et al. 1992 ; Tolosa et al. 2011), l'exposition à de fortes radiations UV (Treigner et al. 2008 ; Leal et al. 2013), ou l'exposition à une pollution chimique (par exemple par des pesticides, Cantin et al. 2007 ; ou des herbicides, Owen et al. 2002). Il existe également d'autres moyens non-naturels pour induire une rupture de la symbiose : à titre d'exemple, l'exposition à des conditions d'obscurité prolongées, ou l'exposition au 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU, Jones 2004). Les expériences en conditions contrôlées permettent un suivi cinétique du stress et du blanchissement induit. Elles font cependant face à deux difficultés majeures : (1) l'induction d'un blanchissement par ces moyens peut mener à la mort des individus, et (2) la quantité de matériel biologique analysé est souvent faible et ne permet le suivi que d'une fraction du métabolome de l'holobionte.

La méthodologie mise en œuvre pour l'étude de la réponse au stress chez *A. viridis* permet de limiter ces difficultés, par (1) la mise en place d'un stress selon deux méthodes différentes (d'origine thermique ou chimique), et (2) l'utilisation d'une base de données de métabolites caractérisés en conditions symbiotiques comme élément de comparaison, ainsi que l'utilisation d'un outil analytique peu-intrusif : l'imagerie par spectrométrie de masse. De plus, l'anémone de mer *A. viridis* possède l'ensemble des avantages permettant l'élaboration d'un suivi cinétique ([Chapitre 1, partie IV.1](#), p. 57).

## 1. *Un stress thermique, un stress chimique*

Un suivi sur 59 jours a été mis en place selon deux conditions de stress différentes. La première condition implique une méthode d'induction de stress largement répandue, l'augmentation de la température de l'eau de mer. Le stress hyperthermique affecte directement la photosynthèse et augmente la production de ROS.

Différents mécanismes de rupture de la symbiose ont été démontrés à la suite d'un stress thermique : l'apoptose (Lesser et Farrell 2004 ; Richier et al. 2006), l'autophagie (Dunn et al. 2007), le détachement cellulaire (Gates et al. 1992), la nécrose cellulaire (Dunn et al. 2004) ou encore l'exocytose (Steen et Muscatine, 1987 ; Tableau 2 p. 39). Une étude réalisée au laboratoire a récemment montré que l'exocytose, la nécrose et l'apoptose sont les principaux mécanismes de rupture de la symbiose rencontrés lors d'un stress hyperthermique chez *A. viridis* (Dani et al. 2015, soumis). Des modifications du métabolome de l'hôte Cnidaire et de ses symbiotes ont pu être décrits à la suite d'un stress hyperthermique (Tolosa et al. 2011 ; Raina et al. 2013), mais n'ont jamais été examinées chez *A. viridis*.

Le second stress appliqué est d'origine chimique, par exposition au menthol de manière sérielle 8/24h (*Démarche expérimentale, partie IV.1, p. 230*). Le menthol est dilué à 20% dans l'éthanol, à une concentration de 0,58 mM dans l'eau de mer (*Encart 4*).

#### Encart 4 : le menthol

Le menthol est un monoterpène cyclique (Figure 71) habituellement utilisé en laboratoire afin d'anesthésier les anémones (Moore 1989 ; Häussermann et Försterra 2005).

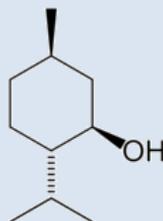


Figure 71 Structure du (-)-menthol

Son mécanisme d'action décrit chez l'Homme agit par blocage des canaux  $\text{Na}^+$  des muscles squelettiques et des neurones, provoquant une dépolarisation des cellules et, par conséquent, une anesthésie locale (Haeseler et al. 2002). De plus, le menthol induit une augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , qui a pour conséquence d'activer des neurones sensoriels TRPM8 responsables d'une sensation de froid chez l'homme (Peier et al. 2002 ; Hans et al. 2012).

La toxicité du menthol a été évaluée par l'ICPS-INCHEM (OCED SIDS 2003, <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/MENTHOLS>) chez un crustacé, *Daphnia magna* ( $\text{LC}_{50}$  à 24h :  $37,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ), et chez une algue chlorophyte, *Scenedesmus subspicatus* ( $\text{ErC}_{50}$  représentant 50% d'inhibition de la croissance :  $16,2 \text{ mg.L}^{-1}$  à 72h).

Leur toxicité chez les Cnidaires n'a pas été évaluée, mais certains monoterpènes (par exemple le géraniol ou la carvone) peuvent induire entre autres une inhibition de la photosynthèse chez les plantes (Brown et al. 1987).

L'utilisation du menthol comme méthode de blanchissement des Anthozoaires symbiotiques a été mise au point par Wang et al. (2012) sur les coraux *Isopora palifera* et *Stylophora pistillata*. Les résultats obtenus sur ces coraux montrent que les paramètres physiologiques et biochimiques de l'hôte rendu aposymbiotique ne sont pas significativement modifiés par rapport à son homologue symbiotique. Une étude récente réalisée au laboratoire a pu déterminer que l'autophagie était le mécanisme majoritaire de rupture de la symbiose induit par l'action du menthol (Dani et al. 2015, soumis).

Le stress thermique appliqué est écologiquement pertinent, puisqu'il mime des conditions naturelles de réchauffement climatique. C'est une technique largement étudiée, il est donc possible

de comparer la réponse d'*A. viridis* au niveau métabolomique et d'émettre des hypothèses basées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu observés à partir d'études réalisées sur d'autres groupes taxonomiques. Le principal inconvénient de cette technique est la forte mortalité qu'elle entraîne en laboratoire (Berkelmans et Van Oppen 2006). Le stress chimique appliqué ne simule pas les conditions naturelles, mais cette nouvelle méthode permet d'obtenir des individus aposymbiotiques avec une viabilité de 100%, et dont les caractéristiques physiologiques et biochimiques sont comparables à celles d'individus symbiotiques (Wang et al. 2012).

## 2. Evaluation de la réponse au stress

L'évaluation de la réponse au stress chez *A. viridis* a été réalisée en parallèle par deux techniques. La première approche est une étude comparative : elle consiste à répéter la méthodologie utilisée pour l'étude d'anémones symbiotiques ([Chapitre 2, III.2, p. 70](#)), et comparer les empreintes chimiques obtenues (symbiotique vs stressées). L'identification de la réponse au stress a donc été déduite à partir de la condition symbiotique.

D'autre part, une technique d'imagerie par spectrométrie de masse a été mise en œuvre. Les techniques utilisées pour la caractérisation du métabolome d'une espèce requièrent souvent une quantité de matériel biologique conséquente, et ne permettent ni leur localisation, ni leur suivi cinétique. Les méthodes traditionnelles (radio- ou immuno- marquage) permettent l'accès à la localisation de composés spécifiques, mais requièrent une connaissance préalable des composés étudiés. L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (désorption/ionisation laser assistée par matrice) permet à la fois l'identification et la localisation de composés directement à partir de coupes de tissus (Caprioli et al. 1997) avec une haute sensibilité et sélectivité. Cette technique ne nécessite pas de connaissance préalable du système métabolomique étudié (Gagnon et al. 2012) pour l'identification de familles de composés recensées dans les bases de données, ou très étudiés par spectrométrie de masse. Cette technique non-intrusive a été adaptée pour l'étude du métabolome d'*A. viridis* afin d'obtenir une cartographie de l'ensemble des molécules potentiellement impliquées dans la relation symbiotique.

Dans le [Chapitre 2, partie IV p. 73](#), le métabolome de l'anémone de mer *A. viridis* a été caractérisé, et la distribution des composés entre les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme) et des symbiotes a été déterminée. Il s'avère que le métabolome d'*A. viridis* est composé en grande

majorité de lipides. Ainsi, une étude par approche lipidomique a été réalisée afin de mieux appréhender la diversité et la distribution lipidique d'*A. viridis*.

Afin d'évaluer la réponse au stress d'*A. viridis* au niveau métabolomique, deux types de stress (thermique et chimique) menant à la rupture de la symbiose ont été appliqués pendant 59 jours, et un stress hyperthermique à court terme a été mis en œuvre pour étudier la réponse du lipidome d'*A. viridis* (Figure 72).

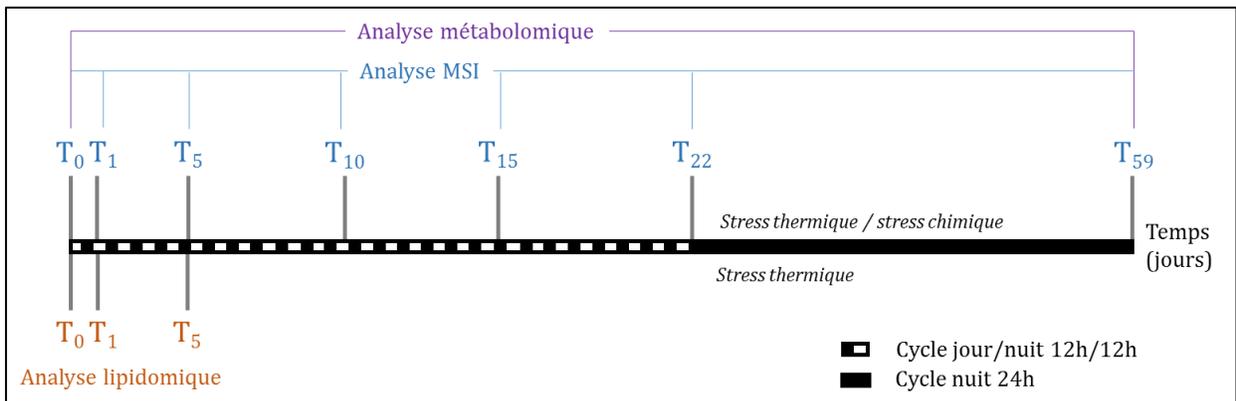


Figure 72 Méthodologie générale employée au prélèvement de tentacules ou d'individus entiers *A. viridis* au cours d'un stress chimique (par ajout de menthol) ou hyperthermique.

Pour l'analyse métabolomique, l'acquisition des empreintes chimiques d'*A. viridis* sont réalisées par HPLC-UV-DEDL avant l'induction du stress (T<sub>0</sub>) et à la fin de la cinétique de stress (T<sub>59</sub>) afin d'identifier des marqueurs potentiels de stress. Les extraits ont ensuite été analysés par LC/MS afin d'identifier ces composés.

Pour l'analyse par MALDI-MSI, des prélèvements de tentacules ont été réalisés à des temps définis (T<sub>1</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>22</sub>) et des coupes de tentacules ont été analysées afin de suivre l'évolution de ces marqueurs au cours des différents stress. Pour chaque prélèvement, la densité relative de symbiotes a été évaluée afin de suivre l'évolution du blanchissement des individus.

Pour l'analyse lipidomique, un stress thermique à court terme (de 5 jours) a été appliqué afin d'évaluer l'éventuelle présence de marqueurs précoces de rupture de la symbiose.

### III. Modifications du métabolome d'*A. viridis* en réponse à un stress

Pour la mise en place du protocole de stress, neuf anémones de mer ont été placées dans les conditions contrôlées de laboratoire (Figure 73) :

- Un stress thermique par augmentation de la température de 10°C a été induit sur 3 individus, et trois autres individus traités par du menthol à 0,58 mM, 8h par jour (Démarche expérimentale, partie IV.1, p. 230)
- Trois individus contrôles sont placés dans des conditions identiques mais sans subir de stress. Un tentacule a été prélevé à chaque temps défini dans la Figure 73 pour le suivi du blanchissement
- A l'issue du stress, un individu stressé chimiquement est prélevé pour une analyse métabolomique.

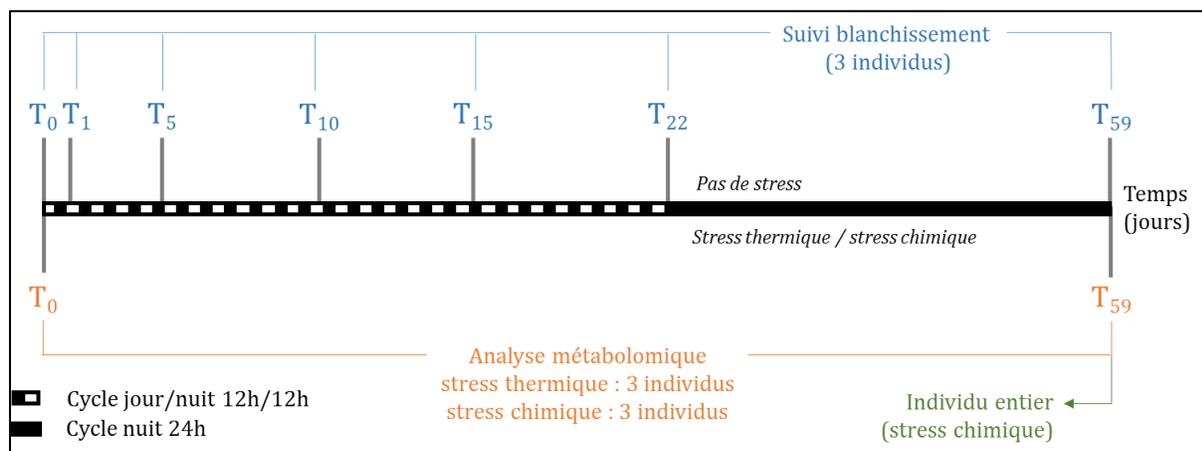


Figure 73 Méthodologie générale employée au prélèvement de tentacules ou d'individus entiers *A. viridis* au cours d'un stress chimique (par ajout de menthol) ou thermique dans le cadre de l'analyse métabolomique.

La méthodologie d'extraction et d'analyse est présentée dans la Figure 74. Le suivi du blanchissement est calculé par rapport à la densité relative en symbiotes. Les analyses métabolomiques sont réalisées à partir des extraits bruts organiques issus de tentacules, dont les compartiments de l'hôte (épiderme et gastroderme) et les cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées (FIS) ont été séparés. L'extrait brut organique issu d'un individu entier aposymbiotique est analysé afin de comparer son empreinte chimique à celle obtenue pour un individu symbiotique (Chapitre 2 III.1 p. 69).

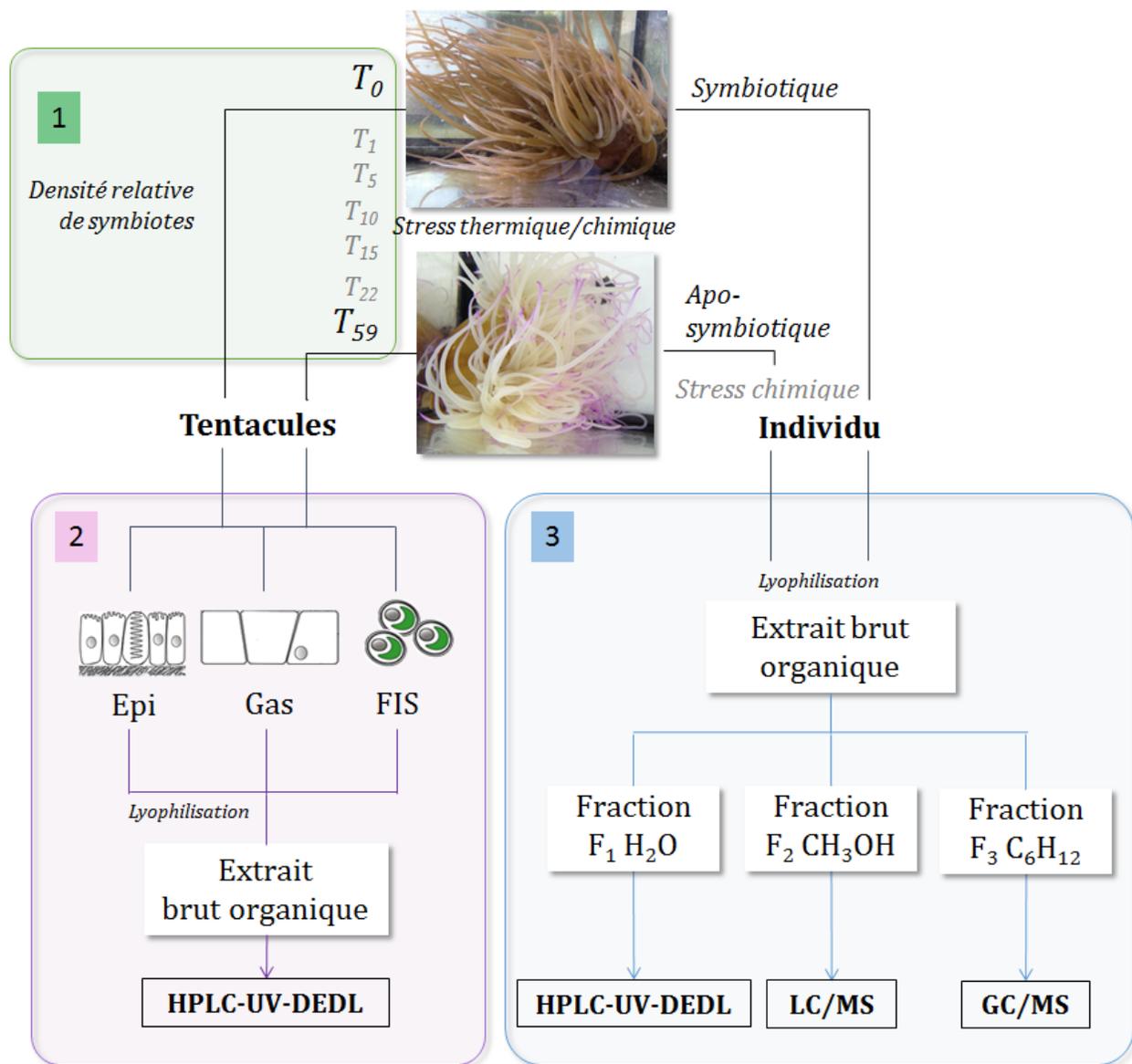


Figure 74 Schéma expérimental global de la méthodologie (1) de suivi du blanchissement lors d'un stress thermique ou chimique, (2) d'extraction et d'analyse des extraits bruts organiques obtenus à partir des compartiments animaux (épiderme, Epi et gastroderme, Gas) et des symbiotes fraîchement isolés (FIS) et (3) d'extraction et de partition à partir d'un individu entier.

### 3. Densité relative de symbiotes

Le suivi cinétique de la densité de symbiotes a été déterminé à partir du prélèvement d'un tentacule, sur la base du nombre de cellules de *Symbiodinium* normalisé par rapport au poids sec de tissu (Figure 75).

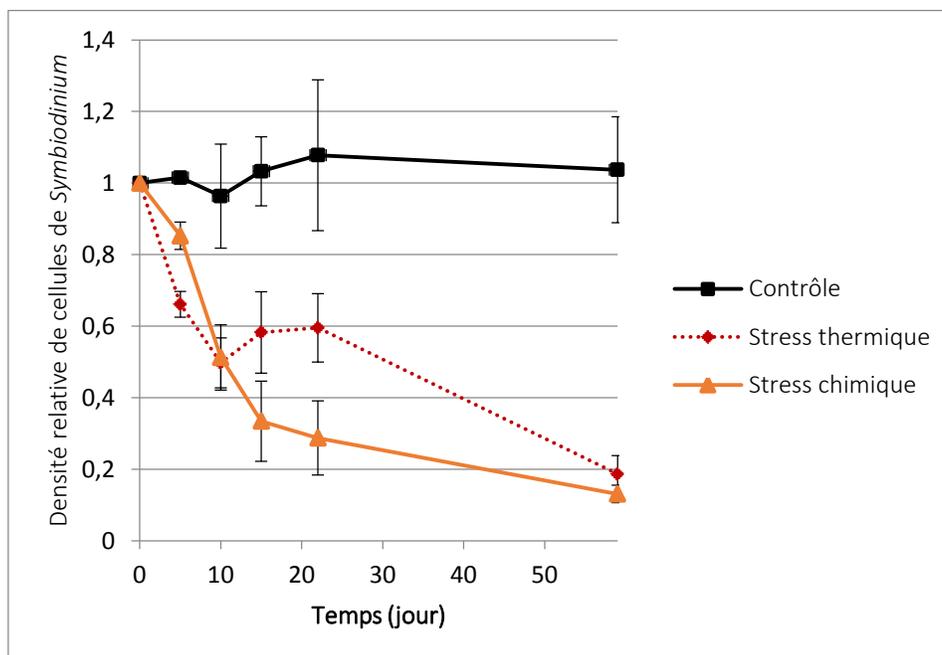


Figure 75 Suivi de la densité relative (par rapport au  $T_0$ ) de cellules de *Symbiodinium* au cours d'un stress hyperthermique (+10°C) ou chimique (menthol). Le nombre de cellules de *Symbiodinium* est normalisé par le poids sec de tissu ; n = 3, moyenne  $\pm$  SEM.

La densité relative de symbiotes fluctue légèrement ( $1 \pm 0,2$ ) dans l'anémone contrôle. Ces variations ne sont pas dues au rythme circadien, puisque les prélèvements ont tous été réalisés à la même heure, mais ils démontrent la régulation de la population de cellules de *Symbiodinium* de l'hôte (Chapitre 1 II.4.c p. 35). L'induction d'un stress thermique ou chimique est efficace pour entamer un processus de rupture de la symbiose, car en moyenne 50% des symbiotes ont été éliminés à  $T_{10}$ , et à la fin de l'expérience ( $T_{59}$ ) la densité de symbiotes atteint environ 20% de sa densité initiale dans les tentacules d'*A. viridis*. A partir de ce stade, les individus seront considérés comme aposymbiotiques.

Un stress chimique par l'ajout de menthol dans l'eau de mer provoque une diminution graduelle de la quantité de *Symbiodinium*, un peu plus rapide dans les 15 premiers jours (perte de 65% des symbiotes), suivie d'une diminution légèrement plus lente entre  $T_{15}$  et  $T_{22}$ .

#### 4. Comparaison des empreintes chimiques

A  $T_0$  et après 59 jours de stress, le protocole mis en place pour l'étude du métabolome d'*A. viridis* (Figure 28 p. 68) a été répété : 10 tentacules d'*A. viridis* ont été prélevées, les tissus animaux (épiderme et gastroderme) ont été séparés, et la fraction symbiotique a été isolée du gastroderme

(cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées, FIS), selon les conditions décrites dans la [démarche expérimentale, partie I.2.b](#) p. 216. L'opération a été réalisée sur 3 individus pour chaque condition (stress thermique et chimique). Une variabilité intra-spécifique d'ordre quantitatif est observée, mais reste comparable d'un individu à l'autre (Annexe 6). Les empreintes métabolomiques des différents compartiments cellulaires avant et à la suite d'un stress ont été réalisées par HPLC-UV-DEDL en vue de comparer l'évolution du métabolome en réponse à un stress.

#### a) *Stress thermique*

Les chromatogrammes HPLC-DEDL ont été obtenus à partir des extraits bruts organiques issus des tissus animaux (épiderme et gastroderme) et des symbiotes. Une étude comparative a été réalisée entre T<sub>0</sub> et T<sub>59</sub> ([Figure 76](#)). Les premiers signaux sont observés à des temps de rétention de 12 à 17 min, et sont caractéristiques des peptides (composés **5** à **8**, caractérisés de la F<sub>1</sub>', [Chapitre 2 IV.2 p. 81](#)). Entre 20 et 35 min, les lipides polaires sont élués (composés **9** à **77**, caractérisés de la F<sub>2</sub>, [Chapitre 2 IV.3 p. 89](#)), et entre 35 et 40 min sortent les lipides neutres (composés **77** à **96**, caractérisés de la F<sub>3</sub>, [Chapitre 2 IV.4 p. 108](#)).

Au niveau de l'épiderme, les signaux caractéristiques des peptides sont surexprimés en condition de stress par rapport à ceux des lipides polaires et neutres, qui sont en moyenne relativement moins abondants. La réponse au stress est différente dans les cellules du gastroderme, les signaux corrélés à l'éluion des lipides étant surexprimés à T<sub>59</sub> par rapport aux peptides. Si le stress thermique est responsable de la diminution des FIS de 80% ([Figure 75](#)), leur empreinte chimique à T<sub>59</sub> montre une augmentation des signaux caractéristiques des lipides neutres chez les *Symbiodinium* restants.

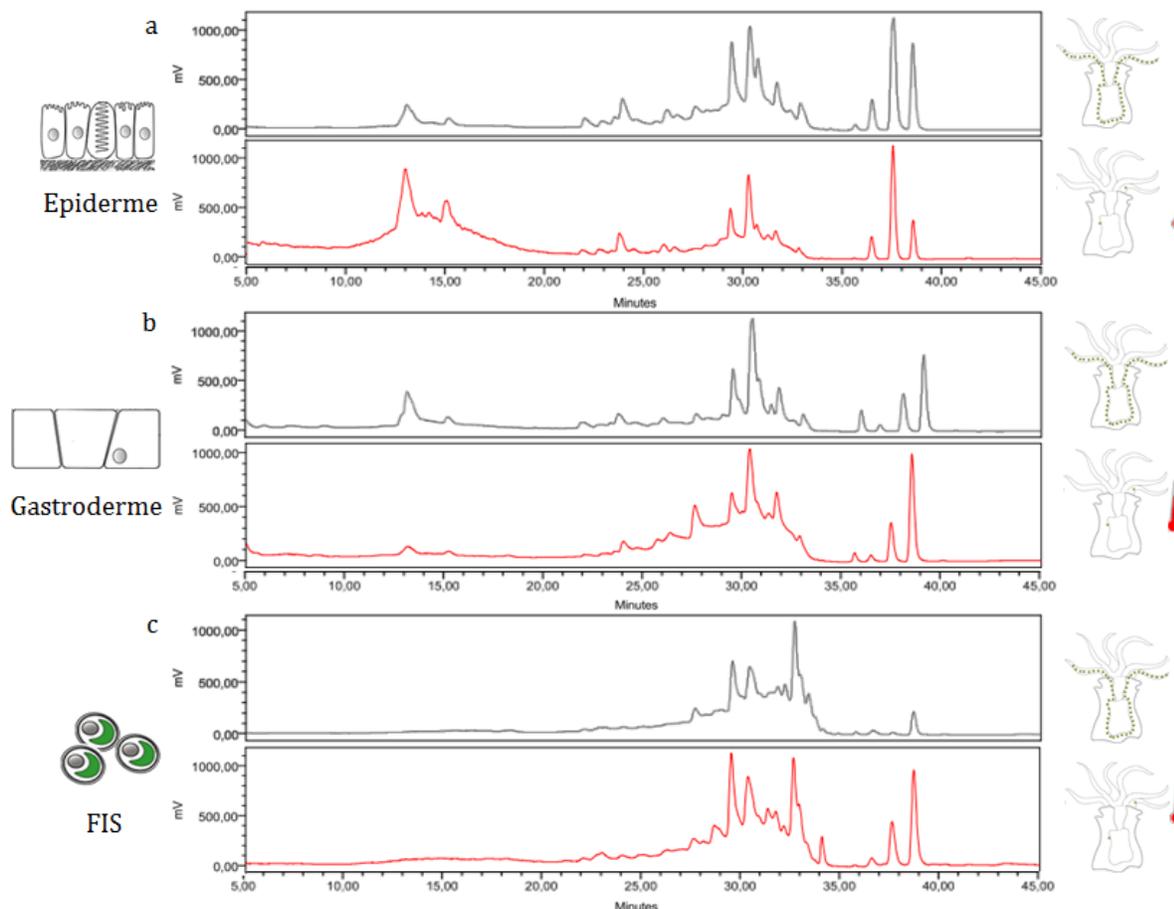


Figure 76 Chromatogrammes HPLC-DEDL des extraits bruts caractéristiques des différents tissus de l'anémone *A. viridis* avant et à la suite d'un stress thermique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

### b) *Stress chimique*

Les chromatogrammes HPLC-DEDL des extraits bruts organiques issus des tissus animaux (épiderme et gastroderme) et des symbiotes d'anémones traitées par le menthol ont été comparés entre  $T_0$  et  $T_{59}$  (Figure 77).

A première vue, l'induction d'un stress chimique semble influencer de manière plus significative que le stress thermique sur le métabolome des différents compartiments de l'anémone *A. viridis*.

Les signaux correspondant aux peptides sont fortement surexprimés par rapport aux lipides en conditions de stress dans l'épiderme et le gastroderme, mais cette régulation n'est visible que pour 2 des 3 anémones analysées (Annexe 6). Les FIS ont un profil similaire entre  $T_0$  et  $T_{59}$ , les lipides polaires sont cependant exprimés différemment.

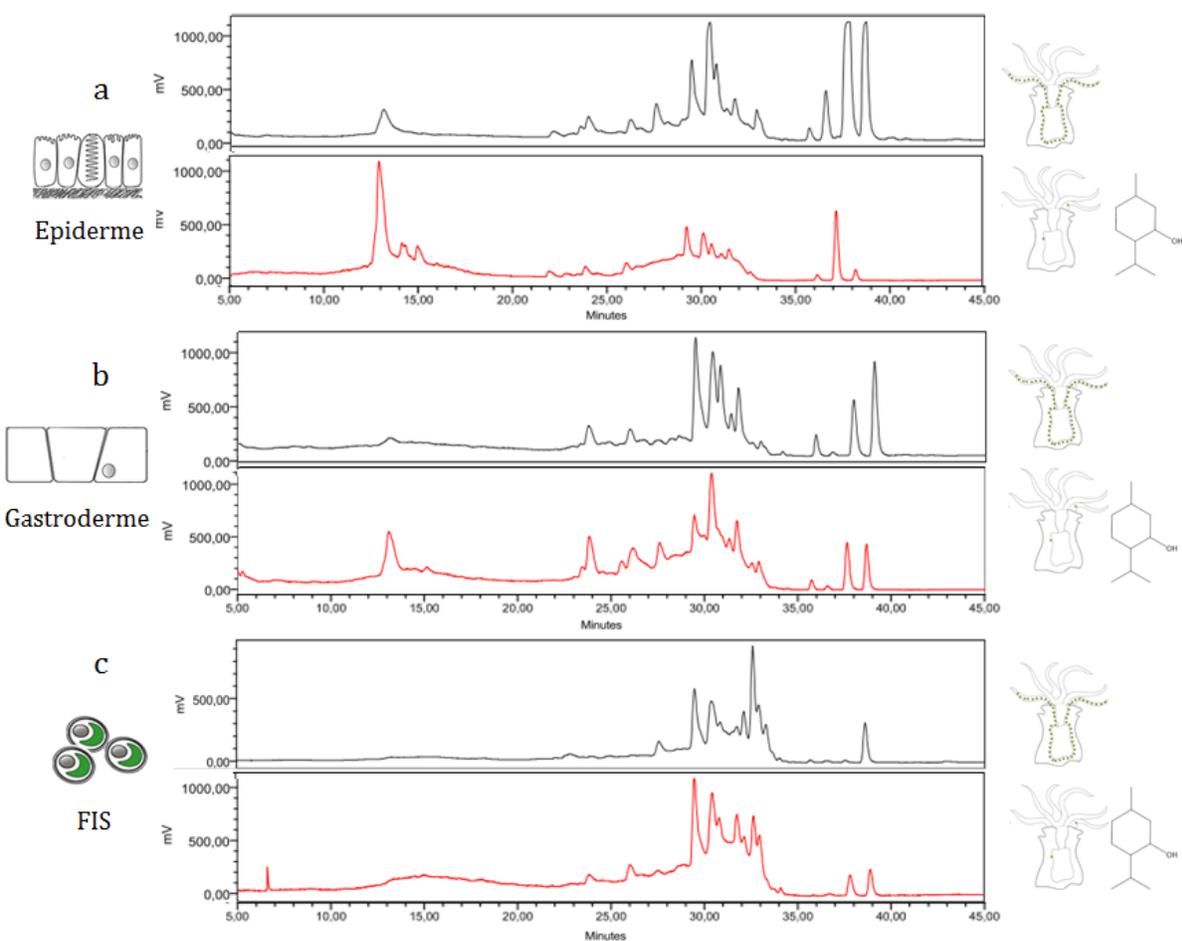


Figure 77 Chromatogrammes HPLC-DEDL des extraits bruts caractéristiques des différents tissus de l'anémone *A. viridis* avant et à la suite d'un stress chimique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

## 5. Individu entier (stress chimique)

Chez le corail *S. pistillata*, la rupture de la symbiose induite chimiquement permet d'obtenir des individus aposymbiotiques sans modification significative de leurs paramètres physiologiques (fréquence respiratoire) et biochimiques (quantité d'acides aminés libres, activité enzymatique ; Wang et al. 2013). Ce mode de blanchissement a été choisi par rapport à un stress thermique dans le but d'étudier de plus près la réponse au stress de l'anémone de mer *A. viridis* au niveau métabolomique. En parallèle, des analyses ultrastructurales ont été entreprises au laboratoire et ont permis de déterminer que l'autophagie est le mécanisme principal de rupture de la symbiose induite par un stress chimique (Dani et al. 2015, soumis). La comparaison des empreintes chimiques dans les différents compartiments d'*A. viridis* a montré une évolution de signaux correspondant aux

peptides et aux lipides. Afin d'identifier les métabolites modifiés par ce stress, des empreintes chimiques ont été comparées à celle issue de métabolome d'un individu entier stressé chimiquement. Pour réaliser ces comparaisons, une donnée supplémentaire est à prendre en compte : le corps (ou pied) de l'anémone. Des empreintes chimiques de la partie « tentacules » et la partie « corps » de l'anémone séparément ont donc été comparées par HPLC-UV-DEDL (Figure 78).

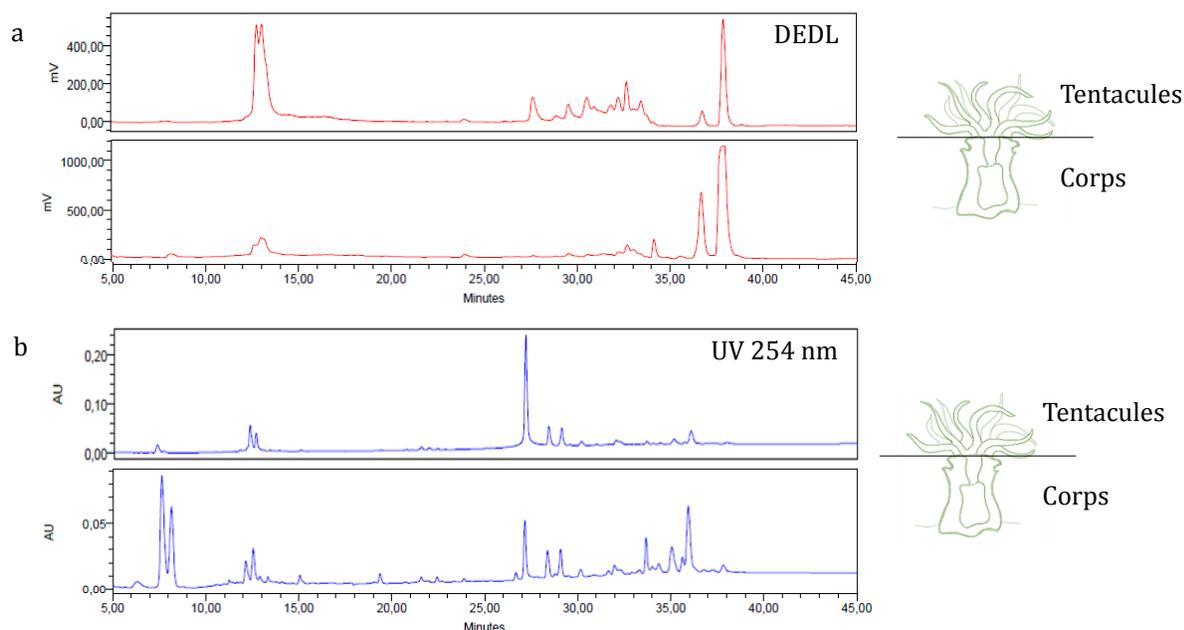


Figure 78 Comparaison des empreintes chimiques issues des extraits bruts organiques de la partie tentacules et la partie corps d'une anémone de mer *A. viridis*. (a) : chromatogramme DEDL ; (b) : chromatogramme UV à 254 nm. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

Il s'avère que l'empreinte chimique issue de la partie « corps » de l'anémone présente des similitudes avec celle de la partie « tentacules » au niveau de la présence des peptides (composés **5-8**) aux temps de rétention 12 à 16 min, ainsi que des stérols et des cérides (composés **78-96**) aux temps de rétention 35 à 40 min. Ces composés sont cependant représentés dans des proportions relatives très différentes (Figure 78a). Les lipides polaires (composés **9-77**) aux temps de rétention 26 à 35 min sont très faiblement présents dans la partie « corps » de l'anémone. L'analyse HPLC-UV à 254 nm permet de distinguer au mieux la présence de lipides polaires dans cette partie (Figure 78b), et souligne la présence de certains signaux dans la partie « corps » (2 signaux éluant entre 7 et 9 min et 2 autres signaux entre 33 et 35 min) absents de la partie « tentacules ». Des différences qualitatives sont donc observées entre les parties « tentacule » et « corps » de l'anémone de mer *A. viridis*.

a) *Analyse de la fraction F<sub>1</sub> (bétaines)*

Les profils métabolomiques issus de la fraction F<sub>1</sub> d'une anémone symbiotique ainsi que d'une anémone stressée chimiquement ont été analysés par HPLC-UV-DEDL. Les chromatogrammes HPLC-UV sont présentés dans la Figure 79. Les signaux 1 à 3 correspondent aux composés **1**, **2** et **3** caractérisés (respectivement, l'homarine, la trigonelline et la zooanémonine, Chapitre 2, partie IV.1, p. 75).

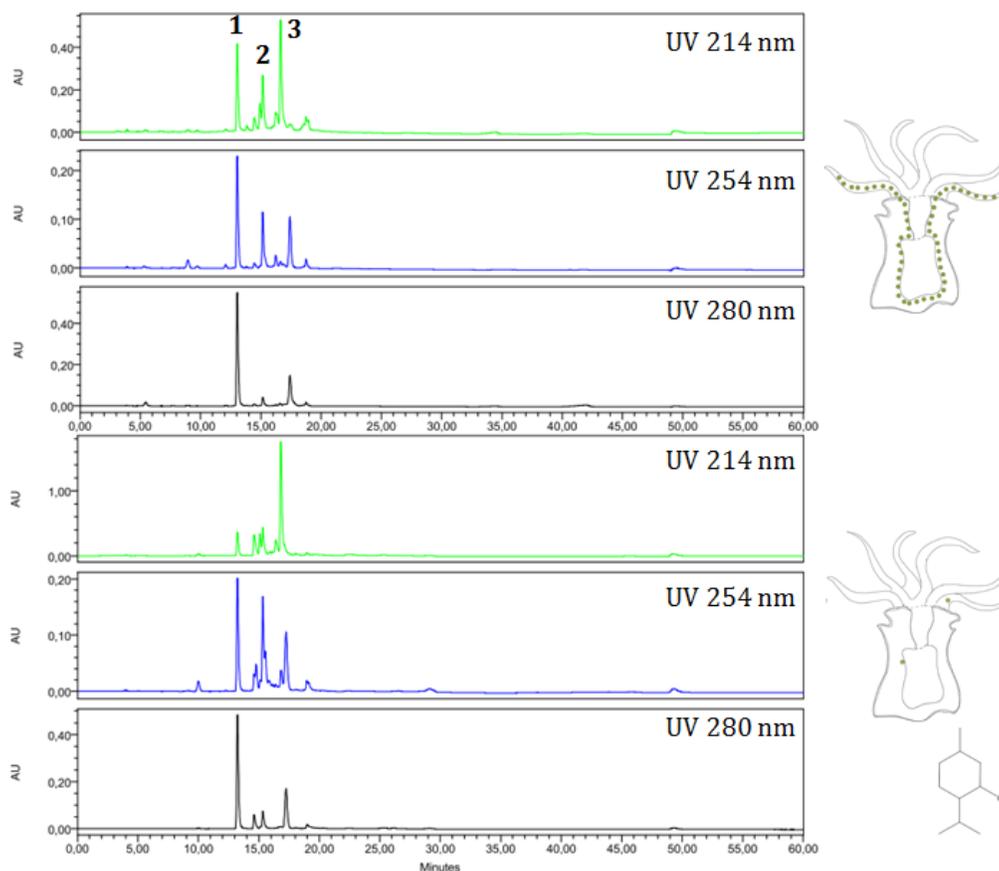


Figure 79 Chromatogramme HPLC-UV (HILIC) caractéristique de la F<sub>1</sub> d'un individu symbiotique et d'un individu ayant subi un stress chimique de 59 jours. Colonne Machery-Nagel Nucleodur HILIC (250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O /CH<sub>3</sub>CN, 90:10 de 0 à 5 min puis 90:10 à 10:90 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

L'ensemble de ces composés reste présent suite à un stress de 59 jours, mais leurs contributions relatives sont modifiées : l'homarine et la trigonelline sont moins fortement produites par rapport à la zooanémonine.

Les bétaines sont des composés zwitterioniques connus pour jouer un rôle dans l'osmoprotection et la photoprotection (Hill et al. 2010) ; ils protègent de l'attaque de ROS (Ganesan et al. 2011). Chez les plantes, des bétaines telles que la glycine bétaine sont accumulées lors de l'exposition à des stress thermiques, salins ou UV (Chen et Murata 2008). Ces auteurs postulent que la glycine bétaine agit entre autres en limitant l'oxydation des lipides membranaires. La zooanémone, surexprimée à la suite d'un stress chimique, pourrait jouer un rôle équivalent chez *A. viridis*.

### b) Analyse de la fraction F<sub>2</sub> (lipides polaires)

La fraction F<sub>2</sub> de l'anémone aposymbiotique a été analysée par LC/MS/MS (Figure 80) afin de comparer sa signature chimique à celles issues des compartiments d'une anémone symbiotique.

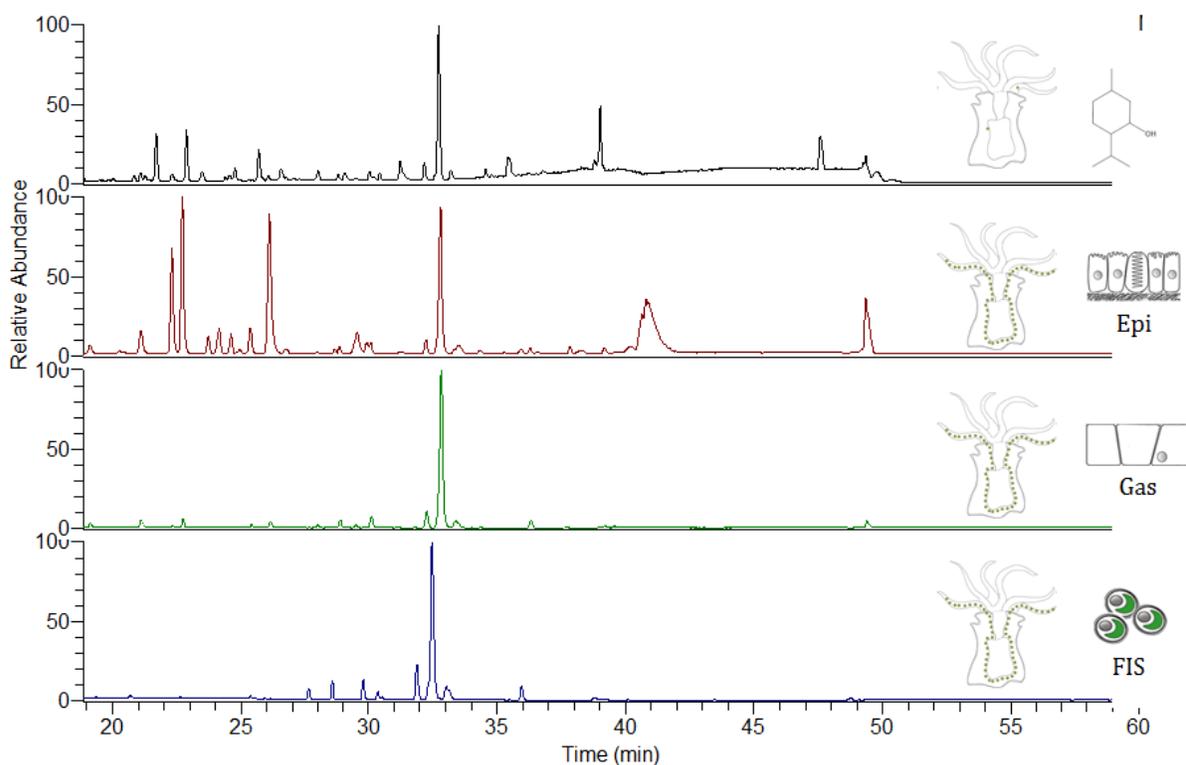


Figure 80 Chromatogrammes UPLC-HRMS des extraits bruts organiques dessalés issus des compartiments animaux (Epiderme et Gastroderme), et symbiotes fraîchement isolés (FIS) d'*A. viridis*. Colonne Thermo Scientific Accucore C<sub>18</sub> (100x2,1 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 96:4 à 100:0:0 en 42 min ; retour aux conditions initiales de 45 à 60 min.

A partir des composés majoritaires caractérisés de l'anémone symbiotique (Chapitre 2, partie IV, p. 73), des comparaisons ont été effectuées et sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 Comparaison de la présence des composés majoritaires de l'anémone symbiotique dans l'anémone aposymbiotique. Epi : épiderme, Gas : gastroderme, FIS : cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées et CS : de culture. Souligné : majoritaire.

n°	composé	Présence (anémone symbiotique)	Présence (anémone aposymbiotique)
25	Lyso-DGCC C16:0	Epi/ <u>Gas</u> / <u>CS</u> /FIS	Présent
28	Lyso-DGCC C22:6n-3	Epi/ <u>Gas</u> /FIS/ <u>CS</u>	Traces
37	DGCC C38:6	Epi/Gas/ <u>FIS</u> / <u>CS</u>	Traces
43	DGCC C44:12	<u>Gas</u> / <u>FIS</u> / <u>CS</u>	Absent
46	Lyso-PC Alkyl-16:0	<u>Epi</u> / <u>Gas</u>	Traces
47	Lyso-PC Alkyl-17:0	<u>Epi</u> / <u>Gas</u>	Absent
61	Lyso-PE C20:5	<u>Epi</u>	Absent
65	CAEP	<u>Epi</u>	Absent
72	C14:1-amide	Epi/Gas/FIS/CS	Absent
73	C16:0-amide	<u>Epi</u> / <u>Gas</u> / <u>FIS</u> /CS	Présent
74	C16:1-amide	Epi/Gas/FIS/CS	Traces
75	C18:0-amide	<u>Epi</u> / <u>Gas</u> / <u>FIS</u> / <u>CS</u>	Absent
76	C18:1-amide	Epi/Gas/FIS	Présent
77	C18:2-amide	Epi/Gas/FIS	Traces

La plupart des composés majoritairement présents dans l'anémone symbiotique sont absents ou présents à l'état de trace dans l'anémone aposymbiotique. Seuls le lyso DGCC-C16:0, et les amides gras C16:0 et C18:1 sont maintenus après 59 jours de stress chimique. Tous les composés liés à des acides gras (AG) polyinsaturés sont absents de l'anémone aposymbiotique ou à l'état de trace. Des composés tels que les lyso-PC Alkyl17:0, lyso-PE C20:5 ou le CAEP sont ici proposés comme des indicateurs de blanchissement. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le déficit en lipides polaires observé chez l'anémone aposymbiotique : certains de ces composés (les DGCC) sont synthétisés par les symbiotes, et la diminution de la population de Dinoflagellés contribue donc directement à une diminution de l'apport métabolique par transfert vers leur hôte. De plus, le stress oxydant engendré par un dysfonctionnement de la photosynthèse est responsable de l'attaque de ROS, pour lesquels les AG polyinsaturés sont la cible. Les produits de l'oxydation des AG peuvent être nombreux. Sont recensés des dérivés -oxo, -hydroxy ou -carboxy (Domingues et al. 2008).

### c) *Analyse de la fraction F<sub>3</sub> (lipides neutres)*

La fraction F<sub>3</sub> a été analysée par GC/MS, son chromatogramme a été comparé à celui issu de la fraction F<sub>3</sub> d'une anémone symbiotique (Figure 81).

Une faible réponse au stress est observée pour les stérols, mais cette réponse est flagrante pour les cérides. En effet, les cérides ne sont observés qu'à l'état de trace à la suite d'un stress chimique menant à la rupture de la symbiose. Les cérides sont des constituants à la fois du mucus sécrété par l'épiderme des Cnidaires, mais aussi des lipides de réserve (Chapitre 2 IV.4.b p. 114). La production et l'excrétion de mucus est perturbée à la suite d'un stress, qu'il soit de nature thermique ou salin (Kato et al. 1987), chimique (par exposition à l'acide hydroxycyanique, Cervino et al. 2003), ou encore pathogène (Hayes et Goreau 1998). De plus, la rupture de la symbiose met en jeu des processus de dégradation des membranes du gastroderme afin d'expulser les symbiotes (Chapitre 1 II.4.d p. 39). Il a été montré que du mucus lipidique résulte de cette expulsion (Steen et Muscatine 1987 ; Cervino et al. 2003 ; en revue dans Wooldridge 2009). Nos observations chez *A. viridis* sont donc en accord avec les résultats de l'ensemble de ces études.

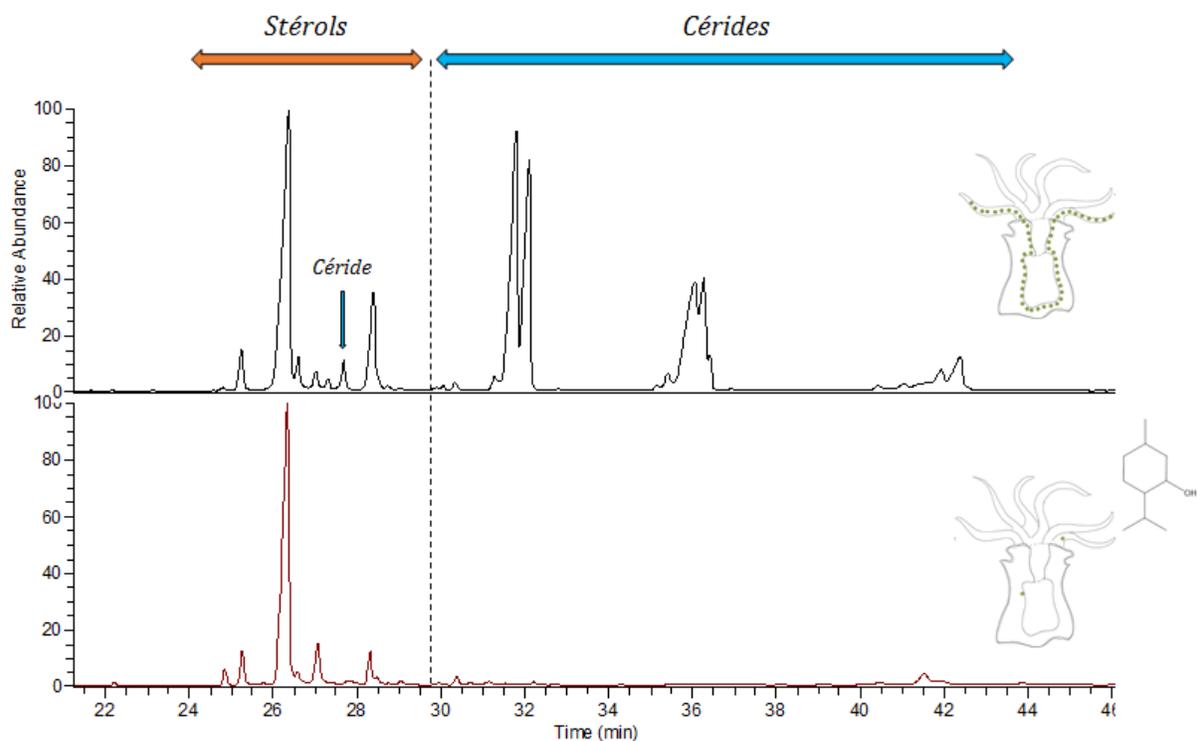


Figure 81 Chromatogrammes GC/MS caractéristiques des fractions  $F_3$  issues d'une anémone symbiotique et d'une anémone rendue aposymbiotique pas un stress chimique (instrument A, colonne Zebtron ZB-5MS  $30 \times 0,25$  mm, épaisseur de film  $0,25\mu\text{m}$ ). Gradient de température :  $100\text{-}230^\circ\text{C}$  à  $25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $230\text{-}290^\circ\text{C}$  à  $2,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $290\text{-}300^\circ\text{C}$  à  $11^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Ionisation électronique ( $70\text{ eV}$ ).

## IV. Localisation des composés par MALDI-MSI

L'analyse par MALDI-MSI permet de réaliser une cartographie de l'ensemble des composés *in situ* à partir d'une surface, en une seule analyse. De plus, cette méthode est non-intrusive (pour *A. viridis*, le prélèvement d'un tentacule est largement suffisant). L'ensemble de ces avantages a largement participé au succès de cette technique cette dernière décennie (en revue dans Chaurand 2012). Ainsi, de nombreux organismes ont pu être étudiés, tels que des mammifères (Lemaire et al. 2006), des invertébrés (Meriaux et al. 2011 ; Wisztorski et al. 2008) ou des plantes (Hölscher et al. 2009). Des études ont centré leurs efforts sur la détection de protéines (Wisztorski et al. 2008), d'ARNm (Lemaire et al. 2007), ou de métabolites, tels que les lipides (Sugiura et al 2007) ou encore de saponines (Van Dyck et al. 2010).

En vue d'analyser la distribution des médiateurs chimiques d'*A. viridis* et de suivre le devenir de certains composés d'intérêt pendant une cinétique de stress, l'imagerie par MALDI-MS est un outil de choix. Les études ont été réalisées au laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM) de l'université de Lille 1, dirigé par le Pr. Michel Salzet.

Pour ce faire, des coupes de tentacules ont d'abord été réalisées par cryosection, puis photographiées en microscopie optique. Après mise au point de la méthode, les coupes transversales ont été adoptées (Figure 82).

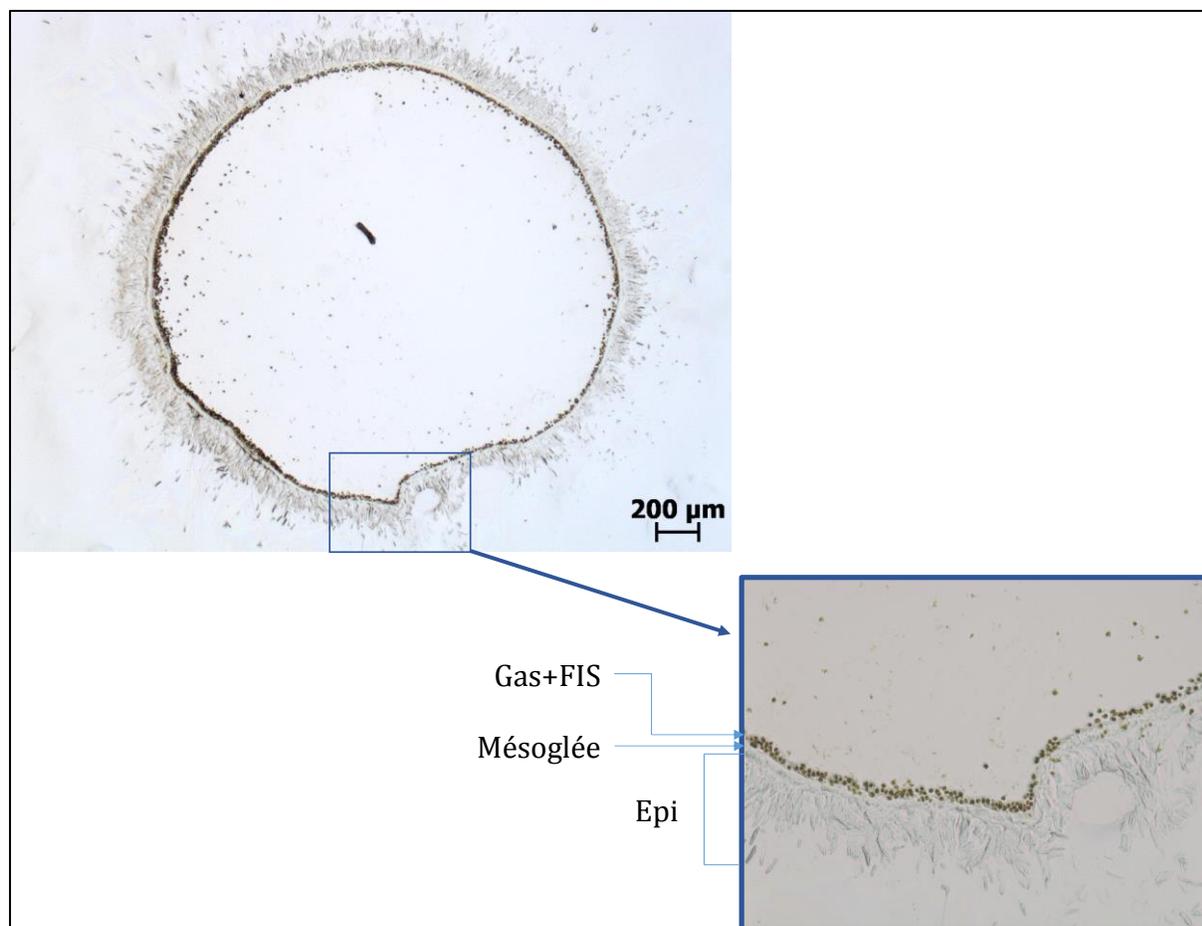


Figure 82 Photographie d'une coupe transversale de tentacule d'*A. viridis* symbiotique prise par microscopie optique. Epi : épiderme ; Gas : gastroderme ; FIS : cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées.

### 1. Localisation de médiateurs chimiques par MALDI-MSI

Un ensemble de composés a pu être caractérisé à partir de l'anémone symbiotique, et leur distribution entre les compartiments animaux (épiderme et gastroderme) et les symbiotes a été déterminée (Chapitre 2). L'analyse par MALDI-MSI à partir de coupes transversales de tentacules permet d'analyser plus finement la localisation de ces composés. Plusieurs matrices ont été testées (9-AA : 9-amino-acridine, HCCA : acide  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamique ; DHB : acide 2,5-Dihydroxybenzoïque).

Le lyso-DGCC C22:6 (composé **28**), et le DGDG C18:5/18:5 (composé **70**) sont deux composés synthétisés par les cellules de *Symbiodinium* spp. et décrits comme composés majoritaires du compartiment symbiotique (gastroderme et symbiotes) en conditions symbiotiques (Tableau 4 p. 94 ; Tableau 7 p.105); Des analyses MALDI-MSI ont été acquises pour ces composés (Figure 83).

A partir des images moléculaires, il est possible d'observer à la fois la localisation des composés, ainsi que leur intensité relative (échelle de couleurs) dans la région analysée (représentée en pointillés blancs). Les compartiments animaux ne sont pas visibles sur l'image, mais les points noirs représentent les symbiotes. A l'intérieur du cercle formé par les symbiotes se situe le gastroderme, et à l'extérieur se situe l'épiderme (observés dans la Figure 82).

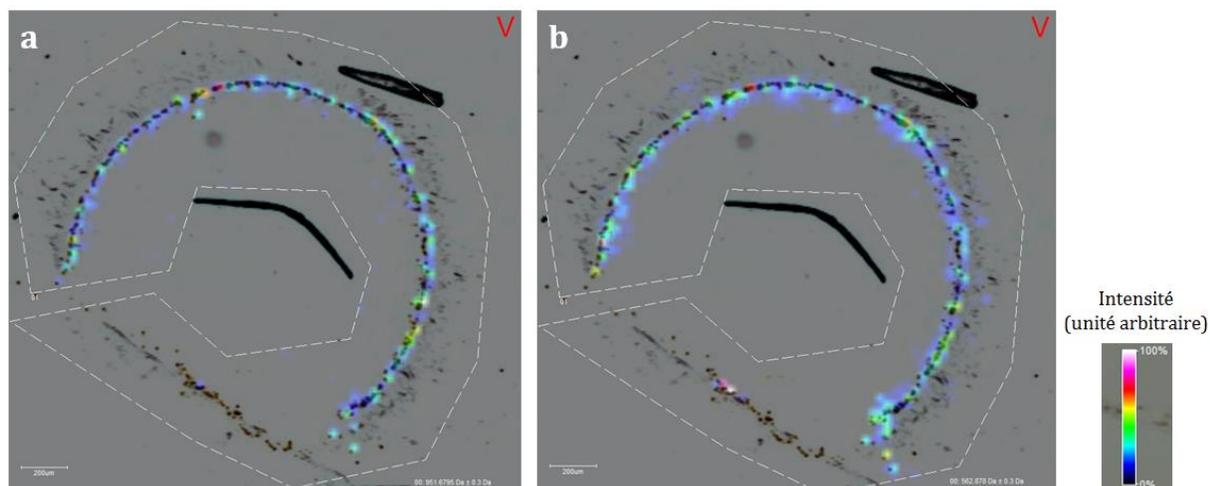


Figure 83 Images MALDI de la répartition de l'ion quasi-moléculaire (a) de  $m/z = 951,679$  Da et (b)  $562,878$  Da acquises en mode positif sur des coupes transversales de tentacules d'*A. viridis* symbiotique. Gamme de masse ciblée à  $\pm 0,300$  Da. Matrice utilisée : 9-amino acridine, résolution :  $20 \mu\text{m}$ .

Les images acquises à partir des cibles lyso-DGCC C22:6 (Figure 83a), et DGDG C18:5/18:5 (Figure 83b) confirment leur localisation exclusivement dans le compartiment symbiotique.

Le lyso-PC alkyl-16:0 (composé 46) est un composé majoritaire des compartiments animaux de l'anémone symbiotique (Tableau 5 p. 97). La cartographie de ce composé par MALDI-MSI montre que sa localisation est majoritairement épidermique (Figure 84).

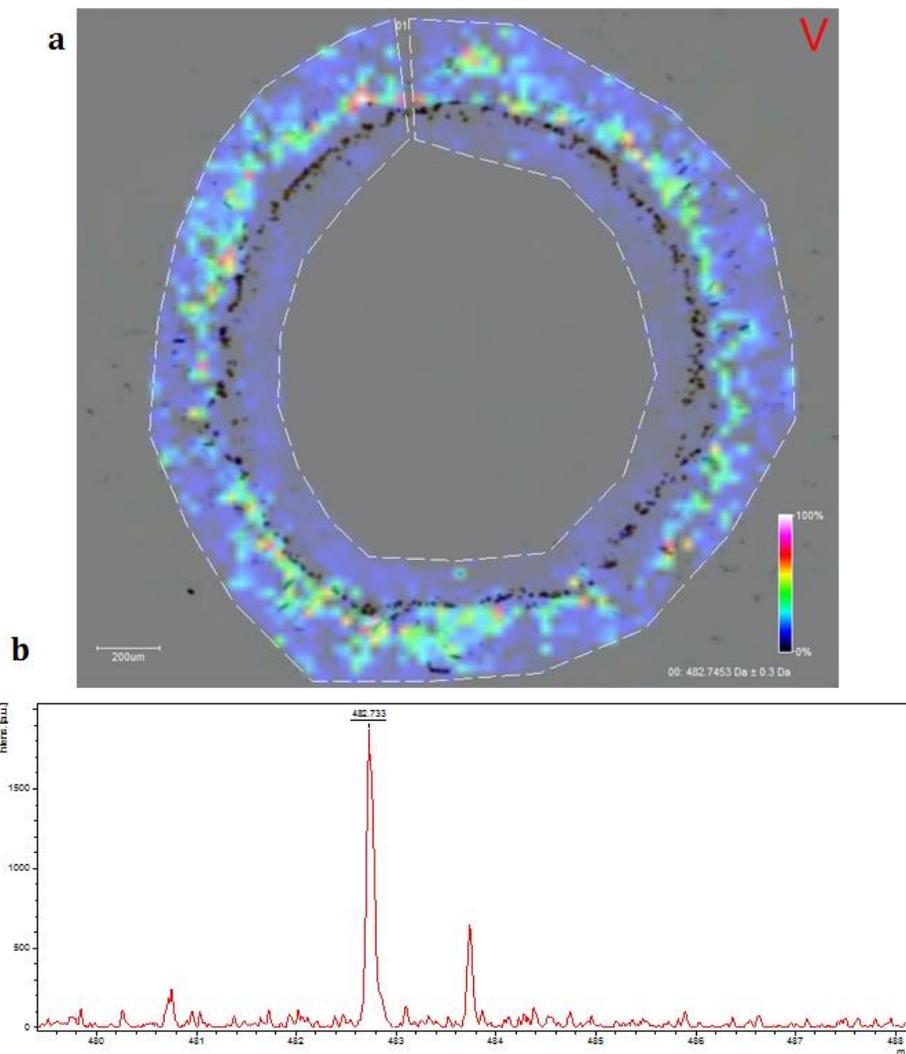


Figure 84 (a) : Image MALDI de la répartition de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 482,745$  Da acquise en mode positif sur une coupe transversale de tentacule d'*A. viridis* symbiotique. Gamme de masse ciblée à  $\pm 0,300$  Da. Matrice utilisée : 9-amino acridine, résolution :  $20 \mu\text{m}$ . (b) : spectre moyen de la zone épidermique.

D'autre part, des superpositions ont pu être réalisées à partir de signaux localisés dans différents compartiments du tentacule d'*A. viridis*. Ainsi, le composé de  $m/z = 683,38$  est spécifiquement localisé dans l'épiderme, le composé de  $m/z = 814,88$  est retrouvé au niveau de la mésogée, et le composé de  $m/z = 800,67$  composé au niveau du compartiment symbiotique (Figure 85). Les images obtenues montrent que la résolution de l'acquisition permet bien de distinguer la localisation des composés (Kopp et al. 2014).

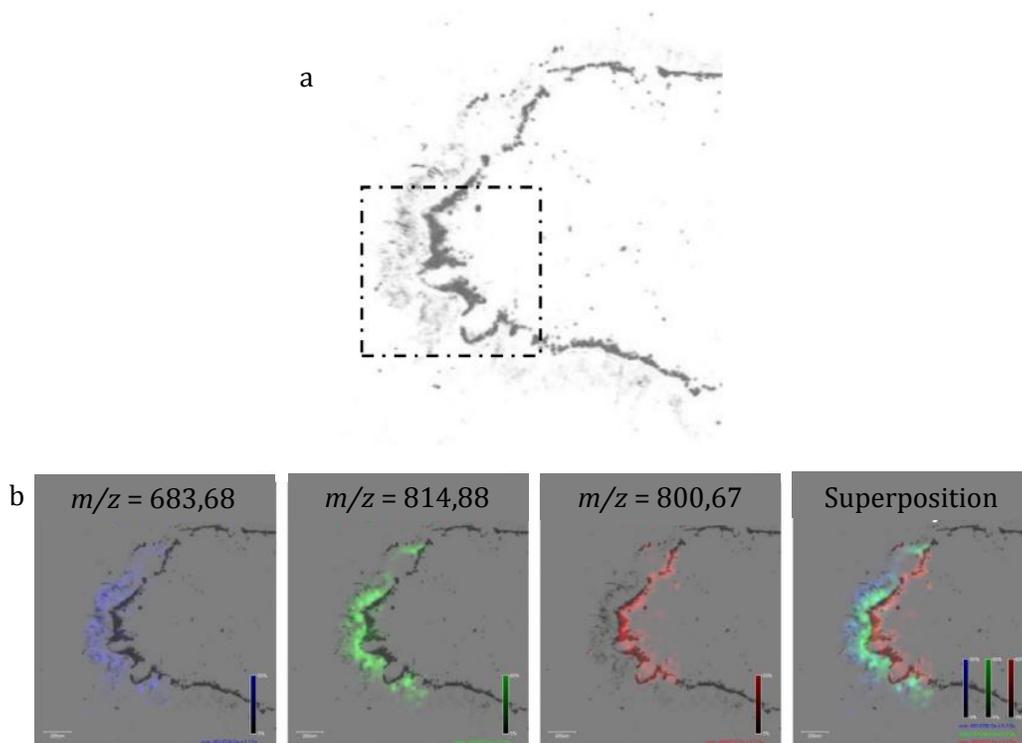


Figure 85 Images moléculaires sur une coupe transversale de tentacule d'*A. viridis* symbiotique. a, coupe histologique (la zone analysée est représentée par le carré en pointillés) ; b, images MALDI acquises en mode positif de la répartition des ions quasi-moléculaires de  $m/z = 683,68$  (bleu), 814,88 (vert) et 800,67 (rouge), ainsi que leur superposition. Modifié d'après Kopp et al. 2014

## 2. Suivi de la réponse au stress par MALDI-MSI

Des tentacules ont été prélevés à différents temps au cours d'un stress chimique induit par l'addition de menthol dans l'eau de mer (Figure 86).

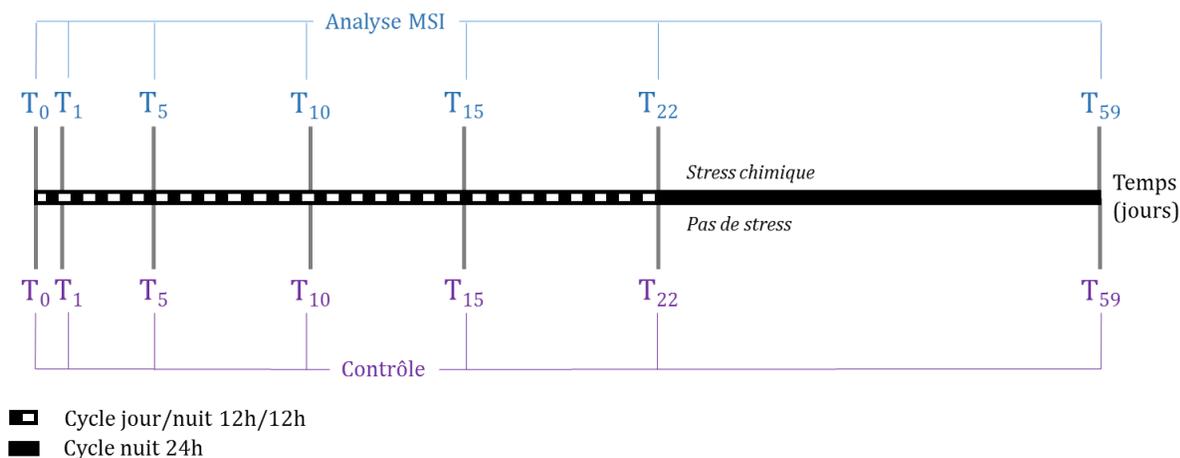


Figure 86 Schéma de la méthodologie générale appliquée au prélèvement de tentacules d'anémones *A. viridis* au cours d'un stress chimique (par ajout de menthol) destiné aux analyses par MALDI-MSI.

Des coupes ont ensuite été réalisées, puis une étude préliminaire a été menée par MALDI-MSI. Plusieurs lipides majoritaires caractérisés à partir de l'anémone symbiotique ont été ciblés sur les coupes réalisées à partir des prélèvements aux temps définis dans la Figure 86, afin de suivre leur évolution au cours du stress. Une réponse qualitative et localisée a pu être observée pour quelques DGCC, les autres lipides polaires ciblés ont donné des résultats non-homogènes mais qui présentent certaines caractéristiques intéressantes.

a) *Réponse au stress des DGCC*

L'analyse par approche métabolomique a permis d'observer une perte presque totale des DGCC après 59 jours de stress (Tableau 16). L'ensemble des  $m/z$  correspondant aux composés de la classe des DGCC a donc été ciblé par MALDI-MSI. Le DGCC C22:6/C22:6 (composé **43**) de  $m/z = 872,6042$  a été observé dans les cellules du gastroderme et les FIS de l'anémone symbiotique. Son suivi au cours des différents temps de la cinétique de stress a été réalisé par MALDI-MSI (Figure 87). Le signal est présent de façon homogène à tous les temps chez l'anémone contrôle, et localisé au niveau du compartiment symbiotique (gastroderme et FIS). Cependant, de manière intéressante, le signal correspondant à cet ion augmente pendant les premiers jours de la cinétique de stress ( $T_1$  et  $T_5$ ), puis tend à diminuer de manière importante dès  $T_{10}$  jusqu'à disparaître totalement à  $T_{59}$ . L'hypothèse d'une simple corrélation entre la perte des DGCC et à la perte des symbiotes qui les synthétisent ne peut pas être établie, car à  $T_5$  une diminution de la densité de symbiotes est déjà établie (Figure 75, p. 146). L'absence de signal à  $T_{59}$  confirme les observations faites dans l'analyse métabolomique.

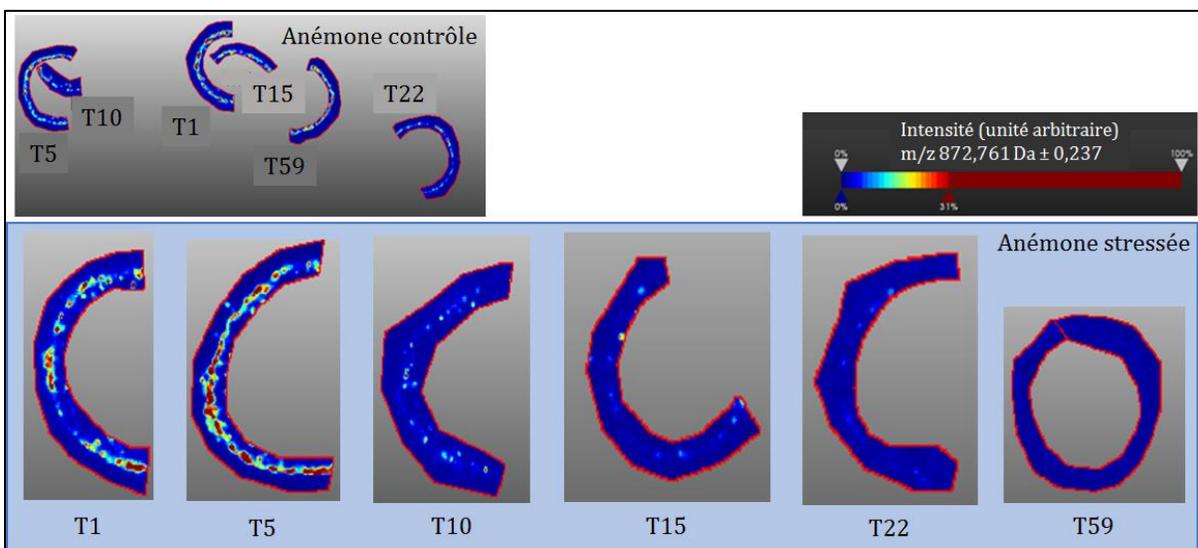


Figure 87 Images MALDI de la répartition de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 872,761$  acquises en mode positif sur des coupes transversales de tentacules d'*A. viridis* prélevées pendant une cinétique de stress chimique. En haut : images issues de l'anémone contrôlée ; en bas : images issues d'une anémone stressée. Une échelle d'intensité de la réponse est donnée en haut à droite. Gamme de masse ciblée :  $872,761 \pm 0,237$  Da. Matrice utilisée : DHB, résolution :  $20 \mu\text{m}$ .

Le lyso-DGCC C16:0 (composé **25**) de  $m/z = 490,3744$  est caractéristique du compartiment gastrodermique de l'anémone symbiotique (Tableau 4 p. 94). Ce composé est conservé chez l'anémone aposymbiotique (Tableau 16). Il a été ciblé par MALDI-MSI (Figure 88) mais est absent des coupes de tentacules à T<sub>59</sub>. Il est donc fort probable que ce composé soit présent dans la partie « corps » de l'anémone. De manière intéressante, sa réponse au stress suit la même cinétique que celle du DGCC C22:6/C22:6, par augmentation jusqu'à T<sub>5</sub>, puis diminution jusqu'à disparition totale à T<sub>59</sub>.

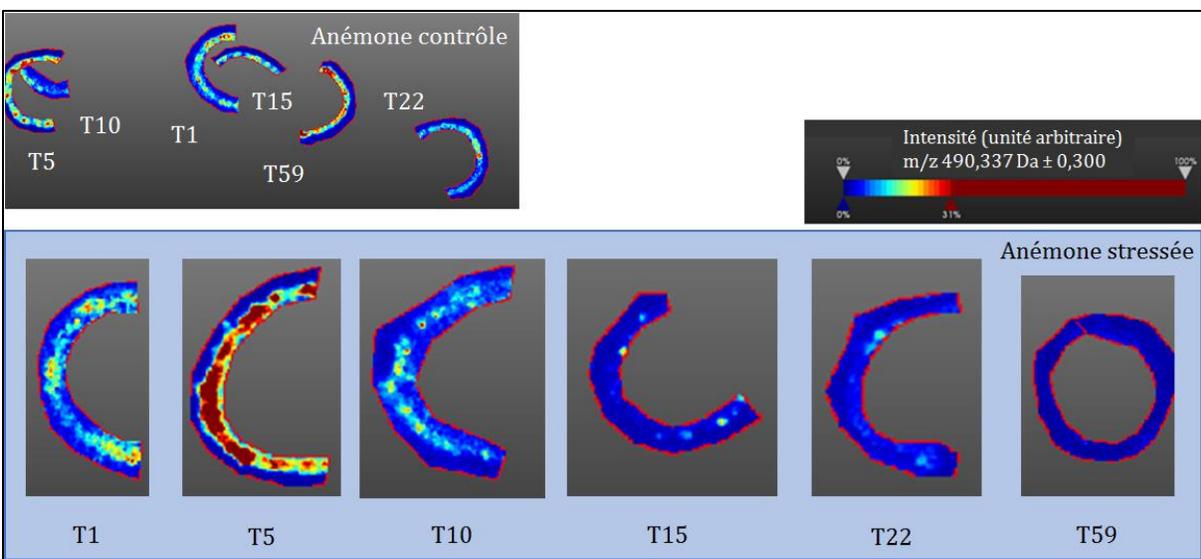


Figure 88 Images MALDI de la répartition l'ion de  $m/z = 490,337$  acquises en mode positif sur des coupes transversales de tentacules d'*A. viridis* prélevées pendant une cinétique de stress chimique. En haut : images issues de l'anémone contrôlée ; en bas : images issues d'une anémone stressée. Une échelle d'intensité de la réponse est donnée en haut à droite. Gamme de masse ciblée :  $490,337 \pm 0,300$  Da. Matrice utilisée : DHB, résolution :  $20 \mu\text{m}$ .

Le DGCC C16:0/C22:6 (composé **37**) de  $m/z = 800,3040$  est majoritaire dans les cellules de *Symbiodinium* de l'anémone symbiotique (Tableau 4 p. 94), et n'est présent qu'à l'état de trace dans l'anémone blanchie (Tableau 16). Ce composé a été ciblé par MALDI-MSI (Figure 89). Sa réponse au stress est identique à celle des deux composés analysés précédemment (Figure 87 ; Figure 89). L'absence de ce composé à T<sub>59</sub> peut être liée à sa détection dans la partie « corps » de l'anémone, ou à la forte diminution de la densité des symbiotes, ainsi qu'à la différence de sensibilité des techniques de mesure utilisées (LC/MS/MS et MALDI-MSI).

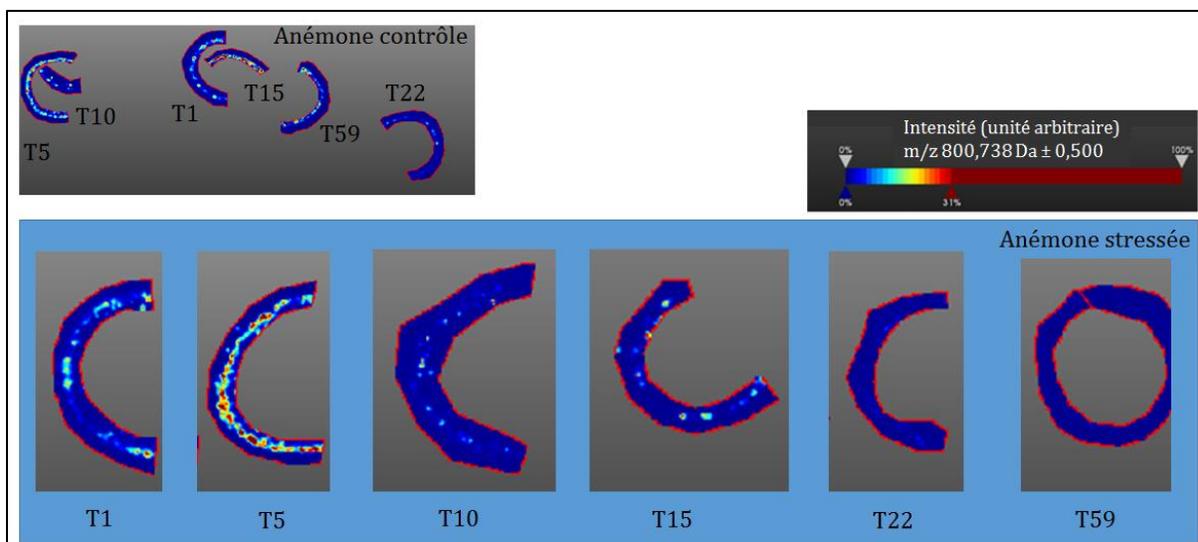


Figure 89 Images MALDI de la répartition de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 800,738$  acquises en mode positif sur des coupes transversales de tentacules d'*A. viridis* prélevées pendant une cinétique de stress chimique. En haut : images issues de l'anémone contrôlée ; en bas : images issues d'une anémone stressée. Une échelle d'intensité de la réponse est donnée en haut à droite. Gamme de masse ciblée :  $800,738 \pm 0,500$  Da. Matrice utilisée : DHB, résolution :  $20 \mu\text{m}$ .

Ces analyses ont été reportées sur l'ensemble des autres DGCC caractérisées d'*A. viridis*, et tous répondent de la même manière au stress. Les signaux ne sont cependant pas homogènes sur les images issues de l'anémone contrôlée. Un exemple est donné pour le DGCC C17:1/C22:6 (composé **38**) de  $m/z = 814,6197$ , présent seulement chez les FIS dans l'anémone symbiotique, et absent de l'anémone aposymbiotique (Figure 90).

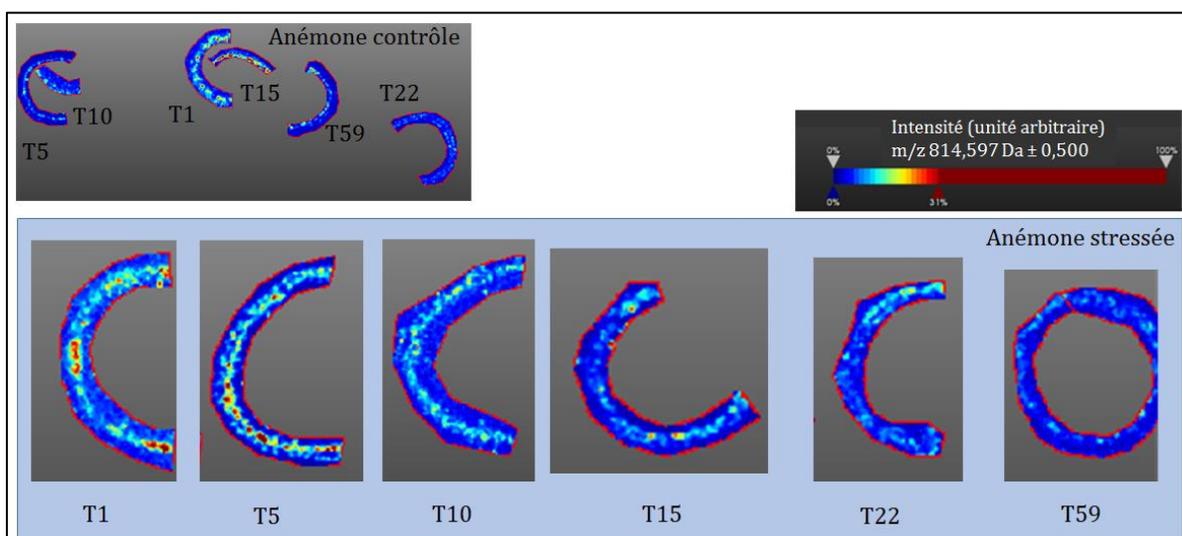


Figure 90 Images MALDI de la répartition de l'ion quasi-moléculaire de  $m/z = 814,597$  acquises en mode positif sur des coupes transversales de tentacules d'*A. viridis* prélevées pendant une cinétique de stress chimique. En haut : images issues de l'anémone contrôlée ; en bas : images issues d'une anémone stressée. En haut à droite : échelle d'intensité de la réponse. Gamme de masse ciblée :  $814,597 \pm 0,500$  Da. Matrice utilisée : DHB, résolution :  $20 \mu\text{m}$ .

Les DGCC ont été décrits pour la première fois chez l'hôte Cnidaire, et sont connus pour être synthétisés par les organismes photosynthétiques. La disparition de ces composés à la suite d'un stress thermique est corrélée avec la rupture de la symbiose observée, mais il est intéressant de noter leur disparition de manière simultanée dans les cellules du gastroderme. Une augmentation de la température (de 10°C) n'a pas montré d'effet sur les DGCC de *Symbiodinium microadriaticum* en culture (Leblond et al. 2015), cela démontre une implication de la relation symbiotique dans la réponse de ces composés à un stress, donc d'une régulation de la part de l'hôte. De plus, une augmentation dans les premiers jours de l'induction du stress est observée pour l'ensemble de ces composés. L'enrichissement en DGCC est donc proposé comme marqueur précoce de rupture de la symbiose.

b) ***Réponse au stress des PC, des PE et du CAEP***

Des analyses similaires ont été réalisées sur la phosphatidylcholine lyso-PC Alkyl-16:0 (composés **46**, de  $m/z = 482,3611$ ), la phosphatidyléthanolamine Lyso-PE C20:5 (composés **61**, de  $m/z = 500,2776$ ) et le céramide amino-éthylphosphonate (composés **65**, de  $m/z = 643,5182$ ) majoritaires dans l'anémone symbiotique. Ces composés sont absents de l'anémone aposymbiotique, en dehors de la lyso-PC Alkyl-16:0, présente à l'état de traces. Les images MALDI-MSI ont été acquises pour ces composés (Figure 91). La localisation de ces derniers n'est pas claire, puisque leur présence n'est pas homogène sur l'anémone contrôle. Les résultats sont par conséquent difficilement interprétables.

Des acquisitions sur les peptides, ainsi que sur les MGDG/DGDG présents dans les tissus de l'anémone symbiotique sont en cours. Il est important de déterminer les variations en galactolipides au cours d'un stress, car les DGDG sont impliqués dans la thermotolérance pour la plante modèle *A. thaliana* (Chen et al. 2006) ainsi que chez des cyanobactéries du genre *Synechocystis* (Mizusawa et al. 2009), pour lesquels ils sont essentiels à la stabilisation du photosystème II (Sakurai et al. 2007). De plus, il a été montré que la chaîne grasse en position *Sn*-2 des DGDG était modifiée après un stress thermique sur des cellules de *Symbiodinium microadriaticum* mises en culture (Leblond et al. 2015). Ces lipides sont au centre de la formation des membranes photosynthétiques, ils peuvent ainsi être des marqueurs de stress. Leur suivi par MALDI-MSI peut alors être une méthode de détection d'un stress menant à la rupture de la symbiose. De façon identique, les DGCC exclusivement synthétisés par les symbiotes peuvent être d'excellents marqueurs de stress.

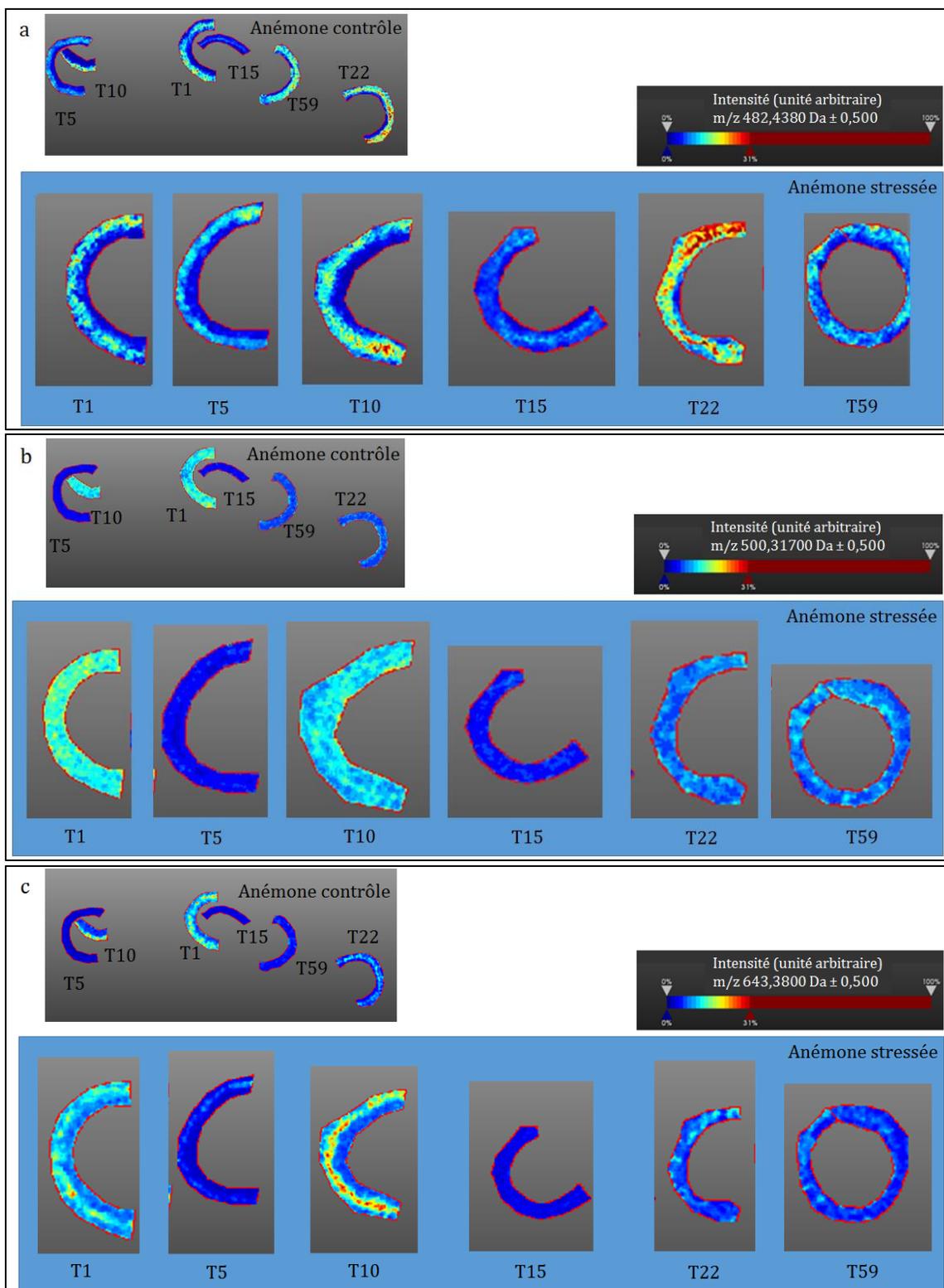


Figure 91 Images moléculaires des ion quasi-moléculaires de (a)  $m/z = 482,438$  ; (b)  $m/z = 500,317$  et (c)  $m/z = 643,380$  acquises par MALDI-MSI en mode positif sur des coupes transversales de tentacules d'*A. viridis* prélevées pendant une cinétique de stress chimique. En haut : images issues de l'anémone contrôlée ; en bas : images issues d'une anémone stressée. Une échelle d'intensité de la réponse est donnée en haut à droite. Gamme de masse ciblées à  $\pm 0,500$  Da. Matrice utilisée : DHB.

c) *Limites de l'étude*

Si l'analyse par MALDI-MSI a pu montrer toute son efficacité sur un certain nombre de composés majoritaires d'*A. viridis*, tous n'ont pas pu être observés. En tout premier lieu, une mise au point conséquente s'impose pour chaque type de matériel biologique : traitement et taille de la coupe, choix du type de matrice, gamme de masse à analyser, type de détection ou encore ajustements de la résolution spatiale. Le diamètre d'une coupe transversale de tentacule de l'anémone *A. viridis* ne dépasse pas 0,8 cm, et l'épaisseur épiderme-mésoglée-gastroderme mesure moins de 0,3 cm. Pour l'ensemble des analyses, une résolution spatiale maximale a dû être employée. L'ajustement de la sensibilité du spectromètre de masse ainsi que de l'efficacité d'ionisation apportée par la matrice sont aussi des facteurs importants pour l'analyse du métabolome complet. En effet, l'investigation réalisée chez *A. viridis* a pu montrer que pour une famille de molécules donnée, seuls les composés majoritaires semblent donner une réponse stable entre les individus et entre les coupes. De plus, les paramètres d'ionisation mis au point n'ont pas permis d'examiner les composés polaires de faible poids moléculaire (bétaïnes par exemple).

Face au phénomène de blanchissement massif des Cnidaires à travers le monde, et de leurs impacts écologiques comme économiques majeurs, un des enjeux actuels est d'identifier des indicateurs permettant de détecter un stress pouvant mener à une rupture de la symbiose. Certains DGCC sont des candidats prometteurs pour la détection d'une rupture engagée de la symbiose. L'anémone *A. viridis* contient une grande majorité de lipides, ainsi qu'une grande diversité d'AG qui sont une des principales cibles du stress oxydant et des ROS. Un stress thermique à court terme a été utilisé pour une étude ciblée par approche lipidomique afin de rechercher des marqueurs de stress précoces.

## V. Modifications du lipidome d'*A. viridis* en réponse à un stress

### 1. Contexte de l'étude

Le lipidome d'*A. viridis* a été extrait puis caractérisé, la composition en classes de lipides ainsi qu'en acides gras issus de lipides neutres et de lipides polaires a été déterminée dans les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme) et des symbiotes fraîchement isolés (Chapitre 2, V.3 p. 120). Il s'est avéré qu'*A. viridis* possède une majorité de lipides polaires, mais ces lipides ne sont pas distribués uniformément entre les compartiments.

Des stress environnementaux tels que l'augmentation de la température ou de la luminosité induisent des modifications de la teneur en lipides et en acides gras chez les Cnidaires (Treigner et al. 2008 ; Tolosa et al. 2011), ainsi que dans des cellules de *Symbiodinium* mises en culture (Tchernov et al. 2004 ; Kneeland et al. 2013). Par exemple, il a été montré que des Cnidaires symbiotiques présentent des quantités importantes d'AG C18:4n-3 et C18:5n-3 (Papina et al. 2003) comparativement à des Cnidaires aposymbiotiques (Imbs et al. 2009) ou blanchis (Bachok et al. 2006). Certaines de ces modifications ont ainsi été proposées comme indicateurs de stress (Tchernov et al. 2004, Tolosa et al. 2011, Kneeland et al. 2013). Ces analyses ont été réalisées sur des stress à long terme (entre 4 semaines et 2 mois), mais aucune n'a été effectuée sur la distribution des lipides dans les compartiments animaux.

Dans le cadre de l'étude présentée, les anémones de mer ont subi un stress thermique à court terme (5 jours), et les classes de lipides, ainsi que les acides gras issus des lipides neutres et des lipides polaires ont été caractérisés entre les différents compartiments de l'hôte et les symbiotes (Figure 92). Un stress à court terme n'entraîne pas de modification significative de la densité des symbiotes chez *A. viridis*, mais leur contenu lipidique peut être un indicateur précoce d'un stress. Dans ce but, trois indicateurs lipidiques ont été testés dans l'épiderme, le gastroderme et les symbiotes.

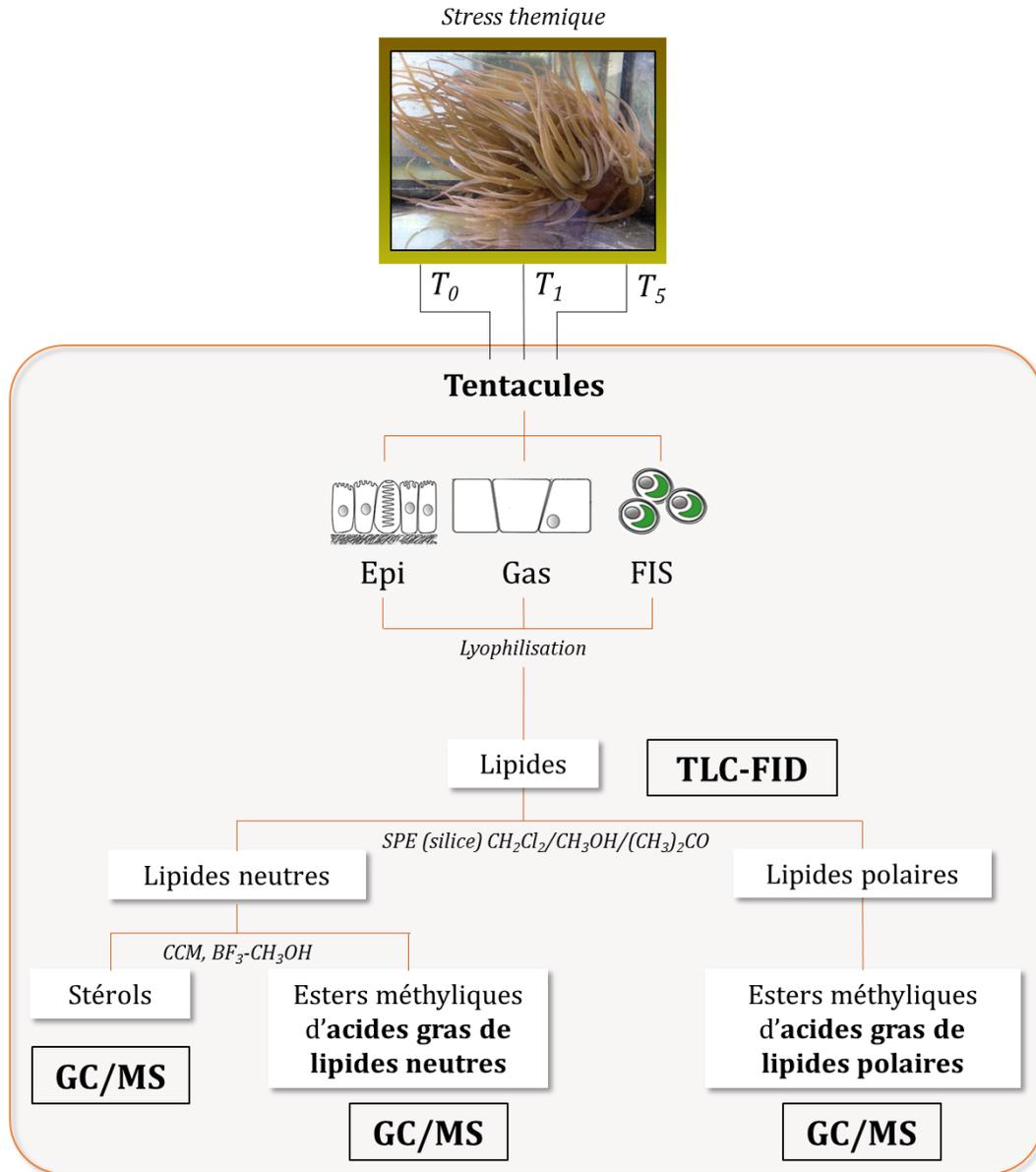


Figure 92 Schéma expérimental global de la méthodologie d'extraction, séparation, dérivatisation et analyse des fractions lipidiques obtenues à partir des compartiments animaux (épiderme, Epi et gastroderme, Gas) et des symbiotes fraîchement isolés (FIS) au cours d'un stress (à  $T_0$ ,  $T_1$  et  $T_5$  jours).

## 2. Densité en Symbiodinium

Les anémones de mer *A. viridis* ont été exposées à une augmentation de la température de l'eau de 10°C, passant de 19 à 29°C, pendant 5 jours. Des prélèvements de tentacules ont été réalisés juste avant l'induction du stress ( $T_0$ ), ainsi que 24h et 5 jours après le début du stress ( $T_1$  et  $T_5$ ). La densité en symbiotes a été suivie (Figure 93) : elle n'est pas modifiée au bout de 24h ( $T_1$ ), mais diminue légèrement à  $T_5$ .

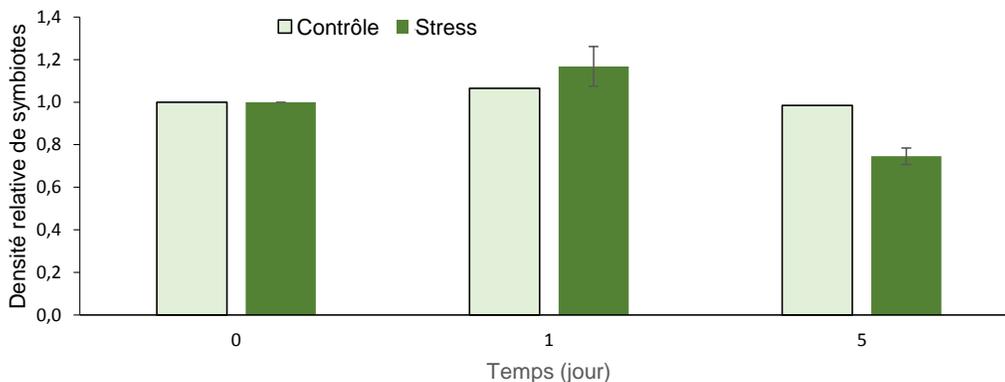


Figure 93 Densité relative de cellules de *Symbiodinium* symbiotiques lors d'un stress thermique de 5 jours. Le nombre de cellules de *Symbiodinium* est normalisé par la concentration en protéines. Moyenne  $\pm$  SEM, Contrôle : n=1 ; stress : n=4.

### 3. Indicateurs lipidiques de stress

La composition relative en acides gras issus de lipides neutres et de lipides polaires a été répertoriée avant un stress ( $T_0$ ), après 24h de stress ( $T_1$ ) et 5 jours de stress ( $T_5$ ) dans les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme), et les cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées (Annexe 7).

Trois indicateurs lipidiques de stress ont été décrits à la suite d'un stress thermique réalisé sur des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées puis mises en culture (Tchernov et al. 2004 ; Kneeland et al. 2013). Ces indicateurs ont été appliqués aux compartiments de l'hôte (épiderme et gastroderme) et aux symbiotes lors du stress à court terme induit chez *A. viridis*.

Le premier décrit le degré d'insaturation des AG de la série C18 (Kneeland et al. 2013) définit par l'équation suivante :

$$\text{Degré d'insaturation des AG} = \frac{\sum \text{AG C18 insaturés}}{\sum \text{AG C18}}$$

Les résultats (Figure 94) montrent que cet indicateur diminue significativement au niveau des symbiotes (lipides neutres :  $P = 0,043$  et lipides polaires :  $P = 0,046$ , test Oneway), mais pas dans les compartiments animaux. Au contraire, le degré d'insaturation des AG issus de lipides neutres de la série C18 tend à augmenter entre  $T_0$  et  $T_1$  pour l'épiderme et le gastroderme (Figure 94 a).

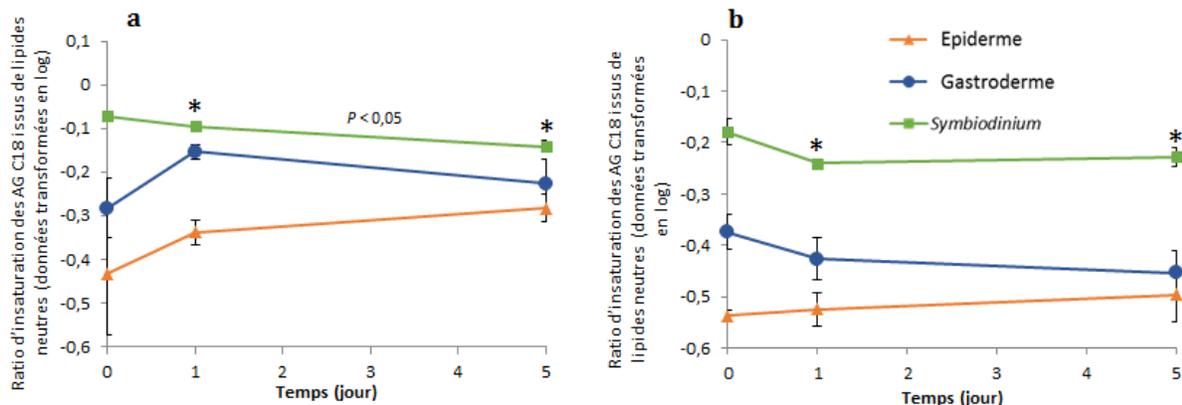


Figure 94 Evolution du degré d'insaturation des acides gras issus (a) de lipides neutres, et (b) de lipides polaires au cours d'un stress thermique dans les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme), et les symbiotes fraîchement isolés de tentacules d'*A. viridis*. Données brutes transformées en log. Moyenne  $\pm$  SEM, n=3. \*: significativement différent de T<sub>0</sub>, et « P < 0,05 » : significativement différent entre T<sub>1</sub> et T<sub>5</sub> (P < 0,05, test Oneway suivi du test post hoc de Tukey).

Le second indicateur concerne la quantité relative d'acides gras par rapport aux stérols (Kneeland et al. 2013). Il est évalué chez *A. viridis* en séparant les AG issus de lipides neutres et de lipides polaires. Ce ratio adapté permet d'analyser l'évolution de lipides de réserve par rapport à des lipides de structure, mais aussi de lipides de structure entre eux.

La Figure 95 présente les résultats obtenus pour *A. viridis*. Les tendances entre les ratios d'acides gras de lipides neutres (Figure 95 a) et de lipides polaires (Figure 95 b) sont très différentes. Tandis que la quantité de lipides de réserve n'est pas significativement modifiée par rapport aux stérols, la quantité de lipides polaires diminue pour les symbiotes entre T<sub>0</sub> et T<sub>1</sub>, puis l'effet inverse est observé à T<sub>5</sub> (P = 0,048, test Oneway). Cette tendance est aussi observée dans les compartiments de l'hôte, sans être toutefois significative.

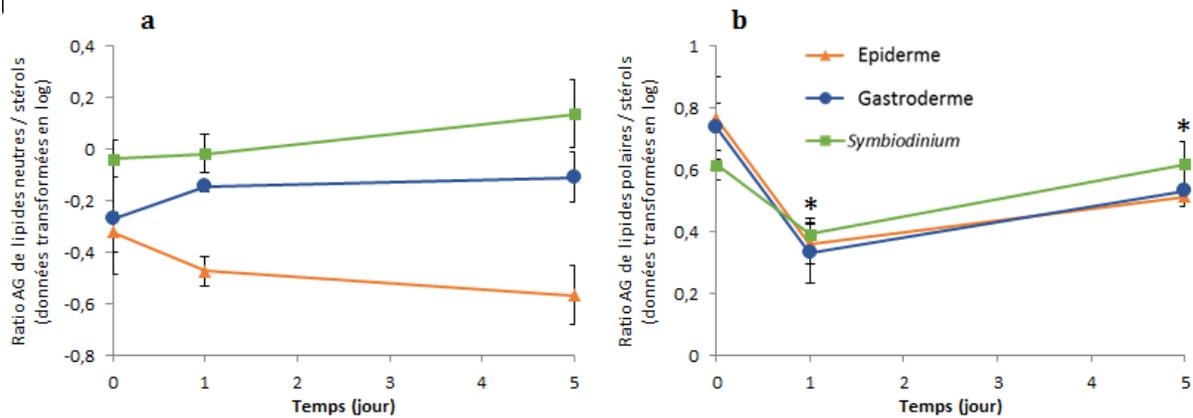
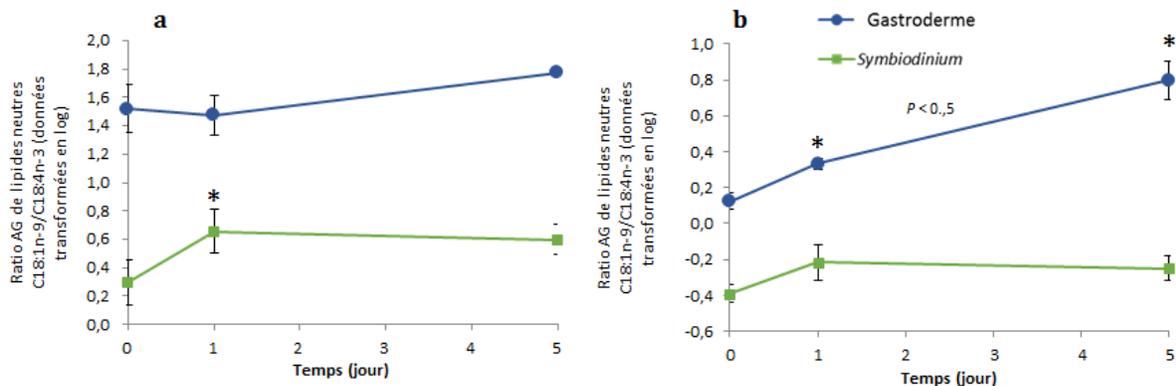


Figure 95 Evolution du ratio d'acides gras issus (a) de lipides neutres, et (b) de lipides polaires par rapport aux stérols au cours d'un stress thermique dans les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme), et les symbiotes fraîchement isolés de tentacules de *A. viridis*. Données brutes transformées en log. Moyenne  $\pm$  SEM, n=3. \* : significativement différent de T<sub>0</sub> (P<0,05, test Oneway suivi du test post hoc de Tukey).

Le dernier indicateur lipidique de stress est basé sur l'évolution croisée de deux acides gras particuliers (Tchernov et al. 2004) : le C18:1n-9 (acide oléique) et le C18:4n-3 (acide stéaridonique). Le caractère plutôt ubiquitaire de l'acide oléique et le statut de marqueur lipidique de l'acide stéaridonique chez des Cnidaires symbiotiques (Papina et al. 2003 ; Imbs et al. 2010b) justifie l'étude de leur évolution croisée lors d'un stress chez les Cnidaires symbiotiques. Pour *A. viridis*, ce ratio a été calculé pour les lipides neutres et les lipides polaires, pour les compartiments symbiotiques : le gastroderme et les cellules de *Symbiodinium* (Figure 96). L'épiderme n'a pas été pris en compte car le C18:4n-3 est sous le seuil de détection. Cet indicateur est beaucoup plus élevé parmi les lipides neutres (entre 0,3 et 1,8 ; Figure 96 a) que les lipides polaires (entre -0,4 et 0,8 ; Figure 96 b), à cause d'une concentration plus élevée du C18 :1n-9 parmi les lipides neutres (Figure 66 p. 125). De même, le ratio est plus élevé dans le gastroderme par rapport aux symbiotes durant les 5 jours de l'expérience. Intégré aux lipides neutres, cet indicateur moléculaire augmente significativement chez les symbiotes ( $P = 0,037$ , test Oneway), mais n'est pas modifié dans les cellules du gastroderme au cours du stress thermique. Parmi les lipides polaires, la tendance est inversée : le ratio C18:1n-9/C18:3n-4 augmente significativement dans le gastroderme à T<sub>1</sub> et à T<sub>5</sub> ( $P = 0,04$ , test Oneway), mais n'est pas modifié dans les cellules de *Symbiodinium*.



#### 4. Discussion générale

Le nombre d'insaturations des acides gras issus de lipides membranaires influe sur la rigidité des membranes : le ratio C18:1n-9/C18:3n-4 ainsi que le degré d'insaturation des AG C18 issus de lipides polaires sont donc des indicateurs de fluidité membranaire. La production de ROS lors d'un stress thermique est connue pour oxyder les lipides membranaires et a pu être montrée chez *Symbiodinium* (Tchernov et al. 2004). Ce processus participe à l'induction de la rupture de la symbiose chez les Cnidaires (Downs et al. 2002). Les ROS affectent principalement les lipides polyinsaturés, et la modulation de la concentration de ces derniers dans les membranes des thylakoïdes augmente la stabilité des individus (Murakami et al. 2000). La diminution de la concentration relative d'AG polyinsaturés observée (Figure 94 ; Figure 96) peut être expliquée par une attaque des ROS ainsi que par la diminution de l'activité métabolique des symbiotes. En effet, des produits issus de la peroxydation des lipides sont observés dès 24h de stress dans une étude similaire chez *A. viridis* (Richier et al. 2005). La diminution des AG polyinsaturés ne peut pas être attribuée à un blanchissement, puisque plus de 80% des symbiotes initiaux sont encore présents après 5 jours de stress.

Les stérols sont reliés aux AG saturés dans les membranes (Pitman et al. 2004). La concentration relative en stérols est stable le long des 5 jours de stress. La diminution observée du ratio AG issus de lipides polaires/stérols est donc due à une évolution de la concentration en acides gras. Cette observation est marquée dans les cellules de *Symbiodinium*, l'évolution de ce ratio est corrélée aux autres indicateurs (le ratio d'insaturation des AG de type C18 et le ratio C18:1n-

9/C18:4n-3) qui reflètent tous une diminution de la concentration relative en AG polyinsaturés. Ces tendances ont été mises en évidence dans des cellules de *Symbiodinium* mises en culture (Kneeland et al. 2003), mais aussi chez le corail *Pavona frondifera* (Bachok et al. 2006).

Il est intéressant de noter que la plupart des indicateurs montrent des évolutions significatives dès 24h de stress. Ces résultats montrent qu'un stress thermique induit des modifications rapides du métabolisme lipidique. Des résultats acquis d'une étude transcriptomique sur *A. viridis* dans des conditions de stress identiques ont aussi montré de fortes réponses dès le 1<sup>er</sup> jour de stress (Moya et al. 2012). Les indicateurs lipidiques montrent une tendance vers un rétablissement à T<sub>5</sub>, suggérant qu'*A. viridis* est capable de s'acclimater, au moins temporairement, à de hautes températures.

Enfin, cette étude indique que la réponse au stress n'est pas uniforme entre les compartiments de l'hôte et les symbiotes : les lipides des cellules de *Symbiodinium* ont une réponse plus soutenue par rapport aux compartiments de l'hôte, et les lipides de l'épiderme semblent être préservés par un stress à court terme. Le gastroderme, compartiment symbiotique, est directement touché par les dérèglements photosynthétiques des cellules de *Symbiodinium* induits par un stress, et agit comme un « tampon » pour le compartiment épidermique.

## VI. Conclusions et perspectives

L'importance écologique et économique de la relation symbiotique entre Cnidaire et Dinoflagellés est largement reconnue, mais dans le contexte des phénomènes actuels de blanchissement massif, l'étude de la réponse au stress est d'une importance cruciale afin de mieux comprendre et prévenir la rupture de la symbiose. Des investigations ont été menées aux niveaux physiologiques, et biochimiques, allant de la génomique à la métabolomique.

Les travaux menés dans ce chapitre s'attachent à étudier la réponse au stress au niveau métabolomique chez l'anémone de mer *A. viridis*. Pour cela, une étude a été basée sur deux inductions de stress différentes permettant d'induire une rupture de la symbiose : un stress thermique mimant le dérèglement climatique actuel, ainsi qu'un stress chimique par ajout de menthol dans l'eau de mer. Cette dernière méthode de blanchissement est prometteuse car elle permet d'obtenir des individus aposymbiotiques à un taux de réussite de 100%, et gardant les mêmes propriétés physiologiques et biochimiques que leurs homologues symbiotiques. Cette méthode s'avère utile pour l'étude de leur comportement à plus long terme, mais l'action du menthol sur les Cnidaires a été très peu étudiée.

L'objectif des travaux réalisés est donc de caractériser la réponse au stress d'*A. viridis*. Pour cela, une première approche par étude métabolomique a été engagée, puis une cartographie de l'évolution de molécules cibles en réponse au stress a été réalisée. Enfin, la réponse au stress à court terme a été menée par approche lipidomique.

Les empreintes chimiques issues des compartiments de l'hôte et des symbiotes ont été obtenues avant un stress et à la suite de 59 jours de stress, une investigation comparative a été menée. La réponse au stress thermique semble être différente de la réponse au stress chimique. Afin d'étudier plus précisément les modifications métabolomiques engendrées par un stress, l'ensemble des composés présents à l'état symbiotique chez *A. viridis* a pu être suivi au cours d'un stress d'origine chimique. Une étude comparative a été réalisée entre le métabolome d'anémones symbiotiques et aposymbiotiques (prélevées à T<sub>59</sub>). L'anémone blanchie a été extraite et partitionnée selon le protocole mis au point pour l'analyse métabolomique en condition symbiotique (Figure 32 p. 73), et les différentes fractions ont été analysées par HPLC-UV-DEDL, par LC/MS ou par GC/MS. La plupart des composés présents majoritairement dans l'anémone symbiotique n'ont pas été détectés chez l'individu aposymbiotique traité au menthol. Notamment, la

classe des cérides est totalement absente de l'anémone blanchie, alors que les stérols semblent préservés de modifications significatives face au stress. Par ailleurs, les DGCC sont des lipides polaires synthétisés par les symbiotes, mais aussi majoritairement présents dans l'anémone symbiotique. Ils sont cependant absents de l'anémone aposymbiotique, ce qui en fait de très bons indicateurs de stress. Mais la perte métabolomique induite par un stress n'affecte pas seulement les composés d'origine symbiotique. D'autres lipides polaires, tels que les phosphatidylcholines ou CAEP peuvent être biosynthétisés par l'hôte mais ne sont pas retrouvés dans l'anémone aposymbiotique. Ces résultats indiquent que la rupture de la symbiose a non-seulement un impact sur les métabolites transférés des symbiotes vers leur hôte, mais aussi sur le métabolisme endogène de l'hôte. L'hypothèse formulée est que la disparition des lipides à la suite d'un stress est expliquée par l'oxydation des AG induits par l'attaque de ROS. La caractérisation des produits de l'oxydation d'un individu aposymbiotique de ces lipides permettra de valider cette hypothèse.

Une localisation fine des composés identifiés de l'anémone symbiotique a pu être entreprise par une étude d'imagerie par spectrométrie de masse : le MALDI-MSI. Cette étude a permis dans un premier temps de confirmer et d'affiner les résultats obtenus sur la distribution des métabolites entre les compartiments de l'hôte (épiderme et gastroderme) et des symbiotes. Dans un second temps, un suivi cinétique de la rupture de la symbiose a pu être réalisé, et montré que leur réponse au stress au niveau quantitatif n'était pas linéaire. Les DGCC sont par exemple surexprimés 5 jours après l'induction du stress, avant de décroître pour disparaître totalement à T<sub>59</sub>. Des travaux concernant la cartographie d'autres composés d'intérêt, tels que les galactolipides sont en cours.

En parallèle, des essais préliminaires sur des coupes identiques de tentacules sont réalisés par imagerie par désorption-électrospray : DESI-MSI, afin de localiser les composés de faible poids moléculaire, non détectés par MALDI-MSI.

Certains biais à l'étude métabolomique par l'induction d'un stress au menthol devront cependant être étudiés, tels que l'effet du menthol sur la physiologie cellulaire d'*A. viridis*. Il serait notamment intéressant d'observer la localisation par MALDI-MSI des neuropeptides caractérisés à partir de l'anémone symbiotique ([chapitre2 III.2 p. 81](#)), ainsi que leur réponse au stress (stress thermique et chimique). Les empreintes chimiques réalisées de l'anémone blanchie à la suite d'un stress au menthol montrent une surexpression des signaux caractéristiques des neuropeptides dans les compartiments animaux. Le menthol agit sur les canaux ioniques des cellules neuronales et son

action croisée avec les neuropeptides pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution de ces composés, ainsi que le mode d'action du menthol au niveau des neurones chez *A. viridis*.

Une étude similaire par approche métabolomique et par MALDI-MSI réalisée à partir d'une anémone blanchie pas l'induction d'un stress thermique est en cours. Cette analyse permettra à terme d'effectuer une étude comparative sur deux types de stress menant à la rupture de la symbiose.

Enfin, une étude ciblée par approche lipidomique a permis d'identifier des indicateurs lipidiques de réponse précoce au stress, dont la réponse est observable avant que la rupture de la symbiose ne soit induite. Un ratio d'AG issus de lipides polaires par rapport aux stérols, ainsi que deux ratios basés sur le taux d'insaturation des AG (taux d'insaturation des AG de type C18 et ratio C18:1n-9/C18:4n-3) ont pu mettre en évidence une réponse particulièrement probante dans les compartiments symbiotiques. L'utilisation de ces marqueurs de stress précoce peut par conséquent être un excellent outil pour de la prévention de la rupture de la symbiose.

# Conclusions générales et perspectives

---

Les épisodes de mortalité massive des coraux symbiotiques sont accentués par les dérèglements climatiques actuels, et ont un impact économique et écologique considérable. L'étude des mécanismes qui régissent l'établissement, le maintien et la rupture de la symbiose entre Cnidaire et Dinoflagellés est essentielle afin de prévenir des phénomènes de blanchissement de grande ampleur. Dans ce contexte, l'objectif principal de mon projet de thèse a été d'explorer la diversité des **médiateurs chimiques** dans une symbiose Cnidaire-Dinoflagellés, leur **localisation**, ainsi que leur **réponse face à un stress**.

L'ensemble de cette étude a été réalisée à partir de l'anémone de mer de Méditerranée *A. viridis*, organisme modèle de l'équipe Symbiose Marine ([Chapitre 1, partie IV.1, p. 57](#)). Les caractéristiques physiologiques d'*A. viridis* (taille des polypes et des tentacules) permettent la séparation et la purification des tissus de l'animal (l'épiderme et le gastroderme) d'une part, et des symbiotes fraîchement isolés d'autre part. Des cellules de *Symbiodinium* isolées d'*A. viridis* ont été mises en culture et maintenues depuis plusieurs années en conditions contrôlées.

A partir de ce modèle, la première étape décrite dans le [Chapitre 2](#) a été d'effectuer une **étude globale comparative** de la distribution des médiateurs chimiques dans la symbiose. L'empreinte chimique d'*A. viridis* symbiotique a été obtenue à partir de l'extrait brut organique d'individus entiers, et a été comparée aux empreintes chimiques obtenues à partir des compartiments animaux (épiderme et gastroderme), des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées (FIS), et des cellules de *Symbiodinium* de culture (CS, [Chapitre 2, partie III, p.68](#)). Une méthodologie analytique d'extraction/séparation/purification des composés a été mise au point, et leur caractérisation a été entreprise par LC/MS/MS, GC/MS et/ou RMN. Par cette approche, **96 métabolites** ont pu être caractérisés, et leur distribution dans les tissus de l'hôte et les FIS a été établie et comparée aux CS ([Chapitre 2, partie IV, p. 73](#)).

Les **bétaines** sont des composés zwitterioniques qui jouent un rôle dans l'osmoadaptation et la photoprotection, tous deux importants pour le maintien de la relation symbiotique. D'autres composés zwitterioniques ont été observés chez *A. viridis*, leur isolement est en cours. Des **neuropeptides**, modifiés post traductionnellement en position C-terminale ont été identifiés comme composés majoritaires du compartiment épidermique de l'hôte et absents des symbiotes. Ce sont des neurotransmetteurs et neurohormones, localisés dans les neurones de l'épiderme et de la mésoglée des anémones de mer *Anthopleura elegantissima* et *Actinia equinata*. Des tests de bioactivité de ces composés seront réalisés afin de confirmer leurs rôles chez *A. viridis*. Un ensemble

de lipides polaires constitue la majorité du métabolome caractérisé d'*A. viridis*. Les **phosphatidylcholines** (PC) et **phosphatidyléthanolamines** (PE) sont les phospholipides majoritaires retrouvés dans le monde vivant. Ils ont été identifiés majoritairement dans les compartiments épidermique et gastrodermique de l'anémone *A. viridis*. De manière intéressante, ces composés sont presque absents des symbiotes, hormis deux PC contenant des acides gras (AG) en C22:6. Les diacylglycérylcarboxyhydroxyméthylcholines (**DGCC**) et **galactolipides** (mono-galactosyldiacylglycérols, MGDG et di-galactosyldiacylglycérols, DGDG) sont des composants membranaires non synthétisés par les animaux. Lorsque le milieu est appauvri en phosphore, ils peuvent se substituer aux lipides. Ils ont été caractérisés dans les symbiotes, mais des DGCC sont aussi retrouvés dans les compartiments animaux, épiderme et gastroderme. Il est fortement suggéré que les DGCC soient transférés des symbiotes vers leur hôte, ou au moins leurs intermédiaires de biosynthèse. Un céramide aminoéthylphosphonate (**CAEP**) a été identifié dans le compartiment épidermique d'*A. viridis*. Les CAEP sont des lipides membranaires plus résistants aux phospholipases que les phospholipides, et sont retrouvés chez un grand nombre d'invertébrés marins, incluant les Cnidaires, mais a été identifié pour la première fois chez *A. viridis*. Les CAEP pourraient ainsi protéger des membranes cellulaires des attaques par les phospholipases dans le compartiment épidermique d'*A. viridis*. Des **amides gras** ont été identifiés, et pourraient jouer un rôle dans la protection contre la prédation chez *A. viridis*. Des lipides de réserve ont aussi pu être identifiés dans les compartiments de l'hôte : les **cérides** sont des lipides de réserve lente, des composants des gouttelettes lipidiques, ainsi que des composants principaux du mucus sécrété à la surface de l'épiderme. Des **stérois** ont pu être caractérisés, et le cholestérol apparaît comme stérol largement majoritaire. Des investigations ont été réalisées dans l'équipe Symbiose Marine par le doctorant Vincent Dani sur la protéine NPC2-d ([Chapitre 1, partie IV.2, p. 59](#)), un transporteur potentiel de stérois chez *A. viridis*. Dans ce cadre, des expériences de docking *in silico* ont débuté avec le professeur Serge Antonczak de l'équipe Arômes, Parfums, Synthèse et Modélisation de l'Institut de Chimie de Nice) en vue d'étudier les cibles (stérois) potentielles de cette protéine. La purification des stérois a été entreprise, en vue de réaliser des expériences d'interaction ligand-récepteur et de spécificité des substrats par SPR (Surface Plasmon Resonance) à l'aide de la technologie Biacore (plateau technique de biochimie analytique, INRA Agrobiotech).

La diversité et l'abondance de lipides observés chez *A. viridis* a conduit à réaliser une étude spécifique par approche lipidomique ([Chapitre 2, partie V, p. 118](#)) afin de mieux appréhender leurs abondances relatives ainsi que de confirmer la structure des AG proposée en partie IV. Cette étude a permis de comparer l'abondance relative de **6 classes de lipides**, et de décrire **70 acides gras** issus

de lipides neutres ou polaires ainsi que leur distribution dans les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme) et des symbiotes, appuyés par une étude statistique approfondie.

Cette étude a pu confirmer que les lipides polaires étaient largement majoritaires dans les 3 compartiments d'*A. viridis* (entre 81,9 et 86,5 % des lipides totaux). La composition en acides gras issus de lipides polaires et de lipides neutres et leur distribution dans les compartiments d'*A. viridis* ont pu montrer que la composition en AG est différente selon le compartiment analysé. De plus, certains acides gras essentiels, ou considérés comme marqueurs de Dinoflagellés (tels que les C18:4n-3 et 18:5n-3), ont été caractérisés dans les tissus de l'hôte. Enfin, les cellules de *Symbiodinium* spp. symbiotiques possèdent en grande quantité relative certains AG (20:4n-6 et 22:4n-6) habituellement absents de leur homologues son-symbiotiques. Ces résultats permettent de formuler l'hypothèse que la présence de ces AG dans les Dinoflagellés isolés d'*A. viridis* est due à leur état symbiotique. L'ensemble de ces résultats a permis de proposer des hypothèses de transferts d'AG ou de lipides des symbiotes vers leur hôte, mais aussi de l'hôte vers les symbiotes.

La seconde étape exposée dans le [Chapitre 3](#) a été d'explorer la **réponse au stress** d'*A. viridis* au niveau métabolomique. La mise en œuvre de deux inductions de stress différentes, l'une thermique et l'autre chimique en conditions contrôlées a permis dans les deux cas d'induire une rupture de la symbiose menant au blanchissement des individus. De nombreuses études physiologiques et biochimiques ont été entreprises chez des Cnidaires symbiotiques traités par une augmentation de la température de l'eau, dans le but de comprendre les effets éventuels du réchauffement climatique global. Mais dans l'environnement naturel comme dans des conditions de laboratoire, il peut être léthal, ce qui complique les investigations menées. Le stress chimique est un nouveau mode de blanchissement prometteur pour l'obtention d'individus aposymbiotiques gardant des propriétés biochimiques et physiologiques semblables à leurs homologues symbiotiques. Ce stress a pu être appliqué aux anémones de mer *A. viridis*, avec un taux de survie de 100%. Le protocole adapté de stress a duré 59 jours dans les deux cas, des prélèvements de tentacules ont été effectués à T<sub>0</sub> et à T<sub>59</sub>, ainsi qu'à des temps intermédiaires définis. La densité relative en symbiotes a été mesurée à chaque temps de prélèvement. Une perte de 50% des symbiotes au bout de 10 jours de stress et de 80% des symbiotes à la fin de la cinétique de stress a été décrite, qu'elle soit d'origine thermique ou chimique. Une étude globale comparative a été effectuée à partir de prélèvements de tentacules à T<sub>0</sub> (**symbiotique**) et T<sub>59</sub> (**aposymbiotique**), ainsi que par le prélèvement d'un individu stressé chimiquement ([Chapitre 3, partie III, p. 144](#)).

L'approche analytique mise en œuvre est identique à celle réalisée pour l'anémone symbiotique. Il a été établi que la plupart des composés majoritairement présents dans l'anémone symbiotique (DGCC, phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines, amides gras, cérides) sont absents ou à l'état de traces dans l'anémone aposymbiotique. Par exemple, les cérides ne sont présents qu'à l'état de trace à la suite d'un stress chimique, marquant une perte de lipides de réserves lentes, alors que les stérols ne sont pas particulièrement altérés. De DGCC contenant des acides gras en C22:6, PC, PE et cérides absents de l'anémone aposymbiotique sont proposés comme des **marqueurs** de blanchissement.

Dans un second temps, les composés identifiés de l'anémone symbiotique ont été cartographiés par imagerie par spectrométrie de masse MALDI, permettant de les **localiser** finement à partir d'une coupe transversale de tentacule ([Chapitre 3, partie IV, p. 156](#)). Des composés ont tout d'abord été ciblés dans le but de confirmer les investigations réalisées sur leur distribution ([Chapitre II](#)), mais aussi de les localiser précisément. Ainsi, la présence du DGCC C22:6 et du DGDG C18:5/C18:5 est associée au compartiment symbiotique, alors que le lyso-PC C16:0 est associé au compartiment épidermique. Par la suite, des médiateurs chimiques choisis pour leur réponse au stress ont été ciblés par **MALDI-MSI**. Un suivi de ces cibles a été réalisé au cours de la cinétique de stress induite chimiquement, et a permis de montrer que la réponse des médiateurs chimiques n'était pas linéaire dans le temps. Les DGCC C22:6/C22:6 et lyso-C16:0 sont majoritairement présents dans les cellules de *Symbiodinium* de l'anémone symbiotique. Leur suivi par MALDI-MSI indique dans un premier temps une augmentation de ces composés jusqu'à T<sub>5</sub>, puis une diminution jusqu'à disparaître totalement à T<sub>59</sub>. Cette évolution n'est pas totalement corrélée à la perte des symbiotes, et indique une **réponse précoce** au stress par augmentation de ces composés. Par conséquent, ces composés ont été proposés comme marqueurs de réponse précoce au stress. Un ciblage de ces composés est en cours à partir de coupes de tentacules d'anémone ayant subi un stress thermique. Une mise au point des paramètres de la méthode sera réalisée afin d'observer la localisation des neuropeptides. En parallèle, des essais préliminaires ont été réalisés sur des coupes identiques par DESI-MSI, afin de localiser les composés polaires de faible poids moléculaire, tels que les bêtaïnes.

Enfin, un suivi de la réponse à un stress thermique a été mené par approche lipidomique afin d'évaluer plus finement l'évolution des lipides lors de l'induction d'un stress à court terme, et d'identifier des indicateurs de réponse précoce au stress ([Chapitre 3, partie V, p. 168](#)). Par cette approche, trois **marqueurs lipidiques** de **réponse précoce** au stress ont pu être identifiés. Leur réponse au stress a pu être déterminée avant qu'une rupture significative de la symbiose ne soit

induite. Deux ratios évaluent le nombre d'insaturations des acides gras : le ratio C18:1n-9/C18:4n-3 ainsi que le degré d'insaturation des AG de type C18, un troisième indicateur évalue la quantité d'acides gras issus de lipides polaires par rapport aux stérols. Le premier augmente significativement dès 24h de stress dans le compartiment gastrodermique, le second et le troisième diminuent significativement dès 24h de stress dans les cellules de *Symbiodinium*. Ces trois indicateurs sont des marqueurs de fluidité membranaire, dont la réponse précoce à un stress peut être appliquée à un grand nombre d'études pour la prévention de la rupture de la symbiose.

## Références Bibliographiques

---

- ACKERMANN D, LIST P (1960A). ZUR KONSTITUTION DES ZOOANEMONINS UND DES HERBIPOLINS. HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE 318:281-281
- ACKERMANN D, MENSSSEN H (1960B). N-HALTIGE INHALTSSTOFFE DES PFERDESCHWAMMES *HIPPOSPIONGIA EQUINA*. HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE 322:198-207
- ACKMAN R (1981). FLAME IONIZATION DETECTION APPLIED TO THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY ON COATED QUARTZ RODS. METHODS IN ENZYMOLOGY 72:205-252
- ADEREM A, UNDERHILL DM (1999). MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY 17:593-623
- AFFELD S (2006). DISTRIBUTION OF HOMARINE IN SOME OPISTHOBRANCHIA. BONNER ZOOLOGISCHE BEITRÄGE 55:181-190
- ALIEVA NO, KONZEN KA, FIELD SF, MELESHKEVITCH EA, HUNT ME, BELTRAN-RAMIREZ V, MILLER DJ, WIEDENMANN J, SALIH A, MATZ MV (2008). DIVERSITY AND EVOLUTION OF CORAL FLUORESCENT PROTEINS. PLOS ONE 3:e2680-e2680
- ALLOUI A, ZIMMERMANN K, MAMET J, DUPRAT F, NOËL J, CHEMIN J, GUY N, BLONDEAU N, VOILLEY N, RUBAT-COUDERT C (2006). TREK-1, A K<sup>+</sup> CHANNEL INVOLVED IN POLYMODAL PAIN PERCEPTION. THE EMBO JOURNAL 25:2368-2376
- ALPERT AJ (1990). HYDROPHILIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF PEPTIDES, NUCLEIC ACIDS AND OTHER POLAR COMPOUNDS. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 499:177-196
- ALTMANN R (1890). DIE ELEMENTARORGANISMEN UND IHRE BEZIEHUNGEN ZU DEN ZELLEN. VEIT, LEIPZIG
- ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, DE BRUIJN M, COULSON AR, DROUIN J, EPERON I, NIERLICH D, ROE BA, SANGER F (1981). SEQUENCE AND ORGANIZATION OF THE HUMAN MITOCHONDRIAL GENOME. NATURE 290:457-465
- ANTHONY K, HOOGENBOOM MO, MAYNARD JA, GROTTOLI AG, MIDDLEBROOK R (2009). ENERGETICS APPROACH TO PREDICTING MORTALITY RISK FROM ENVIRONMENTAL STRESS: A CASE STUDY OF CORAL BLEACHING. FUNCTIONAL ECOLOGY 23:539-550
- ARBELOA EM, CARIGNAN MO, ACUÑA FH, CHURIO MS, CARRETO JI (2010). MYCOSPORINE-LIKE AMINO ACID CONTENT IN THE SEA ANEMONES *AULACTINIA MARPLATENSIS*, *OULACTIS MUSCOSA* AND *ANTHOTHOE CHILENSIS*. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 156:216-221
- BACHAR A, ACHITUV Y, PASTERNAK Z, DUBINSKY Z (2007). AUTOTROPHY VERSUS HETEROTROPHY: THE ORIGIN OF CARBON DETERMINES ITS FATE IN A SYMBIOTIC SEA ANEMONE. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 349:295-298 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.JEMBE.2007.05.030
- BACHOK Z, MFLINGE P, TSUCHIYA M (2006). CHARACTERIZATION OF FATTY ACID COMPOSITION IN HEALTHY AND BLEACHED CORALS FROM OKINAWA, JAPAN. CORAL REEFS 25:545-554
- BAGHDASARIAN G, MUSCATINE L (2000). PREFERENTIAL EXPULSION OF DIVIDING ALGAL CELLS AS A MECHANISM FOR REGULATING ALGAL-CNIDARIAN SYMBIOSIS. THE BIOLOGICAL BULLETIN 199:278-286
- BALLANTINE JA, ROBERTS JC, MORRIS RJ (1976). MARINE STEROLS. III—THE STEROL COMPOSITIONS OF OCEANIC JELLYFISH. THE USE OF GAS CHROMATOGRAPHIC MASS SPECTROMETRIC TECHNIQUES TO IDENTIFY UNRESOLVED COMPONENTS. BIOLOGICAL MASS SPECTROMETRY 3:14-20 DOI: 10.1002/BMS.1200030104
- BANASZAK AT, TRENCH RK (1995). EFFECTS OF ULTRAVIOLET (UV) RADIATION ON MARINE MICROALGAL-INVERTEBRATE SYMBIOSES. II. THE SYNTHESIS OF MYCOSPORINE-LIKE AMINO ACIDS IN RESPONSE TO EXPOSURE TO UV IN *ANTHOPELEURA ELEGANTISSIMA* AND *CASSIOPEIA XAMACHANA*. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 194:233-250

- BARBEITOS MS, ROMANO SL, LASKER HR (2010). REPEATED LOSS OF COLONIALITY AND SYMBIOSIS IN SCLERACTINIAN CORALS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 107:11877-11882
- BARNAY-VERDIER S, DALL'OSSO D, JOLI N, OLIVRÉ J, PRIOUZEAU F, ZAMOUM T, MERLE P-L, FURLA P (2013). ESTABLISHMENT OF PRIMARY CELL CULTURE FROM THE TEMPERATE SYMBIOTIC CNIDARIAN, *ANEMONIA VIRIDIS*. CYTOTECHNOLOGY 65:697-704
- BAUMANN J, GROTTOLI AG, HUGHES AD, MATSUI Y (2014). PHOTOAUTOTROPHIC AND HETEROTROPHIC CARBON IN BLEACHED AND NON-BLEACHED CORAL LIPID ACQUISITION AND STORAGE. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 461:469-478 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.JEMBE.2014.09.017
- BAUMGARTEN S, SIMAKOV O, ESHERICK LY, LIEW YJ, LEHNERT EM, MICHELL CT, LI Y, HAMBLETON EA, GUSE A, OATES ME (2015). THE GENOME OF *AIPTASIA*, A SEA ANEMONE MODEL FOR CORAL SYMBIOSIS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES:201513318
- BEHENNA DC, STOCKDILL JL, STOLTZ BM (2008). THE BIOLOGY AND CHEMISTRY OF THE ZOANTHAMINE ALKALOIDS. ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION 47:2365-2386 DOI: 10.1002/ANIE.200703172
- BENZECRI JP (1973). L'ANALYSE DES DONNEES: L'ANALYSE DES CORRESPONDANCES. DUNOD.
- BÉRESS L, BÉRESS R, WUNDERER G (1975). PURIFICATION OF THREE POLYPEPTIDES WITH NEUROAND CARDIOTOXIC ACTIVITY FROM THE SEA ANEMONE *ANEMONIA SULCATA*. TOXICON 13:359-364 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0041-0101(75)90196-8
- BERGÉ J-P, BARNATHAN G (2005). FATTY ACIDS FROM LIPIDS OF MARINE ORGANISMS: MOLECULAR BIODIVERSITY, ROLES AS BIOMARKERS, BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS, AND ECONOMICAL ASPECTS. IN: ULBER R, GAL Y (EDS) MARINE BIOTECHNOLOGY I, VOL 96. ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING/BIOCHEMISTRY. SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, PP 49-125. DOI:10.1007/B135782
- BERKELMANS R, VAN OPPEN MJ (2006). THE ROLE OF ZOOXANTHELLAE IN THE THERMAL TOLERANCE OF CORALS: A 'NUGGET OF HOPE' FOR CORAL REEFS IN AN ERA OF CLIMATE CHANGE. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES 273:2305-2312
- BERTIN MJ, ZIMBA PV, BEAUCHESNE KR, HUNCIK KM, MOELLER PDR (2012). IDENTIFICATION OF TOXIC FATTY ACID AMIDES ISOLATED FROM THE HARMFUL ALGA *PRYMNESIUM PARVUM* CARTER. HARMFUL ALGAE 20:111-116 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/L.HAL.2012.08.005](http://dx.doi.org/10.1016/l.hal.2012.08.005)
- BEZUGLOV V, BOBROV M, ARCHAKOV A (1998). BIOACTIVE AMIDES OF FATTY ACIDS. BIOCHEMISTRY. BIOKIMIJA 63:22-30
- BISALPUTRA T, BISALPUTRA A (1967). CHLOROPLAST AND MITOCHONDRIAL DNA IN A BROWN ALGA *EGREGIA MENZIESII*. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 33:511-520
- BISHOP D, KENRICK J (1980). FATTY ACID COMPOSITION OF SYMBIOTIC ZOOXANTHELLAE IN RELATION TO THEIR HOSTS. LIPIDS 15:799-804 DOI: 10.1007/BF02534368
- BLIGH EG, DYER WJ (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. CANADIAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 37:911-917 DOI:DOI:10.1139/059-099
- BOGDANOV M, DOWHAN W (1999). LIPID-ASSISTED PROTEIN FOLDING. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 274:36827-36830 DOI: 10.1074/JBC.274.52.36827
- BOITANO S, EVANS WH (2000). CONNEXIN MIMETIC PEPTIDES REVERSIBLY INHIBIT  $Ca^{2+}$  SIGNALING THROUGH GAP JUNCTIONS IN AIRWAY CELLS. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 279:L623-L630

- BONFANTE P, GENRE A (2010). MECHANISMS UNDERLYING BENEFICIAL PLANT–FUNGUS INTERACTIONS IN MYCORRHIZAL SYMBIOSIS. *NATURE COMMUNICATIONS* 1:48
- BORTOLOMEAZZI R, DE ZAN M, PIZZALE L, CONTE LS (1999). MASS SPECTROMETRY CHARACTERIZATION OF THE 5A-, 7A-, AND 7B-HYDROXY DERIVATIVES OF B-SITOSTEROL, CAMPESTEROL, STIGMASTEROL, AND BRASSICASTEROL. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* 47:3069-3074
- BROOKS C, HORNING EC, YOUNG J (1968). CHARACTERIZATION OF STEROLS BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY OF THE TRIMETHYLSILYL ETHERS. *LIPIDS* 3:391-402
- BROWN B (1997). CORAL BLEACHING: CAUSES AND CONSEQUENCES. *CORAL REEFS* 16:S129-S138
- BROWN B, BYTHELL J (2005). PERSPECTIVES ON MUCUS SECRETION IN REEF CORALS. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 296:291-309
- BROWN B, LE TISSIER M, BYTHELL J (1995). MECHANISMS OF BLEACHING DEDUCED FROM HISTOLOGICAL STUDIES OF REEF CORALS SAMPLED DURING A NATURAL BLEACHING EVENT. *MARINE BIOLOGY* 122:655-663
- BROWN BE, COSSINS AR (2011). THE POTENTIAL FOR TEMPERATURE ACCLIMATISATION OF REEF CORALS IN THE FACE OF CLIMATE CHANGE. IN: *CORAL REEFS: AN ECOSYSTEM IN TRANSITION*. SPRINGER, PP 421-433
- BROWN J, HEGARTY P, CHARLWOOD B (1987). THE TOXICITY OF MONOTERPENES TO PLANT CELL CULTURES. *PLANT SCIENCE* 48:195-201
- BROWSE J, SOMERVILLE C (1991). GLYCEROLIPID SYNTHESIS: BIOCHEMISTRY AND REGULATION. *ANNUAL REVIEW OF PLANT BIOLOGY* 42:467-506
- BRÜCK TB, BRÜCK WM, SANTIAGO-VÁZQUEZ 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*. *MARINE BIOTECHNOLOGY* 9:561-576
- BRUHN T, SCHALLER C, SCHULZE C, SANCHEZ-RODRIGUEZ J, DANNMEIER C, RAVENS U, HEUBACH JF, ECKHARDT K, SCHMIDTMAYER J, SCHMIDT H, ANEIRO S A, WACHTER E, BÉRESS L (2001). ISOLATION AND CHARACTERISATION OF FIVE NEUROTOXIC AND CARDIOTOXIC POLYPEPTIDES FROM THE SEA ANEMONE *ANTHOPLLEURA ELEGANTISSIMA*. *TOXICON* 39:693-702 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0041-0101\(00\)00199-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00199-9)
- BUDDEMEIER RW, FAUTIN DG (1993). CORAL BLEACHING AS AN ADAPTIVE MECHANISM. *BIOSCIENCE* 43:320-326 DOI:10.2307/1312064
- BURRIESCI MS, RAAB TK, PRINGLE JR (2012). EVIDENCE THAT GLUCOSE IS THE MAJOR TRANSFERRED METABOLITE IN DINOFLAGELLATE–CNIDARIAN SYMBIOSIS. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY* 215:3467-3477
- BYTHELL JC, WILD C (2011). BIOLOGY AND ECOLOGY OF CORAL MUCUS RELEASE. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY* 408:88-93 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.JEMBE.2011.07.028](http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.028)
- CAFIERI F, FATTORUSSO E, TAGLIALATELA-SCAFATI O (1998). NOVEL BETAINES FROM THE MARINE SPONGE *AGELAS DISPAR*. *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS* 61:1171-1173 DOI:10.1021/NP980157TLESSER
- CALDER DR (1996). HYDROIDS (CNIDARIA: HYDROZOA) RECORDED FROM DEPTHS EXCEEDING 3000 M IN THE ABYSSAL WESTERN NORTH ATLANTIC. *CANADIAN JOURNAL OF ZOOLOGY* 74:1721-1726
- CANTIN NE, COHEN AL, KARNAUSKAS KB, TARRANT AM, MCCORKLE DC (2010). OCEAN WARMING SLOWS CORAL GROWTH IN THE CENTRAL RED SEA. *SCIENCE* 329:322-325
- CANTIN NE, NEGRI AP, WILLIS BL (2007). PHOTOINHIBITION FROM CHRONIC HERBICIDE EXPOSURE REDUCES REPRODUCTIVE OUTPUT OF REEF-BUILDING CORALS. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 344:81-93

- CAPRIOLI RM, FARMER TB, GILE J (1997). MOLECULAR IMAGING OF BIOLOGICAL SAMPLES: LOCALIZATION OF PEPTIDES AND PROTEINS USING MALDI-TOF MS. *ANALYTICAL CHEMISTRY* 69:4751-4760
- CAPRON L, BOUTOUTE M, MASSI L, MARTINEZ G, ZAFFINI AL, GANOT P, FURLA P, SABOURAULT C (2010). LIPIDOMICS DECIPHERS SYMBIOTIC EXCHANGES BETWEEN *SYMBIODINIUM* AND THE SEA ANEMONE *ANEMONIA VIRIDIS*. *EURO ISRS SYMPOSIUM 2010: REEFS IN A CHANGING ENVIRONMENT (WAGENINGEN, NETHERLANDS)*
- CARIELLO L, CRESCENZI S, PROTA G, CAPASSO S, GIORDANO F, MAZZARELLA L (1974). ZOANTHOXANTHIN, A NATURAL 1, 3, 5, 7-TETRAZACYCLOPENT-AZULENE FROM *PARAZOANTHUS AXINELLAE*. *TETRAHEDRON* 30:3281-3287
- CARIELLO L, TOTA B (1974). INHIBITION OF SUCCINIC OXIDASE ACTIVITY OF BEEF HEART MITOCHONDRIA BY A NEW FLUORESCENT METABOLITE, ZOANTHOXANTIN. *EXPERIENTIA* 30:244-245 DOI:10.1007/BF01934804
- CARSTENSEN K, RINEHART KL, MCFARLANE ID, GRIMMELIKHUIJZEN CJP (1992). ISOLATION OF LEU-PRO-PRO-GLY-PRO-LEU-PRO-ARG-PRO-NH<sub>2</sub> (ANTHO-RPAMIDE), AN N-TERMINALLY PROTECTED, BIOLOGICALLY ACTIVE NEUROPEPTIDE FROM SEA ANEMONES. *PEPTIDES* 13:851-857 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0196-9781(92)90040-A
- CERNICHIARI E, MUSCATINE L, SMITH D (1969). MALTOSE EXCRETION BY THE SYMBIOTIC ALGAE OF *HYDRA VIRIDIS*. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES* 173:557-576
- CERVINO JM, HAYES RL, HONOVICH M, GOREAU TJ, JONES S, RUBEC P (2003). CHANGES IN ZOOXANTHELLAE DENSITY, MORPHOLOGY, AND MITOTIC INDEX IN HERMATYPIC CORALS AND ANEMONES EXPOSED TO CYANIDE. *MARINE POLLUTION BULLETIN* 46:573-586
- CHA J, CHRIST W, FINAN J, FUJIOKA H, KISHI Y, KLEIN L, KO S, LEDER J, MCWHORTER W, PFAFF K (1982). STEREOCHEMISTRY OF PALYTOXIN. PART 4. COMPLETE STRUCTURE. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 104:7369-7371
- CHAURAND P (2012). IMAGING MASS SPECTROMETRY OF THIN TISSUE SECTIONS: A DECADE OF COLLECTIVE EFFORTS. *JOURNAL OF PROTEOMICS* 75:4883-4892 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.JPROT.2012.04.005
- CHELOMIN V, ZHUKOVA N (1981). LIPID COMPOSITION AND SOME ASPECTS OF AMINOPHOSPHOLIPID ORGANIZATION IN ERYTHROCYTE MEMBRANE OF THE MARINE BIVALVE MOLLUSC *SCAPHARCA BROUGHTONI* (SCHRENCK). *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: COMPARATIVE BIOCHEMISTRY* 69:599-604
- CHEN H-K, SONG S-N, WANG L-H, MAYFIELD AB, CHEN Y-J, CHEN W-NU, CHEN C-S (2015). A COMPARTMENTAL COMPARISON OF MAJOR LIPID SPECIES IN A CORAL-*SYMBIODINIUM* ENDOSYMBIOSIS: EVIDENCE THAT THE CORAL HOST REGULATES LIPOGENESIS OF ITS CYTOSOLIC LIPID BODIES. *PLOS ONE* 10:e0132519
- CHEN J, BURKE JJ, XIN Z, XU C, VELTEN J (2006). CHARACTERIZATION OF THE *ARABIDOPSIS* THERMOSENSITIVE MUTANT ATTS02 REVEALS AN IMPORTANT ROLE FOR GALACTOLIPIDS IN THERMOTOLERANCE. *PLANT, CELL & ENVIRONMENT* 29:1437-1448
- CHEN M-C, CHENG Y-M, HONG M-C, FANG L-S (2004). MOLECULAR CLONING OF RAB5 (APRAB5) IN *AIPTASIA PULCHELLA* AND ITS RETENTION IN PHAGOSOMES HARBORING LIVE ZOOXANTHELLAE. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 324:1024-1033
- CHEN TH, MURATA N (2002). ENHANCEMENT OF TOLERANCE OF ABIOTIC STRESS BY METABOLIC ENGINEERING OF BETAINES AND OTHER COMPATIBLE SOLUTES. *CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY* 5:250-257
- CHEN W-N, KANG H-J, WEIS V, MAYFIELD A, JIANG P-L, FANG L-S, CHEN C-S (2012). DIEL RHYTHMICITY OF LIPID-BODY FORMATION IN A CORAL-*SYMBIODINIUM* ENDOSYMBIOSIS. *CORAL REEFS* 31:521-534

- CHENG JB, RUSSELL DW (2004). MAMMALIAN WAX BIOSYNTHESIS I. IDENTIFICATION OF TWO FATTY ACYL-COENZYME A REDUCTASES WITH DIFFERENT SUBSTRATE SPECIFICITIES AND TISSUE DISTRIBUTIONS. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 279:37789-37797
- CHERUKU SR, XU Z, DUTIA R, LOBEL P, STORCH J (2006). MECHANISM OF CHOLESTEROL TRANSFER FROM THE NIEMANN-PICK TYPE C2 PROTEIN TO MODEL MEMBRANES SUPPORTS A ROLE IN LYSOSOMAL CHOLESTEROL TRANSPORT. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 281:31594-31604
- CHEVREUL ME (1823). RECHERCHES CHIMIQUES SUR LES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE. FG LEVRAULT
- CHU KH, QI J, YU Z-G, ANH V (2004). ORIGIN AND PHYLOGENY OF CHLOROPLASTS REVEALED BY A SIMPLE CORRELATION ANALYSIS OF COMPLETE GENOMES. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION 21:200-206
- CIENOWSKI L (1871). MEMOIRS: ON THE PRODUCTION OF SPORES IN THE RADIOLARIA. QUARTERLY JOURNAL OF MICROSCOPICAL SCIENCE
- CIMINIELLO P, DELL'AVERSANO C, FORINO M (2014). PALYTOXINS: CHEMISTRY AND DETECTION. IN: TOXINS AND BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM MICROALGAE 1:208-231
- CLARKE K, GORLEY R (2005). PRIMER: GETTING STARTED WITH V6. PRIMER-E LTD: PLYMOUTH, UK
- CLARKE K, GREEN R (1988). STATISTICAL DESIGN AND ANALYSIS FOR A " BIOLOGICAL EFFECTS" STUDY. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 46:213-226
- COHEN Z, KHOZIN-GOLDBERG I, RATLEDGE C (2010). SEARCHING FOR POLYUNSATURATED FATTY ACID-RICH PHOTOSYNTHETIC MICROALGAE. IN: SINGLE CELL OILS: MICROBIAL AND ALGAL OILS. ED. 2. PP 201-224
- COOK C (1971). TRANSFER OF 35S-LABELED MATERIAL FROM FOOD INGESTED BY *Aiptasia* SP. TO ITS ENDOSYMBIOTIC ZOOXANTHELLAE. EXPERIMENTAL COELENTERATE BIOLOGY. UNIVERSITY OF HAWAII PRESS, HONOLULU:218-224
- COOK CB, DAVY SK (2001). ARE FREE AMINO ACIDS RESPONSIBLE FOR THE HOST FACTOR' EFFECTS ON SYMBIOTIC ZOOXANTHELLAE IN EXTRACTS OF HOST TISSUE? HYDROBIOLOGIA 461:71-78
- CORTES-SANCHEZ ADJ, HERNANDEZ-SANCHEZ H, JARAMILLO-FLORES ME (2013). BIOLOGICAL ACTIVITY OF GLYCOLIPIDS PRODUCED BY MICROORGANISMS: NEW TRENDS AND POSSIBLE THERAPEUTIC ALTERNATIVES. MICROBIOLOGICAL RESEARCH 168:22-32 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.MICRES.2012.07.002
- CRAVATT BF, PROSPERO-GARCIA O, SIUZDAK G, GILULA NB, HENRIKSEN SJ, BOGER DL, LERNER RA (1995). CHEMICAL CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF BRAIN LIPIDS THAT INDUCE SLEEP. SCIENCE 268:1506-1509
- CROSSLAND CJ, BARNES DJ, COX T, DEVEREUX M (1980). COMPARTMENTATION AND TURNOVER OF ORGANIC CARBON IN THE STAGHORN CORAL *ACROPORA FORMOSA*. MARINE BIOLOGY 59:181-187 DOI: 10.1007/BF00396866
- CZECZUGA B (1972). INVESTIGATIONS OF CAROTENOIDS IN SOME FAUNA OF THE ADRIATIC SEA. II. *ANEMONIA SULCATA* AND *ACTINIA EQUINA* (COELENTERATA: ANTHOZOA). MARINE BIOLOGY 13:124-126
- D'ANGELO C, DENZEL A, VOGT A, MATZ MV, OSWALD F, SALIH A, NIENHAUS GU, WIEDENMANN J (2008). BLUE LIGHT REGULATION OF HOST PIGMENT IN REEF-BUILDING CORALS. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 364:97-106
- DALL W (1971). THE ROLE OF HOMARINE IN DECAPOD CRUSTACEA. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: COMPARATIVE BIOCHEMISTRY 39:31-44 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0305-0491(71)90250-1
- DALSGAARD J, ST. JOHN M, KATTNER G, MÜLLER-NAVARRA D, HAGEN W (2003). FATTY ACID TROPHIC MARKERS IN THE PELAGIC MARINE ENVIRONMENT. ADVANCES IN MARINE BIOLOGY (VOL. VOLUME 46, PP. 225-340): ACADEMIC PRESS.

- DALY M, BRUGLER MR, CARTWRIGHT P, COLLINS AG, DAWSON MN, FAUTIN DG, FRANCE SC, MCFADDEN CS, OPRESKO DM, RODRIGUEZ E, ROMANO SL, STAKE JL (2007). THE PHYLUM CNIDARIA: A REVIEW OF PHYLOGENETIC PATTERNS AND DIVERSITY 300 YEARS AFTER LINNAEUS. IN LINNAEUS TERCENTENARY: PROGRESS IN INVERTEBRATE TAXONOMY. Z.-Q. ZHANG AND W. A. SHEAR, EDITORS. ZOOTAXA 1668:127-182
- DANI V, GANOT P, PRIOUZEAU F, FURLA P, SABOURAULT C (2014). ARE NIEMANN-PICK TYPE C PROTEINS KEY PLAYERS IN CNIDARIAN-DINOFLLAGELLATE ENDOSYMBIOSES? MOLECULAR ECOLOGY 23:4527-4540 DOI: 10.1111/MEC.12876
- DANI V, PRIOUZEAU F, PAGNOTTA S, CARETTE D, LAUGIER JP, SABOURAULT C. THERMAL AND MENTHOL STRESS INDUCE DIFFERENT CELLULAR EVENTS DURING SEA ANEMONE BLEACHING. SYMBIOSIS. (SOUIMIS)
- DAVIES PS (1991). EFFECT OF DAYLIGHT VARIATIONS ON THE ENERGY BUDGETS OF SHALLOW-WATER CORALS. MARINE BIOLOGY 108:137-144
- DAVY SK, LUCAS I, TURNER JR (1996). CARBON BUDGETS IN TEMPERATE ANTHOZOAN-DINOFLLAGELLATE SYMBIOSES. MARINE BIOLOGY 126:773-7837
- DAVY SK, TURNER JR, LUCAS I (1997). THE NATURE OF TEMPERATE ANTHOZOAN-DINOFLLAGELLATE SYMBIOSES. PROCEEDINGS OF THE 8TH INTERNATIONAL CORAL REEF SYMPOSIUM (VOL. 2, PP. 1307-1312).
- DAVY SK, ALLEMAND D, WEIS VM (2012). CELL BIOLOGY OF CNIDARIAN-DINOFLLAGELLATE SYMBIOSIS. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS 76:229-261 DOI:10.1128/MMBR.05014-11
- DAVY SK, TURNER JR (2003). EARLY DEVELOPMENT AND ACQUISITION OF ZOOXANTHELLAE IN THE TEMPERATE SYMBIOTIC SEA ANEMONE *ANTHOPLEURA BALLII* (COCKS). THE BIOLOGICAL BULLETIN 205:66-72
- DAVY SK, WITHERS KJT, HINDE R (2006). EFFECTS OF HOST NUTRITIONAL STATUS AND SEASONALITY ON THE NITROGEN STATUS OF ZOOXANTHELLAE IN THE TEMPERATE CORAL *PLESIASTREA VERSIPORA* (LAMARCK). JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 335:256-265 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.JEMBE.2006.03.019
- DE KONING A (1970). PHOSPHOLIPIDS OF MARINE ORIGIN V.-THE CRAB-A COMPARATIVE STUDY OF A MARINE SPECIES (*CYCLOGRAPSUS PUNCTATUS*) AND A FRESH WATER SPECIES (POTAMON). JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE 21:290-293
- DEBARY A (1866). DE LA GENERATION SEXUELLE DANS LES CHAMPIGNONS. ANNALES DES SCIENCES NATURELLES BOTANIQUE SERIE V 5:343-348
- DEEDS JR, SCHWARTZ MD (2010). HUMAN RISK ASSOCIATED WITH PALYTOXIN EXPOSURE. TOXICON 56:150-162
- DEMBITSKY VM, SHKROB I, ROZENTSVET OA (2000). FATTY ACID AMIDES FROM FRESHWATER GREEN ALGA *RHIZOCLONIUM HIEROGLYPHICUM*. PHYTOCHEMISTRY 54:965-967
- DEWICK PM (2009). THE ACETATE PATHWAY: FATTY ACIDS AND POLYKETIDES. IN: MEDICINAL NATURAL PRODUCTS. JOHN WILEY & SONS, LTD, PP 39-135. DOI:10.1002/9780470742761.CH3
- DI CAMILLO CG, LUNA GM, BO M, GIORDANO G, CORINALDESI C, BAVESTRELLO G (2012). BIODIVERSITY OF PROKARYOTIC COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE ECTODERM OF *ECTOPLEURA CROCEA* (CNIDARIA, HYDROZOA). PLoS ONE 7(6): e39926. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0039926
- DIMOND J, CARRINGTON E (2008). SYMBIOSIS REGULATION IN A FACULTATIVELY SYMBIOTIC TEMPERATE CORAL: ZOOXANTHELLAE DIVISION AND EXPULSION. CORAL REEFS 27:601-604
- DOBSON G, CHRISTIE WW (2002). MASS SPECTROMETRY OF FATTY ACID DERIVATIVES. EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY 104:36-43 DOI: 10.1002/1438-9312(200201)104:1

- DOMINGUES MRM, SIMÕES C, DA COSTA JP, REIS A, DOMINGUES P (2009). IDENTIFICATION OF 1-PALMITOYL-2-LINOLEOYL-PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE MODIFICATIONS UNDER OXIDATIVE STRESS CONDITIONS BY LC-MS/MS. BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY 23:588-601 DOI: 10.1002/bmc.1157
- DOUGLAS A (2003). CORAL BLEACHING--HOW AND WHY? MARINE POLLUTION BULLETIN 46:385-392
- DOWNES CA, FAUTH JE, HALAS JC, DUSTAN P, BEMISS J, WOODLEY CM (2002). OXIDATIVE STRESS AND SEASONAL CORAL BLEACHING. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 33:533-543 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0891-5849(02)00907-3
- DOWNES CA, KRAMARSKY-WINTER E, MARTINEZ J, KUSHMARO A, WOODLEY CM, LOYA Y, OSTRANDER GK (2009). SYMBIOPHAGY AS A CELLULAR MECHANISM FOR CORAL BLEACHING. AUTOPHAGY 5:211-216
- DUBOIS N, BARNATHAN G, GOUYGOU J-P, BERGÉ J-P (2009). GAS CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOR OF FATTY ACID DERIVATIVES FOR MASS SPECTROMETRY ON LOW-POLARITY CAPILLARY COLUMNS . EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY 111:688-697 DOI: 10.1002/EJLT.200800148
- DUNLAP WW, SHICK JM (1998). ULTRAVIOLET RADIATION-ABSORBING MYCOSPORINE-LIKE AMINO ACIDS IN CORAL REEF ORGANISMS: A BIOCHEMICAL AND ENVIRONMENTAL PERSPECTIVE. JOURNAL OF PHYCOLOGY 34:418-430
- DUNN S, THOMASON J, LE TISSIER M, BYTHELL J (2004). HEAT STRESS INDUCES DIFFERENT FORMS OF CELL DEATH IN SEA ANEMONES AND THEIR ENDOSYMBIOTIC ALGAE DEPENDING ON TEMPERATURE AND DURATION. CELL DEATH & DIFFERENTIATION 11:1213-1222
- DUNN SR, SCHNITZLER CE, WEIS VM (2007). APOPTOSIS AND AUTOPHAGY AS MECHANISMS OF DINOFLAGELLATE SYMBIONT RELEASE DURING CNIDARIAN BLEACHING: EVERY WHICH WAY YOU LOSE. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B: BIOLOGICAL SCIENCES 274:3079-3085 DOI:10.1098/RSPB.2007.0711
- DUNN SR, THOMAS MC, NETTE GW, DOVE SG (2012). A LIPIDOMIC APPROACH TO UNDERSTANDING FREE FATTY ACID LIPOGENESIS DERIVED FROM DISSOLVED INORGANIC CARBON WITHIN CNIDARIAN-DINOFLAGELLATE SYMBIOSIS. PLoS ONE 7:e46801
- DYKENS JA, SHICK JM (1982). OXYGEN PRODUCTION BY ENDOSYMBIOTIC ALGAE CONTROLS SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY IN THEIR ANIMAL HOST. NATURE 297:579-580
- EHRlich HP, SUN B, SAGGERS GC, KROMATH F (2006). GAP JUNCTION COMMUNICATIONS INFLUENCE UPON FIBROBLAST SYNTHESIS OF TYPE I COLLAGEN AND FIBRONECTIN. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 98:735-743
- EIPPER BA, MILGRAM SL, JEAN HUSTEN E, YUN HY, MAINS RE (1993). PEPTIDYLGLYCINE A-AMIDATING MONOOXYGENASE: A MULTIFUNCTIONAL PROTEIN WITH CATALYTIC, PROCESSING, AND ROUTING DOMAINS. PROTEIN SCIENCE 2:489-497
- FAHEY S, CARROLL A (2007). NATURAL PRODUCTS ISOLATED FROM SPECIES OF HALGERDA BERGH, 1880 (MOLLUSCA: NUDIBRANCHIA) AND THEIR ECOLOGICAL AND EVOLUTIONARY IMPLICATIONS. JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY 33:1226-1234 DOI: 10.1007/s10886-007-9288-z
- FALKOWSKI PG, DUBINSKY Z, MUSCATINE L, MCCLOSKEY L (1993). POPULATION CONTROL IN SYMBIOTIC CORALS. BIOSCIENCE 43:606-611 DOI: 10.2307/1312147
- FALKOWSKI PG, DUBINSKY Z, MUSCATINE L, PORTER JW (1984). LIGHT AND THE BIOENERGETICS OF A SYMBIOTIC CORAL. BIOSCIENCE 34:705-709
- FERRIER-PAGÈS C, WITTING J, TAMBUTTÉ E, SEBENS KP (2003). EFFECT OF NATURAL ZOOPLANKTON FEEDING ON THE TISSUE AND SKELETAL GROWTH OF THE SCLERACTINIAN CORAL *STYLOPHORA PISTILLATA*. CORAL REEFS 22:229-240 DOI: 10.1007/s00338-003-0312-7

- FIGHN O, KOPKA J, DORMANN P, ALTMANN T, TRETHERWEY RN, WILLMITZER L (2000). METABOLITE PROFILING FOR PLANT FUNCTIONAL GENOMICS. *NATURE BIOTECHNOLOGY* 18:1157-1161
- FIGUEIREDO J, BAIRD AH, COHEN MF, FLOT JF, KAMIKI T, MEZIANE T, TSUCHIYA M, YAMASAKI H (2012). ONTOGENETIC CHANGE IN THE LIPID AND FATTY ACID COMPOSITION OF SCLERACTINIAN CORAL LARVAE. *CORAL REEFS* 31:613-619 doi: 10.1007/s00338-012-0874-3
- FITT W (2000). CELLULAR GROWTH OF HOST AND SYMBIOT IN A CNIDARIAN-ZOOXANTHELLAR SYMBIOSIS. *THE BIOLOGICAL BULLETIN* 198:110-120s2-11:396-403
- FITT W, WARNER M (1995). BLEACHING PATTERNS OF FOUR SPECIES OF CARIBBEAN REEF CORALS. *THE BIOLOGICAL BULLETIN* 189:298-307
- FITT WK, TRENCH RK (1983). ENDOCYTOSIS OF THE SYMBIOTIC DINOFLAGELLATE *SYMBIODINIUM MICROADRIATICUM* FREUDENTHAL BY ENDODERMAL CELLS OF THE SCYPHISTOMAE OF *CASSIOPEIA XAMACHANA* AND RESISTANCE OF THE ALGAE TO HOST DIGESTION. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* 64:195-212
- FITZGERALD M, MURPHY RC (2007). ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY OF HUMAN HAIR WAX ESTERS. *JOURNAL OF LIPID RESEARCH* 48:1231-1246 doi:10.1194/JLR.D700002-JLR200
- FLAIM G, OBERTEGGER U, ANESI A, GUELLA G (2014). TEMPERATURE-INDUCED CHANGES IN LIPID BIOMARKERS AND MYCOSPORINE-LIKE AMINO ACIDS IN THE PSYCHROPHILIC DINOFLAGELLATE *PERIDINIUM ACICULIFERUM*. *FRESHWATER BIOLOGY* *IN PRESS* doi: 10.1111/fwb.12321
- FRANK AB (1876). UEBER DIE BIOLOGISCHEN VERHÄLTNISSE DES THALLUS EINIGER KRUSTENFLECHTEN. JU KERN.
- FRAZÃO B, VASCONCELOS V, ANTUNES A (2012). SEA ANEMONE (CNIDARIA, ANTHOZOA, ACTINIARIA) TOXINS: AN OVERVIEW. *MARINE DRUGS* 10:1812-1851
- FREUDENTHAL HD (1962). *SYMBIODINIUM* GEN. NOV. AND *SYMBIODINIUM MICROADRIATICUM* SP. NOV., A ZOOXANTHELLA: TAXONOMY, LIFE CYCLE, AND MORPHOLOGY. *THE JOURNAL OF PROTOZOOLOGY* 9:45-52 doi:10.1111/j.1550-7408.1962.tb02579.x
- FRIEDLAND N, LIU H-L, LOBEL P, STOCK AM (2003). STRUCTURE OF A CHOLESTEROL-BINDING PROTEIN DEFICIENT IN NIEMANN-PICK TYPE C2 DISEASE. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* 100:2512-2517 doi: 10.1073/pnas.0437840100
- FURLA P, ALLEMAND D, SHICK JM, FERRIER-PAGÈS C, RICHIER S, PLANTIVAUX A, MERLE P-L, TAMBUTTÉ S (2005). THE SYMBIOTIC ANTHOZOAN: A PHYSIOLOGICAL CHIMERA BETWEEN ALGA AND ANIMAL. *INTEGRATIVE AND COMPARATIVE BIOLOGY* 45:595-604 doi:10.1093/icb/45.4.595
- FURLA P, BÉNAZET-TAMBUTTÉ S, JAUBERT J, ALLEMAND D (1998). FUNCTIONAL POLARITY OF THE TENTACLE OF THE SEA ANEMONE *ANEMONIA VIRIDIS*: ROLE IN INORGANIC CARBON ACQUISITION. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY* 274:R303-R310
- GALOIS R, THOMASSIN B (1982). BIOCHEMICAL COMPOSITION OF SOFT AND HARD CORAL MUCUS ON A NEW CALEDONIAN LAGOONAL REEF. *PROC. FOURTH INT. CORAL REEF SYMP (VOL. 2, PP. 59-67)*.
- GANESAN B, ANANDAN R, LAKSHMANAN PT (2011). STUDIES ON THE PROTECTIVE EFFECTS OF BETAINE AGAINST OXIDATIVE DAMAGE DURING EXPERIMENTALLY INDUCED RESTRAINT STRESS IN WISTAR ALBINO RATS. *CELL STRESS AND CHAPERONES* 16:641-652
- GANOT P, MOYA A, MAGNONE V, ALLEMAND D, FURLA P, SABOURAULT C (2011). ADAPTATIONS TO ENDOSYMBIOSIS IN A CNIDARIAN-DINOFLAGELLATE ASSOCIATION: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION AND SPECIFIC GENE DUPLICATIONS. *PLoS GENETICS* 7:e1002187

- GARRETT TA, SCHMEITZEL JL, KLEIN JA, HWANG JJ, SCHWARZ JA (2013). COMPARATIVE LIPID PROFILING OF THE CNIDARIAN *AIPTASIA PALLIDA* AND ITS DINOFLAGELLATE SYMBIONT. PLOS ONE 8:e57975
- GASTEIGER E, GERGEN J, HAAKE P (1955). A STUDY OF THE DISTRIBUTION OF HOMARINE (N-METHYL PICOLINIC ACID) BIOLOGICAL BULLETIN (VOL. 109, PP. 345-346): MARINE BIOLOGICAL LABORATORY 7 MBL ST, WOODS HOLE, MA 02543.
- GATES RD, BAGHDASARIAN G, MUSCATINE L (1992). TEMPERATURE STRESS CAUSES HOST CELL DETACHMENT IN SYMBIOTIC CNIDARIANS: IMPLICATIONS FOR CORAL BLEACHING. THE BIOLOGICAL BULLETIN 182:324-332
- GATES RD, HOEGH-GULDBERG O, MCFALL-NGAI MJ, BIL KY, MUSCATINE L (1995). FREE AMINO ACIDS EXHIBIT ANTHOZOAN "HOST FACTOR" ACTIVITY: THEY INDUCE THE RELEASE OF PHOTOSYNTHATE FROM SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES IN VITRO. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 92:7430-7434
- GEBSER B, POHNERT G (2013). SYNCHRONIZED REGULATION OF DIFFERENT ZWITTERIONIC METABOLITES IN THE OSMOADAPTION OF PHYTOPLANKTON. MARINE DRUGS 11:2168-2182
- GERST N, RUAN B, PANG J, WILSON W, SCHROEPFER G (1997). AN UPDATED LOOK AT THE ANALYSIS OF UNSATURATED C27 STEROLS BY GAS CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY. JOURNAL OF LIPID RESEARCH 38:1685-1701
- GHOSAL S, DUTTA S (1971). ALKALOIDS OF *ABRUS PRECATORIUS*. PHYTOCHEMISTRY 10:195-198
- GINER J-L, WIKFORS GH (2011). "DINOFLAGELLATE STEROLS" IN MARINE DIATOMS. PHYTOCHEMISTRY 72:1896-1901 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.PHYTCHEM.2011.05.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.05.002)
- GLEIBS S, MEBS D, WERDING B (1995). STUDIES ON THE ORIGIN AND DISTRIBUTION OF PALYTOXIN IN A CARIBBEAN CORAL REEF. TOXICON 33:1531-1537
- GODINOT C (2012). ABSORPTION ET DEVENIR DU PHOSPHORE AU SEIN DE LA SYMBIOSE CORALLIENNE. THESE : SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT, UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE-PARIS VI
- GOIRAN C, AL-MOGRABI S, ALLEMAND D, JAUBERT J (1996). INORGANIC CARBON UPTAKE FOR PHOTOSYNTHESIS BY THE SYMBIOTIC CORAL/DINOFLAGELLATE ASSOCIATION I. PHOTOSYNTHETIC PERFORMANCES OF SYMBIONTS AND DEPENDENCE ON SEA WATER BICARBONATE. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 199:207-225
- GORDON BR, LEGGAT W (2010). *SYMBIODINIUM*-INVERTEBRATE SYMBIOSES AND THE ROLE OF METABOLOMICS. MARINE DRUGS 8:2546-2568 DOI: 10.3390/md8102546
- GOULET TL, COFFROTH MA (2003). STABILITY OF AN OCTOCORAL-ALGAL SYMBIOSIS OVER TIME AND SPACE. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 250:117-124 DOI:10.3354/meps250117
- GOUNARIS K, BARBER J (1983). MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL: THE MOST ABUNDANT POLAR LIPID IN NATURE. TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES 8:378-381
- GRAEVE M, KATTNER G, HAGEN W (1994). DIET-INDUCED CHANGES IN THE FATTY ACID COMPOSITION OF ARCTIC HERBIVOROUS COPEPODS: EXPERIMENTAL EVIDENCE OF TROPHIC MARKERS. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 182:97-110
- GRAFF D, GRIMMELIKHUIJZEN CJP (1988). ISOLATION OF <GLU-SER-LEU-ARG-TRP-NH<sub>2</sub>, A NOVEL NEUROPEPTIDE FROM SEA ANEMONES. BRAIN RESEARCH 442:354-358 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0006-8993\(88\)91525-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(88)91525-9)
- GRANT A, RÉMOND M, HINDE R (1998). LOW MOLECULAR-WEIGHT FACTOR FROM *PLESIASTREA VERSIPORA* (SCLERACTINIA) THAT MODIFIES RELEASE AND GLYCEROL METABOLISM OF ISOLATED SYMBIOTIC ALGAE. MARINE BIOLOGY 130:553-557

- GRAY CG, LASITER AD, LI C, LEBLOND JD (2009). MONO- AND DIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL COMPOSITION OF DINOFLAGELLATES. I. PERIDININ-CONTAINING TAXA. EUROPEAN JOURNAL OF PHYCOLOGY 44:191-197 doi:10.1080/09670260802419481
- GRIMMELIKHUIJZEN C, RINEHART K, JACOB E, GRAFF D, REINSCHIED R, NOTHACKER H, STALEY A (1990). ISOLATION OF L-3-PHENYLLACTYL-LEU-ARG-ASN-NH<sub>2</sub> (ANTHO-RNAMIDE), A SEA ANEMONE NEUROPEPTIDE CONTAINING AN UNUSUAL AMINO-TERMINAL BLOCKING GROUP. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 87:5410-5414
- GRIMMELIKHUIJZEN CJ, LEVIEV I, CARSTENSEN K (1996). PEPTIDES IN THE NERVOUS SYSTEMS OF CNIDARIANS: STRUCTURE, FUNCTION, AND BIOSYNTHESIS. INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY 167:37-89
- GRIMMELIKHUIJZEN CJ, WILLIAMSON M, HANSEN GN (2002). NEUROPEPTIDES IN CNIDARIANS. IN: CELL SIGNALLING IN PROKARYOTES AND LOWER METAZOA. SPRINGER, PP 115-139
- GROSS R, VAVRE F, HEDDI A, HURST GD, ZCHORI-FEIN E, BOURTZIS K (2009). IMMUNITY AND SYMBIOSIS. MOLECULAR MICROBIOLOGY 73:751-759
- GROVER R, MAGUER J-F, REYNAUD-VAGANAY S, FERRIER-PAGES C (2002). UPTAKE OF AMMONIUM BY THE SCLERACTINIAN CORAL *STYLOPHORA PISTILLATA*: EFFECT OF FEEDING, LIGHT, AND AMMONIUM CONCENTRATIONS. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY 47:782-790
- GUELLA G, FRASSANITO R, MANCINI I (2003). A NEW SOLUTION FOR AN OLD PROBLEM: THE REGIOCHEMICAL DISTRIBUTION OF THE ACYL CHAINS IN GALACTOLIPIDS CAN BE ESTABLISHED BY ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY 17:1982-1994
- GUEST JR, BAIRD AH, MAYNARD JA, MUTTAQIN E, EDWARDS AJ, CAMPBELL SJ, YEWDALL K, AFFENDI YA, CHOU LM (2012). CONTRASTING PATTERNS OF CORAL BLEACHING SUSCEPTIBILITY IN 2010 SUGGEST AN ADAPTIVE RESPONSE TO THERMAL STRESS. PLOS ONE 7:e33353
- GUNSTONE FD, HARWOOD JL, DIJKSTRA AJ (2007). THE LIPID HANDBOOK WITH CD-ROM: CRC PRESS, BOCA RATON, FL.
- GUPTA K, MILLER R, WILLIAMS J, BLOUNT J (1977). NORZOOANEMONIN IN THE HYDROID *TUBULARIA LARYNX*. CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 33:1556-1556
- GUSTAFSSON MSM (2014). MODELLING THE EFFECT OF NUTRIENT SUPPLY, TEMPERATURE AND LIGHT INTENSITY ON CNIDARIAN-ALGAE SYMBIOSIS. THESIS: ENVIRONMENTAL SCIENCE, UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, SYDNEY.
- HAESELER G, MAUE D, GROSSKREUTZ J, BUFLER J, NENTWIG B, PIEPENBROCK S, DENGLER R, LEUWER M (2002). VOLTAGE-DEPENDENT BLOCK OF NEURONAL AND SKELETAL MUSCLE SODIUM CHANNELS BY THYMOL AND MENTHOL. EUROPEAN JOURNAL OF ANAESTHESIOLOGY 19:571-579
- HANNUN Y, OBEID L, DBAIBO G, BELL R (1996). HANDBOOK OF LIPID RESEARCH VOLUME 8: LIPID SECOND MESSENGERS" (PP. 177-204): PLENUM PRESS NEW YORK.
- HANS M, WILHELM M, SWANDULLA D (2012). MENTHOL SUPPRESSES NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR FUNCTIONING IN SENSORY NEURONS VIA ALLOSTERIC MODULATION. CHEMICAL SENSES 37:463-469
- HARLAND AD, FIXTER LM, DAVIES PS, ANDERSON RA (1991). DISTRIBUTION OF LIPIDS BETWEEN THE ZOOXANTHELLAE AND ANIMAL COMPARTMENT IN THE SYMBIOTIC SEA ANEMONE *ANEMONIA VIRIDIS*: WAX ESTERS, TRIGLYCERIDES AND FATTY ACIDS. MARINE BIOLOGY 110:13-19 doi:10.1007/BF01313087
- HARLAND AD, FIXTER LM, DAVIES PS, ANDERSON RA (1992). EFFECT OF LIGHT ON THE TOTAL LIPID CONTENT AND STORAGE LIPIDS OF THE SYMBIOTIC SEA ANEMONE *ANEMONIA VIRIDIS*. MARINE BIOLOGY 112:253-258 doi:10.1007/BF00702469

- HARLAND AD, NAVARRO JC, SPENCER DAVIES P, FIXTER LM (1993). LIPIDS OF SOME CARIBBEAN AND RED SEA CORALS: TOTAL LIPID, WAX ESTERS, TRIGLYCERIDES AND FATTY ACIDS. *MARINE BIOLOGY* 117:113-117 DOI: 10.1007/BF00346432
- HARRISON P, WALLACE C (1990). REPRODUCTION, DISPERSAL AND RECRUITMENT OF SCLERACTINIAN CORALS. *ECOSYSTEMS OF THE WORLD* 25:133-207
- HARWOOD JL, GUSCHINA IA (2009). THE VERSATILITY OF ALGAE AND THEIR LIPID METABOLISM. *BIOCHIMIE* 91:679-684
- HATTORI T, MATSUI S, ADACHI K, SHIZURI Y (2001). ISOLATION OF ANTIFOULING SUBSTANCES FROM THE PALAUAN SPONGE *PROTOPHILITASPONGIA AGA*. *FISHERIES SCIENCE* 67:690-693
- HÄUSSERMANN V, FÖRSTERRA G (2005). DISTRIBUTION PATTERNS OF CHILEAN SHALLOW-WATER SEA ANEMONES (CNIDARIA: ANTHOZOA: ACTINIARIA, CORALLIMORPHARIA); WITH A DISCUSSION OF THE TAXONOMIC AND ZOOGEOGRAPHIC RELATIONSHIPS BETWEEN THE ACTINOFAUNA OF THE SOUTH EAST PACIFIC, THE SOUTH WEST ATLANTIC AND THE ANTARCTIC. *SCIENTIA MARINA* 69:91-102
- HAYES RL, GOREAU NI (1998). THE SIGNIFICANCE OF EMERGING DISEASES IN THE TROPICAL CORAL REEF ECOSYSTEM. *REV. BIOL. TROP* 46:173-185
- HENDERSON TO, GLONEK T, HILDERBRAND RL, MYERS TC (1972). PHOSPHORUS-<sup>31</sup> NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDIES OF THE PHOSPHONATE AND PHOSPHATE COMPOSITION OF THE SEA ANEMONE, *BUNADOSOMA*, *SP.* *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 149:484-497
- HEURTEAUX C, GUY N, LAIGLE C, BLONDEAU N, DUPRAT F, MAZZUCA M, LANG-LAZDUNSKI L, WIDMANN C, ZANZOURI M, ROMÉY G (2004). TREK-1, A K<sup>+</sup> CHANNEL INVOLVED IN NEUROPROTECTION AND GENERAL ANESTHESIA. *THE EMBO JOURNAL* 23:2684-2695
- HILL RW, LI C, JONES AD, GUNN JP, FRADE PR (2010). ABUNDANT BETAINES IN REEF-BUILDING CORALS AND ECOLOGICAL INDICATORS OF A PHOTOPROTECTIVE ROLE. *CORAL REEFS* 29:869-880 DOI: 10.1007/s00338-010-0662-x
- HIRAGA Y, SHIKANO T, WIDIANTI T, OHKATA K (2008). THREE NEW GLYCOLIPIDS WITH CYTOLYTIC ACTIVITY FROM CULTURED MARINE DINOFLAGELLATE *HETEROCAPSA CIRCULARISQUAMA*. *NATURAL PRODUCT RESEARCH* 22:649-657 DOI:10.1080/14786410701369417
- HIROSE M, REIMER J, HIDAKA M, SUDA S (2008). PHYLOGENETIC ANALYSES OF POTENTIALLY FREE-LIVING *SYMBIODINIUM* *SPP.* ISOLATED FROM CORAL REEF SAND IN OKINAWA, JAPAN. *MARINE BIOLOGY* 155:105-112 DOI:10.1007/s00227-008-1011-2
- HOEGH-GULDBERG O (1999). CLIMATE CHANGE, CORAL BLEACHING AND THE FUTURE OF THE WORLD'S CORAL REEFS. *MARINE AND FRESHWATER RESEARCH* 50:839-866
- HOEGH-GULDBERG O, MUMBY PJ, HOOTEN AJ, STENECK RS, GREENFIELD P, GOMEZ E, HARVELL CD, SALE PF, EDWARDS AJ, CALDEIRA K, KNOWLTON N, EAKIN CM, IGLESIAS-PRieto R, MUTHIGA N, BRADBURY RH, DUBI A, HATZIOLOS ME (2007). CORAL REEFS UNDER RAPID CLIMATE CHANGE AND OCEAN ACIDIFICATION. *SCIENCE* 318:1737-1742 DOI:10.1126/SCIENCE.1152509
- HOEGH-GULDBERG O, MUMBY PJ, HOOTEN AJ, STENECK RS, GREENFIELD P, GOMEZ E, HARVELL CD, SALE PF, EDWARDS AJ, CALDEIRA K, KNOWLTON N, EAKIN CM, IGLESIAS-PRieto R, MUTHIGA N, BRADBURY RH, DUBI A, HATZIOLOS ME (2007). CORAL REEFS UNDER RAPID CLIMATE CHANGE AND OCEAN ACIDIFICATION. *SCIENCE* 318:1737-1742 DOI: 10.1126/SCIENCE.1152509
- HOHMAN TC, MCNEIL PL, MUSCATINE L (1982). PHAGOSOME-LYSOSOME FUSION INHIBITED BY ALGAL SYMBIONTS OF *HYDRA VIRIDIS*. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 94:56-63

- HONG M-C, HUANG Y-S, LIN W-W, FANG L-S, CHEN M-C (2009). APRA3, A BIOSYNTHETIC RAB PROTEIN, ACCUMULATES ON THE MATURING PHAGOSOMES AND SYMBIOSOMES IN THE TROPICAL SEA ANEMONE, *AIPTASIA PULCHELLA*. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 152:249-259
- HONMA T, HASEGAWA Y, ISHIDA M, NAGAI H, NAGASHIMA Y, SHIOMI K (2005). ISOLATION AND MOLECULAR CLONING OF NOVEL PEPTIDE TOXINS FROM THE SEA ANEMONE *ANTHEOPSIS MACULATA*. TOXICON 45:33-41 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.TOXICON.2004.09.013
- HORGAN RP, KENNY LC (2011). 'OMIC' TECHNOLOGIES: GENOMICS, TRANSCRIPTOMICS, PROTEOMICS AND METABOLOMICS. THE OBSTETRICIAN & GYNAECOLOGIST 13:189-195
- HOULBREQUE F, TAMBUTTE E, ALLEMAND D, FERRIER-PAGES C (2004). INTERACTIONS BETWEEN ZOOPLANKTON FEEDING, PHOTOSYNTHESIS AND SKELETAL GROWTH IN THE SCLERACTINIAN CORAL *STYLOPHORA PISTILLATA*. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 207:1461-1469 DOI: 10.1242/JEB.00911
- IMANISHI Y, GERKE V, PALCZEWSKI K (2004). RETINOSOMES NEW INSIGHTS INTO INTRACELLULAR MANAGING OF HYDROPHOBIC SUBSTANCES IN LIPID BODIES. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 166:447-453
- IMBS AB (2014). LIPID CLASS AND FATTY ACID COMPOSITIONS OF THE ZOANTHID *PALYTHOA CAESIA* (ANTHOZOA: HEXACORALLIA: ZOANTHIDEA) AND ITS CHEMOTAXONOMIC RELATIONS WITH CORALS. BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND ECOLOGY 54:213-218 DOI: 10.1016/J.BSE.2014.01.016
- IMBS A (2013). FATTY ACIDS AND OTHER LIPIDS OF CORALS: COMPOSITION, DISTRIBUTION, AND BIOSYNTHESIS. RUSSIAN JOURNAL OF MARINE BIOLOGY 39:153-168
- IMBS A, DEMIDKOVA D, DAUTOVA T, LATYSHEV N (2009). FATTY ACID BIOMARKERS OF SYMBIONTS AND UNUSUAL INHIBITION OF TETRACOSAPOLYENOIC ACID BIOSYNTHESIS IN CORALS (OCTOCORALLIA). LIPIDS 44:325-335 DOI: 10.1007/S11745-008-3266-2
- IMBS A, DEMINA O, DEMIDKOVA D (2006). LIPID CLASS AND FATTY ACID COMPOSITION OF THE BOREAL SOFT CORAL *GERSEMIA RUBIFORMIS*. LIPIDS 41:721-725 DOI: 10.1007/S11745-006-5023-8
- IMBS A, YAKOVLEVA I, LATYSHEV N, PHAM L (2010A). BIOSYNTHESIS OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN ZOOXANTHELLAE AND POLYPS OF CORALS. RUSSIAN JOURNAL OF MARINE BIOLOGY 36:452-457
- IMBS AB, LATYSHEV NA, DAUTOVA TN, LATYPOV YY (2010B). DISTRIBUTION OF LIPIDS AND FATTY ACIDS IN CORALS BY THEIR TAXONOMIC POSITION AND PRESENCE OF ZOOXANTHELLAE. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 409:65-75
- IN Y, FUJII M, SASADA Y, ISHIDA T (2001). STRUCTURAL STUDIES ON C-AMIDATED AMINO ACIDS AND PEPTIDES: STRUCTURES OF HYDROCHLORIDE SALTS OF C-AMIDATED ILE, VAL, THR, SER, MET, TRP, GLN AND ARG, AND COMPARISON WITH THEIR C-UNAMIDATED COUNTERPARTS. ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION B: STRUCTURAL SCIENCE 57:72-81
- ISHIDA Y, TSUCHIYA W, FUJII T, FUJIMOTO Z, MIYAZAWA M, ISHIBASHI J, MATSUYAMA S, ISHIKAWA Y, YAMAZAKI T (2014). NIEMANN-PICK TYPE C2 PROTEIN MEDIATING CHEMICAL COMMUNICATION IN THE WORKER ANT. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 111:3847-3852
- JAYASIMHULU K, HUNT S, KANESHIRO E, WATANABE Y, GINER J-L (2007). DETECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIOVORAX STOLPII UK12 SPHINGOPHOSPHONOLIPID MOLECULAR SPECIES. JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY 18:394-403 DOI: 10.1016/J.JASMS.2006.10.014
- JONES MR (2007). LIPIDS IN PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTRES: STRUCTURAL ROLES AND FUNCTIONAL HOLES. PROGRESS IN LIPID RESEARCH 46:56-87

- JONES R, HOEGH-GULDBERG O, LARKUM A, SCHREIBER U (1998). TEMPERATURE-INDUCED BLEACHING OF CORALS BEGINS WITH IMPAIRMENT OF THE CO<sub>2</sub> FIXATION MECHANISM IN ZOOXANTHELLAE. *PLANT, CELL & ENVIRONMENT* 21:1219-1230
- JONES RJ (2004). TESTING THE 'PHOTOINHIBITION' MODEL OF CORAL BLEACHING USING CHEMICAL INHIBITORS. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 284:133-145
- JONES RJ, YELLOWLEES D (1997). REGULATION AND CONTROL OF INTRACELLULAR ALGAE (= ZOOXANTHELLAE) IN HARD CORALS. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B: BIOLOGICAL SCIENCES* 352:457-468
- KALSCHUEER R, STÖVEKEN T, LUFTMANN H, MALKUS U, REICHELT R, STEINBÜCHEL A (2006). NEUTRAL LIPID BIOSYNTHESIS IN ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*: JOJOBA OIL-LIKE WAX ESTERS AND FATTY ACID BUTYL ESTERS. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 72:1373-1379
- KALUZHNYAYA OV, ITSKOVICH VB, MCCORMACK GP (2011). PHYLOGENETIC DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH THE ENDEMIC FRESHWATER SPONGE *LUBOMIRSKIA BAICALENSIS*. *WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* 27:1955-1959
- KATO M (1987). MUCUS-SHEET FORMATION AND DISCOLORATION IN THE REEF-BUILDING CORAL, *PORITES CYLINDRICA*: EFFECTS OF ALTERED SALINITY AND TEMPERATURE. *GALAXEA* 6:1-16
- KATO M, SAKAI M, ADACHI K, IKEMOTO H, SANO H (1996). DISTRIBUTION OF BETAINE LIPIDS IN MARINE ALGAE. *PHYTOCHEMISTRY* 42:1341-1345
- KAUR G, CAMERON-SMITH D, GARG M, SINCLAIR AJ (2011). DOCOSAPENTAENOIC ACID (22:5N-3): A REVIEW OF ITS BIOLOGICAL EFFECTS. *PROGRESS IN LIPID RESEARCH* 50:28-34 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.PLIPRES.2010.07.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.004)
- KAWAMATA M, KON-YA K, MIKI W (1994). CHEMICAL STUDIES ON ANTIFOULING SUBSTANCES IN MARINE INVERTEBRATES. IV. TRIGONELLINE, AN ANTIFOULING SUBSTANCE ISOLATED FROM AN OCTOCORAL *DENDRONEPHTHYA SP.* *FISHERIES SCIENCE* 60:485-486
- KAYAL E, ROURE B, PHILIPPE H, COLLINS AG, LAVROV DV (2013). CNIDARIAN PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AS REVEALED BY MITOGENOMICS. *BMC EVOLUTIONARY BIOLOGY* 13:5
- KELLOGG RB, PATTON JS (1983). LIPID DROPLETS, MEDIUM OF ENERGY EXCHANGE IN THE SYMBIOTIC ANEMONE *CONDYLACTIS GIGANTEA*: A MODEL CORAL POLYP. *MARINE BIOLOGY* 75:137-149 DOI:10.1007/BF00405996
- KELLY AA, FROELICH JE, DÖRMANN P (2003). DISRUPTION OF THE TWO DIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE GENES DGD1 AND DGD2 IN *ARABIDOPSIS* REVEALS THE EXISTENCE OF AN ADDITIONAL ENZYME OF GALACTOLIPID SYNTHESIS. *THE PLANT CELL ONLINE* 15:2694-2706
- KHOZIN-GOLDBERG I, BIGOGNO C, SHRESTHA P, COHEN Z (2002). NITROGEN STARVATION INDUCES THE ACCUMULATION OF ARACHIDONIC ACID IN THE FRESHWATER GREEN ALGA *PARIETOCHLORIS INCISA* (TREBUXIOPHYCEAE). *JOURNAL OF PHYCOLOGY* 38:991-994
- KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z (2006). THE EFFECT OF PHOSPHATE STARVATION ON THE LIPID AND FATTY ACID COMPOSITION OF THE FRESH WATER EUSTIGMATOPHYTE *MONODUS SUBTERRANEUS*. *PHYTOCHEMISTRY* 67:696-701
- KITTREDGE JS, ROBERTS E, SIMONSEN DG (1962). THE OCCURRENCE OF FREE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIC ACID IN THE SEA ANEMONE, *ANTHOPLEURA ELEGANTISSIMA*\*. *BIOCHEMISTRY* 1:624-628
- KLUG RM, BENNING C (2001). TWO ENZYMES OF DIACYLGLYCERYL-O-4'-(N, N, N, TRIMETHYL) HOMOSERINE BIOSYNTHESIS ARE ENCODED BY BTAA AND BTAB IN THE PURPLE BACTERIUM *RHODOBACTER SPHAEROIDES*. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* 98:5910-5915

- KNAPP DR (1979). HANDBOOK OF ANALYTICAL DERIVATIZATION REACTIONS. JOHN WILEY & SONS
- KNEELAND J, HUGHEN K, CERVINO J, HAUFF B, EGLINTON T (2013). LIPID BIOMARKERS IN *SYMBIODINIUM* DINOFLAGELLATES: NEW INDICATORS OF THERMAL STRESS. CORAL REEFS 32:923-934
- KNIGHTS B (1967). IDENTIFICATION OF PLANT STEROLS USING COMBINED GLC/MASS SPECTROMETRY. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE 5:273-282
- KO DC, BINKLEY J, SIDOW A, SCOTT MP (2003). THE INTEGRITY OF A CHOLESTEROL-BINDING POCKET IN NIEMANN-PICK C2 PROTEIN IS NECESSARY TO CONTROL LYSOSOME CHOLESTEROL LEVELS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 100:2518-2525 DOI:10.1073/PNAS.0530027100
- KODAMA Y, FUJISHIMA M (2010). SECONDARY SYMBIOSIS BETWEEN *PARAMECIUM* AND CHLORELLA CELLS. INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY 279:33-77
- KOKKE WCMC, FENICAL W, BOHLIN L, DJERASSI C (1981). STEROL SYNTHESIS BY CULTURED ZOOXANTHELLAE; IMPLICATIONS CONCERNING STEROL METABOLISM IN THE HOST-SYMBIOT ASSOCIATION IN CARIBBEAN GORGONIANS. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: COMPARATIVE BIOCHEMISTRY 68:281-287 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0305-0491(81)90099-7
- KOPP C, DOMART-COULON I, ESCRIG S, HUMBEL BM, HIGNETTE M, MEIBOM A (2015). SUBCELLULAR INVESTIGATION OF PHOTOSYNTHESIS-DRIVEN CARBON ASSIMILATION IN THE SYMBIOTIC REEF CORAL *POCILLOPORA DAMICORNIS*. MBIO 6 DOI:10.1128/MBIO.02299-14
- KOPP C, PERNICE M, DOMART-COULON I, DJEDIAT C, SPANGENBERG JE, ALEXANDER DTL, HIGNETTE M, MEZIANE T, MEIBOM A (2013). HIGHLY DYNAMIC CELLULAR-LEVEL RESPONSE OF SYMBIOTIC CORAL TO A SUDDEN INCREASE IN ENVIRONMENTAL NITROGEN. MBIO 4 DOI:10.1128/MBIO.00052-13
- KOPP C, WISZTORSKI M, REVEL J, MEHIRI M, DANI V, CAPRON L, CARETTE D, FOURNIER I, MASSI L, MOUAIJAH D, PAGNOTTA S, PRIOUZEAU F, SALZET M, MEIBOM A, SABOURAULT C (2014). MALDI-MS AND NANOSIMS IMAGING TECHNIQUES TO STUDY CNIDARIAN-DINOFLAGELLATE SYMBIOSES. ZOOLOGY DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.ZOOL.2014.06.006
- KORNPROBST J-M (2014). CNIDARIA AND CTENOPHORA-2. IN: ENCYCLOPEDIA OF MARINE NATURAL PRODUCTS. WILEY-VCH VERLAG GMBH & Co. KGAA. DOI:10.1002/9783527335855.MARPROD202
- KOVATS VE (1958). GAS-CHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN. TEIL 1: RETENTIONSINDICES ALIPHATISCHER HALOGENIDE, ALKOHOLE, ALDEHYDE UND KETONE. HELVETICA CHIMICA ACTA 41:1915-1932
- KÜNZLER K, EICHENBERGER W (1997). BETAINE LIPIDS AND ZWITTERIONIC PHOSPHOLIPIDS IN PLANTS AND FUNGI. PHYTOCHEMISTRY 46:883-892 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0031-9422(97)81274-5
- KURAMOTO M, HAYASHI K, YAMAGUCHI K, YADA M, TSUJI T, UEMURA D (1998). STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF NORZOANTHAMINE EXHIBITING SIGNIFICANT INHIBITION OF OSTEOPOROSIS. BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN 71:771-779
- LAJEUNESSE TC (2005). "SPECIES" RADIATIONS OF SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES IN THE ATLANTIC AND INDO-PACIFIC SINCE THE MIOCENE-PLIOCENE TRANSITION. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION 22:570-581 DOI: 10.1093/MOLBEV/MSI042
- LAJEUNESSE TC, LOH WK, VAN WOESIK R, HOEGH-GULDBERG O, SCHMIDT GW, FITT WK (2003). LOW SYMBIOT DIVERSITY IN SOUTHERN GREAT BARRIER REEF CORALS, RELATIVE TO THOSE OF THE CARIBBEAN. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY 48:2046-2054

- LANDIS WG, CHESTER NA, HALEY MV, JOHNSON DW, TAUBER RM, DURST HD (1989). ALTERNATIVE SUBSTRATES AND AN INHIBITOR OF THE ORGANOPHOSPHATE ACID ANHYDRASE ACTIVITIES OF THE PROTOZOAN, *TETRAHYMENA THERMOPHILA*. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART C: COMPARATIVE PHARMACOLOGY 92:211-216
- LANE DR, READY RC, BUDDEMEIER RW, MARTINICH JA, SHOUSE KC, WOBUS CW (2013). QUANTIFYING AND VALUING POTENTIAL CLIMATE CHANGE IMPACTS ON CORAL REEFS IN THE UNITED STATES: COMPARISON OF TWO SCENARIOS. PLOS ONE 8:e82579
- LÊ S, JOSSE, J. & HUSSON, F. (2008). FACTOMINER: AN R PACKAGE FOR MULTIVARIATE ANALYSIS. JOURNAL OF STATISTICAL SOFTWARE 25:1-18
- LEBLANC DC (2004). STATISTICS: CONCEPTS AND APPLICATIONS FOR SCIENCE. JONES & BARTLETT LEARNING.
- LEBLOND JD, ANDERSON B, KOFINK D, LOGARES R, RENGEFORS K, KREMP A (2006). FATTY ACID AND STEROL COMPOSITION OF TWO EVOLUTIONARILY CLOSELY RELATED DINOFLAGELLATE MORPHOSPECIES FROM COLD SCANDINAVIAN BRACKISH AND FRESHWATERS. EUROPEAN JOURNAL OF PHYCOLOGY 41:303-311
- LEBLOND JD, CHAPMAN PJ (2000). LIPID CLASS DISTRIBUTION OF HIGHLY UNSATURATED LONG CHAIN FATTY ACIDS IN MARINE DINOFLAGELLATES. JOURNAL OF PHYCOLOGY 36:1103-1108
- LEBLOND JD, CHAPMAN PJ (2002). A SURVEY OF THE STEROL COMPOSITION OF THE MARINE DINOFLAGELLATES *KARENIA BREVIS*, *KARENIA MIKIMOTOI*, AND *KARLODINIUM MICRUM*: DISTRIBUTION OF STEROLS WITHIN OTHER MEMBERS OF THE CLASS DINOPHYCEAE. JOURNAL OF PHYCOLOGY 38:670-682
- LEBLOND JD, KHADKA M, DUONG L, DAHMEN JL (2015). SQUISHY LIPIDS: TEMPERATURE EFFECTS ON THE BETAINE AND GALACTOLIPID PROFILES OF A C18/C18 PERIDININ-CONTAINING DINOFLAGELLATE, *SYMBIODINIUM MICROADRIATICUM* (DINOPHYCEAE), ISOLATED FROM THE MANGROVE JELLYFISH, *CASSIOPEA XAMACHANA*. PHYCOLOGICAL RESEARCH:N/A-N/A DOI:10.1111/PRE.12093
- LEBLOND JD, TIMOFTE HI, ROCHE SA, PORTER NM (2010). MONO- AND DIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL COMPOSITION OF GLAUCOCYSTOPHYTES (GLAUCOPHYTA): A MODERN INTERPRETATION USING POSITIVE-ION ELECTROSPRAY IONIZATION/MASS SPECTROMETRY/MASS SPECTROMETRY. PHYCOLOGICAL RESEARCH 58:222-229 DOI:10.1111/J.1440-1835.2010.00582.X
- LEE AG (2000). MEMBRANE LIPIDS: IT'S ONLY A PHASE. CURRENT BIOLOGY 10:R377-R380
- LEE R, PATTON J (1989). ALCOHOL AND WAXES. MARINE BIOGENIC LIPIDS, FATS AND OILS 1:73-102
- LEE RF, HAGEN W, KATTNER G (2006). LIPID STORAGE IN MARINE ZOOPLANKTON. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 307:273-306
- LEE RF, HIROTA J, BARNETT AM (1971). DISTRIBUTION AND IMPORTANCE OF WAX ESTERS IN MARINE COPEPODS AND OTHER ZOOPLANKTON. IN: DEEP SEA RESEARCH AND OCEANOGRAPHIC ABSTRACTS, ELSEVIER, 12:1147-1165
- LEGGAT W, SENECA F, WASMUND K, UKANI L, YELLOWLEES D, AINSWORTH TD (2011). DIFFERENTIAL RESPONSES OF THE CORAL HOST AND THEIR ALGAL SYMBIONT TO THERMAL STRESS. PLOS ONE 6:e26687 DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0026687
- LEHNERT EM, MOUCHKA ME, BURRIESCI MS, GALLO ND, SCHWARZ JA, PRINGLE JR (2014). EXTENSIVE DIFFERENCES IN GENE EXPRESSION BETWEEN SYMBIOTIC AND AOSYMBIOTIC CNIDARIANS. G3: GENES|GENOMES|GENETICS 4:277-295 DOI: 10.1534/G3.113.0090844
- LEITZ T, MORAND K, MANN M (1994). METAMORPHOSIN A: A NOVEL PEPTIDE CONTROLLING DEVELOPMENT OF THE LOWER METAZOAN *HYDRACTINIA ECHINATA* (COELENTERATA, HYDROZOA). DEVELOPMENTAL BIOLOGY 163:440-446

- LESSER M, STAT M, GATES R (2013). THE ENDOSYMBIOTIC DINOFLAGELLATES (*SYMBIODINIUM SP.*) OF CORALS ARE PARASITES AND MUTUALISTS. *CORAL REEFS* 32:603-611
- LESSER MP (1996). ELEVATED TEMPERATURES AND ULTRAVIOLET RADIATION CAUSE OXIDATIVE STRESS AND INHIBIT PHOTOSYNTHESIS IN SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY* 41:271-283 DOI: 10.4319/LO.1996.41.2.0271
- LESSER MP (2011). CORAL BLEACHING: CAUSES AND MECHANISMS. IN: *CORAL REEFS: AN ECOSYSTEM IN TRANSITION*. SPRINGER, PP 405-419
- LESSER MP, FARRELL JH (2004). EXPOSURE TO SOLAR RADIATION INCREASES DAMAGE TO BOTH HOST TISSUES AND ALGAL SYMBIONTS OF CORALS DURING THERMAL STRESS. *CORAL REEFS* 23:367-377
- LEUTENEGGER A, KREDEL S, GUNDEL S, D'ANGELO C, SALIH A, WIEDENMANN J (2007). ANALYSIS OF FLUORESCENT AND NON-FLUORESCENT SEA ANEMONES FROM THE MEDITERRANEAN SEA DURING A BLEACHING EVENT. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY* 353:221-234
- LEVY O, KANIEWSKA P, ALON S, EISENBERG E, KARAKO-LAMPERT S, BAY L, REEF R, RODRIGUEZ-LANETTY M, MILLER D, HOEGH-GULDBERG O (2011). COMPLEX DIEL CYCLES OF GENE EXPRESSION IN CORAL-ALGAL SYMBIOSIS. *SCIENCE* 331:175-175
- LEWIS D, SMITH D (1971). THE AUTOTROPHIC NUTRITION OF SYMBIOTIC MARINE COELENTERATES WITH SPECIAL REFERENCE TO HERMATYPIC CORALS. I. MOVEMENT OF PHOTOSYNTHETIC PRODUCTS BETWEEN THE SYMBIONTS. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES* 178:111-129
- LINEBACH JA, TESCH BP, KOVACSIS LM (2014). *NONPARAMETRIC STATISTICS FOR APPLIED RESEARCH*. SPRINGER.
- LIU Z-Q, SHAN H-Y (2006). CHOLESTEROL, NOT POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, IS TARGET MOLECULE IN OXIDATION INDUCED BY REACTIVE OXYGEN SPECIES IN MEMBRANE OF HUMAN ERYTHROCYTES. *CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 45:185-193 DOI: 10.1385/CBB:45:2:185
- LÓPEZ-LARA IM, GAO J-L, SOTO MJ, SOLARES-PÉREZ A, WEISSENMAYER B, SOHLENKAMP C, VERROIOS GP, THOMAS-OATES J, GEIGER O (2005). PHOSPHORUS-FREE MEMBRANE LIPIDS OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI* ARE NOT REQUIRED FOR THE SYMBIOSIS WITH ALFALFA BUT CONTRIBUTE TO INCREASED CELL YIELDS UNDER PHOSPHORUS-LIMITING CONDITIONS OF GROWTH. *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS* 18:973-982
- LUO Y-J, WANG L-H, CHEN W-N, PENG S-E, TZEN J-C, HSIAO Y-Y, HUANG H-J, FANG L-S, CHEN C-S (2009). RATIOMETRIC IMAGING OF GASTRODERMAL LIPID BODIES IN CORAL-DINOFLAGELLATE ENDOSYMBIOSIS. *CORAL REEFS* 28:289-301
- MACKIE G (1990). THE ELEMENTARY NERVOUS SYSTEM REVISITED. *AMERICAN ZOOLOGIST* 30:907-920
- MAKAROV A, SCIGELOVA M (2010). COUPLING LIQUID CHROMATOGRAPHY TO ORBITRAP MASS SPECTROMETRY. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* 1217:3938-3945
- MANSOUR MP, VOLKMAN JK, JACKSON AE, BLACKBURN SI (1999A). THE FATTY ACID AND STEROL COMPOSITION OF FIVE MARINE DINOFLAGELLATES. *JOURNAL OF PHYCOLOGY* 35:710-720 DOI: 10.1046/j.1529-8817.1999.3540710.x
- MANSOUR MP, VOLKMAN JK, HOLDSWORTH DG, JACKSON AE, BLACKBURN SI (1999B). VERY-LONG-CHAIN C28 HIGHLY UNSATURATED FATTY ACIDS IN MARINE DINOFLAGELLATES. *PHYTOCHEMISTRY* 50:541-548
- MAOKA T (2011). CAROTENOIDS IN MARINE ANIMALS. *MARINE DRUGS* 9:278-293
- MARECHAL E, BLOCK MA, DORNE AJ, DOUCE R, JOYARD J (1997). LIPID SYNTHESIS AND METABOLISM IN THE PLASTID ENVELOPE. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 100:65-77 DOI:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03455.x

- MARGULIS L (1967). ON THE ORIGIN OF MITOSING CELLS. JOURNAL OF THEORETICAL BIOLOGY 14:IN1-IN6
- MARLOW HQ, MARTINDALE MQ (2007). EMBRYONIC DEVELOPMENT IN TWO SPECIES OF SCLERACTINIAN CORAL EMBRYOS: *SYMBIODINIUM* LOCALIZATION AND MODE OF GASTRULATION. EVOLUTION & DEVELOPMENT 9:355-367  
DOI:10.1111/j.1525-142X.2007.00173.x
- MARTIN P, VAN MOOY BAS, HEITHOFF A, DYHRMAN ST (2011). PHOSPHORUS SUPPLY DRIVES RAPID TURNOVER OF MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS IN THE DIATOM *THALASSIOSIRA PSEUDONANA*. ISME J 5:1057-1060  
DOI:HTTP://WWW.NATURE.COM/ISMEJ/JOURNAL/V5/N6/SUPPINFO/ISMEJ2010192S1.HTML
- MATHIAS A, ROSS D, SCHACHTER M (1960). THE DISTRIBUTION OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE, TETRAMETHYLAMMONIUM, HOMARINE, AND OTHER SUBSTANCES IN SEA ANEMONES. THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY 151:296-311
- MAYZAUD P, VIRTUE P, ALBESSARD E (1999). SEASONAL VARIATIONS IN THE LIPID AND FATTY ACID COMPOSITION OF THE EUPHAUSIID *MEGANICTIPHANES NORVEGICA* FROM THE LIGURIAN SEA. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 186:199-210
- MERLE PL, SABOURAULT C, RICHIER S, ALLEMAND D, FURLA P (2007). CATALASE CHARACTERIZATION AND IMPLICATION IN BLEACHING OF A SYMBIOTIC SEA ANEMONE. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE 42:236-246  
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.038
- MILLER CB, MORGAN CA, PRAHL F, SPARROW MA (1998). STORAGE LIPIDS OF THE COPEPOD *CALANUS FINMARCHICUS* FROM GEORGES BANK AND THE GULF OF MAINE. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY 43:488-497
- MILLER J, MULLER E, ROGERS C, WAARA R, ATKINSON A, WHELAN K, PATTERSON M, WITCHER B (2009). CORAL DISEASE FOLLOWING MASSIVE BLEACHING IN 2005 CAUSES 60% DECLINE IN CORAL COVER ON REEFS IN THE US VIRGIN ISLANDS. CORAL REEFS 28:925-937
- MIYAZAKI M, KIM H-J, MAN WC, NTAMBI JM (2001). OLEOYL-CoA IS THE MAJOR DE NOVO PRODUCT OF STEAROYL-CoA DESATURASE 1 GENE ISOFORM AND SUBSTRATE FOR THE BIOSYNTHESIS OF THE HARDERIAN GLAND 1-ALKYL-2,3-DIACYLGLYCEROL. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 276:39455-39461 DOI: 10.1074/jbc.M106442200
- MIYAZAKI M, NTAMBI JM (2008). CHAPTER 7 - FATTY ACID DESATURATION AND CHAIN ELONGATION IN MAMMALS. IN D. E. VANCE, J. E. VANCE (EDS.), BIOCHEMISTRY OF LIPIDS, LIPOPROTEINS AND MEMBRANES (FIFTH EDITION) (PP. 191-V). SAN DIEGO: ELSEVIER.
- MIZUSAWA N, SAKATA S, SAKURAI I, SATO N, WADA H (2009). INVOLVEMENT OF DIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL IN CELLULAR THERMOTOLERANCE IN *SYNECHOCYSTIS SP.* PCC 6803. ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 191:595-601  
DOI: 10.1007/s00203-009-0486-7
- MOLDOVAN Z, JOVER E, BAYONA JM (2002). SYSTEMATIC CHARACTERISATION OF LONG-CHAIN ALIPHATIC ESTERS OF WOOL WAX BY GAS CHROMATOGRAPHY-ELECTRON IMPACT IONISATION MASS SPECTROMETRY. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 952:193-204 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0021-9673(02)00073-0
- MONGRAND S, CASSAGNE C, BESSOULE J-J (2000). IMPORT OF LYSO-PHOSPHATIDYLCHOLINE INTO CHLOROPLASTS LIKELY AT THE ORIGIN OF EUKARYOTIC PLASTIDIAL LIPIDS. PLANT PHYSIOLOGY 122:845-852
- MOORE S (1989). NARCOTISING SEA ANEMONES. JOURNAL OF THE MARINE BIOLOGICAL ASSOCIATION OF THE UNITED KINGDOM 69:803-811
- MOORE RE, SCHEUER PJ (1971). PALYTOXIN: A NEW MARINE TOXIN FROM A COELENTERATE. SCIENCE 172:495-498
- MORRISON WR, SMITH LM (1964). PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE-METHANOL. JOURNAL OF LIPID RESEARCH 5:600-608

- MOYA A, GANOT P, FURLA P, SABOURAULT C (2012). THE TRANSCRIPTOMIC RESPONSE TO THERMAL STRESS IS IMMEDIATE, TRANSIENT AND POTENTIATED BY ULTRAVIOLET RADIATION IN THE SEA ANEMONE *ANEMONIA VIRIDIS*. MOLECULAR ECOLOGY 21:1158-1174 DOI:10.1111/j.1365-294X.2012.05458.x
- MULLER-PARKER G, COOK C, D'ELIA C (1990). FEEDING AFFECTS PHOSPHATE FLUXES IN THE SYMBIOTIC SEA ANEMONE *AIPTASIA PALLIDA*. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES OLDENDORF 60:283-290
- MURAKAMI Y, TSUYAMA M, KOBAYASHI Y, KODAMA H, IBA K (2000). TRIENOIC FATTY ACIDS AND PLANT TOLERANCE OF HIGH TEMPERATURE. SCIENCE 287:476-479
- MUSCATINE L (1967). GLYCEROL EXCRETION BY SYMBIOTIC ALGAE FROM CORALS AND TRIDACNA AND ITS CONTROL BY THE HOST. SCIENCE 156:516-519 DOI:10.1126/SCIENCE.156.3774.516
- MUSCATINE L (1990). THE ROLE OF SYMBIOTIC ALGAE IN CARBON AND ENERGY FLUX IN REEF CORALS. ECOSYSTEMS OF THE WORLD 25:75-87
- MUSCATINE L, GATES RD, LAFONTAINE I (1994). DO SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES SECRETE LIPID DROPLETS? LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY 39:925-929 DOI:10.4319/LO.1994.39.4.0925
- MUSCATINE L, HAND C (1958). DIRECT EVIDENCE FOR THE TRANSFER OF MATERIALS FROM SYMBIOTIC ALGAE TO THE TISSUES OF A COELENTERATE. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 44:1259
- MUSCATINE L, MCCLOSKEY L, MARIAN R (1981). ESTIMATING THE DAILY CONTRIBUTION OF CARBON FROM ZOOXANTHELLAE TO CORAL ANIMAL RESPIRATION. OCEANOGRAPHY 26
- MUSCATINE L, PORTER JW (1977). REEF CORALS: MUTUALISTIC SYMBIOSES ADAPTED TO NUTRIENT-POOR ENVIRONMENTS. BIOSCIENCE 27:454-460 DOI:10.2307/1297526
- NAKAMURA H, FUJIMAKI K, SAMPEI O, MURAI A (1993). GONYOL: METHIONINE-INDUCED SULFONIUM ACCUMULATION IN A DINOFLAGELLATE *GONYAULAX POLYEDRA*. TETRAHEDRON LETTERS 34:8481-8484
- NAKAMURA H, JIN T, FUNAHASHI M, FUJIMAKI K, SAMPEI O, MURAI A, ROENNEBERG T, HASTINGS JW (1997). BIOGENESIS OF SULFONIUM COMPOUNDS IN A DINOFLAGELLATE; METHIONINE CASCADE. TETRAHEDRON 53:9067-9074 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0040-4020(97)00599-1
- NAPOLITANO A, CARBONE V, SAGGESE P, TAKAGAKI K, PIZZA C (2007). NOVEL GALACTOLIPIDS FROM THE LEAVES OF *IPOMOEA BATATAS* L.: CHARACTERIZATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH ELECTROSPRAY IONIZATION-QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT TANDEM MASS SPECTROMETRY. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY 55:10289-10297 DOI:10.1021/jf071331z
- NETHERTON J, GURIN S (1982). BIOSYNTHESIS AND PHYSIOLOGICAL ROLE OF HOMARINE IN MARINE SHRIMP. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 257:11971-11975
- NEVALAINEN TJ, PEURAVUORI HJ, QUINN RJ, LLEWELLYN LE, BENZIE JA, FENNER PJ, WINKEL KD (2004). PHOSPHOLIPASE A2 IN CNIDARIA. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 139:731-735
- NICHOLS KK, HAM BM, NICHOLS JJ, ZIEGLER C, GREEN-CHURCH KB (2007). IDENTIFICATION OF FATTY ACIDS AND FATTY ACID AMIDES IN HUMAN MEIBOMIAN GLAND SECRETIONS. INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE 48:34-39
- OECD SIDS (2003). MENTHOLS. CAS No: 2216-51-5, 15356-60-2, 89-78-1, 1490-04-6. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME PUBLICATIONS. P. 5.  
 HTTP://WWW.INCHEM.ORG/DOCUMENTS/SIDS/SIDS/MENTHOLS

- OKAZAKI Y, OTSUKI H, NARISAWA T, KOBAYASHI M, SAWAI S, KAMIDE Y, KUSANO M, AOKI T, HIRAI MY, SAITO K (2013). A NEW CLASS OF PLANT LIPID IS ESSENTIAL FOR PROTECTION AGAINST PHOSPHORUS DEPLETION. NATURE COMMUNICATIONS 4:1510  
DOI:HTTP://WWW.NATURE.COM/NCOMMS/JOURNAL/V4/N2/SUPPINFO/NCOMMS2512\_S1.HTML
- ONODERA K-I, FUKATSU T, KAWAI N, YOSHIOKA Y, OKAMOTO T, NAKAMURA H, OJIKI M (2004B). ZOOXANTHELLACTONE, A NOVEL  $\gamma$ -LACTONE-TYPE OXYLIPINE FROM DINOFLAGELLATES OF *SYMBIODINIUM SP.*: STRUCTURE, DISTRIBUTION, AND BIOLOGICAL ACTIVITY. BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY 68:848-852
- ONODERA K-I, NAKAMURA H, OBA Y, OJIKI M (2003). ZOOXANTHELLAMIDE A, A NOVEL POLYHYDROXY METABOLITE FROM A MARINE DINOFLAGELLATE OF *SYMBIODINIUM SP.* TETRAHEDRON 59:1067-1071
- ONODERA K-I, NAKAMURA H, OBA Y, OJIKI M (2004A). ZOOXANTHELLAMIDE B, A NOVEL LARGE POLYHYDROXY METABOLITE FROM A MARINE DINOFLAGELLATE OF *SYMBIODINIUM SP.* BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY 68:955-958
- OWEN R, KNAP A, TOASPERN M, CARBERY K (2002). INHIBITION OF CORAL PHOTOSYNTHESIS BY THE ANTIFOULING HERBICIDE IRGAROL 1051. MARINE POLLUTION BULLETIN 44:623-632
- PAPINA M, MEZIANE T, VAN WOESIK R (2003). SYMBIOTIC ZOOXANTHELLAE PROVIDE THE HOST-CORAL *MONTIPORA DIGITATA* WITH POLYUNSATURATED FATTY ACIDS. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, PART B 135:533-537 DOI: 10.1016/S1096-4959(03)00118-0
- PARKER MW (2003). CRYPTIC CLUES AS TO HOW WATER-SOLUBLE PROTEIN TOXINS FORM PORES IN MEMBRANES. TOXICON 42:1-6 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0041-0101(03)00106-5
- PARRISH CC, BODENNEC G, GENTIAN P (1998). HAEMOLYTIC GLYCOGLYCEROLIPIDS FROM *GYMNODINIUM* SPECIES. PHYTOCHEMISTRY 47:783-787 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0031-9422(97)00661-4
- PASTERNAK F (1977). ANTIPATHARIA. GALATHEA REPORT 14:157-164
- PATTON J, ABRAHAM S, BENSON A (1977). LIPOGENESIS IN THE INTACT CORAL *POCILLOPORA CAPITATA* AND ITS ISOLATED ZOOXANTHELLAE: EVIDENCE FOR A LIGHT-DRIVEN CARBON CYCLE BETWEEN SYMBIONT AND HOST. MARINE BIOLOGY 44:235-247
- PAUL VJ, PUGLISI MP (2004). CHEMICAL MEDIATION OF INTERACTIONS AMONG MARINE ORGANISMS. NATURAL PRODUCT REPORTS 21:189-209
- PEIER AM, MOQRICH A, HERGARDEN AC, REEVE AJ, ANDERSSON DA, STORY GM, EARLEY TJ, DRAGONI I, MCINTYRE P, BEVAN S (2002). A TRP CHANNEL THAT SENSES COLD STIMULI AND MENTHOL. CELL 108:705-715
- PENG S-E, CHEN W-NU, CHEN H-K, LU C-Y, MAYFIELD AB, FANG L-S, CHEN C-S (2011). LIPID BODIES IN CORAL-DINOFLAGELLATE ENDOSYMBIOSIS: PROTEOMIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES. PROTEOMICS 11:3540-3555 DOI:10.1002/PMIC.201000552
- PENG SE, WANG YB, WANG LH, CHEN WNU, LU CY, FANG LS, CHEN CS (2010). PROTEOMIC ANALYSIS OF SYMBIOSOME MEMBRANES IN CNIDARIA-DINOFLAGELLATE ENDOSYMBIOSIS. PROTEOMICS 10:1002-1016
- PERNET V, GAVINO V, GAVINO G, ANCTIL M (2002). VARIATIONS OF LIPID AND FATTY ACID CONTENTS DURING THE REPRODUCTIVE CYCLE OF THE ANTHOZOAN *RENILLA KOELLIKERI*. JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B 172:455-465 DOI: 10.1007/s00360-002-0268-x
- PERRU O (2006). AUX ORIGINES DES RECHERCHES SUR LA SYMBIOSE VERS 1868-1883. REVUE D'HISTOIRE DES SCIENCES:5-27
- PETROUTSOS D, AMIAR S, ABIDA H, DOLCH L-J, BASTIEN O, REBELLE F, JOUHET J, FALCONET D, BLOCK MA, MCFADDEN GI, BOWLER C, BOTTE C, MARECHAL E (2014). EVOLUTION OF GALACTOGLYCEROLIPID BIOSYNTHETIC

PATHWAYS – FROM CYANOBACTERIA TO PRIMARY PLASTIDS AND FROM PRIMARY TO SECONDARY PLASTIDS. PROGRESS IN LIPID RESEARCH 54:68-85 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.PLIPRES.2014.02.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.02.001)

- PHLEGER CF (1998). BUOYANCY IN MARINE FISHES: DIRECT AND INDIRECT ROLE OF LIPIDS. AMERICAN ZOOLOGIST 38:321-330
- PITMAN MC, SUITS F, MACKERELL AD, FELLER SE (2004). MOLECULAR-LEVEL ORGANIZATION OF SATURATED AND POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN A PHOSPHATIDYLCHOLINE BILAYER CONTAINING CHOLESTEROL. BIOCHEMISTRY 43:15318-15328
- PIZZOFERRATO L, NICOLI S, LINTAS C (1993). GC-MS CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF STEROLS AND CHOLESTEROL OXIDATION PRODUCTS. CHROMATOGRAPHIA 35:269-274
- POCHON X AND GATES RD (2010). A NEW *SYMBIODINIUM* CLADE (DINOPHYCEAE) FROM SORITID FORAMINIFERA IN HAWAI'I. MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION 56: 492-497.
- POCHON X, PAWLOWSKI J (2006). EVOLUTION OF THE SORITIDS-*SYMBIODINIUM* SYMBIOSIS. IN: SYMBIOSIS (REHOVOT), VOL 2. BALABAN PUBLISHERS, PP 77-88
- POCHON X, PUTNAM HM, GATES RD (2014). MULTI-GENE ANALYSIS OF *SYMBIODINIUM* DINOFLAGELLATES: A PERSPECTIVE ON RARITY, SYMBIOSIS, AND EVOLUTION. PEERJ 2:E394
- POHL T, ZIMMER M, MUGELE K, SPIESS J (1991). PRIMARY STRUCTURE AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF A GLUTAMINYL CYCLASE. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 88:10059-10063
- POLETTE A, DESHAYES C, CHANTEGREL B, CROSET M, ARMSTRONG JM, LAGARDE M (1999). SYNTHESIS OF ACETYL, DOCOSAHEXAENOYL-GLYCEROPHOSPHOCHOLINE AND ITS CHARACTERIZATION USING NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE. LIPIDS 34:1333-1337 DOI: 10.1007/s11745-999-0486-1
- POND DW, TARLING GA (2011). PHASE TRANSITIONS OF WAX ESTERS ADJUST BUOYANCY IN DIAPAUSING CALANOIDES ACUTUS. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY 56:1310-1318
- POOL R (1979). THE ROLE OF ALGAL ANTIGENIC DETERMINANTS IN THE RECOGNITION OF POTENTIAL ALGAL SYMBIONTS BY CELLS OF CHLOROHYDRA. JOURNAL OF CELL SCIENCE 35:367-379
- POPENDORF K, FREDRICKS H, VAN MOOY BS (2013). MOLECULAR ION-INDEPENDENT QUANTIFICATION OF POLAR GLYCEROLIPID CLASSES IN MARINE PLANKTON USING TRIPLE QUADRUPOLE MS. LIPIDS 48:185-195 DOI:10.1007/s11745-012-3748-0
- PORTER JW, TOUGAS JI (2001). REEF ECOSYSTEMS: THREATS TO THEIR BIODIVERSITY. ENCYCLOPEDIA OF BIODIVERSITY 5:73-95
- PORTIER P (1918). LES SYMBIOTES. MASSON PARIS,
- PUTNAM HM, EDMUNDS PJ (2011). THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF REEF CORALS TO DIEL FLUCTUATIONS IN SEAWATER TEMPERATURE. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 396:216-223
- QUAST H, SCHMITT E (1970). HETEROCYCLISCHE YLIDE, II) YLIDE DURCH DECARBOXYLIERUNG VON N-METHYL-CARBONSÄUREBETAINEN DES PYRIDINS, CHINOLINS UND ISOCHINOLINS. JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE 732:43-63
- RAINA J-B, TAPIOLAS DM, FORET S, LUTZ A, ABREGO D, CEH J, SENECA FO, CLODE PL, BOURNE DG, WILLIS BL, MOTTI CA (2013). DMSP BIOSYNTHESIS BY AN ANIMAL AND ITS ROLE IN CORAL THERMAL STRESS RESPONSE. NATURE 502:677-680 DOI: 10.1038/NATURE12677
- RAMOS R, GONZÁLEZ-SOLÍS J (2012). TRACE ME IF YOU CAN: THE USE OF INTRINSIC BIOGEOCHEMICAL MARKERS IN MARINE TOP PREDATORS. FRONTIERS IN ECOLOGY AND THE ENVIRONMENT 10:258-266 DOI:10.1890/110140

- RANDS M, LOUGHMAN B, DOUGLAS A (1993). THE SYMBIOTIC INTERFACE IN AN ALGA-INVERTEBRATE SYMBIOSIS. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES 253:161-165
- RAO CB, ANJANEYULA A, SARMA N, VENKATATESWARLU Y, ROSSER RM, FAULKNER DJ, CHEN MH, CLARDY J (1984). ZOANTHAMINE; A NOVEL ALKALOID FROM A MARINE ZOANTHID. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 106:7983-7984
- REAKA-KUDLA ML (1997). THE GLOBAL BIODIVERSITY OF CORAL REEFS: A COMPARISON WITH RAIN FORESTS. IN: BIODIVERSITY II UNDERSTANDING AND PROTECTING OUR BIOLOGICAL RESOURCES (EDS. REAKA-KUDLA ML, WILSON DE & WILSON EO). JOSEPH HENRY PRESS WASHINGTON, PP. 83-104.
- REAKA-KUDLA ML (1997). THE GLOBAL BIODIVERSITY OF CORAL REEFS: A COMPARISON WITH RAIN FORESTS. IN: BIODIVERSITY II: UNDERSTANDING AND PROTECTING OUR BIOLOGICAL RESOURCES. W. REAKA-KUDLA M.L. , D.E. & WILSON, E.O. (ED.), (PP. PP. 83–108): WASHINGTON, DC: JOSEPH HENRY PRESS.
- REVSBECH NP (1995). MICROENVIRONMENT AND PHOTOSYNTHESIS OF ZOOXANTHELLAE IN SCLERACTINIAN CORALS STUDIED WITH MICROSENSORS FOR O<sub>2</sub>, PH AND LIGHT. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 117:159-172.1995
- RICHIER S, FURLA P, PLANTIVAUX A, MERLE P-L, ALLEMAND D (2005). SYMBIOSIS-INDUCED ADAPTATION TO OXIDATIVE STRESS. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 208:277-285
- RICHIER S, MERLE PL, FURLA P, PIGOZZI D, SOLA F, ALLEMAND D (2003). CHARACTERIZATION OF SUPEROXIDE DISMUTASES IN ANOXIA- AND HYPEROXIA-TOLERANT SYMBIOTIC CNIDARIAN. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1621:84-91 doi: 10.1016/S0304-4165(03)00049-7
- RICHIER S, SABOURAULT C, COURTIADÉ J, ZUCCHINI N, ALLEMAND D, FURLA P (2006). OXIDATIVE STRESS AND APOPTOTIC EVENTS DURING THERMAL STRESS IN THE SYMBIOTIC SEA ANEMONE, *ANEMONIA VIRIDIS*. FEBS JOURNAL 273:4186-4198 doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05414.x
- RIEDERER M, MULLER C (2008). ANNUAL PLANT REVIEWS, BIOLOGY OF THE PLANT CUTICLE (VOL. 23): JOHN WILEY & SONS.
- RIZZO P (1991). THE ENIGMA OF THE DINOFLAGELLATE CHROMOSOME. THE JOURNAL OF PROTOZOOLOGY (USA)
- ROCHA J, PEIXE L, GOMES N, CALADO R (2011). CNIDARIANS AS A SOURCE OF NEW MARINE BIOACTIVE COMPOUNDS—AN OVERVIEW OF THE LAST DECADE AND FUTURE STEPS FOR BIOPROSPECTING. MARINE DRUGS 9:1860-1886
- ROCHFORD S (2005). METABOLOMICS REVIEWED: A NEW “OMICS” PLATFORM TECHNOLOGY FOR SYSTEMS BIOLOGY AND IMPLICATIONS FOR NATURAL PRODUCTS RESEARCH. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 68:1813-1820
- ROTH E, JEON K, STACEY G (1988). MOLECULAR GENETICS OF PLANT MICROBE INTERACTIONS. IN: HOMOLOGY IN ENDOSYMBIOTIC SYSTEMS: THE TERM “SYMBIOSOME”. PROCEEDINGS OF THE 4TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MOLECULAR GENETICS OF PLANT—MICROBE INTERACTIONS, ACAPULCO, MEXICO:220–225
- ROTH MS, LATZ MI, GOERICKE R, DEHEYN DD (2010). GREEN FLUORESCENT PROTEIN REGULATION IN THE CORAL *ACROPORA YONGEI* DURING PHOTOACCLIMATION. THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 213:3644-3655
- ROUSER G, KRITCHEVSKY G, HELLER D, LIEBER E (1963). LIPID COMPOSITION OF BEEF BRAIN, BEEF LIVER, AND THE SEA ANEMONE: TWO APPROACHES TO QUANTITATIVE FRACTIONATION OF COMPLEX LIPID MIXTURES. JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY 40:425-454 doi: 10.1007/BF02632842
- RUCHONNET D, BOUTOUTE M, GUINET C, MAYZAUD P (2006). FATTY ACID COMPOSITION OF MEDITERRANEAN FIN WHALE *BALAENOPTERA PHYSALUS* BLUBBER WITH RESPECT TO BODY HETEROGENEITY AND TROPHIC INTERACTION. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES 311:165-174
- SABOURAULT C, GANOT P, DELEURY E, ALLEMAND D, FURLA P (2009). COMPREHENSIVE EST ANALYSIS OF THE SYMBIOTIC SEA ANEMONE, *ANEMONIA VIRIDIS*. BMC GENOMICS 10:333

- SAKURAI I, MIZUSAWA N, WADA H, SATO N (2007). DIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL IS REQUIRED FOR STABILIZATION OF THE OXYGEN-EVOLVING COMPLEX IN PHOTOSYSTEM II. *PLANT PHYSIOLOGY* 145:1361-1370
- SALIH A, LARKUM A, COX G, KÜHL M, HOEGH-GULDBERG O (2000). FLUORESCENT PIGMENTS IN CORALS ARE PHOTOPROTECTIVE. *NATURE* 408:850-853
- SAMUNI AM, LIPMAN A, BARENHOLZ Y (2000). DAMAGE TO LIPOSOMAL LIPIDS: PROTECTION BY ANTIOXIDANTS AND CHOLESTEROL-MEDIATED DEHYDRATION. *CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS* 105:121-134 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0009-3084\(99\)00136-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-3084(99)00136-X)
- SANCHEZ J, BRUHN T, ANEIROS A, WACHTER E, BÉRESS L (1996). A SIMPLE BIOCHEMICAL METHOD IN THE SEARCH FOR BIOACTIVE POLYPEPTIDES IN A SEA ANEMONE (*ANEMONIA SULCATA*). *TOXICON* 34:1361-1366 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0041-0101\(96\)00097-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00097-9)
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ J, CRUZ-VAZQUEZ K (2006). ISOLATION AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NEUROTOXIC COMPOUNDS FROM THE SEA ANEMONE *LEBRUNIA DANAÉ* (DUCHASSAING AND MICHELOTTI, 1860). *ARCHIVES OF TOXICOLOGY* 80:436-441
- SARGENT J (1976). STRUCTURE, METABOLISM AND FUNCTION OF LIPIDS IN MARINE ORGANISMS. IN: *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL PERSPECTIVES IN MARINE BIOLOGY* 3:149-212
- SARGENT J, BELL M, HENDERSON R, TOCHER D (1990). POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN MARINE AND TERRESTRIAL FOOD WEBS. *ANIMAL NUTRITION AND TRANSPORT PROCESSES* 1:11-23
- SARMA NS, KRISHNA MS, PASHA SG, RAO TSP, VENKATESWARLU Y, PARAMESWARAN P (2009). MARINE METABOLITES: THE STEROLS OF SOFT CORAL†. *CHEMICAL REVIEWS* 109:2803-2828
- SCHIMPER AFW (1883). UEBER DIE ENTWICKELUNG DER CHLOROPHYLLKOERNER UND FARBKOEPPER. IN: *BOTANISCHE ZEITUNG*
- SCHLICHTER D (1984) CNIDARIA: PERMEABILITY, EPIDERMAL TRANSPORT AND RELATED PHENOMENA. IN: *BIOLOGY OF THE INTEGUMENT*. SPRINGER, PP 79-95
- SCHWARZ J, WEIS V (2003). LOCALIZATION OF A SYMBIOSIS-RELATED PROTEIN, SYM32, IN THE *ANTHOPLEURA ELEGANTISSIMA*-*SYMBIODINIUM MUSCATINEI* ASSOCIATION. *THE BIOLOGICAL BULLETIN* 205:339-350
- SELOSSE M-A, BESSIS A, POZO MJ (2014). MICROBIAL PRIMING OF PLANT AND ANIMAL IMMUNITY: SYMBIONTS AS DEVELOPMENTAL SIGNALS. *TRENDS IN MICROBIOLOGY* 22:607-613
- SHAPO JL, MOELLER PD, GALLOWAY SB (2007). ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN THE COMMON SEAWHIP, *LEPTOGORGIA VIRGULATA* (CNIDARIA: GORGONACEAE). *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY* 148:65-73 DOI:[HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/j.cbpb.2007.04.019](http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.04.019)
- SHICK JM, DUNLAP WC, PEARSE JS, PEARSE VB (2002). MYCOSPORINE-LIKE AMINO ACID CONTENT IN FOUR SPECIES OF SEA ANEMONES IN THE GENUS *ANTHOPLEURA REFLECTS* PHYLOGENETIC BUT NOT ENVIRONMENTAL OR SYMBIOTIC RELATIONSHIPS. *THE BIOLOGICAL BULLETIN* 203:315-330
- SHNIT-ORLAND M, KUSHMARO A (2009). CORAL MUCUS-ASSOCIATED BACTERIA: A POSSIBLE FIRST LINE OF DEFENSE. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY* 67:371-380
- SIEGENTHALER P-A (1998). MOLECULAR ORGANIZATION OF ACYL LIPIDS IN PHOTOSYNTHETIC MEMBRANES OF HIGHER PLANTS. IN: *LIPIDS IN PHOTOSYNTHESIS: STRUCTURE, FUNCTION AND GENETICS*. SPRINGER, PP 119-144
- SIMPSON RJ, REID GE, MORITZ RL, MORTON C, NORTON RS (1990). COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF TENEBROSIN-C, A CARDIAC STIMULATORY AND HAEMOLYTIC PROTEIN FROM THE SEA ANEMONE *ACTINIA TENEBROSA*. *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* 190:319-328

- SMITH E, D'ANGELO C, SALIH A, WIENMANN J (2013). SCREENING BY CORAL GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)-LIKE CHROMOPROTEINS SUPPORTS A ROLE IN PHOTOPROTECTION OF ZOOXANTHELLAE. CORAL REEFS 32:463-474
- SMITH LL, KULIG MJ, MILLER D, ANSARI GAS (1978). STEROL METABOLISM. 44. OXIDATION OF CHOLESTEROL BY DIOXYGEN SPECIES. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 100:6206-6211 DOI: 10.1021/JA00487A042
- SOHLENKAMP C, LÓPEZ-LARA IM, GEIGER O (2003). BIOSYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE IN BACTERIA. PROGRESS IN LIPID RESEARCH 42:115-162 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0163-7827(02)00050-4
- STÄNDKER L, BÉRESS L, GARATEIX A, CHRIST T, RAVENS U, SALCEDA E, SOTO E, JOHN H, FORSSMANN W-G, ANEIROS A (2006). A NEW TOXIN FROM THE SEA ANEMONE *CONDYLACTIS GIGANTEA* WITH EFFECT ON SODIUM CHANNEL INACTIVATION. TOXICON 48:211-220 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.TOXICON.2006.05.001
- STANLEY JR GD (2003). THE EVOLUTION OF MODERN CORALS AND THEIR EARLY HISTORY. EARTH-SCIENCE REVIEWS 60:195-225 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0012-8252(02)00104-6
- STARCEVIC A, AKTHAR S, DUNLAP WC, SHICK JM, HRANUELI D, CULLUM J, LONG PF (2008). ENZYMES OF THE SHIKIMIC ACID PATHWAY ENCODED IN THE GENOME OF A BASAL METAZOAN, *NEMATOSTELLA VECTENSIS*, HAVE MICROBIAL ORIGINS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 105:2533-2537
- STAT M, CARTER D, HOEGH-GULDBERG O (2006). THE EVOLUTIONARY HISTORY OF *SYMBIODINIUM* AND SCLERACTINIAN HOSTS—SYMBIOSIS, DIVERSITY, AND THE EFFECT OF CLIMATE CHANGE. PERSPECTIVES IN PLANT ECOLOGY, EVOLUTION AND SYSTEMATICS 8:23-43
- STEELE R (1977) THE SIGNIFICANCE OF ZOOXANTHELLA-CONTAINING PELLETS EXTRUDED BY SEA ANEMONES. BULLETIN OF MARINE SCIENCE 27:591-594
- STEEN RG (1986). EVIDENCE FOR HETEROTROPHY BY ZOOXANTHELLAE IN SYMBIOSIS WITH *AIPTASIA PULCHELLA*. THE BIOLOGICAL BULLETIN 170:267-278
- STEEN RG, MUSCATINE L (1987) LOW TEMPERATURE EVOKES RAPID EXOCYTOSIS OF SYMBIOTIC ALGAE BY A SEA ANEMONE. THE BIOLOGICAL BULLETIN 172:246-263
- STEIDINGER KA, LANDSBERG J, FLEWELLING J, KIRKPATRICK B (2008). TOXIC DINOFLAGELLATES. IN: WALSH, P.J., ET AL. (EDS.), OCEANS AND HUMAN HEALTH. ACADEMIC PRESS, BURLINGTON, MA, PP. 239–256
- STEWART JM, BOUDREAU N, BLAKELY JA, STOREY KB (2002). A COMPARISON OF OLEAMIDE IN THE BRAINS OF HIBERNATING AND NON-HIBERNATING RICHARDSON'S GROUND SQUIRREL (*SPERMOPHILUS RICHARDSONII*) AND ITS INABILITY TO BIND TO BRAIN FATTY ACID BINDING PROTEIN. JOURNAL OF THERMAL BIOLOGY 27:309-315
- STEWART FJ, NEWTON ILG, CAVANAUGH CM (2005) CHEMOSYNTHETIC ENDOSYMBIOSES: ADAPTATIONS TO OXIC-ANOXIC INTERFACES. TRENDS IN MICROBIOLOGY 13:439-448 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.TIM.2005.07.007
- STILLWAY LW (1974). NEMATOCYST LIPIDS OF THE PORTUGUESE MAN-OF-WAR *PHYSALIA PHYSALIS*. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: COMPARATIVE BIOCHEMISTRY 48:35-38
- STOCKING CR, GIFFORD JR EM (1959). INCORPORATION OF THYMIDINE INTO CHLOROPLASTS OF SPIROGYRA. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 1:159-164 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0006-291X(59)90010-5
- STORCH J, XU Z (2009). NIEMANN-PICK C2 (NPC2) AND INTRACELLULAR CHOLESTEROL TRAFFICKING. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)-MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS 1791:671-678
- SUESCÚN-BOLÍVAR LP, IGLESIAS-PIRETO R, THOMÉ PE (2012). INDUCTION OF GLYCEROL SYNTHESIS AND RELEASE IN CULTURED *SYMBIODINIUM*. PLOS ONE 7:e47182 DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0047182

- SUTTON D, HOEGH-GULDBERG O (1990). HOST-ZOOXANTHELLA INTERACTIONS IN FOUR TEMPERATE MARINE INVERTEBRATE SYMBIOSES: ASSESSMENT OF EFFECT OF HOST EXTRACTS ON SYMBIONTS. THE BIOLOGICAL BULLETIN 178:175-186
- SUZUKI M, WATANABE K, FUJIWARA S, KURASAWA T, WAKABAYASHI T, TSUZUKI M, IGUCHI K, YAMORI T (2003). ISOLATION OF PERIDININ-RELATED NORCAROTENOIDS WITH CELL GROWTH-INHIBITORY ACTIVITY FROM THE CULTURED DINOFLAGELLATE OF *SYMBIODINIUM SP.*, A SYMBIONT OF THE OKINAWAN SOFT CORAL *CLAVULARIA VIRIDIS*, AND ANALYSIS OF FATTY ACIDS OF THE DINOFLAGELLATE. CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN 51:724-727 DOI: 10.1248/CPB.51.724
- TAKAHASHI S, NAKAMURA T, SAKAMIZU M, VAN WOESIK R, YAMASAKI H (2004). REPAIR MACHINERY OF SYMBIOTIC PHOTOSYNTHESIS AS THE PRIMARY TARGET OF HEAT STRESS FOR REEF-BUILDING CORALS. PLANT AND CELL PHYSIOLOGY 45:251-255
- TAKAHASHI T, TAKEDA N (2015). INSIGHT INTO THE MOLECULAR AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF CNIDARIAN NEUROPEPTIDES. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 16:2610-2625
- TANIYAMA S, ARAKAWA O, TERADA M, NISHIO S, TAKATANI T, MAHMUD Y, NOGUCHI T (2003). *OSTREOPSIS SP.*, A POSSIBLE ORIGIN OF PALYTOXIN (PTX) IN PARROTFISH *SCARUS OVIFRONS*. TOXICON 42:29-33 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0041-0101(03)00097-7
- TARGETT N, BISHOP S, MCCONNELL O, YODER J (1983). ANTIFOULING AGENTS AGAINST THE BENTHIC MARINE DIATOM, *NAVICULA SALINICOLA*: HOMARINE FROM THE GORGONIANS *LEPTOGORGIA VIRGULATA* AND *L. SETACEA* AND ANALOGS. JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY 9:817-829
- TARRANT AM (2005). ENDOCRINE-LIKE SIGNALING IN CNIDARIANS: CURRENT UNDERSTANDING AND IMPLICATIONS FOR ECOPHYSIOLOGY. INTEGRATIVE AND COMPARATIVE BIOLOGY 45:201-214
- TARRANT AM, REITZEL AM, BLOMQUIST CH, HALLER F, TOKARZ J, ADAMSKI J (2009). STEROID METABOLISM IN CNIDARIANS: INSIGHTS FROM *NEMATOSTELLA VECTENSIS*. MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY 301:27-36 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.MCE.2008.09.037
- TAYLOR D (1969). THE NUTRITIONAL RELATIONSHIP OF *ANEMONIA SULCATA* (PENNANT) AND ITS DINOFLAGELLATE SYMBIONT. JOURNAL OF CELL SCIENCE 4:751-762
- TCHERNOV D, GORBUNOV MY, DE VARGAS C, NARAYAN YADAV S, MILLIGAN AJ, HÄGGBLUM M, FALKOWSKI PG (2004). MEMBRANE LIPIDS OF SYMBIOTIC ALGAE ARE DIAGNOSTIC OF SENSITIVITY TO THERMAL BLEACHING IN CORALS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 101:13531-13535 DOI:10.1073/PNAS.0402907101
- THRALL PH, HOCHBERG ME, BURDON JJ, BEVER JD (2007). COEVOLUTION OF SYMBIOTIC MUTUALISTS AND PARASITES IN A COMMUNITY CONTEXT. TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION 22:120-126 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.TREE.2006.11.007
- TITLYANOV E, TITLYANOVA T, LELETKIN V, TSUKAHARA J, VAN WOESIK R, YAMAZATO K (1996). DEGRADATION OF ZOOXANTHELLAE AND REGULATION OF THEIR DENSITY IN HERMATYPIC CORALS. MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES 139:167-178
- TOLOSA I, TREIGNIER C, GROVER R, FERRIER-PAGÈS C (2011). IMPACT OF FEEDING AND SHORT-TERM TEMPERATURE STRESS ON THE CONTENT AND ISOTOPIC SIGNATURE OF FATTY ACIDS, STEROLS, AND ALCOHOLS IN THE SCLERACTINIAN CORAL *TURBINARIA RENIFORMIS*. CORAL REEFS 30:763-774
- TRAPANI M, PARISI M, TOUBIANA M, COQUET L, JOUENNE T, ROCH P, CAMMARATA M (2014). FIRST EVIDENCE OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEUROTOXIN 2 FROM *ANEMONIA SULCATA* (CNIDARIA). ISJ 11:182-191

- TRETHERWEY RN (2004). METABOLITE PROFILING AS AN AID TO METABOLIC ENGINEERING IN PLANTS. CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY 7:196-201 DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.PBI.2003.12.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.003)
- TREIGNIER C, GROVE R, FERRIER-PAGÈS C, TOLOSA I (2008). EFFECT OF LIGHT AND FEEDING ON THE FATTY ACID AND STEROL COMPOSITION OF ZOOXANTHELLAE AND HOST TISSUE ISOLATED FROM THE SCLERACTINIAN CORAL *TURBINARIA RENIFORMIS*. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY:2702-2710
- TREIGNIER C, TOLOSA I, GROVER R, REYNAUD S, FERRIER-PAGÈS C (2009). CARBON ISOTOPE COMPOSITION OF FATTY ACIDS AND STEROLS IN THE SCLERACTINIAN CORAL *TURBINARIA RENIFORMIS*: EFFECT OF LIGHT AND FEEDING. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY 54:1933
- TRENCH R (1971A). THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF ZOOXANTHELLAE SYMBIOTIC WITH MARINE COELENTERATES. I. THE ASSIMILATION OF PHOTOSYNTHETIC PRODUCTS OF ZOOXANTHELLAE BY TWO MARINE COELENTERATES. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES 177:225-235
- TRENCH R (1971B). THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF ZOOXANTHELLAE SYMBIOTIC WITH MARINE COELENTERATES. III. THE EFFECT OF HOMOGENATES OF HOST TISSUES ON THE EXCRETION OF PHOTOSYNTHETIC PRODUCTS IN VITRO BY ZOOXANTHELLAE FROM TWO MARINE COELENTERATES. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES 177:251-264
- TRENCH R (1971C). THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF ZOOXANTHELLAE SYMBIOTIC WITH MARINE COELENTERATES. II. LIBERATION OF FIXED <sup>14</sup>C BY ZOOXANTHELLAE IN VITRO. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B: BIOLOGICAL SCIENCES 177:237-250
- TRENCH R (1979). THE CELL BIOLOGY OF PLANT-ANIMAL SYMBIOSIS. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY 30:485-531
- TURK T, KEM WR (2009). THE PHYLUM CNIDARIA AND INVESTIGATIONS OF ITS TOXINS AND VENOMS UNTIL 1990. TOXICON 54:1031-1037
- UEMURA D, HIRATA Y, IWASHITA T, NAKI H (1985). STUDIES ON PALYTOXINS. TETRAHEDRON 41:1007-1017
- UMLAUF E, CSASZAR E, MOERTELMAIER M, SCHUETZ GJ, PARTON RG, PROHASKA R (2004). ASSOCIATION OF STOMATIN WITH LIPID BODIES. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 279:23699-23709
- URBANOVÁ K, VRKOSLAV V, VALTEROVÁ I, HÁKOVÁ M, CVACKA J (2012). STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF WAX ESTERS BY ELECTRON IONIZATION MASS SPECTROMETRY. JOURNAL OF LIPID RESEARCH 53:204-213 DOI: [10.1194/JLR.D020834](http://dx.doi.org/10.1194/JLR.D020834)
- VAN BENEDEN PJ (1878). LES COMMENSAUX ET LES PARASITES DANS LE REGNE ANIMAL, VOL 9. BAILLIÈRE.
- VAN MOOY BA, FREDRICKS HF (2010). BACTERIAL AND EUKARYOTIC INTACT POLAR LIPIDS IN THE EASTERN SUBTROPICAL SOUTH PACIFIC: WATER-COLUMN DISTRIBUTION, PLANKTONIC SOURCES, AND FATTY ACID COMPOSITION. GEOCHIMICA ET COSMOCHIMICA ACTA 74:6499-6516
- VAN MOOY BAS, FREDRICKS HF, PEDLER BE, DYHRMAN ST, KARL DM, KOBLIZEK M, LOMAS MW, MINCER TJ, MOORE LR, MOUTIN T, RAPPE MS, WEBB EA (2009). PHYTOPLANKTON IN THE OCEAN USE NON-PHOSPHORUS LIPIDS IN RESPONSE TO PHOSPHORUS SCARCITY. NATURE 458:69-72 DOI:[HTTP://WWW.NATURE.COM/NATURE/JOURNAL/V458/N7234/SUPINFO/NATURE07659\\_S1.HTML](http://www.nature.com/nature/journal/v458/n7234/supinfo/nature07659_S1.html)
- VANHOOF G, GOOSSENS F, DE MEESTER I, HENDRIKS D, SCHARPE S (1995). PROLINE MOTIFS IN PEPTIDES AND THEIR BIOLOGICAL PROCESSING. THE FASEB JOURNAL 9:736-744
- VIGNERON A, MASSON F, VALLIER A, BALMAND S, REY M, VINCENT-MONÉGAT C, AKSOY E, AUBAILLY-GIRAUD E, ZAIDMAN-RÉMY A, HEDDI A (2014). INSECTS RECYCLE ENDOSYMBIONTS WHEN THE BENEFIT IS OVER. CURRENT BIOLOGY 24:2267-2273 DOI:[HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.CUB.2014.07.065](http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.065)

- VISRAM S, WIEDENMANN J, DOUGLAS A (2006). MOLECULAR DIVERSITY OF SYMBIOTIC ALGAE OF THE GENUS *SYMBIODINIUM* (ZOOXANTHELLAE) IN CNIDARIANS OF THE MEDITERRANEAN SEA. JOURNAL OF THE MARINE BIOLOGICAL ASSOCIATION OF THE UNITED KINGDOM 86:1281-1283
- VOLKMAN J (2003). STEROLS IN MICROORGANISMS. APPL MICROBIOL BIOTECHNOL 60:495-506
- VOLKMAN J, JEFFREY S, NICHOLS P, ROGERS G, GARLAND C (1989). FATTY ACID AND LIPID COMPOSITION OF 10 SPECIES OF MICROALGAE USED IN MARICULTURE. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY 128:219-240
- VOLKMAN J, NICHOLS P (1991). APPLICATIONS OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY-FLAME IONIZATION DETECTION TO THE ANALYSIS OF LIPIDS AND POLLUTANTS IN MARINE AND ENVIRONMENTAL SAMPLES. JPC JOURNAL OF PLANAR CHROMATOGRAPHY-MODERN TLC 4:19-26
- VON HOLT C, VON HOLT M (1968). TRANSFER OF PHOTOSYNTHETIC PRODUCTS FROM ZOOXANTHELLAE TO COELENTERATE HOSTS. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 24:73-81
- WALLIN IE (1923). THE MITOCHONDRIA PROBLEM. THE AMERICAN NATURALIST 57:255-261 doi:10.2307/2456429
- WANG J-T, CHEN Y-Y, TEW KS, MENG P-J, CHEN CA (2012). PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PERFORMANCES OF MENTHOL-INDUCED APOSYMBIOTIC CORALS. PLoS ONE 7(9)
- WANG JT, DOUGLAS AE (1999). ESSENTIAL AMINO ACID SYNTHESIS AND NITROGEN RECYCLING IN AN ALGA-INVERTEBRATE SYMBIOSIS. MARINE BIOLOGY 135:219-222 doi:10.1007/s002270050619
- WARD S (1995). TWO PATTERNS OF ENERGY ALLOCATION FOR GROWTH, REPRODUCTION AND LIPID STORAGE IN THE SCLERACTINIAN CORAL *POCILLOPORA DAMICORNIS*. CORAL REEFS 14:87-90 doi: 10.1007/BF00303428
- WARNER ME, FITT WK, SCHMIDT GW (1999). DAMAGE TO PHOTOSYSTEM II IN SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES: A DETERMINANT OF CORAL BLEACHING. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 96:8007-8012
- WEBSTER NS, TAYLOR MW, BEHNAM F, LÜCKER S, RATTEI T, WHALAN S, HORN M, WAGNER M (2010). DEEP SEQUENCING REVEALS EXCEPTIONAL DIVERSITY AND MODES OF TRANSMISSION FOR BACTERIAL SPONGE SYMBIONTS. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 12:2070-2082
- WEINHEIMER A, METZNER E, MOLE M (1973). A NEW MARINE BETAINE, NORZOOANEMONIN, IN THE GORGONIAN *PSEUDOPTEROGORGIA AMERICANA*. TETRAHEDRON 29:3135-3136
- WEIS V, REYNOLDS W, DEBOER M, KRUPP D (2001). HOST-SYMBIONT SPECIFICITY DURING ONSET OF SYMBIOSIS BETWEEN THE DINOFLAGELLATES *SYMBIODINIUM* SPP. AND PLANULA LARVAE OF THE SCLERACTINIAN CORAL *FUNGIA SCUTARIA*. CORAL REEFS 20:301-308 doi:10.1007/s003380100179
- WEIS VM (2008). CELLULAR MECHANISMS OF CNIDARIAN BLEACHING: STRESS CAUSES THE COLLAPSE OF SYMBIOSIS. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 211:3059-3066
- WELSH JH, PROCK PB (1958). QUATERNARY AMMONIUM BASES IN THE COELENTERATES. THE BIOLOGICAL BULLETIN 115:551-561
- WELTI R, WANG X (2004). LIPID SPECIES PROFILING: A HIGH-THROUGHPUT APPROACH TO IDENTIFY LIPID COMPOSITIONAL CHANGES AND DETERMINE THE FUNCTION OF GENES INVOLVED IN LIPID METABOLISM AND SIGNALING. CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY 7:337-344
- WENG L-C, PASARIBU B, PING LIN I, TSAI C-H, CHEN C-S, JIANG P-L (2014). NITROGEN DEPRIVATION INDUCES LIPID DROPLET ACCUMULATION AND ALTERS FATTY ACID METABOLISM IN SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES ISOLATED FROM *AIPTASIA PULCHELLA*. SCI. REP. 4 doi: 10.1038/srep05777
- WENK MR (2005). THE EMERGING FIELD OF LIPIDOMICS. NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY 4:594-610

- WHITEHEAD L, DOUGLAS A (2003). METABOLITE COMPARISONS AND THE IDENTITY OF NUTRIENTS TRANSLOCATED FROM SYMBIOTIC ALGAE TO AN ANIMAL HOST. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY* 206:3149-3157
- WICKER C, GUILLAUD J, BONNOT G (1985). COMPARATIVE COMPOSITION OF FREE, PEPTIDE AND PROTEIN AMINO ACIDS IN SYMBIOTIC AND APOSYMBIOTIC *SITOPHILUS ORYZAE* (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE). *INSECT BIOCHEMISTRY* 15:537-541 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/0020-1790(85)90067-8
- WILKERSON F, MULLER G, MUSCATINE PL (1983). TEMPORAL PATTERNS OF CELL DIVISION IN NATURAL POPULATIONS OF ENDOSYMBIOTIC ALGAE. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY* 28:1009-1014
- WILKINSON C (2008). STATUS OF CORAL REEFS OF THE WORLD: 2008 GLOBAL CORAL REEF MONITORING NETWORK AND REEF AND RAINFOREST RESEARCH CENTRE. TOWNSVILLE, AUSTRALIA 296
- WITHERS KJT, GRANT AJ, HINDE R (1998). EFFECTS OF FREE AMINO ACIDS ON THE ISOLATED SYMBIOTIC ALGAE OF THE CORAL *PLESIASTREA VERSIPORA* (LAMARCK): ABSENCE OF A HOST RELEASE FACTOR RESPONSE. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART A: MOLECULAR & INTEGRATIVE PHYSIOLOGY* 120:599-607 DOI:HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S1095-6433(98)10070-3
- WITHERS N (1983). DINOFLAGELLATE STEROLS. *MARINE NATURAL PRODUCTS: CHEMICAL AND BIOLOGICAL PERSPECTIVES* 5:87-130
- WOLLACK JW, ZELIADT NA, MULLEN DG, AMUNDSON G, GEIER S, FALKUM S, WATTENBERG EV, BARANY G, DISTEFANO MD (2009). MULTIFUNCTIONAL PRENYLATED PEPTIDES FOR LIVE CELL ANALYSIS. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 131:7293-7303
- WOOD-CHARLSON EM, HOLLINGSWORTH LL, KRUPP DA, WEIS VM (2006). LECTIN/GLYCAN INTERACTIONS PLAY A ROLE IN RECOGNITION IN A CORAL/DINOFLAGELLATE SYMBIOSIS. *CELLULAR MICROBIOLOGY* 8:1985-1993
- WOOLDRIDGE SA (2009). A NEW CONCEPTUAL MODEL FOR THE ENHANCED RELEASE OF MUCUS IN SYMBIOTIC REEF CORALS DURING 'BLEACHING' CONDITIONS. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 396:145-152
- WU J, LONG L, SONG Y, ZHANG S, LI Q, HUANG J, XIAO Z (2005). A NEW UNSATURATED GLYCOGLYCEROLIPID FROM A CULTURED MARINE DINOFLAGELLATE *AMPHIDINIUM CARTERAE*. *CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN* 53:330-332
- YAKOVLEVA I, BHAGOOI R, TAKEMURA A, HIDAKA M (2004). DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITY TO OXIDATIVE STRESS OF TWO SCLERACTINIAN CORALS: ANTIOXIDANT FUNCTIONING OF MYCOSPORINE-GLYCINE. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY* 139:721-730 DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/j.cbpc.2004.08.016
- YAMASHIRO H, OKU H, HIGA H, CHINEN I, SAKAI K (1999). COMPOSITION OF LIPIDS, FATTY ACIDS AND STEROLS IN OKINAWAN CORALS. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY* 122:397-407
- ZAPATA F, GOETZ FE, SMITH SA, HOWISON M, SIEBERT S, CHURCH S, SANDERS SM, AMES CL, MCFADDEN CS, FRANCE SC (2015). PHYLOGENOMIC ANALYSES SUPPORT TRADITIONAL RELATIONSHIPS WITHIN CNIDARIA. *BIORxIV*:017632
- ZEILEIS A, WIEL MA, HORNIK K, HOTHORN T (2008). IMPLEMENTING A CLASS OF PERMUTATION TESTS: THE COIN PACKAGE. *JOURNAL OF STATISTICAL SOFTWARE* 28:1-23
- ZHANG Z-Q (2011). ANIMAL BIODIVERSITY: AN INTRODUCTION TO HIGHER-LEVEL CLASSIFICATION AND TAXONOMIC RICHNESS. *ZOOTAXA* 3148:7-12
- ZHUKOVA NV, TITLYANOV EA (2003). FATTY ACID VARIATIONS IN SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES FROM OKINAWAN CORALS. *PHYTOCHEMISTRY* 62:191-195

- ZIEGLER M, FITZPATRICK S, BURGHARDT I, LIBERATORE K, JOSHUA LEFFLER A, TAKACS-VESBACH C, SHEPHERD U (2014). THERMAL STRESS RESPONSE IN A DINOFLAGELLATE-BEARING NUDIBRANCH AND THE OCTOCORAL ON WHICH IT FEEDS. CORAL REEFS 1-15 DOI: 10.1007/s00338-014-1204-8
- ZOREC R, TESTER M, MAČEK P, MASON W (1990). CYTOTOXICITY OF EQUINATOXIN II FROM THE SEA ANEMONE *ACTINIA EQUINA* INVOLVES ION CHANNEL FORMATION AND AN INCREASE IN INTRACELLULAR CALCIUM ACTIVITY. THE JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY 118:243-249

## Démarche expérimentale

---

# I. Instruments et matériel biologique

## 1. Instruments

### a) *HPLC-UV-DEDL*

Un appareil de Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC ; Alliance Waters 2695) fonctionne sous Empower 2. Il est équipé d'un premier détecteur à barrettes de diodes (Waters 996), et permet la détection de l'absorbance à l'UV dans une gamme de 210 à 400 nm. Les chromatogrammes sont habituellement traités à 3 longueurs d'onde : 214 nm (détection des carbonyles), 254 nm (détection des composés aromatiques) et 280 nm (absorbance des systèmes conjugués). Le système est également équipé d'un deuxième Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL ; ELSD-LT, Shimadzu). Le DEDL est qualifié de détecteur universel puisque sa réponse ne dépend pas de la présence de chromophores, nécessaires à la détection UV, mais est basée sur la diffusion de la lumière.

### b) *LC/MS*

Deux instruments ont été utilisés. L'**instrument A** est un appareil Thermo LCQ avantage équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI) et d'un analyseur quadripolaire à piégeage d'ion, de type « ion trap » fonctionnant sous Xcalibur 2.0.7. Cet appareil est couplé à une chaîne HPLC Agilent 1100 équipé d'un détecteur UV à barrettes de diodes. Les conditions de source ont été paramétrées comme suit : voltage du capillaire, 4,5kV; gaz fourreau, 40  $\mu$ a ; gaz auxiliaire, 20  $\mu$ a ; température de désolvatation, 250°C. L'**instrument B** est un appareil Thermo LTQ Q-Exacte Plus équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI) et d'un analyseur hybride quadripole/orbitrap fonctionnant sous Xcalibur 2.2 Dionex Ultimate 3000. Cet appareil est couplé à une chaîne de chromatographie en phase liquide à ultra haute précision (UPLC) Thermo Dionex Ultimate 3000. Les conditions de source ont été paramétrées comme suit : voltage du capillaire, 4,2 kV; gaz fourreau, 40  $\mu$ a ; gaz auxiliaire, 20  $\mu$ a ; température de désolvatation, 250°C.

### c) *RMN*

Les analyses par RMN ont été effectuées à partir d'un appareil Bruker Avance 500 MHz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport aux solvants deutérés utilisés comme étalons internes. Les solvants deutérés utilisés sont le CD<sub>3</sub>OD ( $\delta_H$  = 3,31 ppm et 4,78 ppm,  $\delta_C$

= 49,0 ppm), le  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}} = 7,26$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 77,16$  ppm) et le  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$  ( $\delta_{\text{H}} = 2,50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39,5$  ppm). Les constantes de couplage ( $J$ ) sont exprimées en Hertz (Hz).

#### d) *GC/MS*

Deux instruments ont été utilisés : un Thermoquest trace GC couplé à un analyseur simple quadrupôle Automass III multi (Thermo) fonctionnant sous Xcalibur 1.2 (**instrument A**) ; et un ThermoQuest trace GC couplé à un analyseur quadripolaire à piégeage d'ions Thermo ITQ 900 (Thermo) fonctionnant sous Xcalibur 2.1 (**instrument B**). Pour les deux instruments, le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit constant de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le spectromètre de masse est configuré en ionisation électronique à 70 eV, avec un courant d'émission de  $250 \mu\text{A}$ . La gamme de masse est réglée entre 50 et 700  $m/z$ . La durée de balayage est de 145 ms. Le gain du multiplicateur est de 650 V.

#### e) *MALDI-MSI*

L'instrument de spectrométrie de masse utilisé pour les analyses MSI est un Maldi TOF/TOF (temps de vol, ultraflex II, BRUKER) équipé d'un laser smartbean II (Nd:YAG, 355nm). L'instrument fonctionne *via* les logiciels FlexAnalysis 3.3 (traitement des spectres de masse) et FlexImaging 3 (traitement des images). L'analyse a été réalisée en mode positif, à une gamme de masse de 100 à 1000  $m/z$ . Une distance de  $20 \mu\text{m}$  entre chaque point de mesure a été fixée, les impacts de laser sont effectués à une vitesse de 200 Hz. Les images ont ensuite été retraitées à l'aide du logiciel SCiLS Lab 2015a.

## 2. *Matériel biologique*

#### a) *Echantillonnage des individus, maintien en aquarium*

L'ensemble des spécimens *Anemonia viridis* ont été collectés dans la rade de Villefranche-sur-Mer en début d'automne. Ils sont divisés en deux parties : la première est directement congelée dans de l'azote liquide, puis lyophilisée et congelée à  $-20^\circ\text{C}$ ; la seconde partie est installée dans des bacs individuels disposés dans une salle d'aquarium climatisée, dans des conditions contrôlées de laboratoire exposées ci-après. La circulation de l'eau dans les bacs est assurée par des pompes individuelles fonctionnant en continu, la température de l'eau est maintenue à  $19\pm 0,5^\circ\text{C}$  et est renouvelée tous les deux jours. Un éclairage alterné est mis en place (lampe Hydragyrum quartz

iodide) et fonctionne en photopériode de 12 heures/12 heures (éclairage entre 8h et 20h, obscurité entre 20h et 8h). L'intensité lumineuse est mesurée par une sonde (QSL-100, Biospherical Instruments Inc.) et réglée pour atteindre 175-200  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les individus sont nourris une fois par semaine avec un mélange d'*Artemia salina* et de crevettes grises broyées ; l'eau des aquariums est renouvelée chaque semaine par de l'eau de mer provenant du site de collecte.

#### b) *Protocole de séparation des tissus*

Le prélèvement de tentacules est toujours réalisé à 10h, afin d'éviter des variations dues au rythme circadien (Levy et al. 2011). Les tentacules prélevés sont maintenus dans un bac de glace et immédiatement disséqués. Le gastroderme et les symbiotes sont séparés de l'épiderme de l'anémone selon le protocole préalablement établi (Richier et al. 2003 ; [Figure 97](#)). Chaque tentacule est ouvert dans le sens de la longueur, face gastroderme exposée, et le gastroderme est détaché délicatement de l'épiderme. Ce dernier est rincé avec de l'eau de mer filtrée et purifié par plusieurs centrifugations (3 min à 1500×g). La séparation des cellules de *Symbiodinium* spp. du tissu gastrodermique animal est effectuée par des lavages et centrifugations répétées (3 min à 1500×g). Les symbiotes sont dans le culot, et les cellules du gastroderme dans le surnageant. Les échantillons sont ensuite lyophilisés, puis pesés et congelés à -20°C.

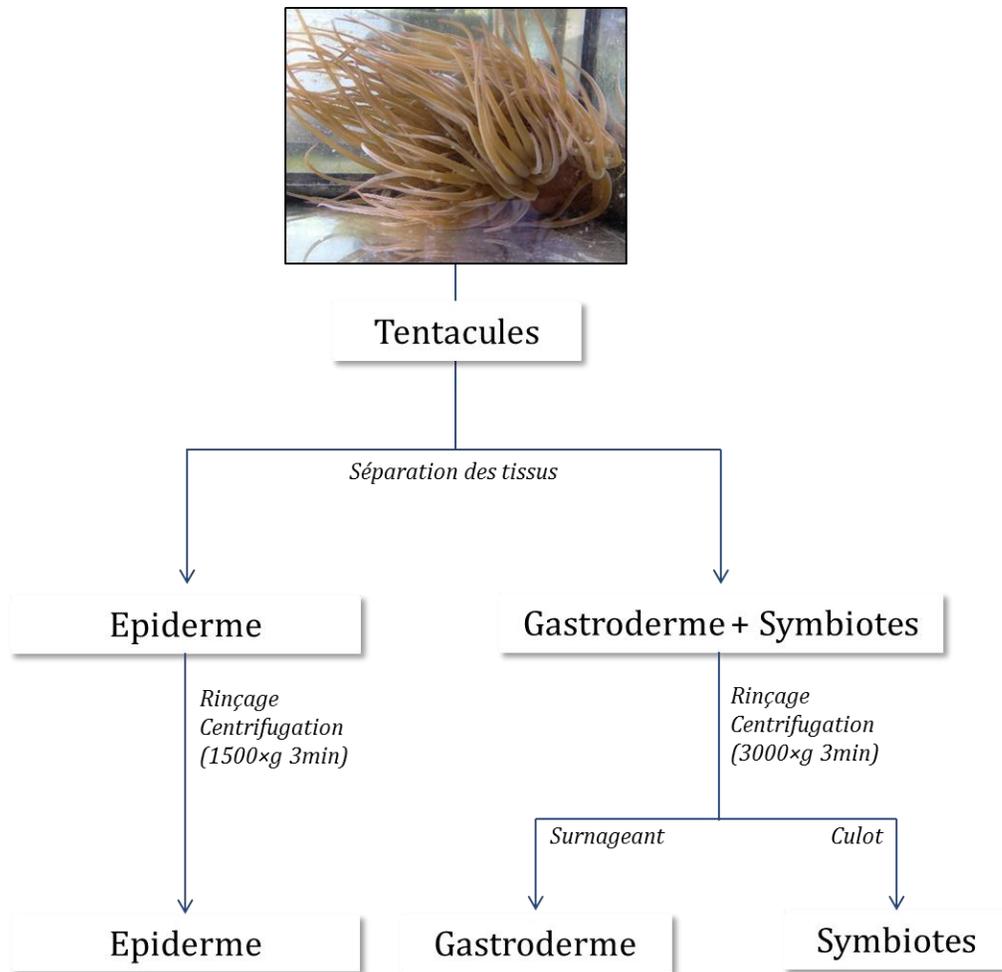


Figure 97 Schéma du protocole d'extraction des tissus animaux (épiderme et gastroderme) et symbiotes à partir de tentacules d'*A. viridis*, adapté de Richier et al. 2003.

### c) *Mise en place et maintien de cultures de Symbiodinium spp.*

Les symbiotes *Symbiodinium spp.* isolés d'*A. viridis* sont maintenus en culture depuis plusieurs années au laboratoire (Equipe Symbiose Marine, UMR 7138). Pour cette expérience, les symbiotes ont été cultivés dans 10 erlenmeyers de 250 mL, dans un milieu de culture composé d'eau de mer filtrée enrichie en milieu nutritif F/2 Guillaards (Sigma). Le milieu de culture est enrichi par 1% (v/v) d'une solution d'antibiotique antimycotique (Sigma). Les cultures ont été maintenues dans une chambre de culture (Witeg Labortecnik GmbH; WiseCube, modèle WGC-450) à une température constante de 24°C, et une luminosité de 200  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  alternée 12h jour / 12h nuit. Le taux d'humidité est de 90% et le pH est constant à 8,1. Un repiquage des cultures a été effectué tous les 15 jours. Après 4 mois de culture, 90% des symbiotes sont prélevés et centrifugés, les 10% restants sont remis en culture selon le même mode opératoire.

## II. Etude métabolomique globale

### 1. *Extraction et fractionnement des métabolites*

Quelques soit le mode de préparation (individus entiers, tissus séparés, cultures) les échantillons ont été lyophilisés, pesés puis extraits à plusieurs reprises sous ultrasons par un mélange dichlorométhane/méthanol (1:1, v/v). Les extraits sont ensuite filtrés sur coton pour éliminer le squelette résiduel. L'extrait brut organique de métabolites ainsi obtenu est partitionné selon la [Figure 98](#). Dans un premier temps, l'extrait est partitionné entre l'eau et le dichlorométhane. L'extrait brut organique est solubilisé dans 100 mL de dichlorométhane par gramme d'extrait, transféré dans une ampoule à décanter, puis 30 mL d'eau sont ajoutés. L'ampoule est agitée, dégazée, la fraction aqueuse appelée  $F_1$  est récupérée et l'opération est renouvelée 3 fois. Environ 1/3 de la  $F_1$  est mise de côté pour l'isolement des composés, et les 2/3 restants sont séparés par extraction sur phase solide (SPE) sur phase silice- $C_{18}$  pour obtenir la  $F_1'$ . La fraction dichlorométhane est ensuite partitionnée entre le méthanol ( $F_2$ ) et le cyclohexane ( $F_3$ ).

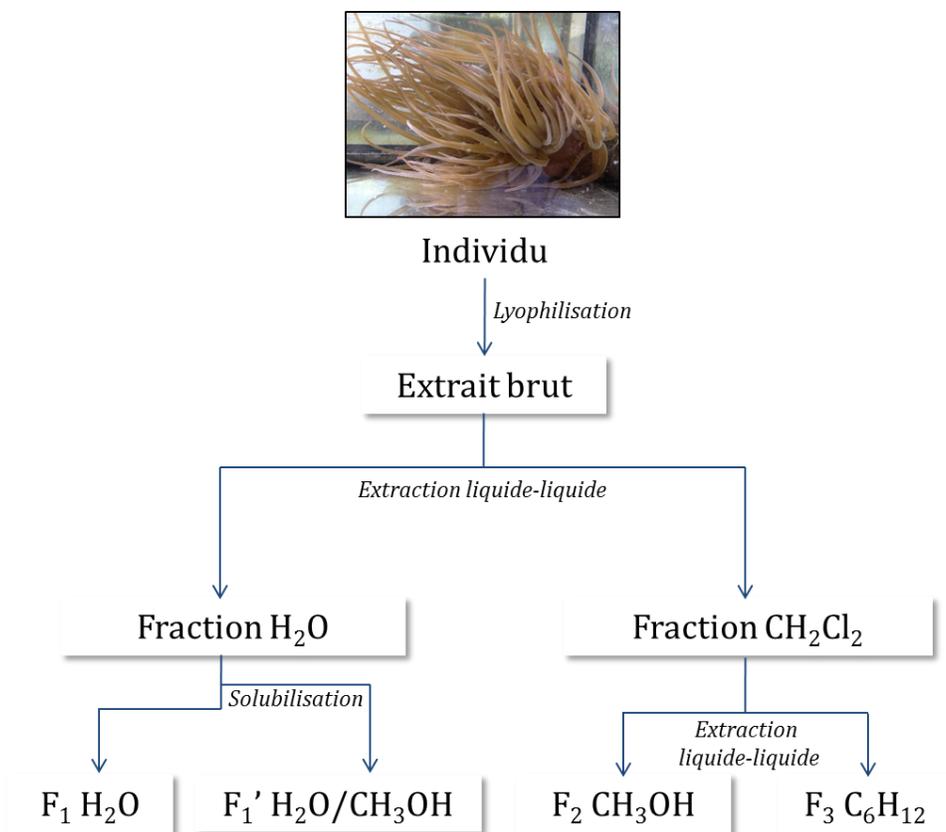


Figure 98 Schéma du protocole d'extraction et de fractionnement des métabolites appliqué à partir d'individus entiers d'*A. viridis*.

## 2. Acquisition des empreintes chimiques

Les empreintes chimiques de l'extrait brut organique et des fractions F<sub>1</sub>', F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub> sont obtenues par HPLC-UV-DEDL à partir d'une solution à 10 mg.mL<sup>-1</sup> d'extrait. La séparation des composés est réalisée sur colonne Machery-Nagel NUCLEODUR Sphinx RP de phase phényl-C<sub>18</sub>, 250×4,6 mm ou 150×4,6 mm (longueur par diamètre interne), la taille des particules est de 5 μm. La colonne est pourvue d'une pré-colonne de phase identique. L'analyse est réalisée à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>; la phase mobile et ses paramètres d'élution sont indiqués dans le [Tableau 17](#).

Tableau 17 Gradient d'élution de la phase mobile employée pour l'acquisition des empreintes chimiques de l'extrait brut organique et des fractions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub> par HPLC-UV-DEDL (Colonne Machery-Nagel NUCLEODUR Sphinx, 250×4,6 mm ou 150×4,6 mm).

Temps (min)	Phase mobile (%)	
	H <sub>2</sub> O + 0,1% HCOOH	CH <sub>3</sub> CN + 0,1% HCOOH
0	90	10
5	90	10
30	0	100
35	0	100
45	90	10
60	90	10

L'empreinte chimique de la fraction F<sub>1</sub> est obtenue par HPLC-UV-DEDL à partir d'une solution à 10 mg.mL<sup>-1</sup> d'extrait. La séparation des composés est réalisée sur colonne Machery-Nagel de phase HILIC (silice greffée à une chaîne carbonée zwitterionique, Figure 99), NUCLEODUR HILIC (250 × 4,6 mm ; 5 μm). La colonne est pourvue d'une pré-colonne de phase identique.

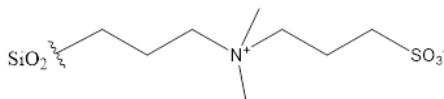


Figure 99 Greffage de colonne Machery-Nagel NUCLEODUR HILIC

L'analyse est réalisée à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>, la phase mobile et ses paramètres d'élution sont indiqués dans le Tableau 18.

Tableau 18 Gradient d'élution de la phase mobile employée pour l'acquisition des empreintes chimiques de la fraction F<sub>1</sub> par HPLC-UV-DEDL (Colonne Machery-Nagel NUCLEODUR HILIC, 250×4,6 mm).

Temps (min)	Phase mobile (%)	
	CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O
0	90	10
5	90	10
30	10	90
35	10	90
45	90	10
60	90	10

Les extraits bruts organiques dessalés (fraction dichlorométhane) issus des tissus épidermique, gastrodermique, des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolés et mis en culture ont été analysés par UPLC/MS/MS à partir de l'**instrument B**. Les analyses ont été réalisées à partir de solutions à 5 mg.mL<sup>-1</sup> d'extrait. La séparation des composés est réalisée sur colonne Thermo Accucore C<sub>18</sub>, 100 × 2.1 mm (longueur par diamètre interne), la taille des particules est de 5 μm. Un four à colonne est maintenu à 35°C pendant l'analyse. L'analyse est réalisée à un débit de 0,250 mL.min<sup>-1</sup>, la phase mobile et ses paramètres d'élution sont indiqués dans le **Tableau 19**. Les acquisitions sont réalisées entre 135 et 2000 *m/z*, une fragmentation MS/MS induite par collision (higher energy collisional dissociation, HCD) est réalisée à une énergie de 27% pour l'ensemble des signaux, avec une fenêtre d'isolement de 4 *m/z*.

Tableau 19 Gradient d'élution de la phase mobile employé pour l'acquisition des empreintes chimiques des extraits bruts dessalés par UPLC/MS (Colonne Thermo Accucore C18, 100×2,1 mm).

Temps (min)	Phase mobile (%)	
	H <sub>2</sub> O + 0,1% HCOOH	CH <sub>3</sub> CN + 0,1% HCOOH
0	96	4
3	96	4
42	0	100
48	0	100
60	95	5

### 3. Isolement et caractérisation des métabolites

#### a) *Fraction F<sub>1</sub>*

La purification est effectuée sur une colonne semi-préparative de phase HILIC Machery-Nagel, Nucleodur HILIC ; 250 × 10 mm, 5 μm). Des injections répétées de 80 μL d'une solution à 100mg.mL<sup>-1</sup> ont été effectuées sur 282 mg de fraction F<sub>1</sub> au total. L'élution est réalisée à un débit de 2,5 ml/min selon les paramètres décrits dans le **Tableau 20**. Les composés purifiés ont ensuite été caractérisés par RMN 1D et 2D. leur masse moléculaire a été déduite de leur *m/z* obtenu par infusion directe en ESI(électrospray)-MS (**instrument A**).

Tableau 20 Gradient d'élution de la phase mobile employé pour l'isolement des métabolites issus de la fraction F<sub>1</sub> par HPLC-UV-DEDL (Colonne Machery-Nagel NUCLEODUR HILIC, 250×10 mm).

Temps (min)	Phase mobile (%)	
	CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O
0	90	10
5	90	10
70	33	67
75	90	10
90	90	10

b) *Fraction F<sub>1</sub>'*

A partir d'un aliquot (2,60 g) de la fraction F<sub>1</sub>, un fractionnement est réalisé par SPE sur phase silice-C<sub>18</sub>. Après conditionnement de la phase stationnaire, l'extrait est élué par successivement 12 mL d'eau (F<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>O), 12 mL d'eau/méthanol (1:1, v/v ; F<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>O/MeOH) et 12 mL de méthanol (F<sub>1</sub>'). Les fractions ainsi obtenues ont été évaporées, lyophilisées et conservées à -20°C. Un contrôle des fractions par HPLC-UV-DEDL a été réalisé selon les conditions décrites dans le [Tableau 17](#), l'utilisation d'acide heptafluorobutyrique à la place de l'acide formique a été nécessaire afin d'observer une rétention des composés. La fraction F<sub>1</sub>' a été retenue car elle présente des signaux correspondant à des composés d'intérêt. Une première purification est ensuite entreprise à partir de 18,6 mg de la fraction F<sub>1</sub>' par HPLC semi-préparative sur phase C<sub>18</sub> (Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) ; 250 × 10 mm, 5µm). L'élution est paramétrée à un débit de 3 mL.min<sup>-1</sup> avec un gradient de solvants décrit dans le [Tableau 21](#). Des injections répétées de 70 µL d'une solution à 80 mg.mL<sup>-1</sup> ont été effectuées.

Tableau 21 Gradient d'élution de la phase mobile employée pour l'isolement des métabolites issus de la fraction F<sub>1</sub>' par HPLC-UV-DEDL (Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) ; 250 × 10 mm, 5µm).

Temps (min)	Phase mobile (%)	
	H <sub>2</sub> O + 0,1% HCOOH	CH <sub>3</sub> CN +0,1% HCOOH
0	90	10
5	80	20
15	75	25
25	0	100
30	0	100
32	90	10
45	90	10

Une seconde purification a été entreprise par chromatographie sur colonne ouverte sur phase LH<sub>20</sub> (10 × 1,5 cm), par élution au méthanol. Les fractions F<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>O/MeOH et F<sub>1</sub>' ont été regroupées afin d'obtenir un total de 120 mg d'extrait, l'élution a permis d'acquérir 9 fractions, l'isolement des composés a été contrôlé par HCPLC-UV-DEDL selon les conditions décrites dans le [Tableau 17](#). L'ensemble des composés purifiés de la F<sub>1</sub>' a ensuite été analysé par LC/MS/MS (**Instruments A et B**). A partir de l'**instrument A**, les analyses ont été réalisées à partir de solutions à 5 mg.mL<sup>-1</sup> d'extrait. La séparation des composés est réalisée sur colonne ACE de phase phényl, 100 × 2.1 mm (longueur par diamètre interne), la taille des particules est de 5 μm. L'analyse est réalisée à un débit de 0,30 mL.min<sup>-1</sup>, la phase mobile et ses paramètres d'élution sont indiqués dans le [Tableau 17](#). Les acquisitions sont réalisées entre 200 et 2000 *m/z*, une fragmentation MS/MS induite par collision (dissociation induite par collision, CID) est réalisée à différentes énergies de 15, 20, 25 et 30% pour l'ensemble des signaux, avec une fenêtre d'isolement de 0,5 *m/z*.

A partir de l'**instrument B**, les analyses ont été réalisées à partir de solutions à 5 mg.mL<sup>-1</sup> d'extrait. La séparation des composés est réalisée sur colonne Thermo Accucore C<sub>18</sub>, 100 × 2.1 mm (longueur par diamètre interne), la taille des particules est de 5 μm. Un four à colonne est maintenu à 35°C pendant l'analyse. L'analyse est réalisée à un débit de 0,250 mL.min<sup>-1</sup>, la phase mobile et ses paramètres d'élution sont indiqués dans le [Tableau 19](#). Les acquisitions sont réalisées entre 135 et 2000 *m/z*, une fragmentation MS/MS induite par collision (higher energy collisional dissociation, HCD) est réalisée à une énergie de 27% pour l'ensemble des signaux, avec une fenêtre d'isolement de 4 *m/z*.

### c) *Fraction F<sub>2</sub>*

La purification est effectuée sur une colonne semi-préparative de phase Phényl-C<sub>18</sub> Machery-Nagel, Nucleodur Sphinx ; 250 × 10 mm, 5 μm). Des injections répétées de 80 μL d'une solution à 100mg.mL<sup>-1</sup> ont été effectuées sur 2,6 g de fraction F<sub>2</sub> au total. L'élution est réalisée à un débit de 3 mL.min<sup>-1</sup> selon les paramètres décrits dans le [Tableau 22](#), permettant d'isoler 34 composés. La pureté des composés isolés a été contrôlée par HCPLC-UV-DEDL selon les conditions décrites dans le [Tableau 17](#). Les composés purifiés ont ensuite été caractérisés par LC/MS (**instruments A et B**). Les paramètres des analyses sont identiques à ceux indiqués dans la [partie II.3.b p. 222](#), hormis la colonne utilisée pour l'instrument A qui est modifiée (Machery-Nagel Nucleodur Sphinx, phase phényl-C<sub>18</sub>, 100 × 2,1 mm, 5 μm).

Tableau 22 Gradient d'élution optimisé de la phase mobile employée pour l'isolement des métabolites issus de la fraction F<sub>2</sub> par HPLC-UV (Colonne Machery-Nagel NUCLEODUR Sphinx, 250×10 mm).

Temps (min)	Phase mobile (%)	
	H <sub>2</sub> O + 0,1% HCOOH	CH <sub>3</sub> CN +0,1% HCOOH
0	35	65
10	35	65
25	0	100
35	0	100
45	35	65

d) **Fraction F<sub>3</sub>**

Les composés issus de la F<sub>3</sub> ont été isolés par CCM (Silice, 20 × 20 cm) semi-préparative. Des standards de stérols (Sigma) sont déposés sur une bande de 1 cm de largeur au bord de la plaque CCM. La séparation est réalisée par du chloroforme 100 % (45 min). Après séchage de la plaque CCM, une deuxième séparation des composés est réalisée par un mélange chloroforme/ éther diéthylique 95:5 (v/v ; 45 min). La bande sur laquelle les standards ont été déposés est révélée à la *p*-anisaldehyde. La silice est prélevée au niveau de 18 bandes définies par les standards, puis extraite par 100 mL de mélange extractant dichlorométhane/méthanol 1:1 (v/v). La suspension a ensuite été filtrée sur coton sous pression réduite, et lavée 3 fois par 40 mL de mélange extractant dichlorométhane/méthanol 1:1 (v/v). La pureté des fractions obtenues a ensuite été vérifiée par GC/MS à partir de l'**instrument B** équipé d'une colonne Thermo TG-5MS, 5% phényl (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 μm). La température de l'injecteur est de 260°C. La température initiale de la colonne est de 100°C pendant la première minute, elle augmente de 25°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 230°C, puis de 2,5°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 290°C, et enfin de 11°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 300°C, maintenue pendant 2 minutes.

### III. Etude lipidomique

#### 1. Extraction et séparation des composés

Un prélèvement de 20 tentacules a été effectué séparément sur 5 anémones maintenues en aquarium (I.2.a p. 215). Les tissus animaux et symbiotes ont été séparés, lyophilisés et congelés (I.2.b p. 216). Un schéma de la méthode d'extraction et de la séparation des lipides est présenté (Figure 100).

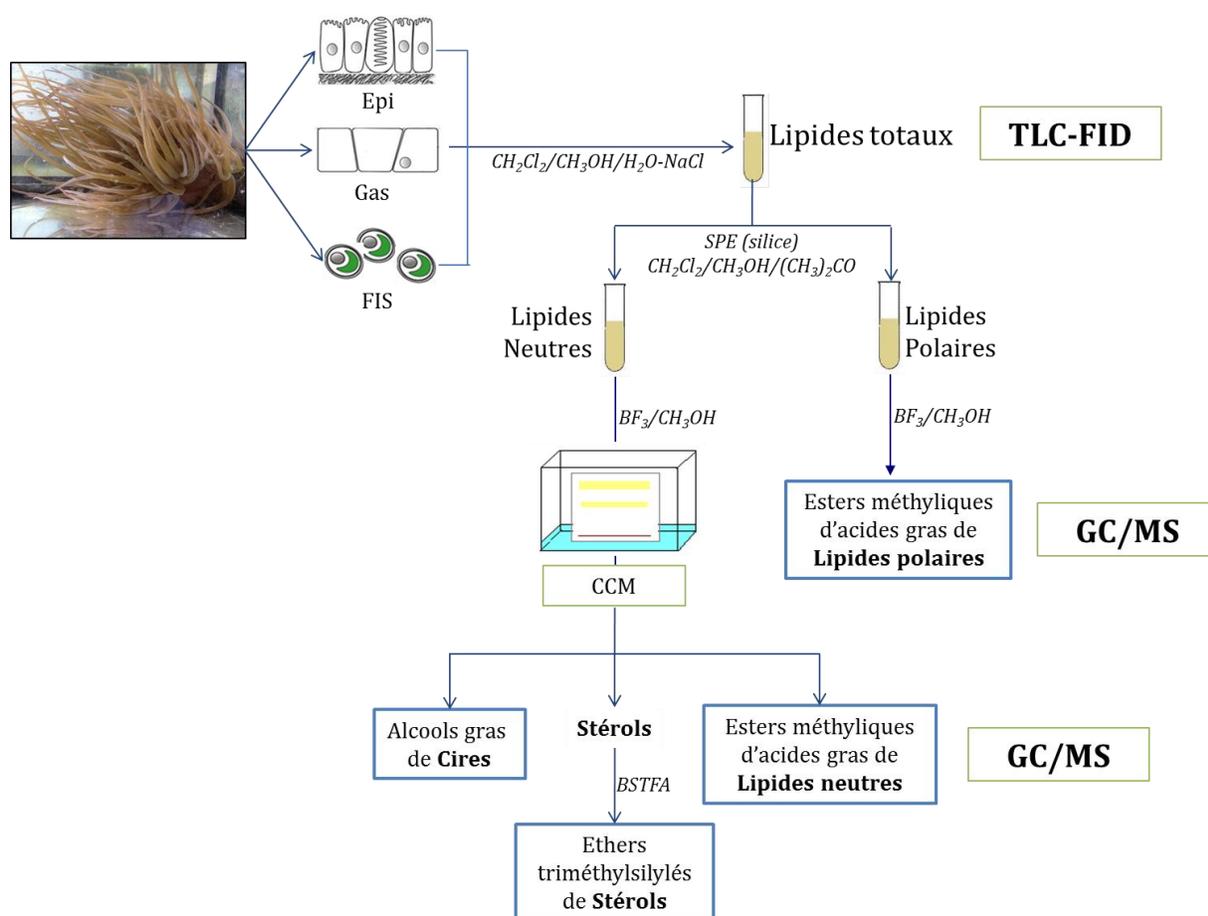


Figure 100 Méthodologie générale d'extraction, de séparation et d'analyse des lipides.

L'extraction des lipides est réalisée à partir des échantillons secs et congelés, selon une méthode adaptée de Bligh et Dyer (1959). Chaque échantillon est broyé ( $2500 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$ , pendant 2 min) dans 38 mL de chloroforme/méthanol/eau-NaCl 7% (1:2:0,8 ; v/v/v), puis filtré (filtres Whatman 541). Le broyat et le filtre sont récupérés, découpés et broyés à nouveau dans le même

mélange extractant, et l'opération est renouvelée dans 30 mL de chloroforme. Une extraction liquide-liquide est réalisée entre la solution obtenue et un mélange eau-NaCl 7%. La phase organique contenant les lipides est évaporée, pesée et conservée à -80°C. Afin de limiter l'autoxydation des lipides, chacune des étapes est effectuée sous azote.

Les lipides totaux sont séparés en lipides neutres et lipides polaires par SPE sur silice (Alltech, 500mg-8mL). Après conditionnement de la phase stationnaire, les extraits lipidiques sont élués par 12 mL de chloroforme, 8ml d'acétone et 12 mL de méthanol suivi de 4mL d'une solution d'ammoniaque à 5% dans le méthanol. Chaque fraction est évaporée, pesée et conservée à -80°C.

Tous les échantillons sont ensuite dérivatisés par ajout de trifluore de bore à 7% dans le méthanol (BF<sub>3</sub>-méthanol), selon une méthode adaptée de Morrison et Smith (1964), afin de transformer les AGs en esters méthyliques (FAMES). 1mL de toluène et 1mL de BF<sub>3</sub>-méthanol 7% sont ajoutés, les échantillons sont agités au vortex puis placés dans un bain sec à 100°C pendant 1 heure. L'ajout de 2 mL d'eau distillée permet l'obtention d'un système biphasique. La phase organique contenant les FAMES est prélevée, l'opération est répétée trois fois. Les lipides neutres contiennent les stérols, les cires et les FAMES, qui sont séparés par chromatographie sur couche mince préparative (CCM) de silice dans un mélange *n*-hexane/éther/acide acétique (170:30:2,5 ; v/v/v) pendant 30 minutes, selon la méthode de Miller et al. 1998. Des standards de FAMES et de stérols (Sigma) sont déposés (environ 10 µl). Les bandes sont révélées sous UV à 254 nm après vaporisation d'une solution de 0,2% 2,7-dichloro-fluorescéine. La silice est prélevée au niveau des bandes de lipides, puis extraite par 20 mL de *n*-hexane. La suspension a ensuite été filtrée au travers d'un verre fritté sous pression réduite, et lavée successivement par 20 mL d'un mélange chloroforme/*n*-hexane (1:1 ; v/v) et 20 mL de chloroforme.

Immédiatement avant l'analyse en GC/MS, les stérols sont dérivatisés par ajout de 500 µL *N,O*-bis-triméthylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA), permettant d'obtenir des éthers triméthylsilylés de stérols (Knapp, 1979). Les échantillons sont maintenus 1 heure sous agitation à température ambiante, puis dilués par ajout de 500 µL de cyclohexane.

## **2. Analyse des composés**

### **a) Analyses par TLC-FID**

Les lipides totaux ont été analysés par Iatroscan MK V TH10, couplant une CCM (en anglais, Thin Layer Chromatography ; TLC) à un analyseur détecteur à ionisation de flamme (TLC-FID ;

Iatron Laboratories ; Ackman 1981). L'analyse TLC-FID sépare les lipides totaux en classes de lipides et permet leur quantification. Chaque échantillon est dilué à une concentration de  $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans du chloroforme, et un échantillonneur automatique (SAS A4100 autospotter) applique  $1 \mu\text{L}$  de solution sur des bâtonnets de quartz recouverts d'une couche mince de silice (chromarods SIII, Iatron Laboratories, longueur : 10 cm, diamètre : 1 mm, Figure 101). La migration des composés se fait suivant deux bains de solvants successifs : *n*-hexane/benzène/acide formique (80:20:1 ; v/v/v), pendant 23 minutes, suivi de 5 minutes de séchage, puis *n*-hexane/diethyl éther/acide formique (97:3:1.5 ; v/v/v) pendant 22 minutes, suivi de 5 minutes de séchage, et 5 minutes de chauffage dans un four à  $100^\circ\text{C}$ . Les chromarods sont analysés immédiatement afin de minimiser l'adsorption de contaminants atmosphériques. Chaque échantillon est analysé en triplicats.



Figure 101 Photo de chromarods utilisés pour les analyses par TLC-FID (d'après [http://www.ses-analysesysteme.de/Zubehoer\\_UK.htm](http://www.ses-analysesysteme.de/Zubehoer_UK.htm)).

Un étalonnage est effectué avant chaque analyse grâce à une solution étalon composée de cholestérol, diacylglycérols, acides gras libres, lipides polaires, triacylglycérols et esters de stérols (Sigma). Les chromatogrammes sont enregistrés avec le logiciel ChromStar version 4.14. Chaque chromatogramme est comparé à celui obtenu de la solution étalon et intégré manuellement. Les résultats sont donnés en pourcentage d'aire par rapport à l'aire totale du chromatogramme. Les résultats d'une analyse sont reproductibles avec  $\pm 10\%$  d'erreur (Volkman et Nichols 1991). Un échantillon blanc est intercalé entre chaque analyse afin d'éviter toute contamination d'une expérience à la suivante (phénomène de « carry over »).

#### b) *Analyses par GC/MS*

L'analyse des stérols et des FAMES est effectuée par GC/MS. Les **Instruments A** et **B** ont été utilisés ([partie I.1.d, p. 215 de ce chapitre](#)). Les analyses ont été réalisées en mode split avec un ratio de 1/10. La gamme de masse est réglée entre 40 et 700  $m/z$ .

- Stérols : L'analyse et la séparation des stérols sont réalisées sur l'**instrument A** équipé d'une colonne Zebron ZB-5MS (Phenomenex) en polydiméthylsiloxane, 5% phényl (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 $\mu$ m). La température de l'injecteur est de 260°C. La température initiale de la colonne est de 100°C pendant la première minute, elle augmente de 25°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 230°C, puis de 2,5°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 290°C, et enfin de 11°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 300°C, maintenue pendant 2 minutes.
- FAMES : la séparation et la caractérisation des FAMES est effectuée sur l'instrument A équipé d'une colonne Zebron ZB-WAX (Phenomenex) en polyéthylène glycol (longueur 30 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de film 0,25 $\mu$ m). La température de l'injecteur est de 225°C. La température initiale de la colonne est de 80°C, puis augmente de 52,5°C.min<sup>-1</sup> pour atteindre une température de 185°C, maintenue pendant 118 minutes. A partir de l'instrument B, les FAMES ont été séparés par une colonne Thermo TG-5MS, 5% phényl (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 0,25  $\mu$ m). La température initiale de la colonne est de 160°C, puis une rampe de 1,5°C.min<sup>-1</sup> est appliquée jusqu'à une température finale de 270°C. Un standard analytique commercial (huile de Menhaden-Capelin, Sigma-Aldrich) est dérivatisé au BF<sub>3</sub>-MeOH et injecté selon la même méthode, permettant d'identifier les temps de rétention des différents FAMES.

Les résultats sont donnés en pourcentage d'aire par rapport à l'aire totale du chromatogramme. Un échantillon blanc est intercalé entre chaque analyse afin d'éviter toute contamination d'une expérience à la suivante.

### **3. Analyses statistiques**

Des études statistiques non-paramétriques ont été employées car elles sont parfaitement destinées à l'analyse de petits échantillons ( $n < 30$ , et particulièrement  $n < 10$ ; LeBlanc 2004; Linebach 2014). Ces analyses comprennent : (1) un test oneway basé sur les permutations, suivi d'un test post-hoc de Tukey; (2) un test ANOSIM (analyse des similarités) ; (3) une AFC (analyse factorielle des correspondances) ; et (4) une ACH (analyse de cluster hiérarchique).

a) *Test oneway*

Le test oneway basé sur les permutations a été réalisé pour chaque classe de lipides et les acides gras individuellement afin de détecter des modifications de leur distribution entre l'épiderme, le gastroderme et les symbiotes. Lorsque les variations sont significatives, un test post-hoc de Tuckey (un équivalent du test de Kruskal et Wallis, mais basé sur des permutations) réalise une comparaison deux à deux afin de définir l'origine des différences attribuées. Ces analyses ont été réalisées sur le logiciel R (version 2.15.2, R Development Core Team 2012), à partir du package Coin (Zeileis et al. 2008). Les comparaisons sont considérées comme statistiquement différentes pour  $P < 0,05$ .

b) *Test ANOSIM*

Le test ANOSIM (Clarke et Green 1988) est un analogue non-paramétrique du test ANOVA (analyse de la variance). L'analyse a été réalisée dans le but de détecter une tendance dans la distribution globale des acides gras entre les tissus de l'hôte (épiderme et gastroderme), et les symbiotes. Le test a été effectué avec le logiciel PRIMER 5, les différences sont considérées comme significatives pour  $P < 0,05$ .

c) *AFC*

Une AFC (Benzécri 1973) a été réalisée entre les tissus de l'hôte afin d'analyser la covariation de leurs lipides polaires. L'analyse a été exécutée à partir d'une matrice de données réduite (données transformées en ArcSinus) avec le logiciel SPAD 3.0. Les acides gras ont été utilisés en tant que variable, et les tissus (épiderme et gastroderme) en tant qu'observations. Les cellules de *Symbiodinium* ont été ajoutées comme observations supplémentaires, c'est-à-dire qu'ils sont projetés graphiquement mais n'influent pas sur les calculs d'axes factoriels. Les distances entre les acides gras ont été calculées avec la métrique du  $\chi^2$  qui permet d'observer sur un même plan les variables et les observations.

d) *HCA*

Une HCA a été réalisée (méthode de Ward, distance Manhattan) afin d'agglomérer l'épiderme, le gastroderme et les *Symbiodinium* à partir de leur contenu en acides gras polaires. L'analyse a été réalisé avec le logiciel R 2.15.2 et le package FactoMineR (Lê 2008).

## IV. Induction d'un stress

### 1. *Stress thermique et chimique*

Un stress a été induit simultanément selon deux méthodes différentes : par augmentation de la température de l'eau de mer de  $10\pm 1^\circ\text{C}$ , et par ajout de menthol. Sept individus ont été placés individuellement dans des béciers de 5 L pendant 7 jours avant le début de l'expérience, dans les conditions décrites dans la [partie I.2.a p. 215 de ce chapitre](#), sans être nourris.

- *Stress température* : 3 individus ont ensuite été soumis à un stress par augmentation de la température de l'eau de mer de  $10\pm 1^\circ\text{C}$  (température finale :  $29\pm 1^\circ\text{C}$ ). L'eau des bacs est renouvelée tous les jours. Les conditions de température sont maintenues jusqu'à 22 jours puis la température est abaissée à la température contrôle jusqu'à la fin de l'expérience (59<sup>ème</sup> jour).

- *Stress menthol* : 3 individus ont été soumis à un stress par ajout de menthol. Le protocole est adapté des travaux de Wang et al. 1992 pour *A. viridis* et réalisé comme suit : le menthol est dilué à 20% dans l'éthanol et ajouté dans les béciers pour une concentration de menthol dans l'eau finale de 0,58 mM. Les individus sont maintenus ainsi 8h par jour (de 10h à 18h). L'opération est répétée tous les jours pendant deux cycles de 5 jours. Après 22 jours, les individus sont placés sous des cloches opaque afin d'occulter la lumière 24h/24h, puis à nouveau nourris dans les conditions décrites dans la [partie I.2.a p. 215 de ce chapitre](#).

- *Témoin négatif* : 3 individus ont été placés dans des conditions identiques sans être soumis à un stress (thermique ou chimique). Ils ont été maintenus sans être nourris et les mêmes prélèvements ont été réalisés afin d'évaluer une possible réponse due (1) à un stress nutritionnel et (2) à un stress induit par la coupe.

L'échantillonnage a été réalisé comme suit ([Figure 102](#)) :

- $T_0$  : 12 tentacules ont été prélevés sur chaque individu juste avant l'induction du stress. 10 sont destinés à l'acquisition des empreintes chimiques, 1 à la réalisation de coupes pour l'imagerie par spectrométrie de masse, et 1 pour la quantification de la densité de symbiotes
- $T_1, T_5, T_{10}, T_{15}, T_{22}$  : un tentacule a été prélevé à chaque temps pour la réalisation de coupes destinées aux analyses d'imagerie par spectrométrie de masse, et 1 pour la quantification de la densité de symbiotes
- $T_{59}$  : 10 tentacules sont prélevés pour l'acquisition des empreintes chimiques, 1 pour la réalisation de coupes, et 1 pour la quantification de la densité de symbiotes.

L'ensemble des tentacules prélevés ont été immédiatement traités selon le protocole exposé dans la Figure 97.

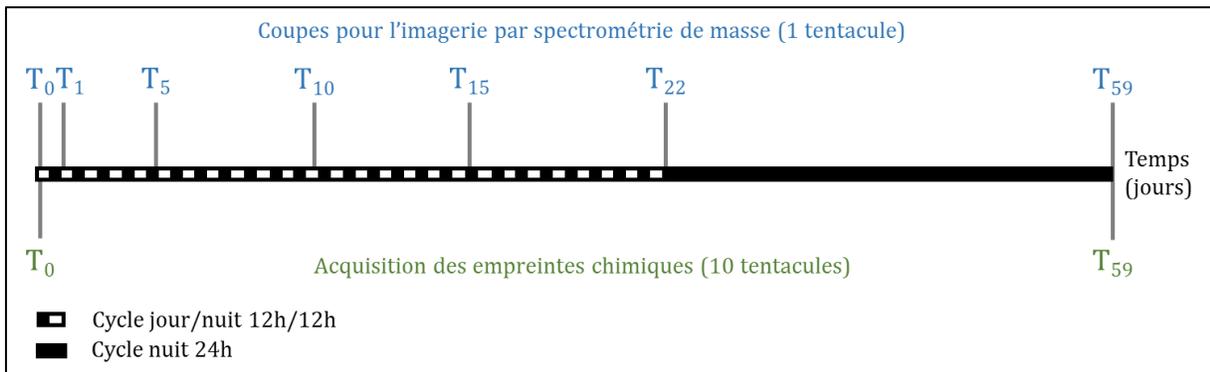


Figure 102 Méthodologie d'échantillonnage des tentacules d'anémones *A. viridis* soumises à un stress thermique ou chimique.

## 2. Stress thermique ajusté pour l'étude lipidomique

Cinq individus ont été placés 7 jours avant le début de l'expérience dans des aquariums de 30L, dans les conditions décrites dans la partie I.2.a de ce chapitre, sans être nourris. Sur les 5 anémones, 4 ont ensuite été soumises à un stress par augmentation de la température de l'eau de mer de  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  (température finale :  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ ), et une a été maintenue dans les mêmes conditions sans modification de la température de l'eau de mer. Le prélèvement des tentacules est réalisé comme suit (Figure 103) :

- $T_0$  : 20 tentacules ont été prélevés sur chaque individu juste avant l'induction du stress.
- $T_1, T_5$  : 20 tentacules ont été prélevés sur chaque individu 24h, puis 5 jours après l'induction du stress.

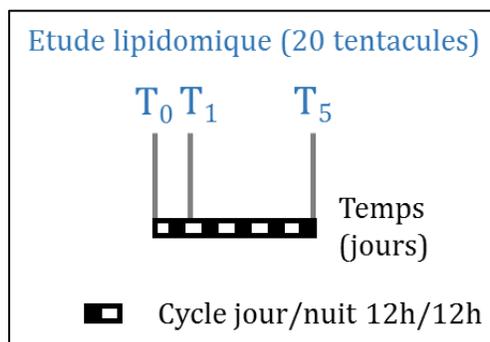


Figure 103 Méthodologie d'échantillonnage des tentacules d'anémones *A. viridis* soumises à un stress thermique pour l'étude lipidomique.

### 3. Quantification de la densité en symbiotes

Un tentacule est prélevé à chaque temps, homogénéisé dans un tampon phosphate. Un aliquot de l'homogénat a été prélevé pour évaluer la densité de *Symbiodinium* par comptage à l'aide d'un hémocytomètre de Neubauer (une lamelle de verre quadrillée utilisée pour le comptage de cellules par microscopie optique). Son nom vient du fait qu'il était utilisé à l'origine pour compter les cellules sanguines. La densité de *Symbiodinium* est alors exprimée en nombre de cellules par mg de poids sec.

### 4. Inclusion et coupe des tentacules

Un tentacule est prélevé à chaque temps défini (Figure 102), puis une inclusion est réalisée dans une solution à 4% de carboxyméthylcellulose (CMC ; Sigma). Des cryocoupes de tentacule de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont préparées. Chaque coupe est ensuite déposée sur une lame ITO (une lame de verre recouverte d'oxyde d'indium dopé à l'étain). Avant l'analyse, la coupe est recouverte d'une matrice préparée comme suit : 20 mg d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB, Sigma) sont dilués dans 1 mL à d'un mélange eau/méthanol 30:70 (v/v). La solution de matrice est passée aux ultrasons 5 min puis vortexée 2 min. La solution est ensuite chargée dans la seringue du nébuliseur (sprayer) manuel pour dépôt de matrice sur la coupe. Le sprayer est une source d'électrospray dont la fonction a été détournée. Il est dirigé, pendant 6 minutes, de haut en bas et de gauche à droite de la coupe. Le débit de solution de matrice est fixé à 300  $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Les lames sont ensuite séchées sous vide puis conservées à  $-80^\circ\text{C}$  avant analyse.

## **Annexes**

---



## Annexe 1 : extraits bruts organiques d'*A. viridis*

### Chromatogrammes DEDL d'extraits bruts organiques d'anémones de mer *A. viridis*.

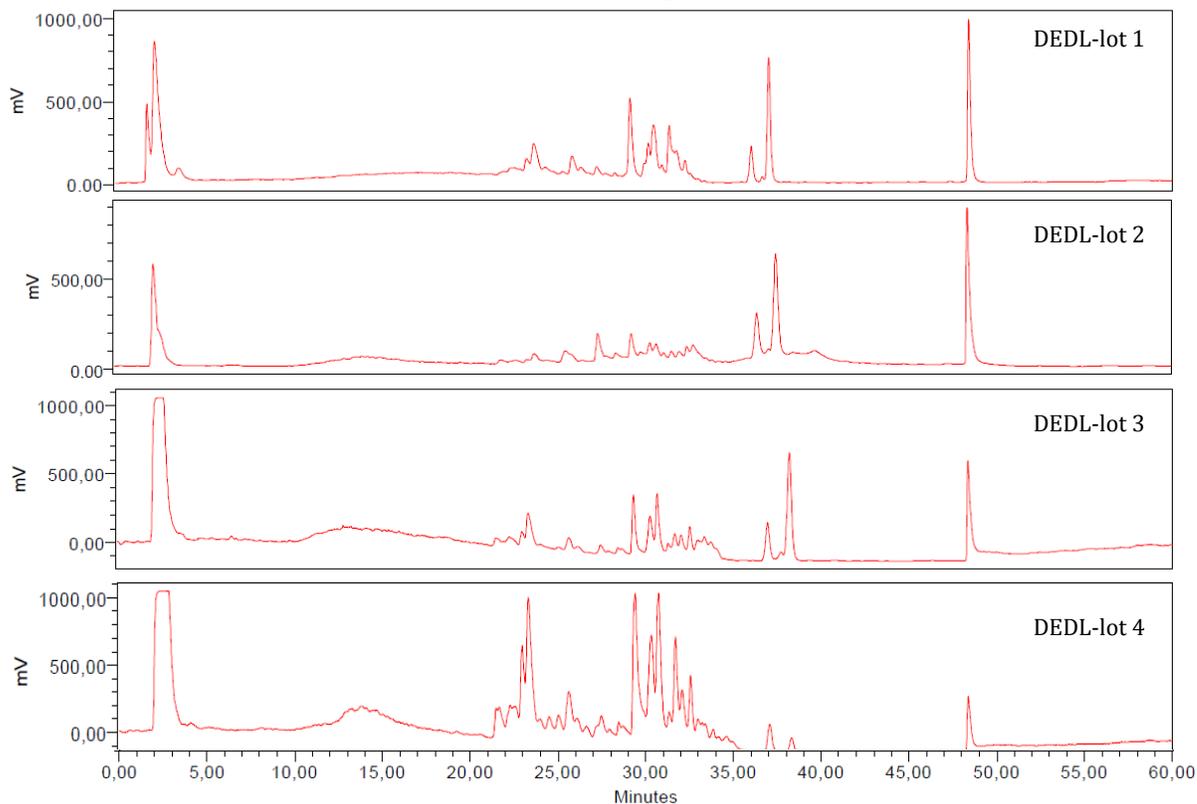


Figure 104 Comparaison de chromatogrammes DEDL obtenus à partir de l'extrait brut organique issu de 4 lots d'anémones. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

## Annexe 2 : extraits bruts organiques de *Symbiodinium* en culture

### Chromatogrammes DEDL d'extraits bruts organiques de cellules de *Symbiodinium* en culture.

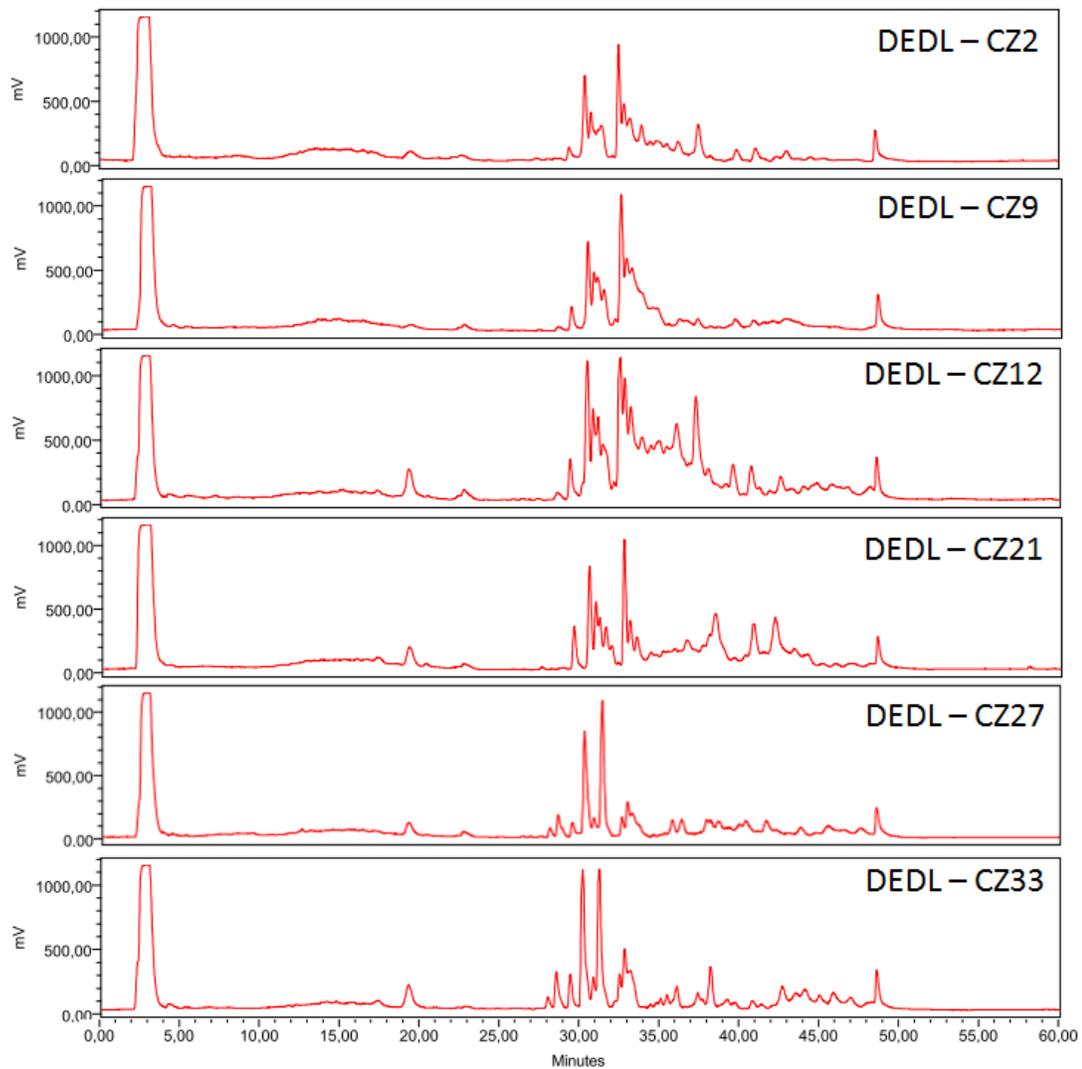


Figure 105 Comparaison de chromatogrammes DEDL obtenus à partir de l'extrait brut organique issu de 6 lots de cellules de *Symbiodinium* mises en culture. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min ; retour aux conditions initiales de 35 à 60 min.

### Annexe 3 : spectres RMN (1D, 2D) Du composé 1

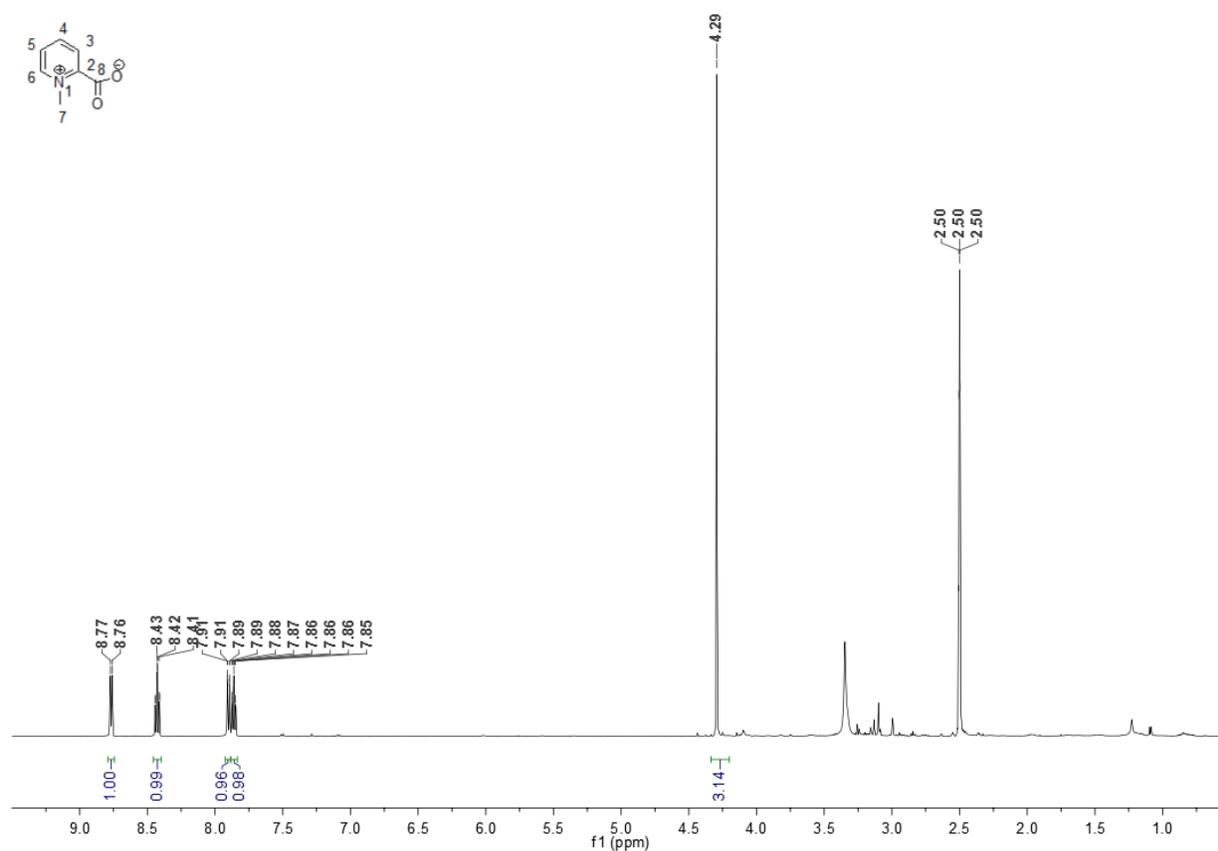


Figure 106 Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) du composé 1

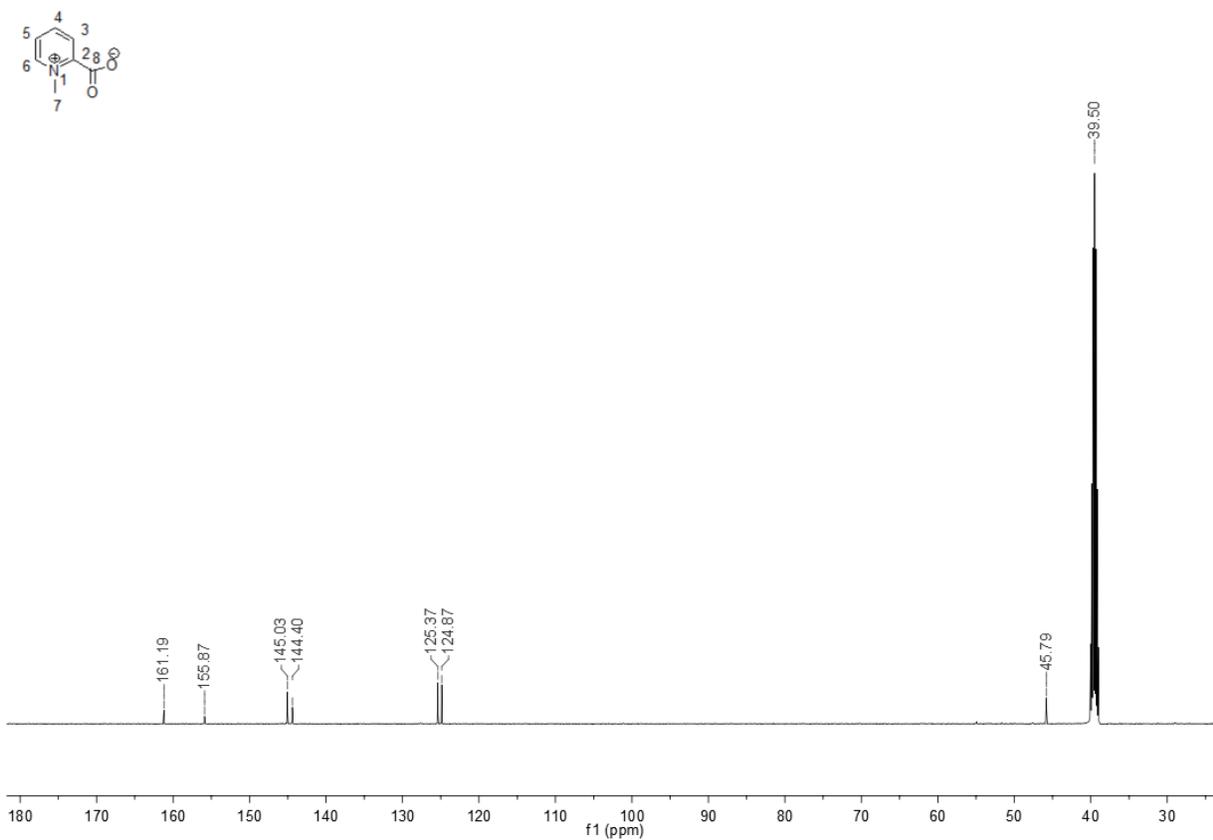


Figure 107 Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) du composé **1**.

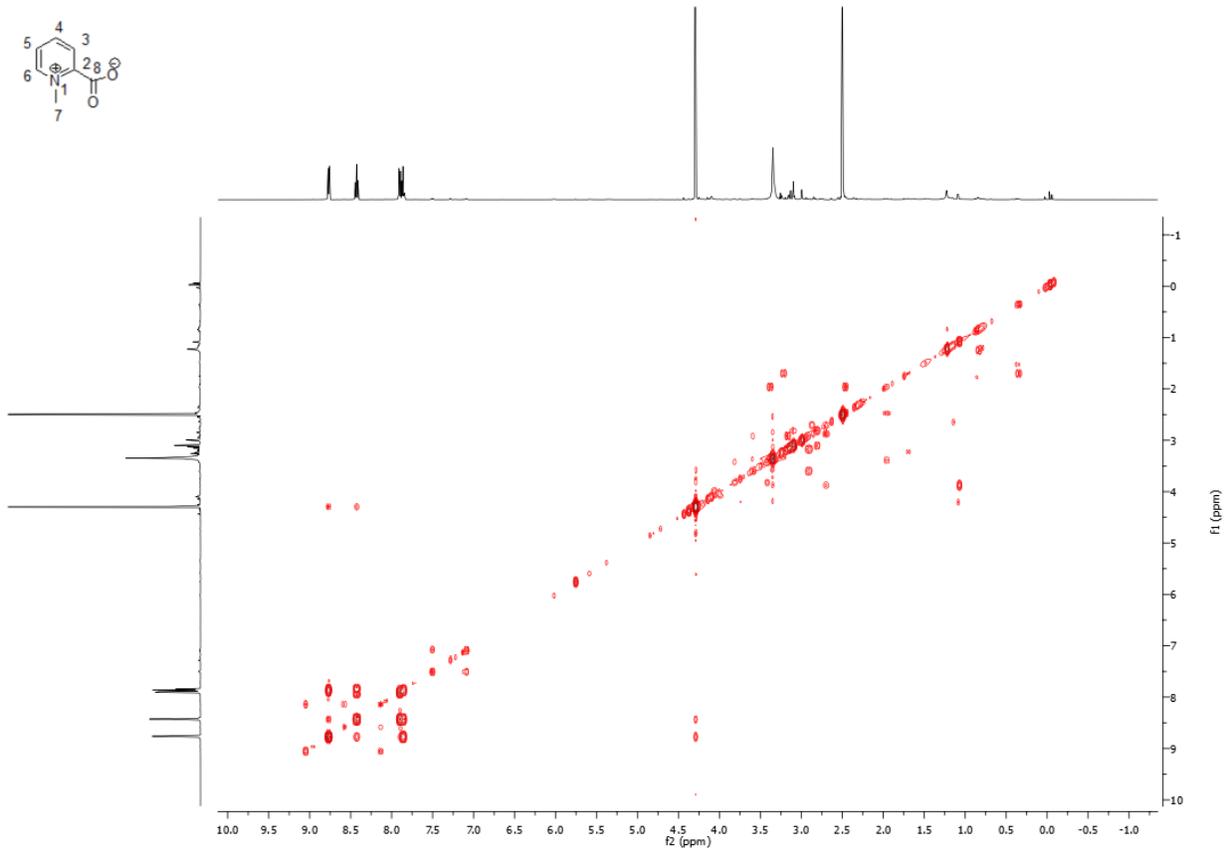


Figure 108 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) du composé **1**.

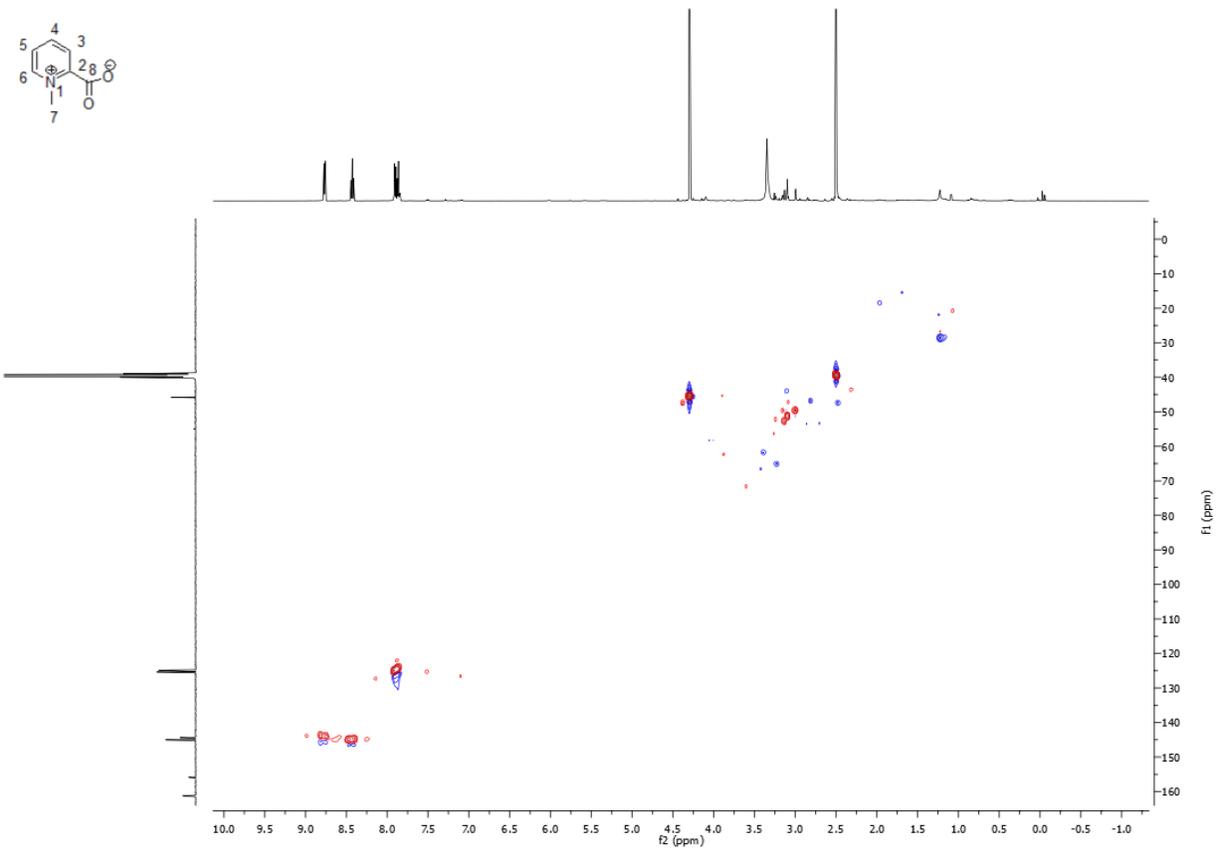


Figure 109 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (DMSO- $d_6$ ) du composé 1.

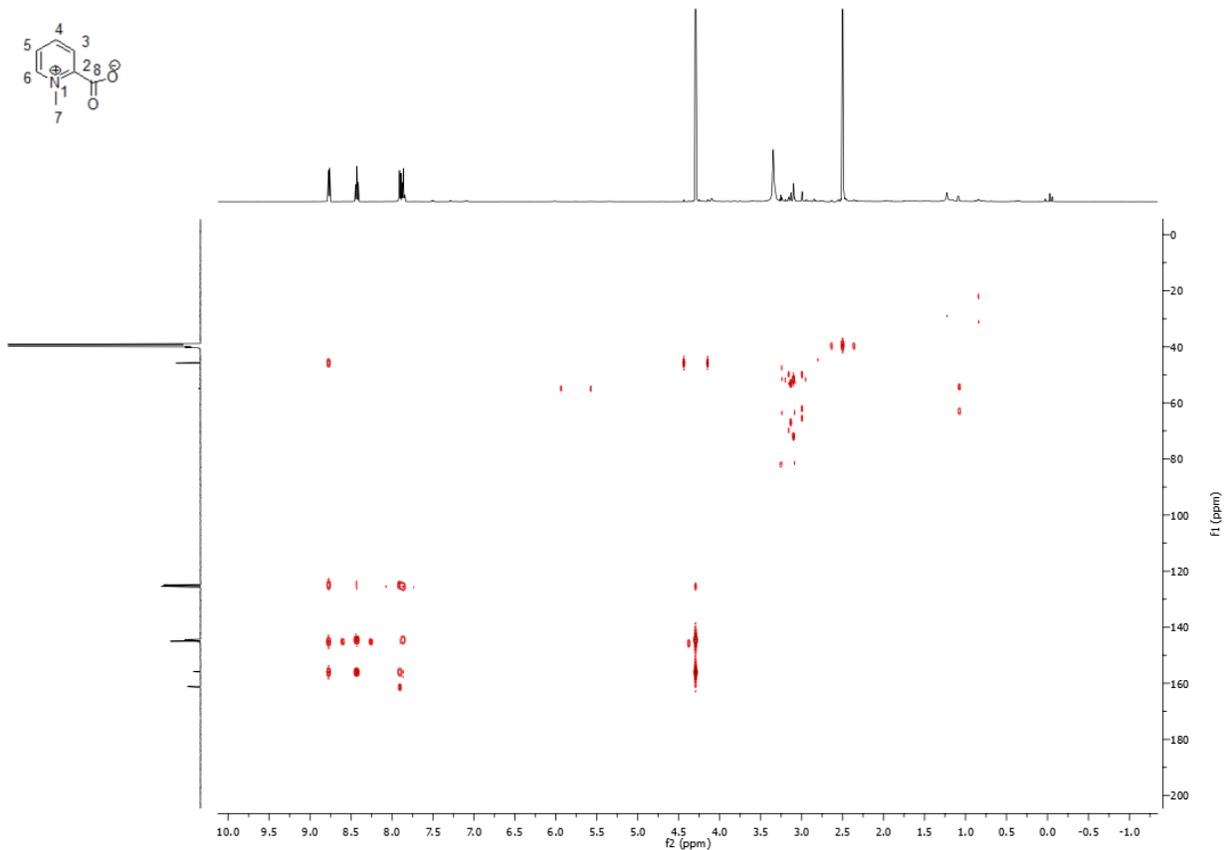


Figure 110 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{DMSO}-d_6$ ) du composé **1**.

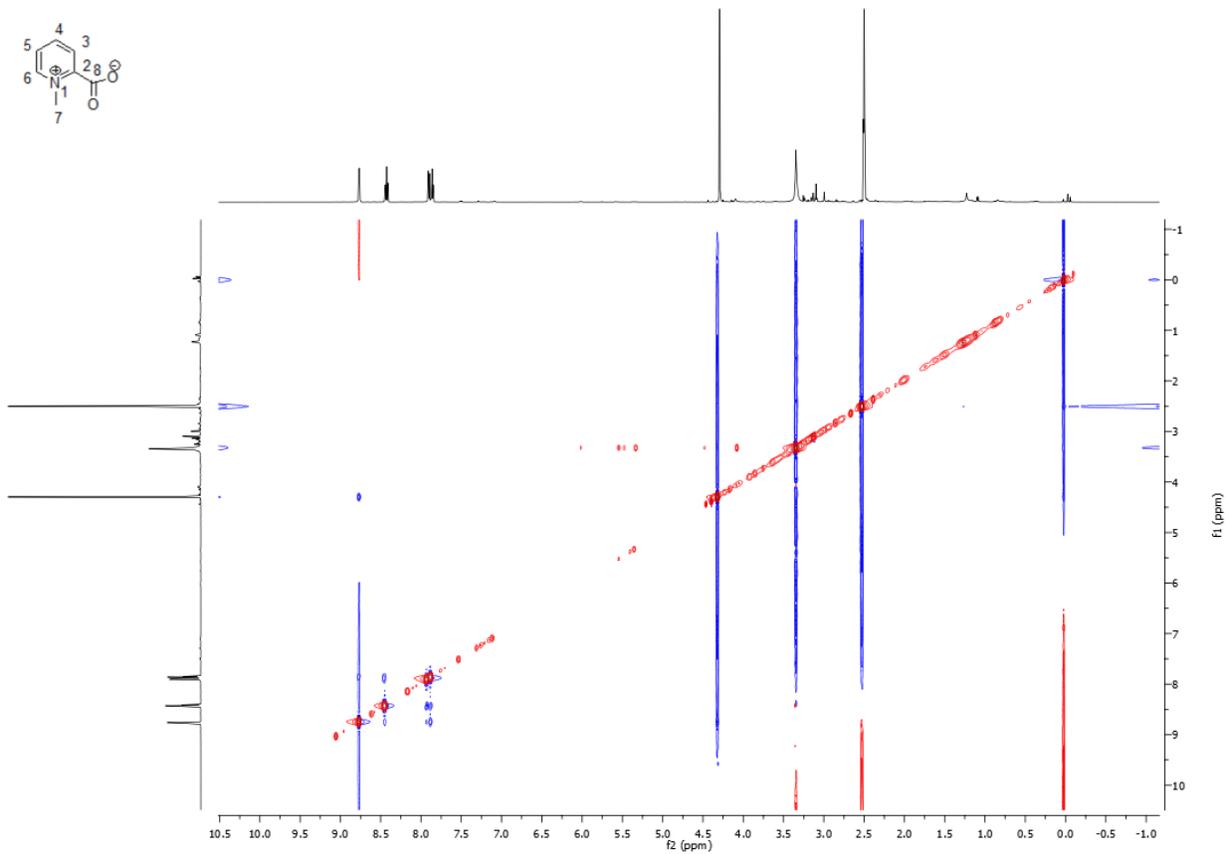


Figure 111 Spectre RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY (DMSO-*d*<sub>6</sub>) du composé **1**.

## Annexe 4 : spectres RMN (1D, 2D) Du composé 2

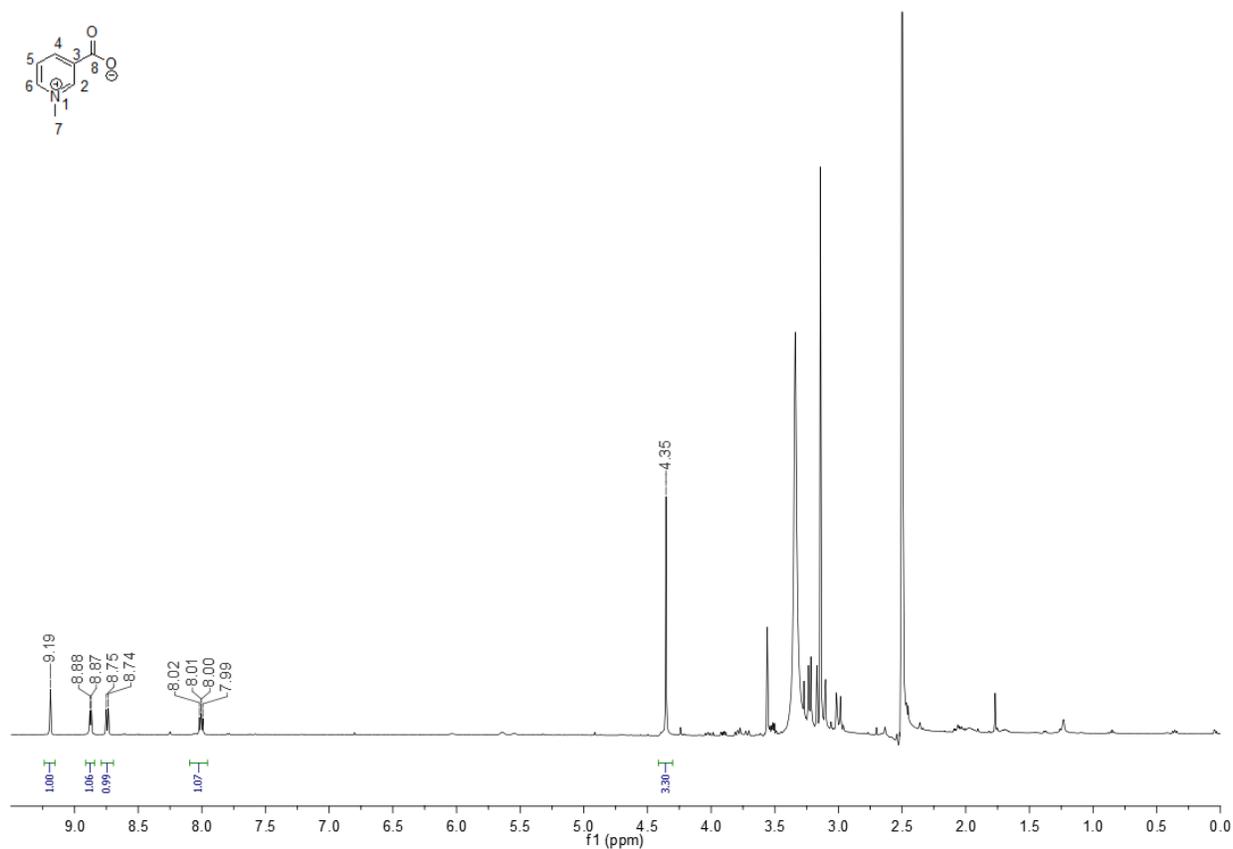


Figure 112 Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) du composé 2

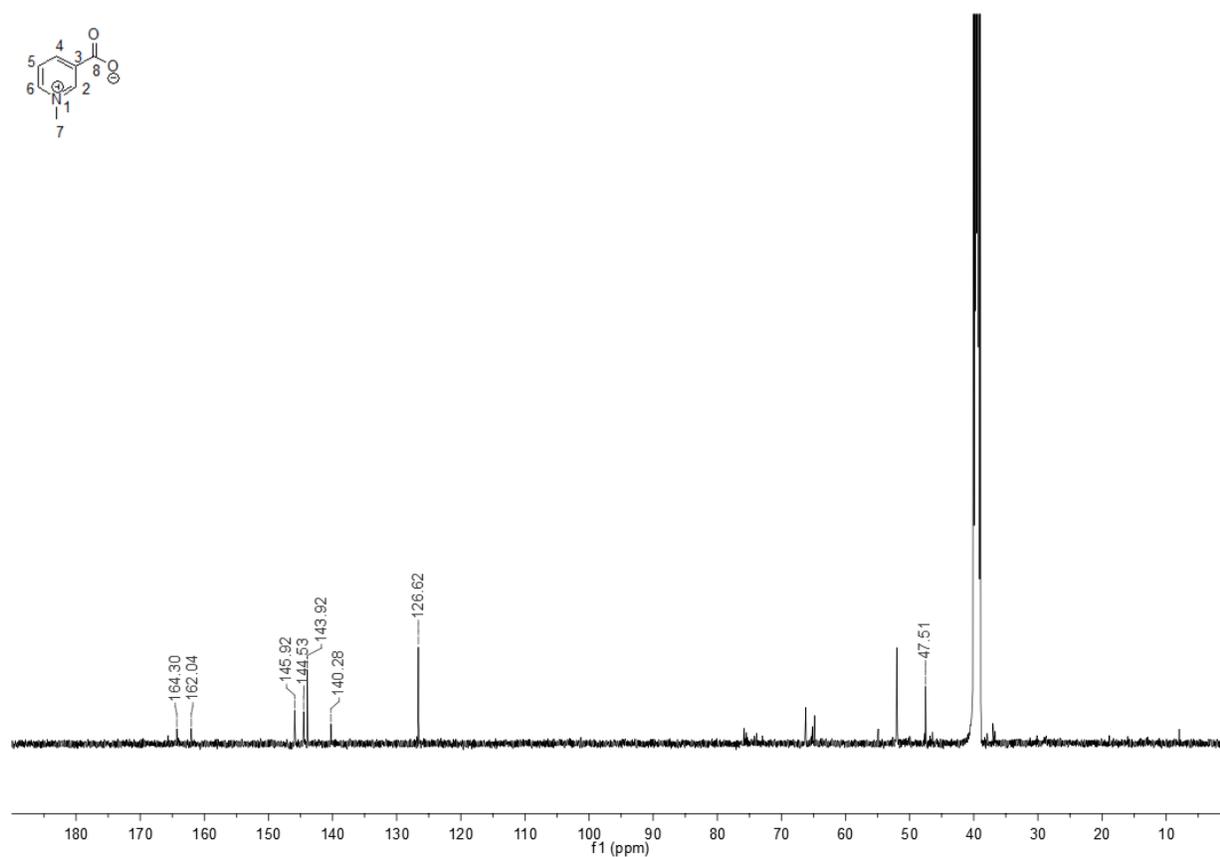
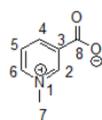


Figure 113 Spectre RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz) du composé 2

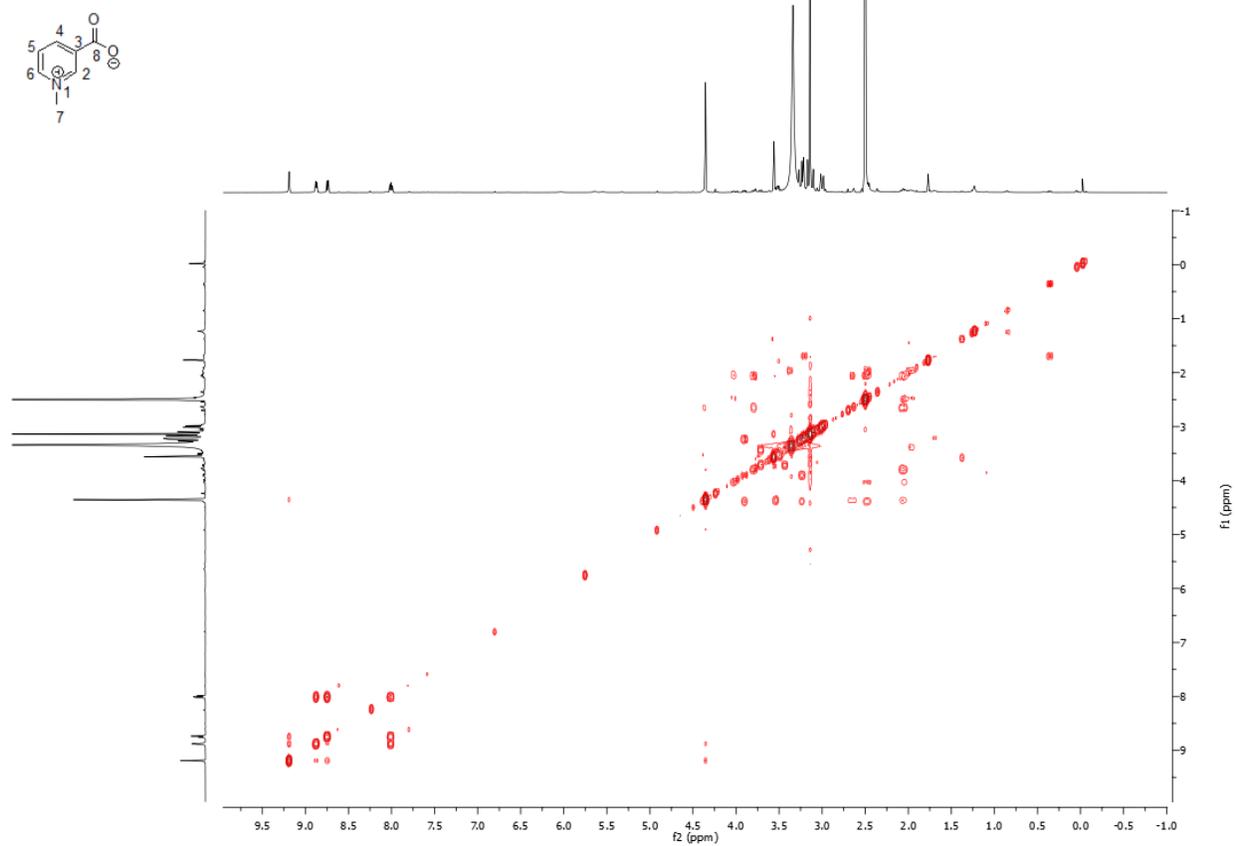


Figure 114 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (DMSO- $d_6$ ) du composé 2

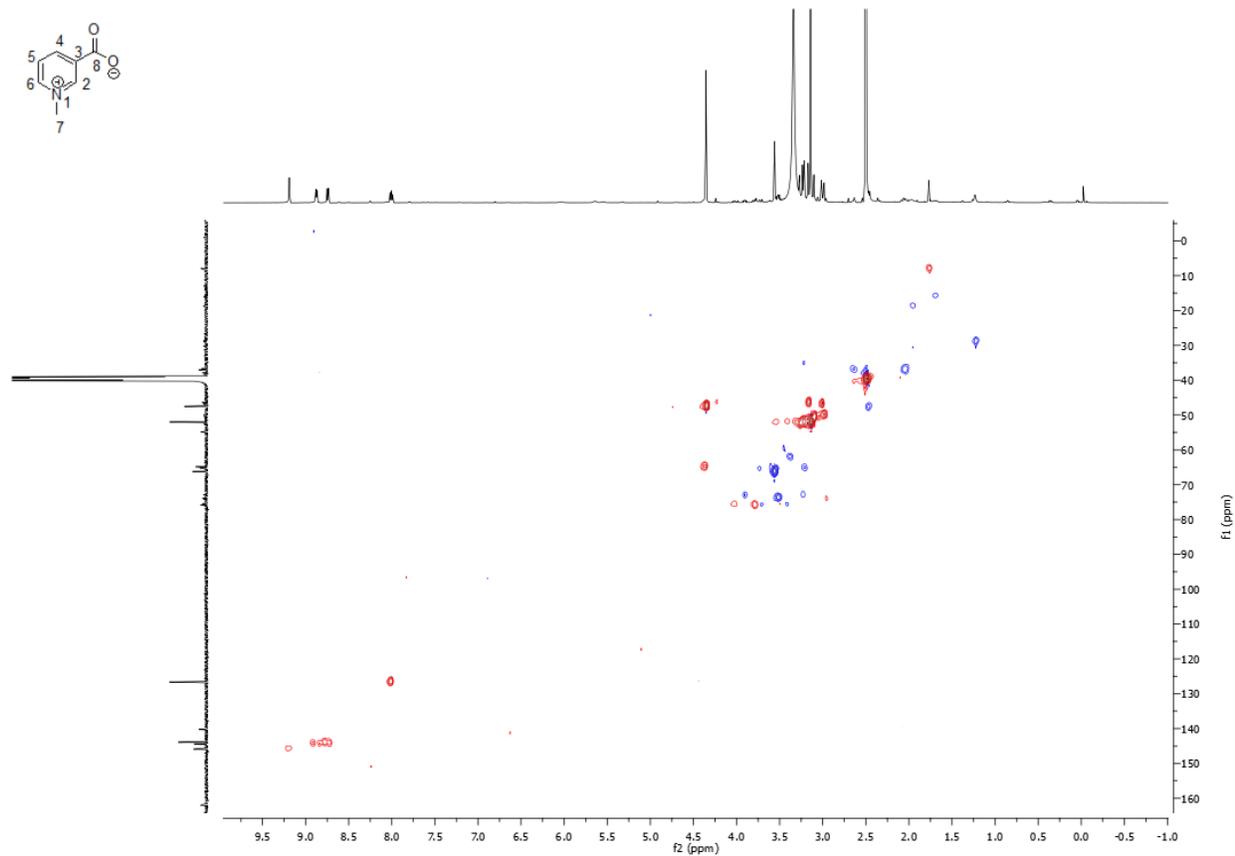


Figure 115 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (DMSO- $d_6$ ) du composé 2

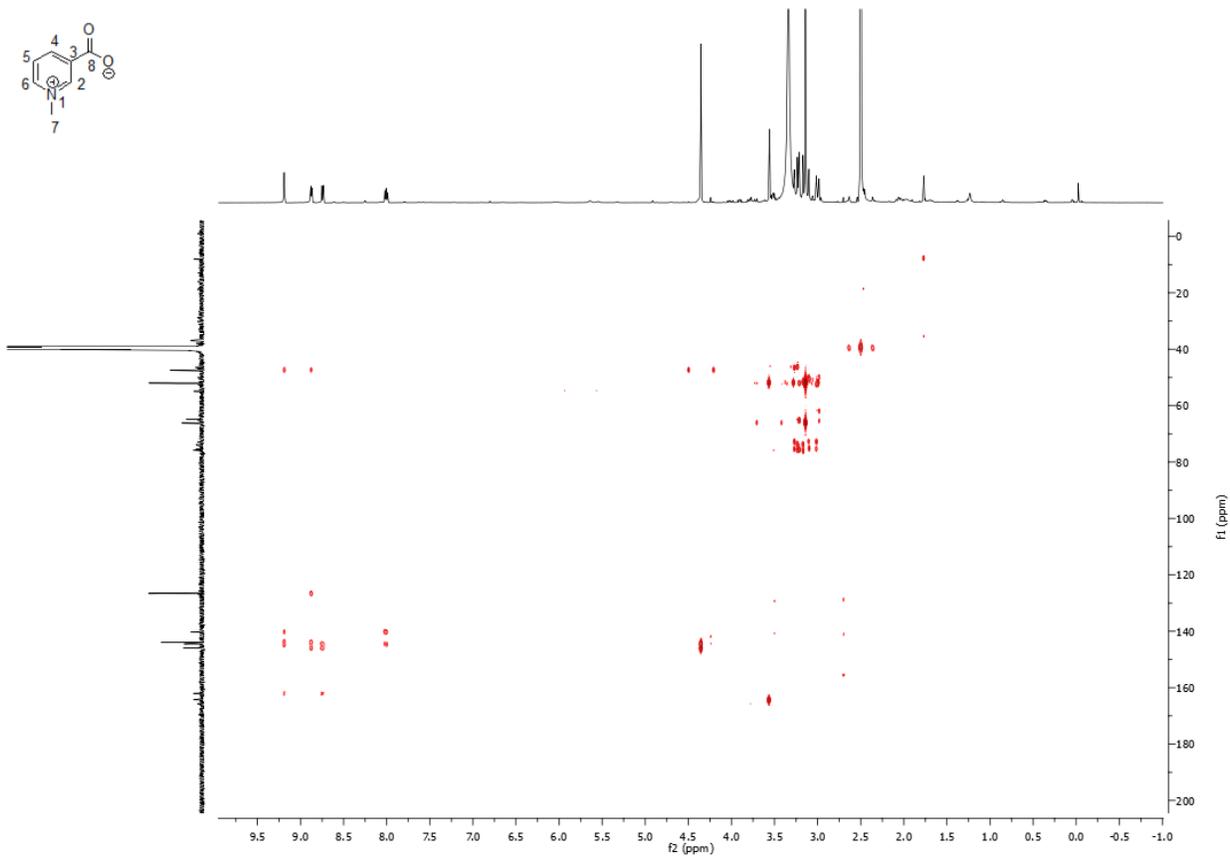


Figure 116 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{DMSO-}d_6$ ) du composé 2

## Annexe 5 : Spectres RMN (1D, 2D) Du composé 3

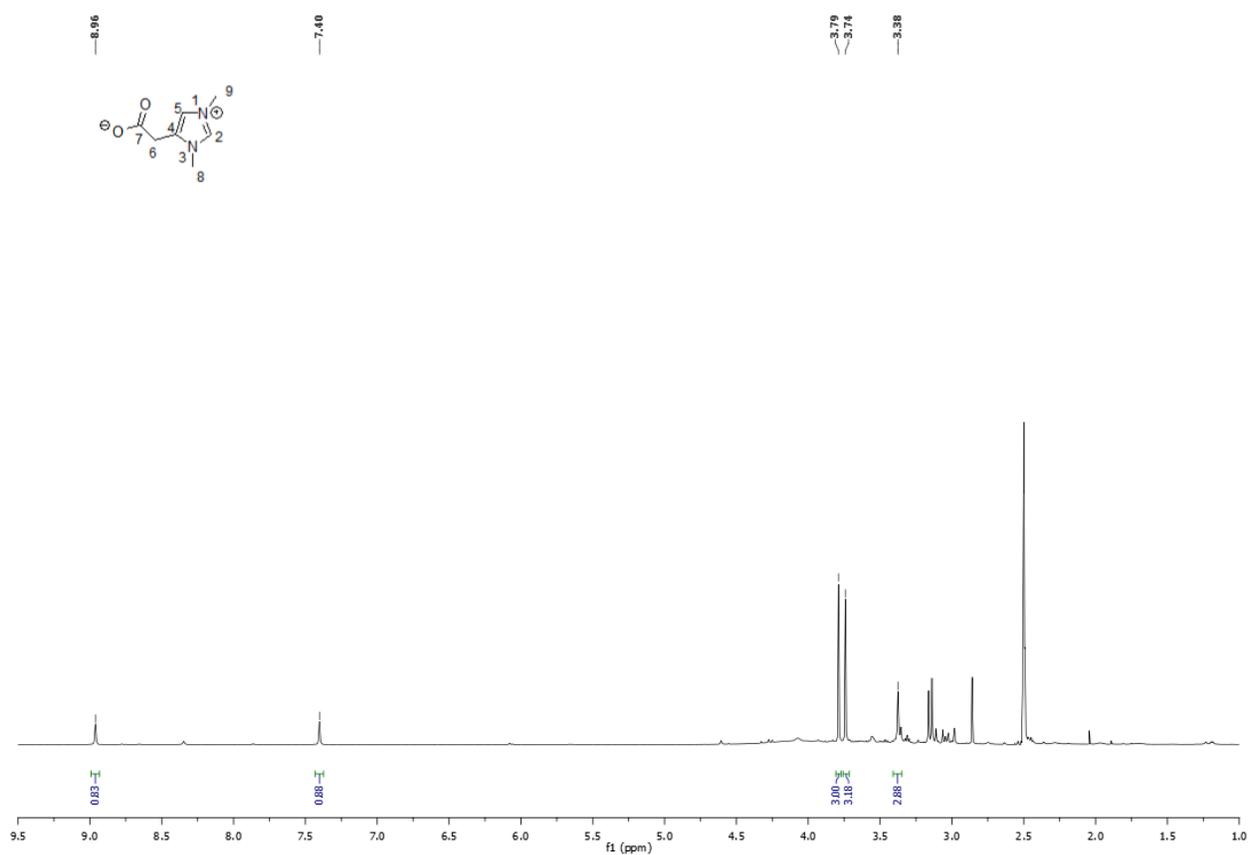


Figure 117 Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) du composé 3

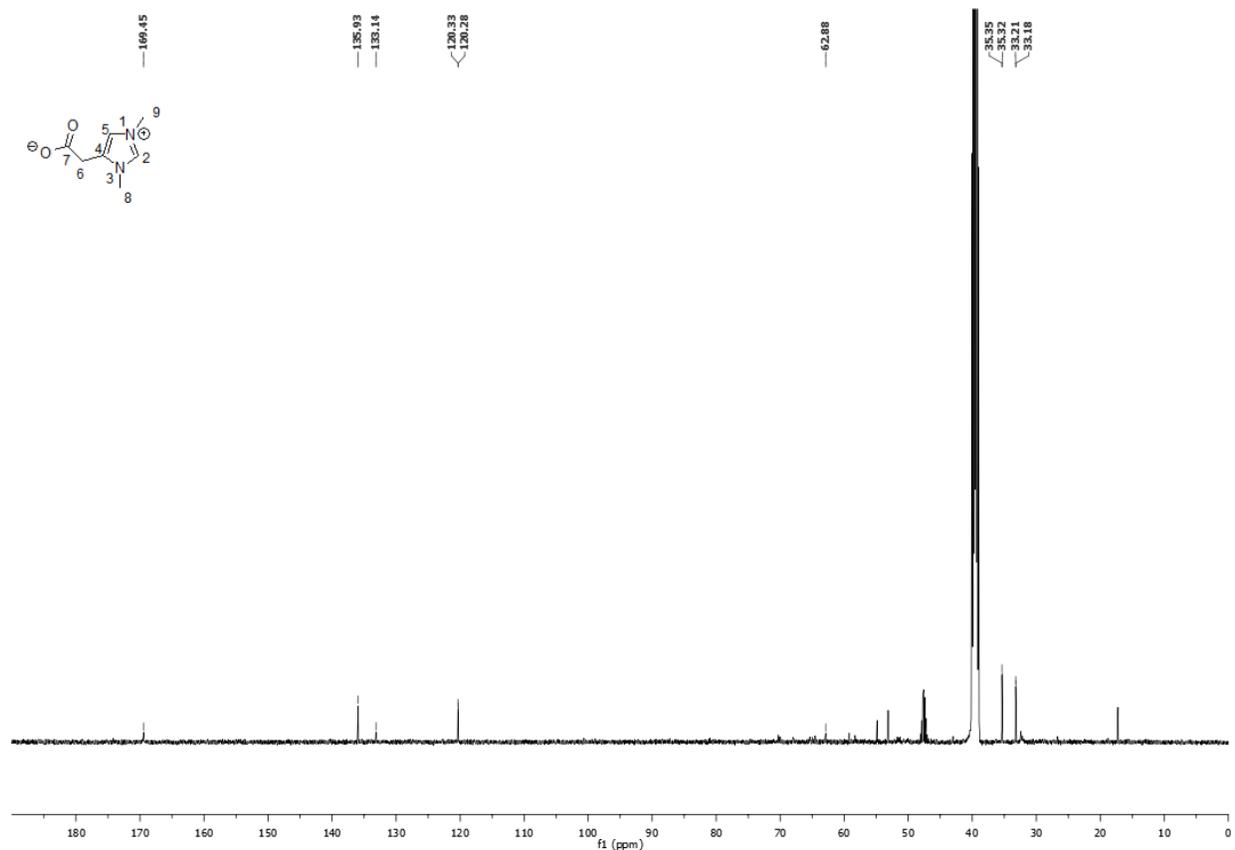


Figure 118 Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) du composé 3

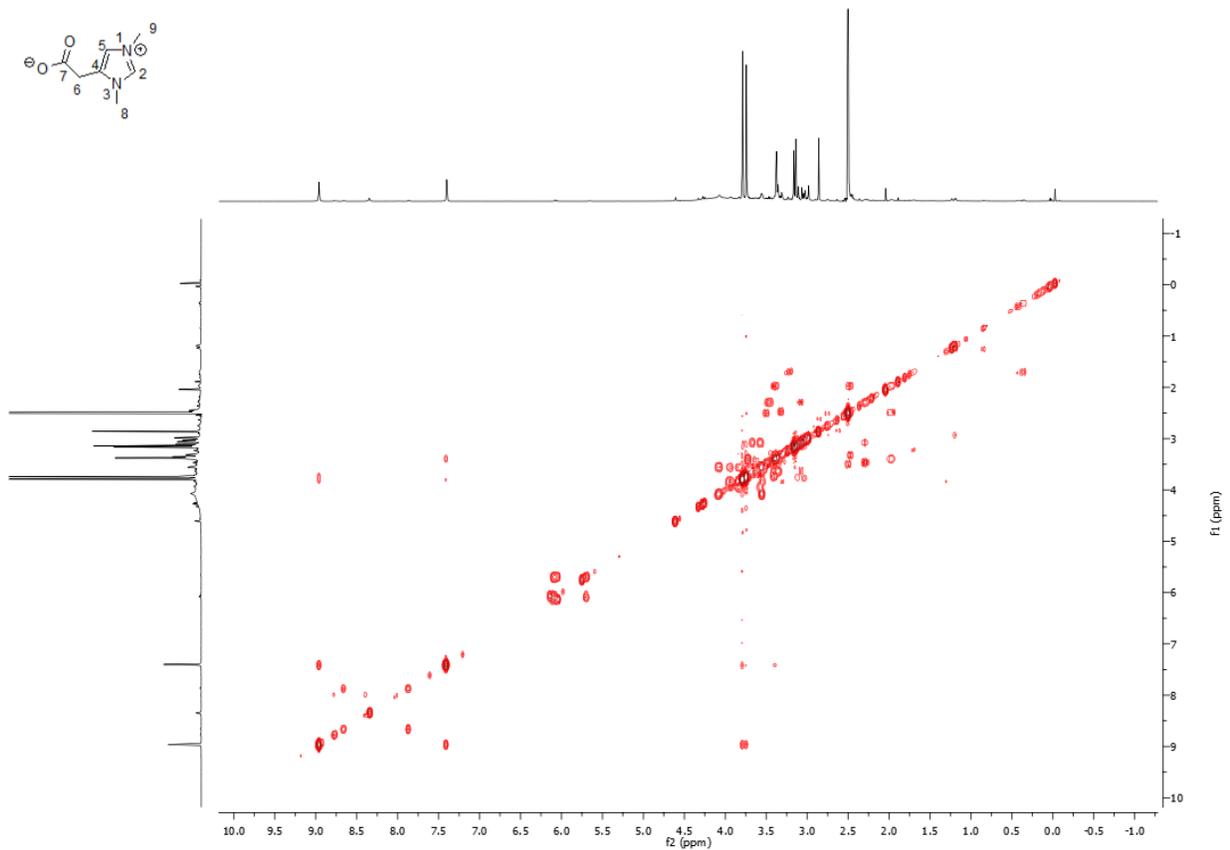


Figure 119 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) du composé 3

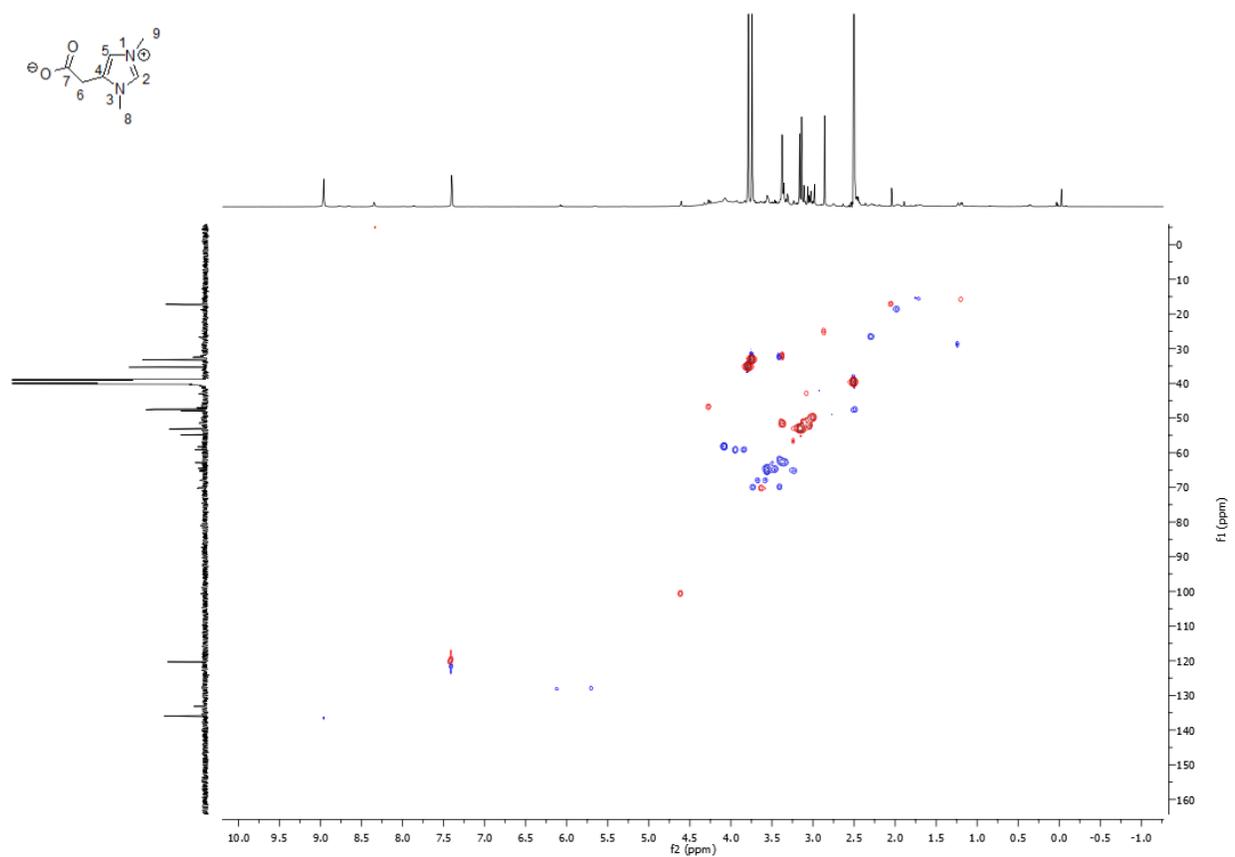


Figure 120 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC ( $\text{DMSO}-d_6$ ) du composé 3

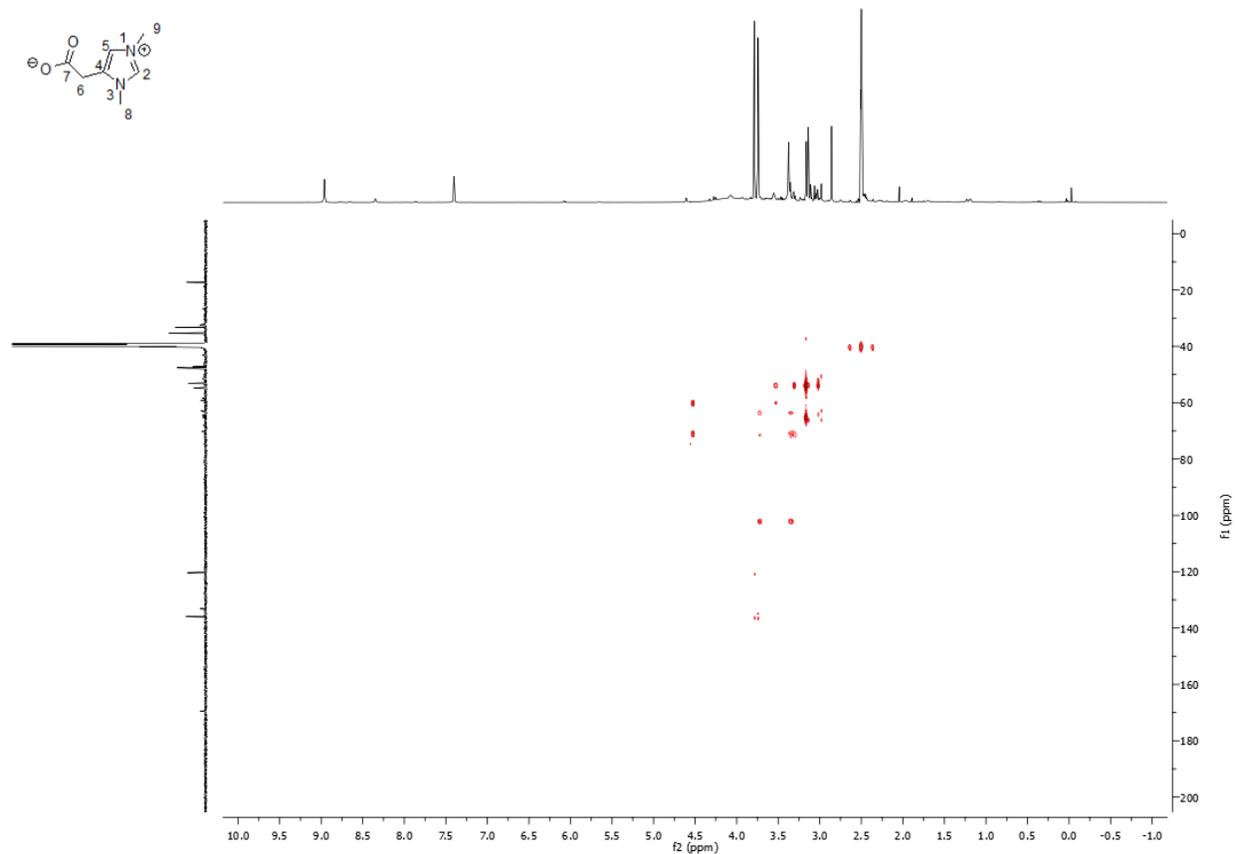


Figure 121 Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (DMSO- $d_6$ ) du composé 3

## Annexe 6 : évolution des empreintes chimiques au cours d'un stress

- a. Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) avant ( $T_0$ ) et après ( $T_F$ ) un stress thermique.

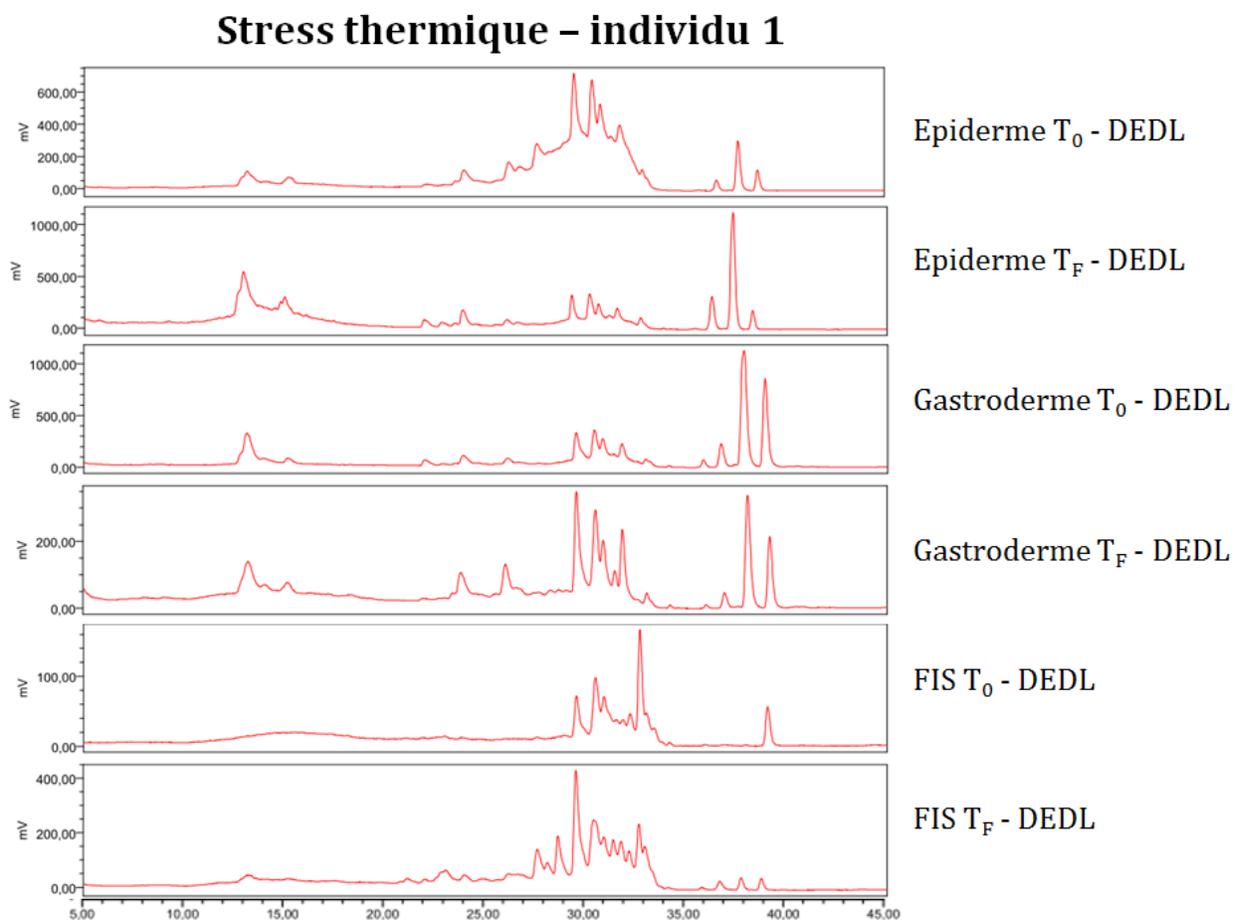


Figure 122 Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) de l'individu 1 avant ( $T_0$ ) et après ( $T_F$ ) un stress thermique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl- $C_{18}$ , 250x4,6 mm). Elution : phase mobile  $H_2O+0,1\%HCOOH/CH_3CN+0,1\%HCOOH$ , 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min.

## Stress thermique - individu 2

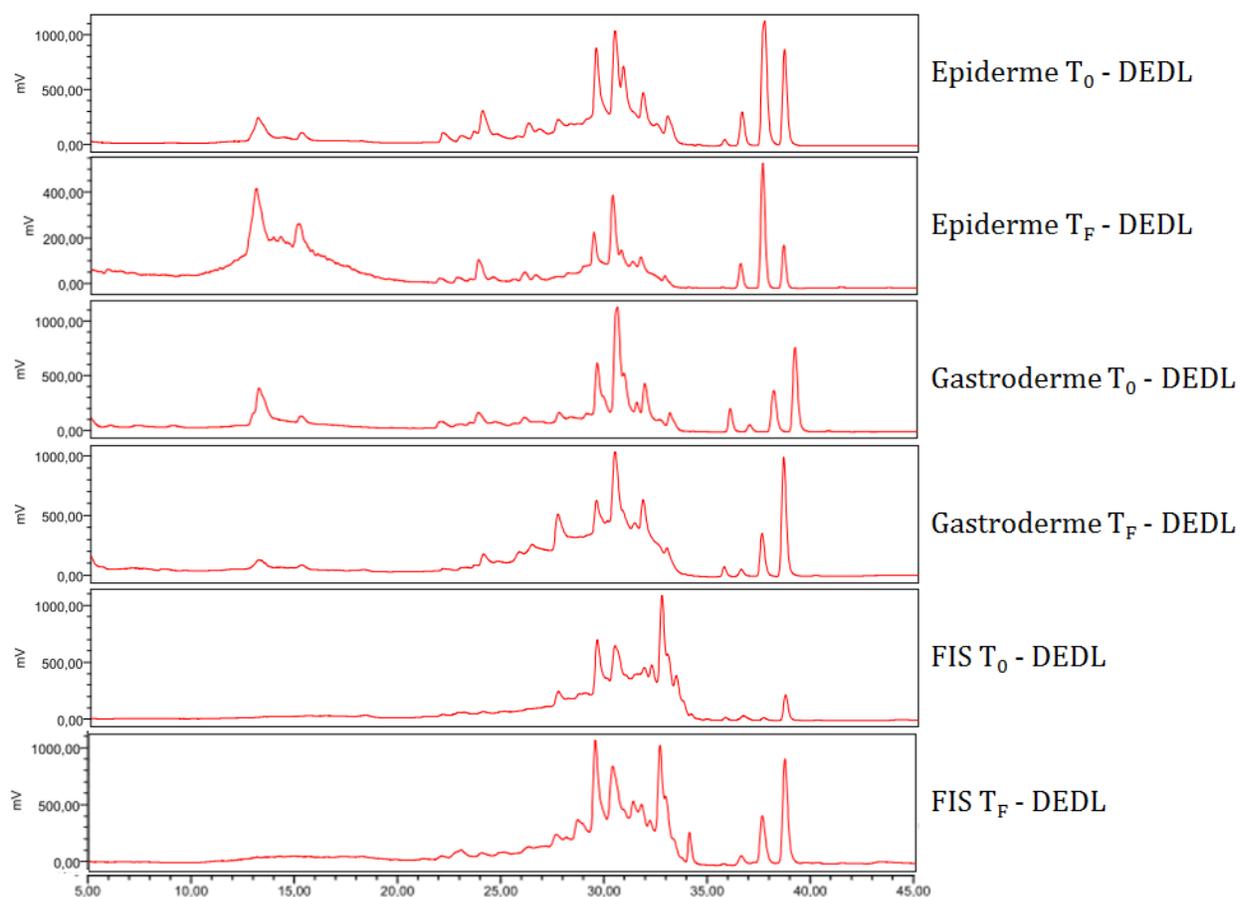


Figure 123 Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) de l'individu 2 avant (T<sub>0</sub>) et après (T<sub>F</sub>) un stress thermique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min.

**b. Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) avant (T<sub>0</sub>) et après (T<sub>F</sub>) un stress chimique.**

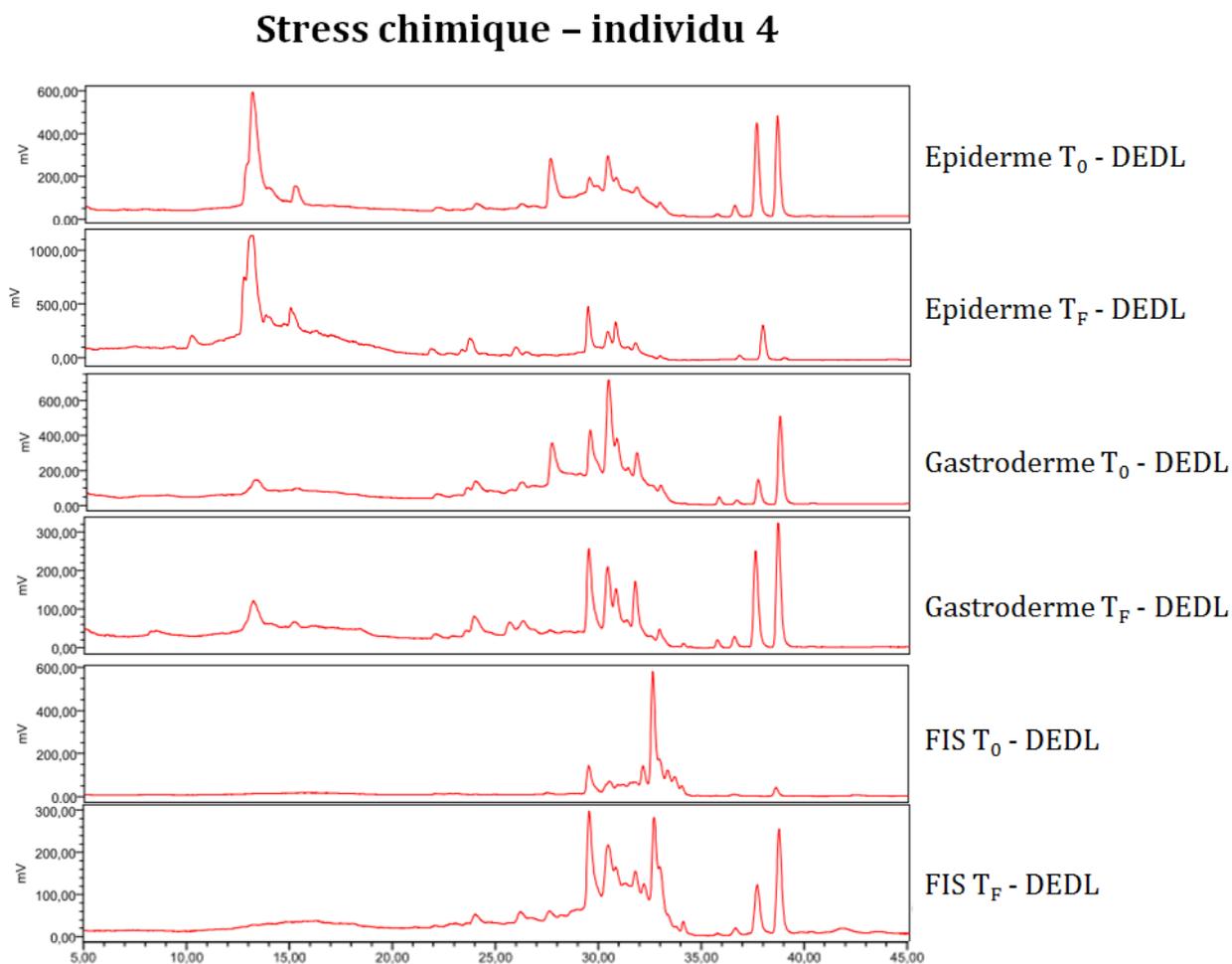


Figure 124 Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) de l'individu 4 avant (T<sub>0</sub>) et après (T<sub>F</sub>) un stress chimique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min.

## Stress chimique - individu 5

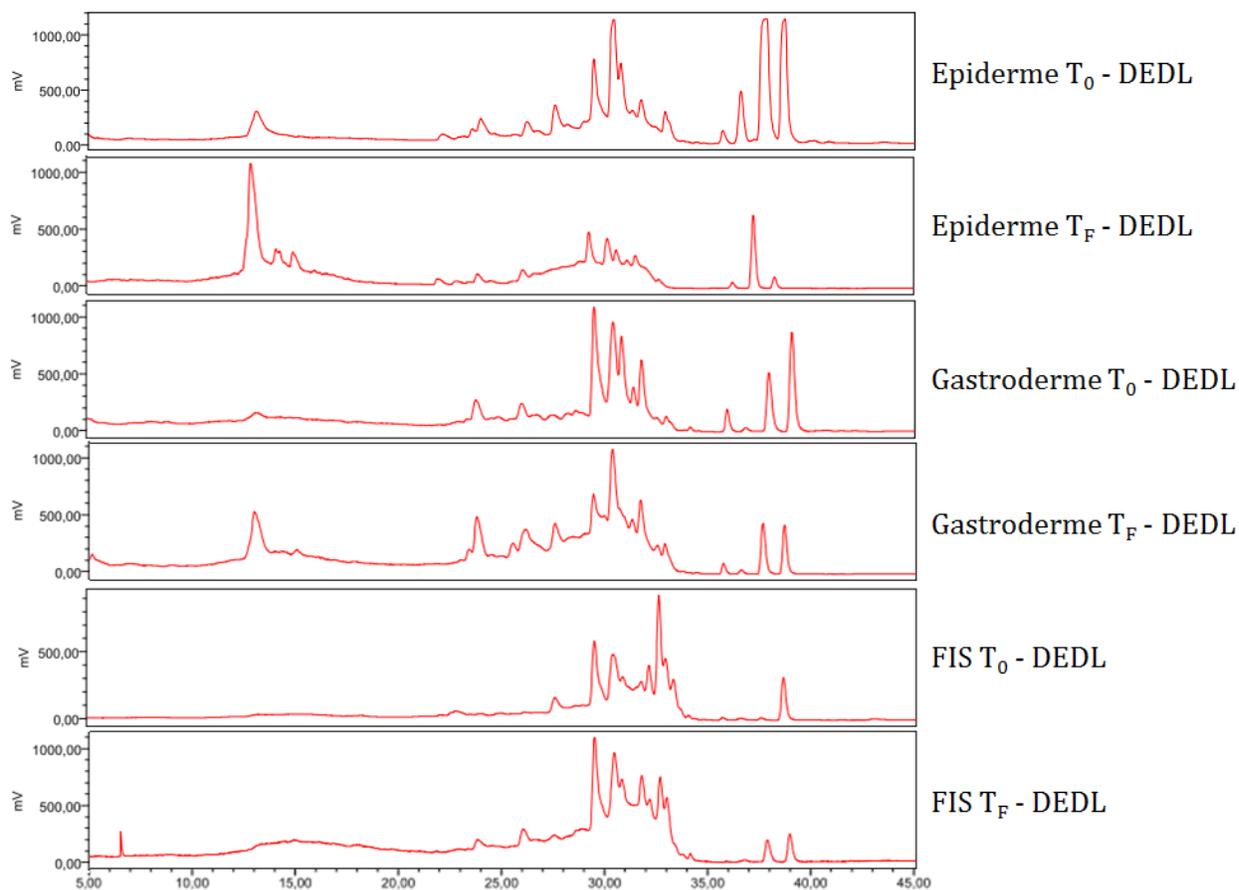


Figure 125 Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) de l'individu 5 avant (T<sub>0</sub>) et après (T<sub>F</sub>) un stress chimique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min.

## Stress chimique - individu 6

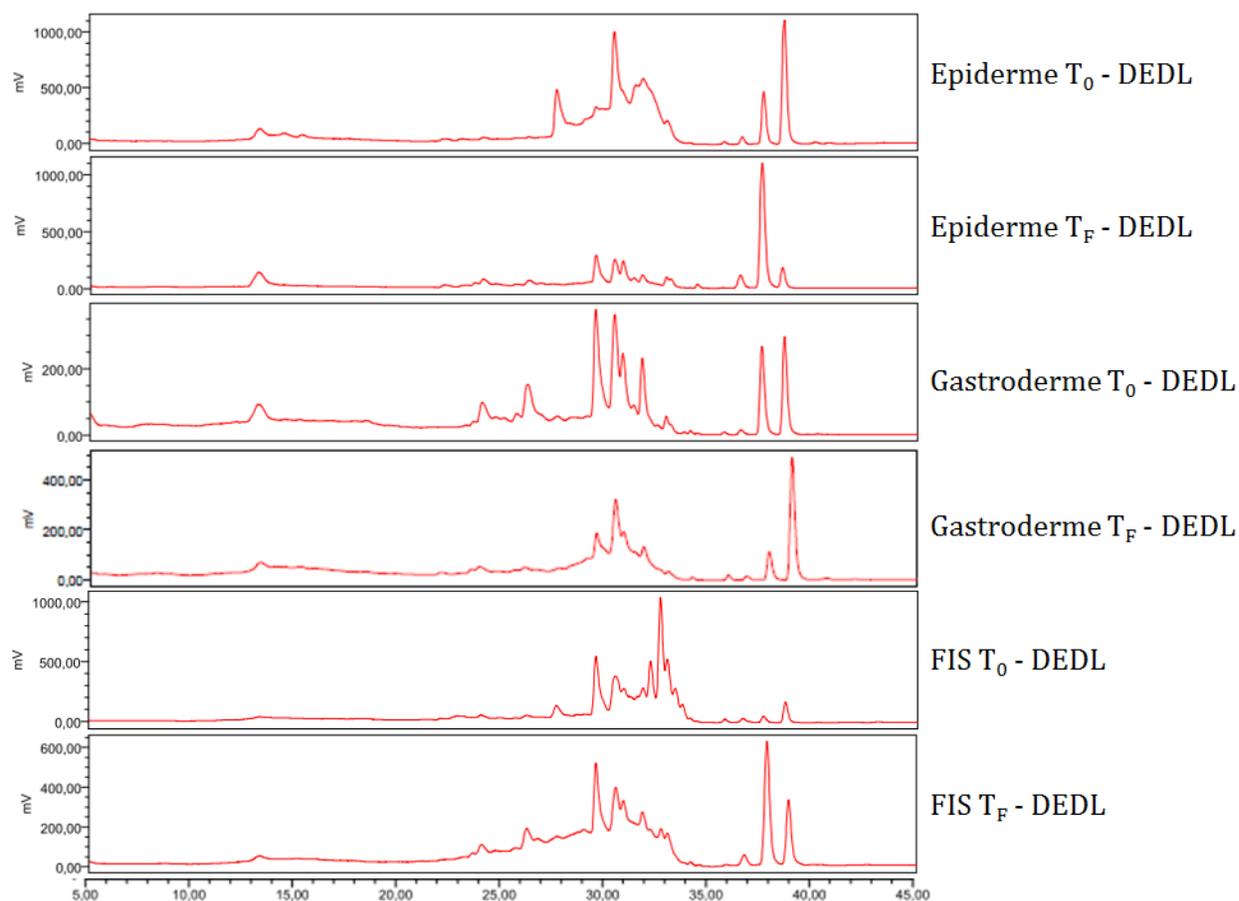


Figure 126 Chromatogrammes DEDL des extraits bruts organiques issus de l'épiderme, du gastroderme et des cellules de Symbiodinium fraîchement isolées (FIS) de l'individu 6 avant (T<sub>0</sub>) et après (T<sub>F</sub>) un stress chimique. Colonne Machery-Nagel Nucleodur Sphinx (phase phényl-C<sub>18</sub>, 250x4,6 mm). Elution : phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%HCOOH/CH<sub>3</sub>CN+0,1%HCOOH, 90:10 de 0 à 5 min puis de 90:10 à 0:100 en 30 min.

## Annexe 7 : acides gras au cours d'un stress thermique

### a. Quantité relative d'acides gras issus de lipides neutres au cours d'un stress thermique. Moy : moyenne ; SEM : erreur standard de la moyenne

	Epiderme						Gastroderme						Symbiodinium						
	T0		T1		T5		T0		T1		T5		T0		T1		T5		
	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	
12:0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14:0 iso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14:0	0,2	0,0	0,5	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,9	0,4	2,2	0,8	
14:1(n-5)	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	
15:0 iso	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	
15:0 aiso	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
15:0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	
15:1(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,3	0,2	
16:0 iso	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	
20:0 phytanate	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,5	0,4	
16:0	20,0	4,8	22,8	5,5	15,1	1,7	14,9	3,0	25,5	5,9	30,4	4,4	23,6	2,9	19,3	2,2	22,1	3,5	
16:1	0,8	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
16:1(n-7)	2,4	1,0	4,4	0,8	3,6	0,5	3,8	2,0	8,5	2,4	6,1	1,7	12,7	2,1	10,5	1,8	9,6	0,8	
16:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
16:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	
17:0 iso	0,5	0,1	0,8	0,1	1,2	0,1	0,1	0,0	0,3	0,1	0,6	0,1	0,1	0,0	0,3	0,1	0,5	0,1	
17:0 iso	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
16:2(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	
17:0 aiso	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	
16:2(n-4)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
17:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
20:0 4 Methyl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
17:1 iso	0,8	0,4	0,5	0,1	1,0	0,3	0,2	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1	0,7	0,2	
17:0	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,0	0,4	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	
16:3(n-4)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
17:1(n-7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	
17:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
18:0 iso	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
16:4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

16:4(n-1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	18,7	7,5	14,7	0,8	10,8	1,0	18,5	5,5	10,4	2,1	12,4	3,1	4,8	0,9	5,2	0,2	6,1	0,2
18:1(n-9)	5,5	0,8	6,8	0,6	6,5	0,6	10,1	0,7	12,0	0,6	9,9	0,7	10,6	2,2	10,7	0,4	8,5	0,2
18:1(n-7)	3,9	0,1	4,7	0,4	4,2	0,7	6,8	0,6	8,2	0,5	7,1	0,7	5,1	0,3	6,5	0,9	4,3	1,1
18:2	0,5	0,1	0,5	0,1	0,8	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1	0,3	0,2	0,3	0,0	0,5	0,0	0,4	0,1
18:1(n-5)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
19:0 iso	0,5	0,4	0,1	0,0	0,1	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2(n-6)	0,5	0,2	0,6	0,2	0,5	0,3	1,9	0,3	2,9	2,0	0,8	0,2	1,1	0,5	1,0	0,2	0,8	0,2
18:2(n-6)	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2(n-4)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3(n-6)	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
19:0	0,7	0,2	0,6	0,1	0,6	0,1	0,7	0,3	0,4	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	1,1	0,5	1,1	0,5
19:1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19:1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0
18:3(n-3)	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	5,3	0,9	2,6	0,8	2,3	0,5
18:4(n-1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:0	0,9	0,5	0,6	0,0	0,6	0,0	1,4	0,5	0,6	0,2	0,6	0,1	0,3	0,1	0,3	0,0	0,4	0,0
20:1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,8	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0	1,0	0,3	0,9	0,2
18:5(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1(n-9)	1,7	0,2	1,9	0,2	1,9	0,2	2,9	0,6	2,2	0,5	2,1	0,4	1,3	0,3	1,9	0,4	1,5	0,4
20:1(n-7)	9,6	1,2	10,6	1,2	10,0	1,6	12,6	0,9	7,9	1,8	7,7	1,3	4,8	1,4	6,2	1,6	4,7	1,5
20:2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
20:2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:2(n-6)	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
20:3(n-6)	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
21:0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4(n-6)	1,3	0,6	1,1	0,4	2,2	0,2	0,5	0,2	0,5	0,1	0,6	0,3	0,5	0,1	0,7	0,1	0,9	0,1
20:2(n-3)	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4(n-3)	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
20:5(n-3)	6,1	2,6	6,1	2,1	11,5	1,8	4,4	0,7	4,4	1,1	4,3	0,8	6,3	1,6	7,9	1,1	6,9	2,1
22:0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
22:1(n-11)	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1(n-9)	7,1	0,5	8,3	0,6	7,6	1,3	5,3	0,8	3,3	0,5	4,2	0,7	2,5	0,9	2,8	0,6	2,5	0,4
22:1(n-7)	1,0	0,1	1,0	0,1	0,9	0,2	1,1	0,1	0,5	0,1	0,6	0,2	0,5	0,2	0,6	0,3	0,3	0,1
22:2	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21:5(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

22:3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4(n-6)	3,7	1,8	3,4	1,2	5,0	1,2	1,3	0,7	1,3	0,4	1,5	0,4	1,8	0,5	1,9	0,6	1,3	0,4
22:5(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1
22:5(n-3)	8,1	3,4	7,4	1,8	11,5	1,8	7,6	1,5	6,1	1,5	6,0	1,5	5,8	1,7	7,3	1,2	5,9	1,5
24:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6(n-3)	0,5	0,3	0,0	0,0	0,9	0,5	1,9	0,6	1,0	0,1	1,5	0,9	5,8	0,4	6,5	2,0	12,2	4,6
24:1(n-9)	0,3	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**b. Quantité relative d'acides gras issus de lipides polaires au cours d'un stress thermique. Moy : moyenne ; SEM : erreur standard de la moyenne**

Acide gras	Epiderme						Gastroderme						Symbiodinium					
	T <sub>0</sub>		T <sub>1</sub>		T <sub>5</sub>		T <sub>0</sub>		T <sub>1</sub>		T <sub>5</sub>		T <sub>0</sub>		T <sub>1</sub>		T <sub>5</sub>	
	moy	SEM																
13:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
14:0 iso	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
14:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14:1(n-5)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	0,6	0,1	0,7	0,1	0,7	0,1
15:0 iso	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0
15:0 aiso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15:1(n-6)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:0 iso	0,5	0,2	0,3	0,2	0,5	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
20:0 phytanate	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:1	13,7	1,6	15,1	2,1	15,4	0,6	19,9	3,0	22,4	0,6	19,8	2,5	22,9	1,6	22,2	2,3	19,7	2,0
16:1(n-7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:1	0,5	0,1	1,1	0,1	1,2	0,1	1,7	0,2	2,7	0,4	1,6	0,3	4,6	0,6	4,4	0,6	3,7	0,2
16:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17:0 iso	0,0	0,0	0,8	0,1	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17:0 iso	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,2	0,1	0,4	0,1	0,8	0,2	0,3	0,0	0,4	0,0	0,5	0,0
16:2(n-6)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17:0 aiso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0
16:2(n-4)	0,1	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
17:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:0 4 Methyl	1,7	0,3	1,0	0,4	1,7	0,1	0,5	0,1	0,2	0,1	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,0	0,5	0,0
17:1 iso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:3(n-4)	0,2	0,0	0,3	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,5	0,3	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1
17:1(n-7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0 iso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:4(n-1)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:1(n-9)	9,1	0,2	12,0	1,0	10,9	0,6	8,5	0,5	12,9	1,7	12,4	0,4	6,9	1,0	8,7	0,1	8,2	0,4
18:1(n-7)	1,4	0,1	2,2	0,2	2,5	0,4	1,8	0,2	2,7	0,2	3,1	0,5	2,3	0,2	2,7	0,2	2,8	0,2
18:2	1,1	0,1	1,6	0,0	1,6	0,1	0,7	0,0	1,0	0,1	1,0	0,1	1,4	0,3	1,5	0,0	1,3	0,1
18:1(n-5)	0,8	0,1	0,9	0,1	0,7	0,1	0,5	0,0	0,7	0,1	0,6	0,1	0,5	0,1	0,4	0,0	0,3	0,0
18:2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

19:0 iso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2(n-6)	0,3	0,1	0,4	0,1	0,4	0,2	0,5	0,1	0,9	0,4	0,7	0,3	0,7	0,2	0,8	0,2	0,6	0,2
18:2(n-4)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,3	1,0	0,4	0,8	0,4	1,9	0,9	1,5	0,8	1,7	0,9
19:1	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
19:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3(n-3)	0,0	0,0	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
18:4(n-1)	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,1	1,3	0,2	0,5	0,1	5,6	0,4	4,5	0,7	5,0	0,4
20:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0
18:5(n-3)	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,8	0,2	0,8	0,2
20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	1,1	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
20:1(n-9)	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1(n-7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:2	3,6	0,6	4,1	0,5	3,8	0,7	4,0	0,2	3,4	0,4	3,3	0,3	1,9	0,4	1,8	0,2	1,8	0,3
20:2	0,7	0,1	0,7	0,1	0,6	0,1	0,5	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,3	0,1
20:2(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
21:0	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
20:4(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:2(n-3)	5,8	0,6	4,6	0,5	5,6	0,7	4,0	0,3	3,5	0,2	4,9	0,3	3,1	0,1	2,8	0,3	3,2	0,1
20:4(n-3)	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5(n-3)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22:0	28,7	0,7	25,5	2,4	24,2	2,6	24,0	1,9	17,2	2,4	19,6	3,7	20,5	2,1	19,4	3,4	19,9	2,9
22:1(n-11)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1(n-9)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1(n-7)	6,4	0,6	7,1	0,8	6,4	0,8	6,5	0,3	5,6	0,8	6,2	0,8	3,1	0,5	2,5	0,4	2,1	0,1
22:2	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,7	0,4	0,7	0,4	0,1	0,1	0,7	0,1	0,4	0,2
22:2	1,0	0,2	1,1	0,3	1,0	0,1	1,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21:5(n-3)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23:0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4(n-6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:5(n-6)	8,1	0,3	5,0	2,6	5,8	3,0	7,2	0,7	8,0	0,6	10,2	0,9	2,8	0,4	3,9	0,0	5,1	0,4
22:5(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
24:0	12,3	0,4	10,1	0,5	7,4	1,2	7,5	1,2	7,3	0,8	7,1	0,2	5,3	1,2	6,3	0,9	5,8	0,9
22:6(n-3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24:1(n-9)	0,3	0,1	0,0	0,0	0,7	0,4	5,0	1,2	4,3	1,1	2,7	0,7	11,1	2,1	10,8	0,3	13,1	2,1

## Annexe 8 : publication n°1

### **Publication n°1**

Kopp C, Wisztorski M, Revel J, Mehiri M, Dani V, Capron L, Carette D, Fournier I, Massi L, Mouajjah D, Pagnotta S, Priouzeau F, Salzet M, Meibom A, Sabourault C (2014). MALDI-MS and NanoSIMS imaging techniques to study cnidarian–dinoflagellate symbioses . *Zoology*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Zoology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/zool](http://www.elsevier.com/locate/zool)

ZOOLOGY



## MALDI-MS and NanoSIMS imaging techniques to study cnidarian–dinoflagellate symbioses<sup>☆</sup>

C. Kopp<sup>a,\*,1</sup>, M. Wisztorski<sup>b,1</sup>, J. Revel<sup>c,d,1</sup>, M. Mehiri<sup>e,1</sup>, V. Dani<sup>c,d</sup>, L. Capron<sup>e</sup>, D. Carette<sup>f</sup>, I. Fournier<sup>b</sup>, L. Massi<sup>e</sup>, D. Mouajjah<sup>b</sup>, S. Pagnotta<sup>f</sup>, F. Priouzeau<sup>c,d</sup>, M. Salzet<sup>b</sup>, A. Meibom<sup>a,g</sup>, C. Sabourault<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory for Biological Geochemistry, School of Architecture, Civil and Environmental Engineering (ENAC), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), CH-1015 Lausanne, Switzerland

<sup>b</sup> PRISM, University of Lille 1, EA 4550 – FRE3637 CNRS, Bat SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>c</sup> UMR7138 University of Nice-Sophia Antipolis, CNRS, Faculty of Science, 28 Avenue Valrose, BP 71, F-06108 Nice Cedex 2, France

<sup>d</sup> UMR7138 Sorbonne University Paris 6, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

<sup>e</sup> UMR7272 University of Nice-Sophia Antipolis, CNRS, Institut de Chimie de Nice, Faculty of Science, 28 Avenue Valrose, BP 71, F-06108 Nice Cedex 2, France

<sup>f</sup> CCMA, University of Nice-Sophia Antipolis, Faculty of Science, 28 Avenue Valrose, BP 71, F-06108 Nice Cedex 2, France

<sup>g</sup> Center for Advanced Surface Analysis, Institute of Earth Sciences, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 April 2014

Received in revised form 29 June 2014

Accepted 30 June 2014

Available online 5 October 2014

#### Keywords:

Cnidarian–dinoflagellate interaction

Symbiosis

NanoSIMS

MALDI-MSI

### ABSTRACT

Cnidarian–dinoflagellate photosynthetic symbioses are fundamental to biologically diverse and productive coral reef ecosystems. The hallmark of this symbiotic relationship is the ability of dinoflagellate symbionts to supply their cnidarian host with a wide range of nutrients. Many aspects of this association nevertheless remain poorly characterized, including the exact identity of the transferred metabolic compounds, the mechanisms that control their exchange across the host–symbiont interface, and the precise subcellular fate of the translocated materials in cnidarian tissues. This lack of knowledge is mainly attributed to difficulties in investigating such metabolic interactions both in situ, i.e. on intact symbiotic associations, and at high spatial resolution. To address these issues, we illustrate the application of two in situ and high spatial resolution molecular and ion imaging techniques—matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) and the nano-scale secondary-ion mass spectrometry (NanoSIMS) ion microprobe. These imaging techniques provide important new opportunities for the detailed investigation of many aspects of cnidarian–dinoflagellate associations, including the dynamics of cellular interactions.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction: cnidarian–dinoflagellate symbioses

Symbioses between members of the phylum Cnidaria, such as scleractinian corals and sea anemones, and photosynthetic dinoflagellates of the *Symbiodinium* genus are commonly found in both temperate and tropical ecosystems (Muller-Parker and Davy, 2001). This cnidarian–dinoflagellate mutualistic association has special ecological significance in often nutrient-poor

environments, such as (sub-)tropical shallow seawater, where it plays an important role in maintaining the health and development of coral reef ecosystems (Hoegh-Guldberg, 1999). One of the main recognized benefits of dinoflagellate symbionts is their ability to supply substantial amounts of photosynthesis-derived nutrients (photosynthates) to their cnidarian host partner, which help support its respiration, growth, reproduction, as well as biocalcification for reef-building corals (Venn et al., 2008; Yellowlees et al., 2008; Stambler, 2011; Davy et al., 2012). The nature of translocated photosynthates (“mobile compounds”) ranges from soluble low molecular weight compounds, such as glycerol, glucose, amino acids and organic acids (Muscatine and Cernichiaro, 1969; Trench, 1971; Burriesci et al., 2012), to more complex molecules such as free fatty acids (Papina et al., 2003; Mortillaro et al., 2009; Teece et al., 2011), glycoconjugates (Markell and Trench, 1993) and even intact lipid droplets (Patton et al., 1977; Kellogg and Patton, 1983; Patton and Burris, 1983; Peng et al., 2011).

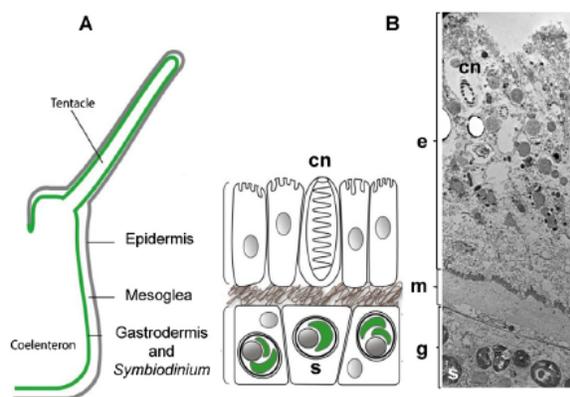
<sup>☆</sup> This article is part of a special issue entitled “Animal evolution: early emerging animals matter”.

\* Corresponding authors at: Laboratory for Biological Geochemistry, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, GR C2 534, Station 2, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

E-mail addresses: [Christophe.Kopp@epfl.ch](mailto:Christophe.Kopp@epfl.ch) (C. Kopp),

[Cecile.Sabourault@unice.fr](mailto:Cecile.Sabourault@unice.fr) (C. Sabourault).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



**Fig. 1.** Anatomy of a tentacle from a symbiotic cnidarian. (A) Schematic representation of a polyp and its diploblastic organization. (B) Transmission electron microscopy of a tentacle cross-section (*A. viridis*). Abbreviations: cn, cnidoblast; e, epidermis; g, gastrodermis (hosting the symbionts); m, mesoglea; s, symbionts.

Dinoflagellate symbionts are hosted within cnidarian gastrodermal cells (Fig. 1) in a phagosome-derived vacuole and are therefore separated from the host cytoplasm by a perisymbiotic membrane of both algal and animal origin (Wakefield et al., 2000; Wakefield and Kempf, 2001), which is involved in controlling host–symbiont metabolic exchanges (Rands et al., 1993; Penget al., 2010). However, this intertwined physical association between the two symbiotic partners is seldom integrated in situ when investigating host–symbiont metabolic interactions in cnidarians, which are still poorly characterized at size scales ranging from histological to cellular and subcellular levels. Indeed, investigations aimed at tracking the metabolic interplay in cnidarian–dinoflagellate symbioses are usually performed on freshly isolated or cultured dinoflagellate cells. However, the physiology of such dinoflagellates certainly differs from that of their symbiotic counterparts, thus raising the possibility that data obtained on isolated algal cells might not precisely mimic what actually occurs in the intact symbiosis. Moreover, intact symbioses are often physically separated (e.g., by centrifugation) into two distinct dinoflagellate and animal fractions for further analyses. However, this separation is difficult to achieve without cross-contaminations and it erases precious information related to the spatial distribution of compounds of interest within tissues and cells.

Here we present two powerful in situ and high spatial resolution molecular imaging techniques, i.e. matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) and the nano-scale secondary-ion mass spectrometry (NanoSIMS) ion microprobe, which substantially enhance the prospects for the detailed investigation of many aspects of the cnidarian–dinoflagellate association, including the dynamics of cellular interactions.

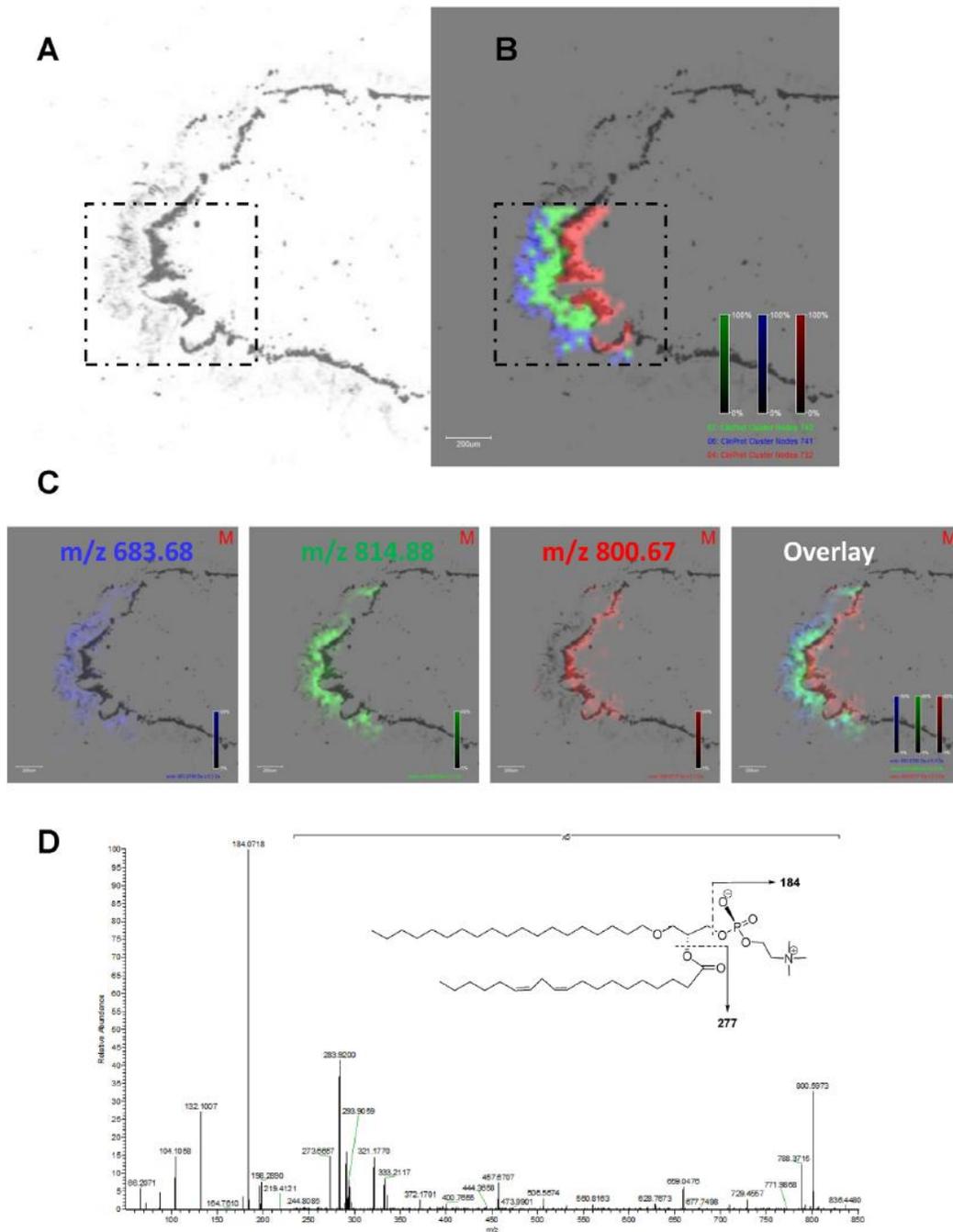
## 2. In situ metabolomic MALDI-MS imaging applied to the cnidarian–dinoflagellate interaction

While many studies have been performed to understand metabolic relationships between the cnidarian host and its dinoflagellate symbionts, most of them were more focused on specific metabolites, mainly related to nutritional interactions (Yellowlees et al., 2008; Gordon and Leggat, 2010). In addition, algal symbionts were usually separated from the animal fraction before analysis, without distinction between the host tissues (epidermis vs. gastrodermis). *Anemonia viridis*, a sea anemone commonly found along the Mediterranean coast, is a great symbiotic model

because the complete separation of the tissues from the organism's large tentacles allows separate studies on the epidermis and gastrodermis, with minimal cross-contamination. *A. viridis* harbors *Symbiodinium* cells all identified as belonging to the Mediterranean clade temperate-A. Comparison of gene expression in symbiotic and aposymbiotic (bleached) *A. viridis* specimens revealed potential key players in symbiosis maintenance (Ganot et al., 2011; Dani et al., 2014), as well as in symbiosis dysfunction (Moya et al., 2012). These studies have shown that many genes involved in lipid metabolism were differentially expressed between symbiotic and aposymbiotic specimens. In order to investigate the molecules involved in the symbiotic interaction, we used different mass spectrometry (MS) techniques to characterize the metabolite profiles of each of the cellular compartments. Epidermis, gastrodermis and isolated symbionts were separated by dissection followed by centrifugation, and their lipid and fatty acid profiles were characterized by HPLC-MS and GC-MS. Epidermis and gastrodermis displayed different lipid and fatty acid profiles, especially for polar lipids. We also suggest that lipids are preferentially stored in gastrodermis tissue, as the main saturated and monounsaturated fatty acids are found in higher quantity in this cellular compartment (Revel, unpublished data). To further characterize the metabolite signatures of the different cell compartments, we adapted the MALDI-MS imaging technology to identify and localize molecules directly in sea anemone tentacle sections.

MALDI-MSI is a molecular imaging tool that enables identification and localization of compounds on surfaces. This technology combines the sensitivity and selectivity of MS with near-microscopic spatial resolution to gain new insight into the distribution of biomolecules in tissue sections. Because of the capacity of MS to discriminate compounds according to their mass-to-charge ( $m/z$ ) ratio, several molecules can be measured, profiled (Fournier et al., 2003), and imaged in a single experiment directly in tissue sections (Caprioli et al., 1997). Conventional MS techniques require complete grinding of organs to allow extraction of their contents. Consequently, it is impossible to determine the precise localization of molecules in the tissues. Using MALDI-MSI, the distribution of several biomolecules can be studied with high sensitivity and selectivity and without requiring any prior knowledge on the molecules to be searched (Gagnon et al., 2012). More than 10 years after its introduction, MALDI-MSI has considerably evolved and achieved performances that make it interesting for biological research (Gagnon et al., 2012). This is demonstrated by the multitude of organisms and biological contexts in which MALDI-MSI has been used. Indeed, MALDI-MSI has been applied on various organisms, including mammals (Lemaire et al., 2006) and invertebrates (Wisztorski et al., 2008; Meriaux et al., 2011), as well as plants (Hölscher et al., 2009). Over the past 10 years, most efforts have been focused on key molecules of physiological processes, such as lipids (Sugiura and Setou, 2009), peptides/proteins (Wisztorski et al., 2008), or mRNA (Lemaire et al., 2007). MALDI-MSI was recently used to localize secondary metabolites (saponins) in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Van Dyck et al., 2010). These results also highlight that MALDI-MSI is a valuable tool for chemical ecology studies in which specific chemical signaling molecules, such as allelochemicals or pheromones, have to be tracked. We therefore applied MALDI-MSI to study the *A. viridis*–*Symbiodinium* interaction.

MALDI-MSI was used to localize metabolites within the tissues of the sea anemone *A. viridis* and especially to compare their occurrence in epidermis, gastrodermis (with or without symbionts) and symbionts (in hospite or in culture). Fig. 2 presents molecular images acquired using MALDI-MSI. A tentacle was embedded in a solution of 4% carboxymethyl cellulose before sectioning and tissue cryosections were mounted on an indium-tin-oxide-coated glass slide for mass spectrometry analysis. The tissue sections were



**Fig. 2.** Molecular images of *A. viridis* tissues acquired using MALDI-MSI. (A) Histological image of an *A. viridis* tentacle, tissue cryosection of 10  $\mu\text{m}$  thickness. The boxed part corresponds to the region which was analyzed by MALDI-MSI. (B) An overlay image of histological and molecular information obtained after a hierarchical clustering analysis of mass spectrometry data. Blue, green and red colors correspond to three different clusters. (C) Example of compounds localized within the different parts of the section ( $m/z$  683.68 in blue,  $m/z$  814.88 in green,  $m/z$  800.67 in red). (D) Annotated MS/MS spectrum in positive mode of the alkyl-phosphatidylcholine (aPC) at  $m/z$  800.60 with the major product ions indicated on the aPC structure shown below.

coated with a matrix solution using an automatic spraying device. Image acquisitions were performed using a MALDI-TOF mass spectrometer with 30  $\mu\text{m}$  resolution using an oversampling method and the conditions required for the analysis of small compounds, such

as metabolites and lipids. Mass spectra were classified by hierarchical clustering and we determined spectra classes (clusters), which were representative of the different tissue features. Fig. 2B shows three different clusters correlated with the sea anemone tissue

organization. These are, from the outer to the inner layers, the apical part of the epidermis (blue), the basal part of the epidermis and the mesoglea (green) and the gastrodermis (red), which harbors the symbionts. The identification of these clusters suggests major differences in the molecular composition of these regions. For example, the three molecular ions presented in Fig. 2C are representative of each part of the tentacle. An MS<sup>2</sup> fragmentation analysis was performed to confirm the identification and real assignment of these molecules. Interestingly, the lipid compound localized in the gastrodermis ( $m/z=800.6$ ) is an alkyl-phosphatidylcholine (Fig. 2D), which was recently identified in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* (Vieler et al., 2007), but also in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida* (Garrett et al., 2013). In that species, this compound is more abundant in symbiotic than in aposymbiotic specimens. Its structure suggests that this compound may be synthesized by the dinoflagellate symbiont, a result that is strongly correlated with its localization obtained using MSI.

Other molecules are still being identified. Comparisons between symbiotic vs. aposymbiotic specimens of *A. viridis*, as well as healthy vs. stressed sea anemones will highlight key molecules involved in the stability or dysfunction of the symbiotic interaction.

### 3. Imaging metabolic interactions in the coral–dinoflagellate symbiosis at the subcellular level using the NanoSIMS ion microprobe

In tropical reef corals living in mutualistic association with *Symbiodinium*, the photosynthesis-dependent acquisition of environmental dissolved inorganic carbon (DIC) and nitrogen (DIN) by dinoflagellates, the translocation of the resulting organic nutrients to the coral host tissue, and the further utilization of C and N in both dinoflagellate and coral cells have been poorly characterized at the cellular and subcellular levels. Translocated organic nutrients are mainly produced by dinoflagellates (i) through photosynthetic fixation of DIC, mostly present in seawater in the form of bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), via the Calvin-Benson “C3” photosynthesis pathway (Trench, 1993), and (ii) through the photosynthesis-dependent uptake and assimilation of DIN, in the form of ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), ultimately via the glutamine synthetase–glutamate synthase (GS-GOGAT) enzymatic cycle (Wilkerson and Muscatine, 1984; Rahav et al., 1989; Swanson and Hoegh-Guldberg, 1998; Roberts et al., 1999). Note that ammonium is usually considered to be the preferential source of DIN for symbiotic reef corals, followed by nitrate (D’Elia et al., 1983; Grover et al., 2008). Moreover, ammonium can also be directly assimilated by the coral host tissue via the glutamine synthetase and/or glutamate dehydrogenase (GS/GDH) assimilatory enzymes (Miller and Yellowlees, 1989; Rahav et al., 1989; Yellowlees et al., 1994; Wang and Douglas, 1998). In contrast, nitrate is only incorporated by dinoflagellates because the coral host tissue lacks the reductase enzymes required for the conversion of nitrate into ammonium for further assimilation (Crossland and Barnes, 1977; Tanaka et al., 2006). Here, we review recent studies in which the NanoSIMS ion microprobe was combined with stable isotopic labeling (e.g.  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  and  $^{15}\text{NO}_3^-$ ) and conventional transmission electron microscopy (TEM) to track – with a subcellular resolution – the spatio-temporal dynamics of nutritional interactions in the intact coral–dinoflagellate symbiosis, including the abundant and widely distributed Indo-Pacific reef-building coral *Pocillopora damicornis* (Pernice et al., 2012; Kopp et al., 2013).

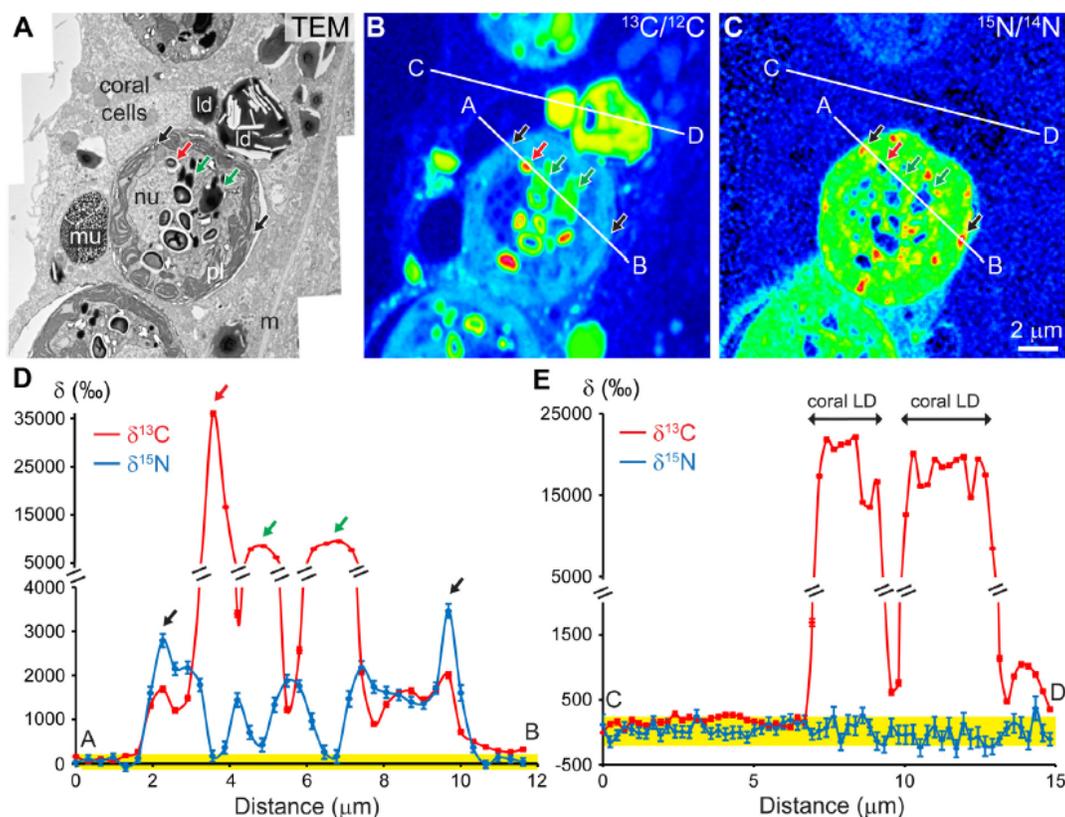
NanoSIMS allows chemical and isotopic micro-imaging of solid samples through the detection of secondary ions generated by the impact of a primary ion beam rastered across the sample surface (Slodzian et al., 1992; Hoppe et al., 2013). The impacts of

primary ions erode the sample surface and eject atoms and clusters of atoms (sputtering), a fraction of which is ionized and forms secondary ions (secondary ion beam). These secondary ions are separated in a mass spectrometer according to their mass-to-charge ( $m/z$ ) ratio and counted individually in separate electron multiplier detectors. Quantitative NanoSIMS images of the distribution of, for instance, stable isotopes in a given sample are thus produced with a high spatial resolution (~50–200 nm) and relatively good precision. NanoSIMS can detect several isotopes simultaneously (e.g., multi-collection of  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ ) from the same sputtered volume of sample, which is advantageous for isotopic ratio quantification because it avoids errors due to changing instrument or sample conditions during analyses. NanoSIMS therefore features a unique combination of instrumental capabilities. This powerful technology can be used in life and biological science research to simultaneously image and measure the distribution of molecules labeled with stable isotopes in cells and their subcellular compartments.

NanoSIMS applications in biological sciences have been reviewed in recent years (Lechene et al., 2006; Boxer et al., 2009; Clode et al., 2009; Hoppe et al., 2013; Zhao et al., 2014). For instance, quantitative NanoSIMS isotopic imaging in combination with stable isotopic labeling and conventional transmission electron microscopy (TEM) was successfully applied to investigate the fixation of  $^{15}\text{N}_2$  and further redistribution of  $^{15}\text{N}$  in a bacterial–animal symbiotic system (Lechene et al., 2007). In this study, the joint use of TEM ultrastructural and NanoSIMS isotopic imaging was found to be very powerful for unambiguously identifying labeled cellular structures.

Of practical interest is that biological samples to be analyzed with NanoSIMS absolutely must not hamper the ultra-high vacuum of the instrument (~ $10^{-10}$  Torr), i.e. volatiles have to be removed from the sample prior to its introduction in the instrument. Ideally, samples must also essentially have a flat surface. The most appropriate sample preparation method for NanoSIMS analyses depends on the specific questions that are being addressed. Here, coral tissue samples were observed by TEM prior to NanoSIMS analyses. Compounds such as proteins, lipids and carbohydrates are highly suitable for incorporating stable isotopic tags ( $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ ) that are retained in the TEM sample preparation, during which non-assimilated (often soluble) isotopic tracers are eliminated. We used conventional electron microscopy preparations, including: (i) chemical fixation of coral tissue with aldehydes and osmium tetroxide to stabilize proteins and a fraction of the lipids and carbohydrates, (ii) demineralization of the coral skeleton through calcium-EDTA chelation, (iii) removal of water and non-incorporated stable isotopic tags with ethanol dehydration, and (iv) hydrophobic resin embedding (e.g. Spurr’s resin). Flat sections of coral tissue (70–80 nm thick) were obtained via ultramicrotomy.

Fig. 3 illustrates the results of a feeding experiment in which a micro-colony of the symbiotic reef coral *Pocillopora damicornis* was incubated in aquarium for 6 h in light in seawater simultaneously enriched with [ $^{13}\text{C}$ ]bicarbonate ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ; 2 mM) and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate ( $^{15}\text{NO}_3^-$ ; 30  $\mu\text{M}$ ), followed by a 6 h chase period in light in seawater with a normal C and N isotopic composition. Representative areas within the dinoflagellate-containing coral gastroderm (in the coenosarcal area) were selected through TEM ultrastructural observations of ultra-thin sections (~70–80 nm thick) (Fig. 3A). Exactly the same areas of interest on the same ultra-thin sections were subsequently analyzed by NanoSIMS to generate the corresponding  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotopic images (Fig. 3B and C). Note that the TEM ultrastructural and isotopic anomaly images are perfectly correlated, so the  $^{13}\text{C}$ - or  $^{15}\text{N}$ -labeled cellular structures were unambiguously identified. Fluctuations in the isotopic enrichments along the AB and CD profiles (cf. Fig. 3B and C) traversing



**Fig. 3.** NanoSIMS visualization and quantification of C and N assimilation and utilization in the coral–dinoflagellate symbiosis. The reef coral *Pocillopora damicornis* was exposed for 6 h in light simultaneously with  $^{13}\text{C}$  bicarbonate (2 mM) and  $^{15}\text{N}$  nitrate (30  $\mu\text{M}$ ), followed by a chase of 6 h in light. (A) TEM micrograph of the oral gastrodermal tissue (in the coenosarcular region connecting polyps together), which contains dinoflagellate endosymbionts. (B) Corresponding NanoSIMS  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and (C)  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotopic maps. At this time point in the pulse–chase experiment, the  $^{13}\text{C}$  tracer was assimilated by dinoflagellates and heterogeneously transferred to the symbiosis. (D) Fluctuations in  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -enrichment along the NanoSIMS profile AB passing through one dinoflagellate cell, and (E) along the NanoSIMS profile CD passing through the coral gastrodermal cells. Yellow bands indicate natural variations in  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -enrichments as measured by NanoSIMS profiles in similar areas of an unlabeled control coral ( $\delta^{13}\text{C}$  or  $\delta^{15}\text{N} = 0 \pm 200\%$ , 3 sd). Abbreviations: ld, coral lipid droplet; m, mesoglea; mu, mucocyte; nu, nucleus; pl, plastid. Black arrows, dinoflagellate uric acid vesicles; red arrows, dinoflagellate starch grains; green arrows, dinoflagellate lipid droplets.

one dinoflagellate cell and the coral host tissue, respectively, are reported in the corresponding graphs (Fig. 3D and E).

Regarding the utilization of C in the symbiosis, Fig. 3 demonstrates that  $^{13}\text{C}$ -labeled bicarbonate was actively incorporated by photosynthesis and that the resulting photosynthetically fixed  $^{13}\text{C}$  (or  $^{13}\text{C}$ -labeled photosynthates) was heterogeneously distributed in both the dinoflagellate and the coral gastrodermal cells. In particular, within the dinoflagellates, retained  $^{13}\text{C}$  was mainly accumulated within cytosolic starch granules (red arrows;  $\delta^{13}\text{C}$  of up to  $\sim 35,000\%$ ) and electron-dense lipid droplets (green arrows;  $\delta^{13}\text{C}$  of  $\sim 8000\%$ ), which reflects the temporary storage of C-rich carbohydrates and lipids as substrates for further cell respiration (e.g., during nighttime). To a lesser extent,  $^{13}\text{C}$ -labeled photosynthates were also distributed in the remaining dinoflagellate compartments (e.g., the plastid, nucleus, and cytosol;  $\delta^{13}\text{C}$  of  $\sim 2000\%$ ), reflecting the fact that  $^{13}\text{C}$  is utilized for cell growth and turnover of cell constituents.

$^{13}\text{C}$ -labeling in coral gastrodermal tissue is due to the translocation of photosynthetically fixed  $^{13}\text{C}$  from the dinoflagellates to the coral host cells that occurred within the short time scale of this experiment. The most strikingly labeled coral cellular structures were large electron-dense lipid droplets ( $\delta^{13}\text{C}$  of  $\sim 22,000\%$ ), which clearly demonstrates that coral lipid droplets constitute one

of the major sinks for translocated photosynthates in the coral symbiosis, as previously proposed (Patton et al., 1977; Stimson, 1987; Peng et al., 2011). Interestingly, some coral tissue structures showed no or very low  $^{13}\text{C}$ -incorporation, such as the mucocyte (mu) or the mesoglea (m) separating the gastrodermis from the epidermis.

Regarding the metabolism of N in the symbiosis, the nitrate assimilation ability of dinoflagellates is clearly highlighted in Fig. 3C. The low level of  $^{15}\text{N}$ -labeling observed in coral tissue on the NanoSIMS  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotopic map (Fig. 3C) was due to limited N translocation by dinoflagellates, which was spatially confined within the immediate vicinity of the endosymbionts.

The distribution of incorporated  $^{15}\text{N}$  in the dinoflagellate cells was highly heterogeneous, with the tracer mainly accumulating within minute organelles known to contain uric acid crystals (black arrows;  $\delta^{15}\text{N}$  of up to  $\sim 4000\%$ ), which strongly suggests that uric acid vesicles have a role in the temporary storage of N in the symbiotic system (Clode et al., 2009; Kopp et al., 2013). Note also the clear heterogeneity in  $^{15}\text{N}$ -labeling among individual dinoflagellates, with the upper endosymbiont being substantially less  $^{15}\text{N}$ -enriched compared to the two lower dinoflagellates in Fig. 3C, which is potentially linked to differences in metabolic performance among *Symbiodinium* cells located in the same coral microenvironment.

#### 4. Conclusion and perspectives

MALDI-MS imaging and the NanoSIMS ion microprobe are two powerful tools for molecular mapping of compounds in tissue sections. MALDI-MS imaging is widely used to map chemical compounds or proteins in biological samples, with a spatial resolution of a few micrometers (30–50  $\mu\text{m}$ ). Recent instrumentation advances have improved the mass sensitivity (sub-ppm) as well as spectral ( $R > 200,000$ ) and spatial resolution ( $< 5 \mu\text{m}$ ). NanoSIMS imaging is already a method of choice for mapping chemical compounds with a high spatial resolution of a few hundreds of nanometers (50–200 nm), especially for compounds labeled with stable isotope tracers.

Such molecular imaging approaches should enhance investigations on the physiology of cnidarian–dinoflagellate symbiotic associations. Indeed, in the context of threatened coral reefs, they may be able to fill current gaps and they will provide new insights into how these organisms may cope with marine environmental modifications, adapt and survive.

#### Acknowledgments

These results have been presented at the 8th International Conference on Coelenterate Biology (Eilat, Israel, 2013), and we are grateful to many colleagues for their comments. We are very grateful to David Manley for editing this manuscript. The MALDI-MSI work on *A. viridis* has been supported by the French National Research Agency (grant ANR-12-JSV7-0009-01, inSIDE project). The NanoSIMS work was supported by grants from the European Research Council (advanced grant 246749, BIOCARB), the Fonds National Suisse (grant CR2312\_141048), and the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne to A.M.

#### References

Boxer, S.G., Kraft, M.L., Weber, P.K., 2009. Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples. *Annu. Rev. Biophys.* 38, 53–74.

Burriesci, M.S., Raab, T.K., Pringle, J.R., 2012. Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate–cnidarian symbiosis. *J. Exp. Biol.* 215, 3467–3477.

Caprioli, R.M., Farmer, T.B., Gile, J., 1997. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* 69, 4751–4760.

Clode, P.L., Kilburn, M.R., Jones, D.L., Stockdale, E.A., Cliff, J.B., Herrmann, A.M., Murphy, D.V., 2009. In situ mapping of nutrient uptake in the rhizosphere using nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol.* 151, 1751–1757.

Crossland, C.J., Barnes, D.J., 1977. Nitrate assimilation enzymes from two hard corals, *Acropora acuminata* and *Goniastrea australensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* B 57, 151–157.

D'Elia, C.F., Domotor, S.L., Webb, K.L., 1983. Nutrient uptake kinetics of freshly isolated zooxanthellae. *Mar. Biol.* 75, 157–167.

Dani, V., Ganot, P., Priouzeau, F., Furla, P., Sabourault, C., 2014. Are Niemann-Pick type C proteins key players in cnidarian–dinoflagellate endosymbioses? *Mol. Ecol.* 23, 4527–4540.

Davy, S.K., Allemand, D., Weis, V.M., 2012. Cell biology of cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 229–261.

Fournier, I., Day, R., Salzet, M., 2003. Direct analyses of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuroendocrinol. Lett.* 1, 9–14.

Gagnon, H., Franck, J., Wiszorski, M., Day, R., Fournier, I., Salzet, M., 2012. Targeted mass spectrometry imaging: specific targeting mass spectrometry imaging technologies from history to perspective. *Prog. Histochem. Cytochem.* 47, 133–174.

Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P., Sabourault, C., 2011. Adaptations to endosymbiosis in a cnidarian–dinoflagellate association: differential gene expression and specific gene duplications. *PLoS Genet.* 7, e1002187.

Garrett, T.A., Schmeitzel, J.L., Klein, J.A., Hwang, J.J., Schwarz, J.A., 2013. Comparative lipid profiling of the cnidarian *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate symbiont. *PLoS ONE* 8, e57975.

Gordon, B.R., Leggat, W., 2010. Symbiodinium–invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Mar. Drugs* 8, 2546–2568.

Grover, R., Maguer, J.-F., Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., 2008. Uptake of dissolved free amino acids by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *J. Exp. Biol.* 211, 860–865.

Hoegh-Guldberg, O., 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshw. Res.* 50, 839–866.

Hölscher, D., Shroff, R., Knop, K., Gottschaldt, M., Creelius, A., Schneider, B., Heckel, D.G., Schubert, U.S., Svatos, A., 2009. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 60, 907–918.

Hoppe, P., Cohen, S., Meibom, A., 2013. NanoSIMS: technical aspects and applications in cosmochemistry and biological geochemistry. *Geostand. Geoanal. Res.* 37, 111–154.

Kellogg, R.B., Patton, J.S., 1983. Lipid droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Mar. Biol.* 75, 137–149.

Kopp, C., Pernice, M., Domart-Coulon, I., Djediat, C., Spangenberg, J.E., Alexander, D.T.L., Hignette, M., Meziane, T., Meibom, A., 2013. Highly dynamic cellular-level response of symbiotic coral to a sudden increase in environmental nitrogen. *mBio* 4, e00052-13.

Lechene, C., Hillion, F., McMahon, G., Benson, D., Kleinfeld, A.M., Kampf, J.P., Distel, D., Luyten, Y., Bonventre, J., Hentschel, D., Park, K.M., Ito, S., Schwartz, M., Benichou, G., Slodzian, G., 2006. High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry. *J. Biol.* 5, 20.

Lechene, C.P., Luyten, Y., McMahon, G., Distel, D.L., 2007. Quantitative imaging of nitrogen fixation by individual bacteria within animal cells. *Science* 317, 1563–1566.

Lemaire, R., Wiszorski, M., Desmons, A., Tabet, J.C., Day, R., Salzet, M., Fournier, I., 2006. MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal. Chem.* 78, 7145–7153.

Lemaire, R., Stauber, J., Wiszorski, M., Van Camp, C., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudloff, I., Woods, A.S., Day, R., Salzet, M., Fournier, I., 2007. Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J. Proteome Res.* 6, 2057–2067.

Markell, D.A., Trench, R.K., 1993. Macromolecules exuded by symbiotic dinoflagellates in culture: amino acid and sugar composition. *J. Phycol.* 29, 64–68.

Meriaux, C., Arafah, K., Tasiemski, A., Wiszorski, M., Brund, J., Boidin-Wichlacz, C., Desmons, A., Debois, D., Laprèvote, O., Brunelle, A., Gaasterland, T., Macagno, E., Fournier, I., Salzet, M., 2011. Multiple changes in peptide and lipid expression associated with regeneration in the nervous system of the medicinal leech. *PLoS ONE* 6, e18359.

Miller, D.J., Yellowlees, D., 1989. Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine cnidarians: a critical review. *Proc. R. Soc. Lond. B (Biol. Sci.)* 237, 109–125.

Mortillaro, J.M., Pitt, K.A., Lee, S.Y., Meziane, T., 2009. Light intensity influences the production and translocation of fatty acids by zooxanthellae in the jellyfish *Cassiopea* sp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 378, 22–30.

Moya, A., Ganot, P., Furla, P., Sabourault, C., 2012. The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Mol. Ecol.* 21, 1158–1174.

Muller-Parker, G., Davy, S.K., 2001. Temperate and tropical algal–sea anemone symbioses. *Invertebr. Biol.* 120, 104–123.

Muscattine, L., Cernichiaro, E., 1969. Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. *Biol. Bull.* 137, 506–523.

Papina, M., Meziane, T., Van Woesik, R., 2003. Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* B 135, 533–537.

Patton, J.S., Burris, J.E., 1983. Lipid synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar. Biol.* 75, 131–136.

Patton, J.S., Abraham, S., Benson, A.A., 1977. Lipogenesis in the intact coral *Pocillopora capitata* and its isolated zooxanthellae: evidence for a light-driven carbon cycle between symbiont and host. *Mar. Biol.* 44, 235–247.

Peng, S.-E., Wang, Y.-B., Wang, L.-H., Chen, W.-N.U., Lu, C.-Y., Fang, L.-S., Chen, C.-S., 2010. Proteomic analysis of symbiosome membranes in cnidarian–dinoflagellate endosymbiosis. *Proteomics* 10, 1002–1016.

Peng, S.-E., Chen, W.-N.U., Chen, H.-K., Lu, C.-Y., Mayfield, A.B., Fang, L.-S., Chen, C.-S., 2011. Lipid bodies in coral–dinoflagellate endosymbiosis: proteomic and ultrastructural studies. *Proteomics* 11, 3540–3555.

Pernice, M., Meibom, A., Van Den Heuvel, A., Kopp, C., Domart-Coulon, I., Hoegh-Guldberg, O., Dove, S., 2012. A single-cell view of ammonium assimilation in coral–dinoflagellate symbiosis. *ISME J.* 6, 1314–1324.

Rahav, O., Dubinsky, Z., Achituv, Y., Falkowski, P.G., 1989. Ammonium metabolism in the zooxanthellate coral, *Stylophora pistillata*. *Proc. R. Soc. Lond. B (Biol. Sci.)* 236, 325–337.

Rands, M.L., Loughman, B.C., Douglas, A.E., 1993. The symbiotic interface in an alga–invertebrate symbiosis. *Proc. R. Soc. Lond. B (Biol. Sci.)* 253, 161–165.

Roberts, J.M., Davies, P.S., Fixter, L.M., Preston, T., 1999. Primary site and initial products of ammonium assimilation in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Mar. Biol.* 135, 223–236.

Slodzian, G., Daigne, B., Girard, F., Boust, F., Hillion, F., 1992. Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biol. Cell* 74, 43–50.

Stambler, N., 2011. Zooxanthellae: the yellow symbionts inside animals. In: Dubinsky, Z., Stambler, N. (Eds.), *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 87–106.

Stimson, J.S., 1987. Location, quantity and rate of change in quantity of lipids in tissue of Hawaiian hermatypic corals. *Bull. Mar. Sci.* 41, 889–904.

Sugiura, Y., Setou, M., 2009. Selective imaging of positively charged polar and non-polar lipids by optimizing matrix solution composition. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 23, 3269–3278.

Swanson, R., Hoegh-Guldberg, O., 1998. Amino acid synthesis in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Mar. Biol.* 131, 83–93.

- Tanaka, Y., Miyajima, T., Koike, I., Hayashibara, T., Ogawa, H., 2006. Translocation and conservation of organic nitrogen within the coral-zooxanthella symbiotic system of *Acropora pulchra*, as demonstrated by dual isotope-labeling techniques. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 336, 110–119.
- Teece, M.A., Estes, B., Gelsleichter, E., Lirman, D., 2011. Heterotrophic and autotrophic assimilation of fatty acids by two scleractinian corals, *Montastraea faveolata* and *Porites astreoides*. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1285–1296.
- Trench, R.K., 1971. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. III. The effect of homogenates of host tissues on the excretion of photosynthetic products in vitro by zooxanthellae from two marine coelenterates. *Proc. R. Soc. Lond. B (Biol. Sci.)* 177, 251–264.
- Trench, R.K., 1993. Microalgal-invertebrate symbioses: a review. *Endocytobiosis Cell Res.* 9, 135–175.
- Van Dyck, S., Flammang, P., Meriaux, C., Bonnel, D., Salzet, M., Fournier, I., Wisztorski, M., 2010. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in *Cuvierian tubules of H. forskali*. *PLoS ONE* 5, e13923.
- Venn, A.A., Loram, J.E., Douglas, A.E., 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* 59, 1069–1080.
- Vieler, A., Wilhelm, C., Goss, R., Süß, R., Schiller, J., 2007. The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chem. Phys. Lipids* 150, 143–155.
- Wakefield, T.S., Kempf, S.C., 2001. Development of host- and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Biol. Bull.* 200, 127–143.
- Wakefield, T.S., Farmer, M.A., Kempf, S.C., 2000. Revised description of the fine structure of in situ zooxanthellae genus *Symbiodinium*. *Biol. Bull.* 199, 76.
- Wang, J., Douglas, A.E., 1998. Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga-invertebrate symbiosis? *J. Exp. Biol.* 201, 2445–2453.
- Wilkerson, F.P., Muscatine, L., 1984. Uptake and assimilation of dissolved inorganic nitrogen by a symbiotic sea anemone. *Proc. R. Soc. Lond. B (Biol. Sci.)* 221, 71–86.
- Wisztorski, M., Croix, D., Macagno, E., Fournier, I., Salzet, M., 2008. Molecular MALDI imaging: an emerging technology for neuroscience studies. *Dev. Neurobiol.* 68, 845–858.
- Yellowlees, D., Rees, T.A.V., Fitt, W.K., 1994. Effect of ammonium-supplemented seawater on glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activities in host tissue and zooxanthellae of *Pocillopora damicornis* and on ammonium uptake rates of the zooxanthellae. *Pac. Sci.* 48, 291–295.
- Yellowlees, D., Rees, T.A.V., Leggat, W., 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ.* 31, 679–694.
- Zhao, F.-J., Moore, K.L., Lombi, E., Zhu, Y.-G., 2014. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends Plant Sci.* 19, 183–192.

## Annexe 9 : publication n°2

### Publication n°2

Revel J, Massi L, Mehiri M, Boutoute M, Mayzaud P, Capron L, Sabourault C. Differential distribution of lipids in epidermis, gastrodermis and hosted *Symbiodinium* in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* (sous presse)

### **Differential distribution of lipids in epidermis, gastrodermis and hosted *Symbiodinium* in the sea anemone *Anemonia viridis***

Johana Revel<sup>a,b,e</sup>, Lionel Massi<sup>c,e</sup>, Mohamed Mehiri<sup>c,e</sup>, Marc Boutoute<sup>d,e</sup>, Patrick Mayzaud<sup>d,e</sup>, Laure Capron<sup>c,e,#</sup>, Cécile Sabourault<sup>a,b,e,#</sup>

<sup>a</sup> *Université Nice Sophia Antipolis, UMR7138, Equipe Symbiose Marine, F-06000, Nice, France*

<sup>b</sup> *Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine, UMR7138, F-75005, Paris, France*

<sup>c</sup> *Université Nice Sophia Antipolis, Institut de Chimie de Nice, UMR7272, F-06000, Nice, France*

<sup>d</sup> *Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Laboratoire Océanologique de Villefranche sur Mer, UMR 7093, F-06320, Villefranche-sur-Mer, France*

<sup>e</sup> *Centre National de la Recherche Scientifique, F-75005, Paris, France*

# These authors contributed equally to the study

\* Corresponding author:

Dr. Cécile Sabourault,

UMR7138 Evolution Paris Seine,

28 Avenue Valrose, BP71,

06108 Nice Cedex 02, France

Fax: 33 492 076 863

E-mail: Cecile.Sabourault@unice.fr

## Abstract

Cnidarian-dinoflagellate symbiosis mainly relies on nutrient recycling, thus providing both partners with a competitive advantage in nutrient-poor waters. Essential processes related to lipid metabolism can be influenced by various factors, including hyperthermal stress. This can affect the lipid content and distribution in both partners, while contributing to symbiosis disruption and bleaching. In order to gain further insight into the role and distribution of lipids in the cnidarian metabolism, we investigated the lipid composition of the sea anemone *Anemonia viridis* and its photosynthetic dinoflagellate endosymbionts (*Symbiodinium*). We compared the lipid content and fatty acid profiles of the host cellular layers, non-symbiotic epidermal and symbiont-containing gastrodermal cells, and those of *Symbiodinium*, in a mass spectrometry-based assessment. Lipids were more concentrated in *Symbiodinium* cells, and the lipid class distribution was dominated by polar lipids in all tissues. The fatty acids distribution between host cell layers and *Symbiodinium* cells suggested potential lipid transfers between the partners. The lipid composition and distribution was modified during short-term hyperthermal stress, mainly in *Symbiodinium* cells and gastrodermis. Exposure to elevated temperature rapidly caused a decrease in polar lipid C18 unsaturated fatty acids and a strong and rapid decrease in the abundance of polar lipid fatty acids relative to sterols. These lipid indicators could therefore be used as sensitive biomarkers to assess the physiology of symbiotic cnidarians, especially the effect of thermal stress at the onset of cnidarian bleaching. Overall, the findings of this study provide some insight on key lipids that may regulate maintenance of the symbiotic interaction.

Keywords: lipidomics, symbiotic interaction, cnidarian bleaching, hyperthermal stress, *Symbiodinium*, *Anemonia*

## 1. Introduction

Marine organisms, especially sponges and cnidarians, produce a great variety of lipids and fatty acids (FAs), often with unusual chemical structures (Bergé and Barnathan 2005). In these organisms, lipids are involved in various processes, such as reproduction, growth, morphogenesis, cell proliferation, cell differentiation and immunity (Tarrant 2005; Wang et al. 2013). Lipogenesis pathways depend on the enzyme repertoire expressed by the organisms and differ between animals (n-6 pathway), plants (n-3 pathway), and algae (both n-6 and n-3 pathways). Therefore, FAs have been used as chemotaxonomic biomarkers of organisms (Sahu et al. 2013), or trophic markers to highlight feeding preferences of organisms (Ramos and González-Solís 2012). Marine algae—which are known to synthesize high amounts of the essential FAs linoleic acid (18:2n-6) and  $\alpha$ -linolenic acid (18:3n-3), as well as their main derivatives, such as arachidonic acid (20:4n-3), eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)—occupy a key position in marine foodwebs (Jeong et al. 2010). Indeed, animals have a limited ability to synthesize 18:2n-6 and 18:3n-3

and must acquire them via dietary sources (Sargent et al. 1990; Bergé and Barnathan 2005; Bachok et al. 2006). An alternative mode of lipid acquisition in animals is through a symbiotic interaction with microalgae that are able to synthesize essential FAs. Such FA transfers from symbiotic photosynthetic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) to their cnidarian hosts have been suggested (Muscatine and Cernichiaro 1969; Whitehead and Douglas 2003; Davy et al. 2012).

Cnidarians, such as corals, jellyfish or sea anemones, are diploblastic animals that are organized in two cellular layers, i.e. the outer epidermis and inner gastrodermis. In symbiotic cnidarians, dinoflagellate symbionts are localized within the host gastrodermal cells, where they are maintained inside specific vacuoles called symbiosomes (Wakefield et al. 2000; Davy et al. 2012; Garrett et al. 2013). Cnidarians can capture prey using their stinging cells. However, especially in nutrient-poor waters, their association with autotrophic dinoflagellate symbionts can give them a significant competitive advantage, largely supported by nutrient exchanges between the symbiotic partners. Indeed, large amounts of *Symbiodinium* photosynthetic products are transferred to the cnidarian host, contributing substantially to its carbon and energy needs to support its metabolism, growth and reproduction (Muscatine 1967; Kellogg and Patton 1983). The hosted *Symbiodinium* meet their own requirements for nutrients, such as carbon (Furla et al. 1998), nitrogen (Grover et al. 2002) and phosphate (Muller-Parker et al. 1990), mainly through recycling the cnidarian waste products (for a review, see Davy et al. 2012). Glycerol, glucose, amino acids and lipids are the major transferred photosynthates identified so far (Gates et al. 1995; Kellogg and Patton 1983; Muscatine 1967; Papina et al. 2003; Patton and Burris 1983; Whitehead and Douglas 2003). Lipids are essential to the cnidarian host for three main reasons: i) some lipid classes, such as wax esters (WEs) and triglycerides (TGs), are a valuable source of energy and are stored in animal tissues (Muscatine and Cernichiaro 1969; Oku et al. 2002), ii) other classes, such as phospholipids and sterols, are important constituents of cell membranes (Boutry et al. 1979; Tchernov et al. 2004), and iii) glycolipids and sterol-derived compounds have important roles in cellular recognition and cell signaling processes (Tarrant 2005; Hiraga et al. 2008). Lipid and FA compositions of both cnidarian hosts and their dinoflagellate symbionts have been widely reported. For example, differences between host and symbiont lipid contents have been described in sea anemones and corals (Harland et al. 1991; Zhukova and Titlyanov 2003; Treignier et al. 2008; Imbs et al. 2010b; Imbs et al. 2014). Transfers of *Symbiodinium* FAs, such as myristic acid (14:0), palmitic acid (16:0),  $\alpha$ -linolenic acid (18:3n-3) or  $\gamma$ -linolenic acid (18:3n-6), to the cnidarian host have been strongly suggested (Al-Moghrabi et al. 1995; Papina et al. 2003; Zhukova and Titlyanov 2003; Imbs et al. 2010a; Teece et al. 2011), and recent studies also found evidence of FA transfers from host to symbionts (Imbs et al. 2014). Recent studies highlighted lipid regulatory mechanisms established between host and symbionts. Cnidarian species have a high sterol content, although these organisms are unable to synthesize sterols *de novo* from glycolytic intermediates (Baumgarten et al. 2015; Tarrant et al. 2009; Yamashiro et al. 1999). Cnidarians must therefore obtain sterols directly through dietary intake or from their dinoflagellate symbionts. Active transport of lipids/sterols through endosomes has been identified between the host and symbionts. A potential lipid/sterol transporter was recently

identified in both *A. viridis* and *A. pallida* (Dani et al. 2014; Lehnert et al. 2014). The related genes were shown to be differentially expressed between the symbiont-containing tissue (gastrodermis) and the non-symbiotic tissue (epidermis), as well as between healthy and stressed specimens (Ganot et al. 2011; Dani et al. 2014). In *A. viridis*, this protein is localized at the symbiosome membrane complex surrounding *Symbiodinium* and is proposed to play a role in the symbiotic interaction (Dani et al. 2014). Under standard conditions, *Symbiodinium* have also been shown to produce lipid droplets, which may translocate in host gastrodermal cells (Peng et al. 2011). This lipid trafficking seems to be mostly involved in symbiotic cells, whereas the epidermal contribution has yet to be determined. Nevertheless, the specific contribution of the host cellular layers has never been investigated via lipid content comparisons in healthy specimens or at the onset of symbiosis disruption.

Symbiotic cnidarians, such as corals, have a key role in marine biodiversity as they form both the trophic and structural foundation of coral reef ecosystems, as well as diverse temperate habitats. However, coral reefs, for example, are highly vulnerable to global warming. Environmental changes, such as increases in seawater temperature or acidification, often result in the loss of symbionts (bleaching), which can ultimately lead to the death of corals and destruction of the reef (Hoegh-Guldberg et al. 2007). Substantial differences in lipid abundance have been described in bleached specimens compared to healthy symbiotic cnidarians (Bachok et al. 2006; Garrett et al. 2013). Environmental changes, such as light and temperature increases, have also been shown to induce variations in cnidarian lipid and FA contents (Zhukova and Titlyanov 2003; Treignier et al. 2008), as well as in *Symbiodinium* cells cultured under high temperatures (Tchernov et al. 2004, Kneeland et al. 2013). These shifts in FA composition have therefore been proposed as sensitive indicators of thermal stress (Tchernov et al. 2004, Bachok et al. 2006, Tolosa et al. 2011, Kneeland et al. 2013). Nevertheless, these indicators have never been investigated in both epidermis and gastrodermis to assess the effect of thermal stress on host physiology.

This study focuses on the FA composition of lipids in the temperate sea anemone *A. viridis* and involves a comparison between host cellular compartments, the non-symbiotic epidermis and symbiont-containing gastrodermal cells, while assessing the FA composition of dinoflagellate symbionts isolated from gastrodermal cells. *A. viridis* was chosen as a model to study cnidarian-dinoflagellate symbiosis because of its homogeneity in the hosted symbiont ("temperate A" clade) and for its experimental advantages (the size of individuals and tentacles). Lipids and FAs were extracted from tentacles, then characterized and identified from each cellular compartment. Lipid and FA compositions were compared to assess potential transfers between the partners, especially those involved in symbiosis maintenance. We also investigated the response of *A. viridis* to short-term hyperthermal stress (5 days) to assess modifications in lipid and FA composition. This was based on the use of lipid indicators of thermal stress previously identified in *Symbiodinium* cells, such as C18 unsaturation and 18:1n-9 to 18:4n-3 ratios, or the polar/neutral lipid-to-sterol ratio (Tchernov et al. 2004; Kneeland et al. 2013). The results indicated that these lipid indicators can be used to assess

symbiotic cnidarian physiology, especially in response to environmental changes or at the onset of cnidarian bleaching.

## 2. Materials and methods

### Biological material

*A. viridis* specimens (n=5) were collected in shallow waters in the bay of Villefranche-sur-Mer (Mediterranean Sea, France). They were maintained in laboratory-controlled conditions and acclimated for at least 2 months before experimentation. The sea water temperature was maintained at  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ . The light level was maintained at  $175\text{-}200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with a 12 h light/dark photoperiod, corresponding to the photosynthetic light saturation of *Symbiodinium*, occurring at about  $190 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fitt et al. 1982; Tytler and Davies 1984). Sea water was renewed every 2 days. Specimens were fed brine shrimp weekly, then starved a few days before the experiments to avoid sample contamination by food metabolites. Four sea anemones were subjected to hyperthermal stress ( $+ 10^\circ\text{C}$ ) for 5 days, with continuous monitoring of temperature and salinity, using the same experimental design as already reported for transcriptomic analyses (Moya et al. 2012). One was not subjected to the thermal stress and was used as an experimental control to assess the sampling bias. Twenty tentacles were sampled using scissors from each of the 5 specimens at day 0 (d0), day 1 (d1) and day 5 (d5). All sampling was performed at 10:00 am to avoid circadian lipid shifts (Crossland et al. 1980).

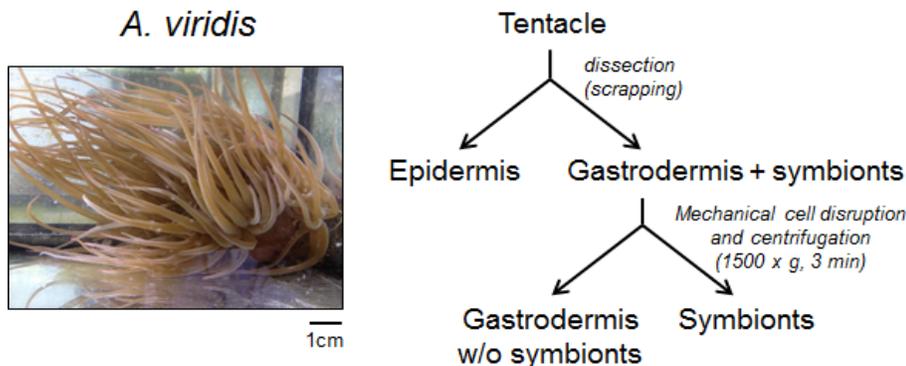
### *Symbiodinium* density quantification

*Symbiodinium* density was quantified as described by Moya et al. (2012). Briefly, samples were homogenized in phosphate buffer using a glass homogenizer, and the protein content was determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, France). An aliquot of this homogenate was used to count the *Symbiodinium* density on a Neubauer hemocytometer (p2074) and results were expressed as a number of cells per mg of protein.

### Tissue layer separation

*A. viridis* has large tentacles, which is an experimental advantage since the two cellular layers can be separated from each other, and the *Symbiodinium* cells may also be isolated. *A. viridis* hosts an average of  $1.10^5$  symbionts per mg of tentacle (Ganot et al. 2011), that all belong to the “temperate A” clade (Visram et al. 2006; Casado-Amezúa et al. 2014). Gastrodermis (Gas) hosting *Symbiodinium* cells (Sym) was scrapped from epidermis (Epi) with forceps. *Symbiodinium* cells were further isolated from the gastrodermis by mechanical cell disruption using a 23 gauge hypodermic needle and then centrifugation at  $1500 \times g$  for 3 min (Figure 1). The supernatant containing the gastrodermal fraction was centrifuged again to remove any trace of symbionts. The pellet containing *Symbiodinium* cells was washed three times with filtered seawater to ensure

complete separation between symbionts and gastrodermal cells. The purity of the symbiont fraction was assessed as described in Dani et al. (Dani et al. 2014). Samples were weighed, deep frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.



**Figure 1: sample processing scheme.** Preparation of epidermal, gastrodermal and *Symbiodinium* cell extracts from *A. viridis* tentacles.

## Lipid extraction

Total lipids were extracted from separated animal tissues and symbionts of each of the 5 specimens according to a method adapted from Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959). Tissue samples were ground in a blender at 2500  $\times$ g for 2 min in a 38 mL mixture of chloroform:methanol: 7% aqueous NaCl (1:2:0.8, v/v/v) and filtered. The slurry and the filter were then ground in a blender, mixed and filtered with the same extraction buffer, and this operation was renewed with 30 mL of chloroform. The liquid phase was transferred into extraction funnel with 30 mL of 7% aqueous NaCl, mixed and degassed under a nitrogen atmosphere. Layer separation took at least 2 hours. The organic layer was evaporated under reduced pressure at 38°C. All evaporated samples were transferred into vials, freeze-dried, and weighed. To avoid lipid auto-oxidation, all operations were carried out under a nitrogen atmosphere. Samples were stored at -80°C between each analysis.

## Lipid separation

Total lipids were separated into neutral lipids (NLs) and polar lipids (PLs) by solid-phase (silica) extraction. NLs were eluted with 12 mL of chloroform. PLs were eluted with 8 mL of acetone and 12 mL of methanol, followed by 4 mL of methanol-30% aqueous  $\text{NH}_3$  (90/10, v/v). Fractions were derivatized with 1mL of 7% boron trifluoride in methanol ( $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ ) and 1mL of toluene (100°C for 60 min) according to a method adapted from Morrison and Smith (1964) to prepare FA methyl esters (FAMES). After heating, 2 mL of distilled water were added. Samples were centrifuged (3000  $\times$ g for 4 min). The organic layer was separated

and the aqueous layer was extracted three times with 1 mL of toluene. FAMES were isolated from sterols and sterol esters by thin layer chromatography on silica gel plates, according to Miller et al. (Miller et al. 1998). The neutral fraction was diluted with 125  $\mu\text{L}$  of chloroform and applied with a syringe pump, as well as 10  $\mu\text{L}$  of commercial FAME and sterol standards. Elution was performed in *n*-hexane:diethylether:acetic acid (170:30:2.5, v/v/v) for 30 min. Plates were dried, sprayed with a solution containing 0.2% of 2,7-dichloro-fluorescein in ethanol and placed under a UV lamp (Ultraviolet products,  $\lambda = 254$  and 366 nm) to display strips. Silica strips containing FAMES and sterols were extracted separately and washed with 20 mL of *n*-hexane. The liquid phase was separated under reduced pressure through fritted glass, and the operation was renewed with 20 mL of chloroform:*n*-hexane (1:1, v/v) and 20 mL of chloroform. Sterols were derivatized just prior GC-MS analyses with *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). 500  $\mu\text{L}$  of BSTFA was added to sterol samples under stirring at ambient temperature for 1 hour. The samples were diluted with 500  $\mu\text{L}$  of cyclohexane and analyzed by GC-MS.

### **Lipid and fatty acid identification**

Total lipids were separated by thin-layer chromatography coupled with flame-ionization detection (TLC-FID) using an Iatroscan MK V TH10 (Chromarods SIII, Iatron Laboratories) and ChromStar 4.14 software (Ackman 1981). Sigma standards were purchased for Chromarods calibration: cholesterol, diacylglycerols (DGs), free FAs (FFAs), polar lipids (PLs), triacylglycerols (TG), and sterol esters (SE). Extracts were diluted with chloroform (12 mg mL<sup>-1</sup>) and 1  $\mu\text{L}$  of solution was applied to 10 cm long silica-coated quartz rods using an automatic sampler and the process was carried out in triplicate. For lipid separation, they were successively eluted in *n*-hexane:benzene:formic acid 80:20:1 (v/v/v) for 23 min followed by 5 min dry at room temperature, eluted in *n*-hexane:diethyl ether:formic acid 97:3:1.5 (v/v/v) for 22 min followed by 5 min drying at room temperature. After development, chromarods were dried (100°C for 5 min) and analyzed immediately to minimize adsorption of atmospheric contaminants. Samples were injected in duplicates, and chromatograms were compared to standards and integrated manually (Volkman and Nichols 1991). The results were given as an area percentage of 1 peak (= 1 lipid class) relative to the total chromatogram area. A blank sample (100% solvent) was injected between each analysis to avoid carry over.

FAMES and sterols were analyzed by GC-MS, and each sample was injected in triplicate. GC-MS analyses were performed on a ThermoQuest trace GC/Automass III multi, single quadrupole mass spectrometer run with the Xcalibur 1.2 software package (instrument A) and on a ThermoQuest trace GC/Thermo ITQ 900, ion trap mass spectrometer run with the Xcalibur 2.1 software package (instrument B). The Electron Ionization method was used at 70 eV. Separation of FAMES was conducted in a Zebron ZB-WAX column (30 m long, 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, Phenomenex) using instrument A. The temperature program was as follows: initial, 80°C; ramp 52.5°C min<sup>-1</sup> to 185°C with a 118 min hold. The injector temperature was maintained at 225°C. Using instrument B, FAMES were separated on a Thermo TG-5MS

column (30 m long, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness). The temperature program was as follows: initial, 160°C; ramp 1.5°C min<sup>-1</sup> to 270°C. The injector temperature was maintained at 280°C. The sterol fraction was analyzed with instrument A, on a Zebron ZB-5MS (5% phenyl, 30 m long, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  thickness, Phenomenex). The temperature program was as follows: initial, 100°C; ramp 25°C min<sup>-1</sup> to 230°C, 2.5°C min<sup>-1</sup> to 290°C, and 11°C min<sup>-1</sup> to 300°C. For both instruments, the carrier gas was helium at a constant flow of 1 ml. min<sup>-1</sup>, and solutions were injected in split mode with a ratio of 10. GC-MS analytical standards were purchased from Sigma-Aldrich (Menhaden:Capelin 1:1 fish oil; sterol standards and FAME Mix no. 47885-U). The GC-MS results were given in relative area (percentage of 1 peak = 1 FAME). Areas are calculated from raw data, and the ionization cross-section of each class of molecules was not taken into account. A blank sample (100% solvent) was injected between each analysis to avoid carryover. Due to the reduced lipid amounts, FAMES and sterols were identified in 3 of the 4 tested sea anemones. FAMES and sterols were identified using the mass spectral database (NIST 2008) and diagnostic ions in mass spectra, with additional FAME identification based on the retention index (equivalent chain length: ECL). Two sets of analytical standards were injected to confirm the FAME and sterol identification. ECLs were calculated using an equation from Dubois et al. (Dubois et al. 2009), which is a modification of Kovats indices. Each FAME has a specific ECL based on its retention parameters and compared to the corresponding saturated fatty acid. According to the international nomenclature, the position of the first double bond is given by the (n-x) notation, by counting the number of carbon atoms from the methyl end (Christie 1982).

## Data analysis

Non-parametric statistics were chosen to analyze data since they are specifically designed for analyzing small datasets ( $n < 30$ ) (LeBlanc 2004; Linebach et al. 2014).

Differences in individual lipid classes between epidermis, gastrodermis and *Symbiodinium*, specific FA variations between tissues, and temperature stress ratios were analyzed using the one-way permutation test (an equivalent of the Kruskal and Wallis test, based on permutations). When significant variations were detected between tissues, a post-hoc Tukey's test was performed to define to which tissue differences were attributed. Analyses were performed using R software (v. 2.15.2; R Development Core Team 2012) with the Coin package (Zeileis et al. 2008). Analyses were performed on raw data, except for lipid ratios, which were log transformed. Comparisons were considered significantly different for  $P$ -values  $< 0.05$ .

A second set of analyses were performed to investigate the overall FA composition of the different compartments: (i) The differences in global FA content between animal tissues (epidermis and gastrodermis) and symbionts were tested with the non-parametric one-way ANOSIM test (analysis of similarities, Clarke and Green 1988), which is an analogue of the ANOVA test (analysis of variance), using PRIMER 5, (ii) the covariation of polar lipid fatty acids (PFAs) between animal tissues was analyzed using factorial correspondence analysis (FCA, Benzécri 1973), with SPAD 3.0 software. The analysis was performed on a

reduced data matrix (raw data and Arcsin transformed data independently), where FAs were used as the variables and animal tissues (epidermis and gastrodermis) as observations. *Symbiodinium* data were added as supplementary observations, i.e. they were graphically projected but not used in the factorial axes calculations. Distances between FAs were computed with the  $\chi^2$  metrics, which allows simultaneous representation of variables and observations on the same plane. The size of symbols is proportional to their contribution on the projected factorial axes, (iii) following the FCA, a hierarchical cluster analysis (HCA) was conducted on PFAs using Ward's method and Manhattan's distance to agglomerate animal tissues and symbionts according to their FA composition, using R 2.15.2, with the FactoMineR package (Lê 2008).

### 3. Results

#### Lipid class composition

Total lipids extracted from *A. viridis* whole tentacles averaged  $17 \pm 2\%$  ( $n=5$ ) of tissue dry mass. Total lipids were also extracted separately from epidermal, gastrodermal and *Symbiodinium* cells (Table 1). Symbionts displayed the highest amount of lipids ( $23.5 \pm 1\%$  of tissue dry mass) compared to animal cell layers, while the lowest lipid content was recorded for the epidermal cell layer ( $14.1 \pm 1.4\%$  of tissue dry mass).

**Table 1: Lipid content in *A. viridis*.** Dry weight and lipid content in *A. viridis* host tissues (epidermis and gastrodermis) and isolated *Symbiodinium* cells (mean  $\pm$  SEM,  $n=5$ ).

	Epidermis	Gastrodermis	<i>Symbiodinium</i>
tissue dw <sup>1</sup> (mg)	41.3 $\pm$ 3.3	19.0 $\pm$ 2.1	19.1 $\pm$ 3.1
tissue dw (%)	52.0 $\pm$ 4.1	23.9 $\pm$ 2.7	24.1 $\pm$ 3.8
lipid content per tissue (mg)	5.8 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.4
lipid content per tissue dw (%)	14.1 $\pm$ 1.4	16.9 $\pm$ 1.2	23.5 $\pm$ 1.0

<sup>1</sup>dry weight

Total lipids from each cellular fraction were divided into six distinct lipid classes: WEs/SEs, FFAs, TGs, DGs, sterols and PLs, which are mainly composed of phospholipids, glycolipids and, in small proportions, pigments. The lipid class distribution (Table 2) was characterized by the dominance of PLs in both animal and *Symbiodinium* cells (81.9 to 86.5% of total lipids) and a high proportion of sterols (8.4 to 15.5% of total lipids).

**Table 2: Lipid classes composition in *A. viridis*.** Content of individual lipid classes (% of total lipids, mean  $\pm$  SEM, n=5) in epidermal and gastrodermal tissues of *A.viridis* and *Symbiodinium* (WE/SE: wax esters and sterols esters; FFA: free fatty acids; TG: triacylglycerol; DG: diacylglycerol). \*, significant values (one-way test followed by Tukey post-hoc test;  $P<0.05$ )

Lipid class	Epidermis	Gastrodermis	<i>Symbiodinium</i>
WE/SE	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.4
FFA	0.6 $\pm$ 0.1*	1.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.4
TG	0.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.4
DG	0.7 $\pm$ 0.0*	1.5 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2
Sterols	15.5 $\pm$ 0.9*	11.5 $\pm$ 0.6*	8.4 $\pm$ 1.0*
Polar Lipids	81.9 $\pm$ 0.8	83.8 $\pm$ 0.8	86.5* $\pm$ 0.8

Regarding the tissue distribution, *Symbiodinium* had a significantly higher relative PL content than gastrodermis and epidermis (86.5%, 83.8% and 81.9% of total lipids, respectively;  $P= 0.027$ , one-way test;  $P <0.05$ , post-hoc Tukey test). In contrast, sterols showed higher percentages in epidermis (15.5% of total lipids) than in gastrodermis and *Symbiodinium* (11.5% and 8.4% of total lipids, respectively;  $P= 0.019$ , one-way test;  $P <0.05$  for each pairwise comparison, post-hoc Tukey test). The main contribution to the sterol fraction was cholesterol (70.2-74.9% of total sterol content). We also detected various quantities of the following sterols: cholesta-4,6-dien-3 $\beta$ ol, 24-norcholestadienol, dehydroergosterol, 22-dehydrocholesterol, cholestanol, stellasterol, brassicasterol and  $\beta$ -sitosterol, as well as the steroid ketone Cholesta-3,5-dien-3 $\beta$ -one (Table 3).

**Table 3 *A. viridis* sterol composition.** Sterol relative composition (%) in epidermis and gastrodermis of *A. viridis* tentacles, and *Symbiodinium*. Mean  $\pm$  SEM, n=3.

Sterol	Epidermis	Gastrodermis	<i>Symbiodinium</i>
Cholesta-4,6-dien-3 $\beta$ -ol	0.1 $\pm$ 0.1	tr	0.1 $\pm$ 0.1
24-norcholestadienol	0.8 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Dehydroergosterol	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
Cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol	7.1 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 1.3	6.0 $\pm$ 0.9
Cholesterol	65.8 $\pm$ 2.3	74.9 $\pm$ 5.4	70.2 $\pm$ 5.3
Cholestanol	0.2 $\pm$ 0.1		0.3 $\pm$ 0.1
Stellasterol	3.3 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 1.0	6.8 $\pm$ 1.4
Brassicasterol	3.3 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 1.8
Unknown C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	6.7 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 1.4	3.8 $\pm$ 1.8
$\beta$ -sitosterol	0.9 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3
Other sterols	8.7 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 3.9

tr, trace

## Fatty acid composition

The FA composition of epidermis, gastrodermis and *Symbiodinium* were determined by GC-MS after derivatization of lipids into their corresponding FAMES (transesterification). The overall FA composition of PLs (PFAs), which contained phospholipids and glycolipids, and FA composition of NLs (NFAs), which were composed of WEs/SEs, FFAs, DGs, and TGs, are presented in Table 4. We identified 71 FAMES, which had a linear carbon chain that ranged from 14 to 24 carbons, 0 to 6 unsaturations and 0 to 4 methyl-groups. The FA composition was similar overall between NFAs and PFAs, but the relative distribution of specific FAs differed between cellular fractions (see for example 18:4n-3 or 20:1n-7, Figure 2). The polyunsaturated FA to monounsaturated FA ratio (PUFA/MUFA) was higher for PFAs (3.3-3.9) than for NFAs (0.4-0.9, Table 4). For both lipid classes, the PUFA/MUFA ratio was highest in *Symbiodinium* cells and lowest in gastrodermal cells. However, the n-6/n-3 ratio was similar in all cellular fractions for both lipid classes, ranging from 0.2 (*Symbiodinium*) to 0.4 (epidermis).

The NFA composition was dominated in both animal and *Symbiodinium* cells by the saturated FAs palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0), as well as the MUFAs oleic acid (18:1n-9) and paullinic acid (20:1n-7), and the PUFAs 20:5n-3 and docosapentaenoic acid (22:5n-3), as listed in Table 4.

**Table 4: *A. viridis* NFA and PFA composition.** Fatty acid relative composition (%) and ratios of fatty acids within neutral lipid fatty acid (NFA) and polar lipid fatty acid (PFA) fractions in epidermis and gastrodermis of *A. viridis* tentacles, and *Symbiodinium*. Mean  $\pm$  SEM, n=3.

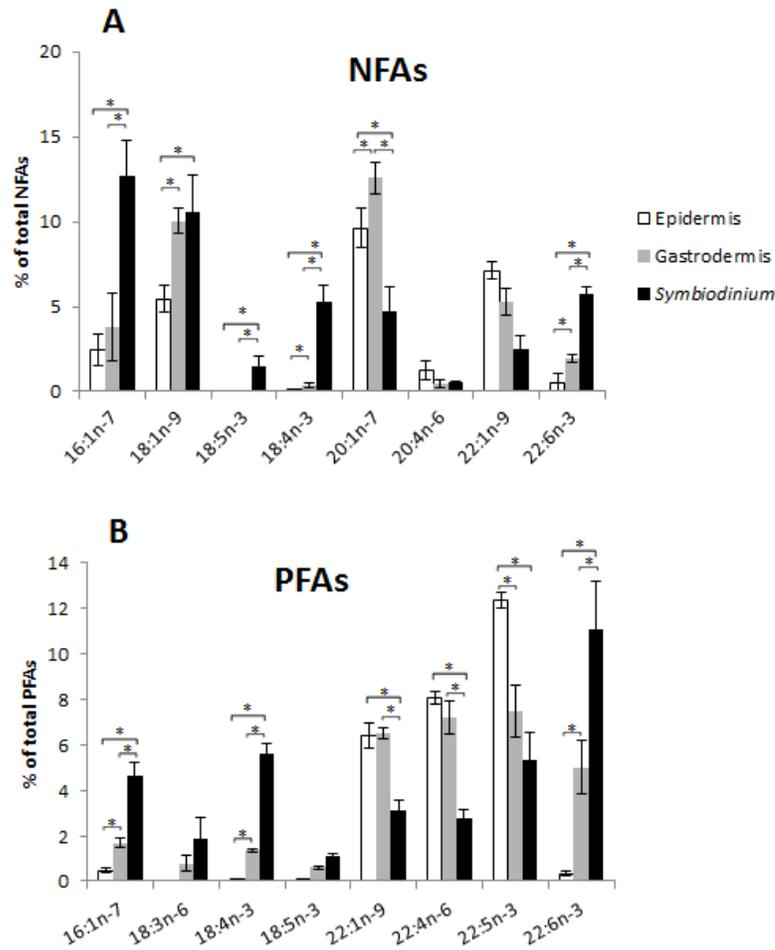
FA	NFA			PFA		
	Epidermis	Gastrodermis	<i>Symbiodinium</i>	Epidermis	Gastrodermis	<i>Symbiodinium</i>
14:0	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	tr	0.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
16:0	20.1 $\pm$ 4.9	14.9 $\pm$ 3.0	23.6 $\pm$ 2.9	13.7 $\pm$ 1.6	19.9 $\pm$ 3.0	22.9 $\pm$ 1.6
18:0	18.7 $\pm$ 7.5	18.5 $\pm$ 5.5	4.8 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 0.2	8.5 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 1.0
19:0	0.7 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.3	tr	0.3 $\pm$ 0.1	tr	tr
20:0	0.9 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
<b><math>\Sigma</math> Saturated</b>	<b>42.9 <math>\pm</math> 11.2</b>	<b>36.6 <math>\pm</math> 3.4</b>	<b>29.3 <math>\pm</math> 3.4</b>	<b>23.8 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>29.2 <math>\pm</math> 3.4</b>	<b>31.1 <math>\pm</math> 2.3</b>
16:1n-9	0.8 $\pm$ 0.3					tr
16:1n-7	2.4 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 2.0	12.7 $\pm$ 2.1	0.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.6
Iso 17:1	0.8 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2
18:1n-9	5.5 $\pm$ 0.8	10.1 $\pm$ 0.7	10.6 $\pm$ 2.2	1.4 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2
18:1n-7	4.0 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.6	5.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3

20:1n-11	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1		tr		
20:1n-9	1.7 ± 0.2	2.9 ± 0.6	1.3 ± 0.3			
20:1n-7	9.6 ± 1.2	12.6 ± 0.9	4.8 ± 1.4	3.6 ± 0.6	4.0 ± 0.2	1.9 ± 0.4
22:1n-9	7.1 ± 0.5	5.3 ± 0.8	2.5 ± 0.9	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.3	3.1 ± 0.5
22:1n-7	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1
<b>Σ MUFA</b>	<b>33.6 ± 2.0</b>	<b>43.7 ± 0.6</b>	<b>37.9 ± 0.7</b>	<b>16.3 ± 0.8</b>	<b>16.2 ± 0.8</b>	<b>14.1 ± 1.9</b>
18:2n-9	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
18:2n-6	0.5 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.1 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2
18:3n-6	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.4 ± 1.4		0.8 ± 0.3	1.9 ± 0.9
18:4n-3	tr	0.3 ± 0.1	5.3 ± 0.9	tr	1.4 ± 0.1	5.6 ± 0.4
18:5n-3			1.5 ± 0.6	tr	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1
20:2n-9	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1
20:4n-6	1.3 ± 0.6	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.1	5.8 ± 0.6	4.0 ± 0.3	3.1 ± 0.1
20:5n-3	6.2 ± 2.6	4.4 ± 0.7	6.3 ± 1.7	28.7 ± 0.7	24.0 ± 1.9	20.5 ± 2.1
22:2	0.9 ± 0.5		0.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1
22:4n-6	3.8 ± 1.8	1.3 ± 0.7	1.8 ± 0.5	8.1 ± 0.3	7.2 ± 0.7	2.8 ± 0.4
22:5n-3	8.1 ± 3.4	7.6 ± 1.5	5.8 ± 1.7	12.3 ± 0.4	7.5 ± 1.2	5.3 ± 1.2
22:6n-3	0.5 ± 0.3	1.9 ± 0.6	5.8 ± 0.4	0.3 ± 0.1	5.0 ± 1.2	11.1 ± 2.1
<b>Σ PUFA</b>	<b>23.1 ± 9.2</b>	<b>18.6 ± 3.3</b>	<b>32.2 ± 4.1</b>	<b>59.0 ± 4.1</b>	<b>54.0 ± 4.0</b>	<b>54.3 ± 4.2</b>
<b>PUFA/MUFA</b>	<b>0.7 ± 0.2</b>	<b>0.4 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>3.6 ± 0.1</b>	<b>3.3 ± 0.4</b>	<b>3.9 ± 0.7</b>
<b>Σ n-6</b>	<b>6.4 ± 2.4</b>	<b>3.8 ± 1.3</b>	<b>6.3 ± 1.3</b>	<b>15.0 ± 0.8</b>	<b>13.0 ± 1.0</b>	<b>9.3 ± 1.3</b>
<b>Σ n-3</b>	<b>14.9 ± 6.3</b>	<b>14.5 ± 1.8</b>	<b>25.0 ± 4.5</b>	<b>41.7 ± 1.0</b>	<b>38.7 ± 3.2</b>	<b>43.9 ± 3.9</b>
<b>n-6/n-3</b>	<b>0.4 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>	<b>0.4 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>

tr, trace; Minor fatty acids (<0.5%) not listed; areas are calculated from raw data, the ionization cross-section of each class of molecules was not taken into account.

We performed an ANOSIM to highlight differences in FA composition between cell compartments. The ANOSIM test revealed no significant difference in the overall NFA composition between epidermal, gastrodermal and *Symbiodinium* cells (Table S1; global  $R = 0.56$ ,  $P = 0.014$ ). A focus on selected NFAs (Figure 2A) demonstrated that specific NFAs were exclusively or predominantly found in *Symbiodinium* cells, such as octadecapentaenoic acid (18:5n-3), stearidonic acid (18:4n-3), 22:6n-3, and to a lesser extent palmitoleic acid

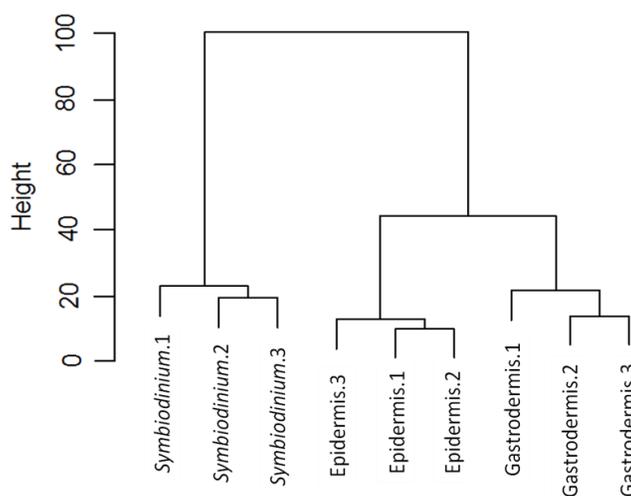
(16:1n-7), as demonstrated by the *One-way* permutation test, followed by the Tukey post-hoc test ( $P = 0.043$ ; 0.026; 0.031 and 0.033, respectively, *One-way* test). In contrast, NFAs 18:0, 20:4n-6, 20:1n-7 and 22:1n-9 tended to be more abundant in sea anemone cell layers than in *Symbiodinium* (Figure 2A, significant for 20:1n-7,  $P = 0.041$  and 22:1n-9,  $P = 0.072$ , *One-way* test).



**Figure 2: *A. viridis* FA composition.** Relative contribution of specific (A) neutral lipid fatty acids (NFAs) and (B) polar lipid fatty acids (PFAs) in *A. viridis* tissues. The results are given as means  $\pm$  SEM,  $n=3$ ; \*, significant values (one-way test followed by Tukey post-hoc test,  $P<0.05$ ).

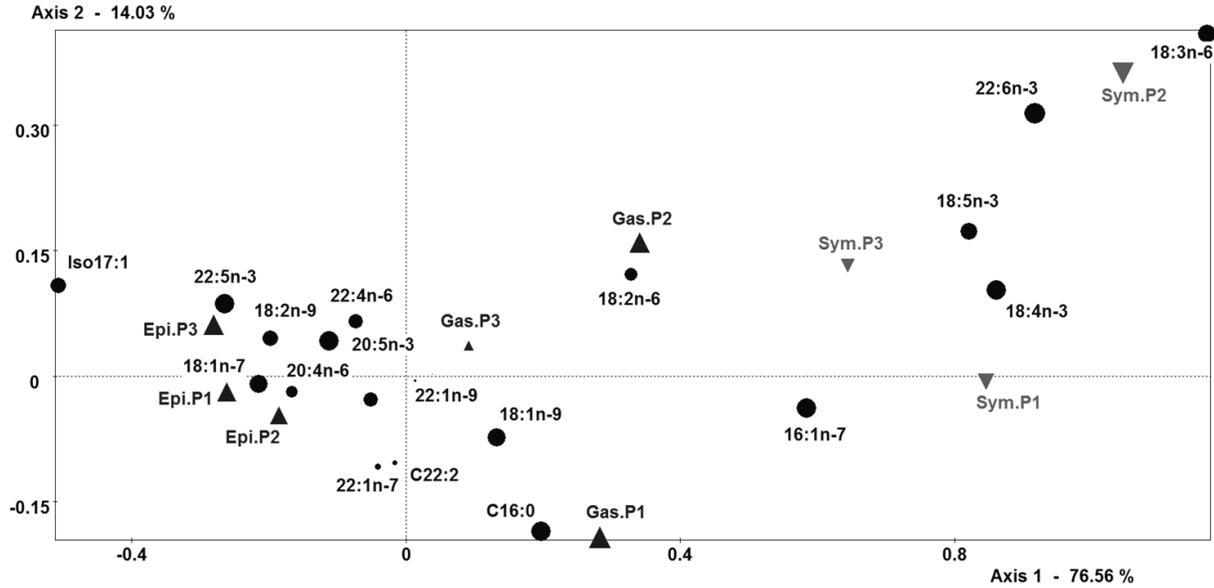
The PFA composition was dominated in both animal cells and *Symbiodinium* by the saturated FAs 16:0 and 18:0, and the PUFAs 20:5n-3 and 22:5n-3 (Table 4). Both ANOSIM and HCA analyses were first performed to estimate the difference in FA composition. The covariation of FAs with cell compartments was then analyzed using FCA. The results of the ANOSIM test revealed significant differences in the overall PFA distribution, not only between animal fractions and *Symbiodinium*, but also between epidermal and gastrodermal cell layers (Table S2;  $R = 0.86$ ,  $P = 0.004$ ). A comparison of specific PFA distributions between

epidermal, gastrodermal and *Symbiodinium* cells demonstrated that 16:1n-7, 18:4n-3, 18:5n-3 and 22:6n-3 were mainly found in *Symbiodinium* and gastrodermis ( $P = 0.032, 0.027, 0.055$  and  $0.048$ , respectively, one-way test), while only traces of these PFAs were detected in epidermis (Figure 2B). In contrast, the PFA composition of sea anemone cell layers (both epidermis and gastrodermis) was dominated by 22:1n-9, 22:4n-6 and 22:5n-3 ( $P = 0.034, 0.026, 0.040$ , respectively, *One-way* test), which were found in lower concentration in *Symbiodinium*. An HCA analysis was conducted to identify similarities between PFA patterns that were characterized for each cellular extract (epidermis, gastrodermis and *Symbiodinium*) from the three tested sea anemones. The results presented in Figure 3 showed three distinct groups, i.e. epidermis, gastrodermis and *Symbiodinium*, thus supporting the previous results obtained in the ANOSIM analysis.



**Figure 3: HCA on *A. viridis* PFA composition.** Hierarchical cluster analysis of the polar lipid fatty acid (PFA) composition of epidermis, gastrodermis and *Symbiodinium* ( $n=3$ ), tested with Ward's method and Manhattan's distance.

Sources of variability in PFA composition were characterized using FCA (Figure 4), with animal PFAs as active variables and *Symbiodinium* PFAs as supplementary variables in order to highlight animal tissue variability. The first two factorial axes explained 90.59% of the total variance. The first axis explained 76.56% of the total inertia, while axis 2 explained 14.03%. Axis 1 distinguished PFAs from *Symbiodinium*, gastrodermis and epidermis. PUFAs 18:3n-6, 18:4n-3, 18:5n-3 and 22:6n-3 were associated with *Symbiodinium* samples, whereas 18:1n-7, 20:5n-3 and 22:5n-3, were associated with the epidermal cell layer. Figure 4 also suggested that the PUFA 18:2n-6 was associated with gastrodermis. Axis 2 matched the saturated FA 16:0 against the PUFAs 18:3n-6 and 22:6n-3n, which were mainly associated with *Symbiodinium* fractions.



**Figure 4: FCA on *A. viridis* PFA composition.** Factorial correspondence analysis on the polar lipid fatty acid (PFA) composition of epidermis (Epi), gastrodermis (Gas) and *Symbiodinium* (Sym), n=3. Epidermis and gastrodermis were used as active variables and plotted with ▲ whereas *Symbiodinium* cells were used as supplementary variables and plotted with ▼. Observations are plotted with ●. The size of symbols is proportional to their respective contribution to the factorial plane.

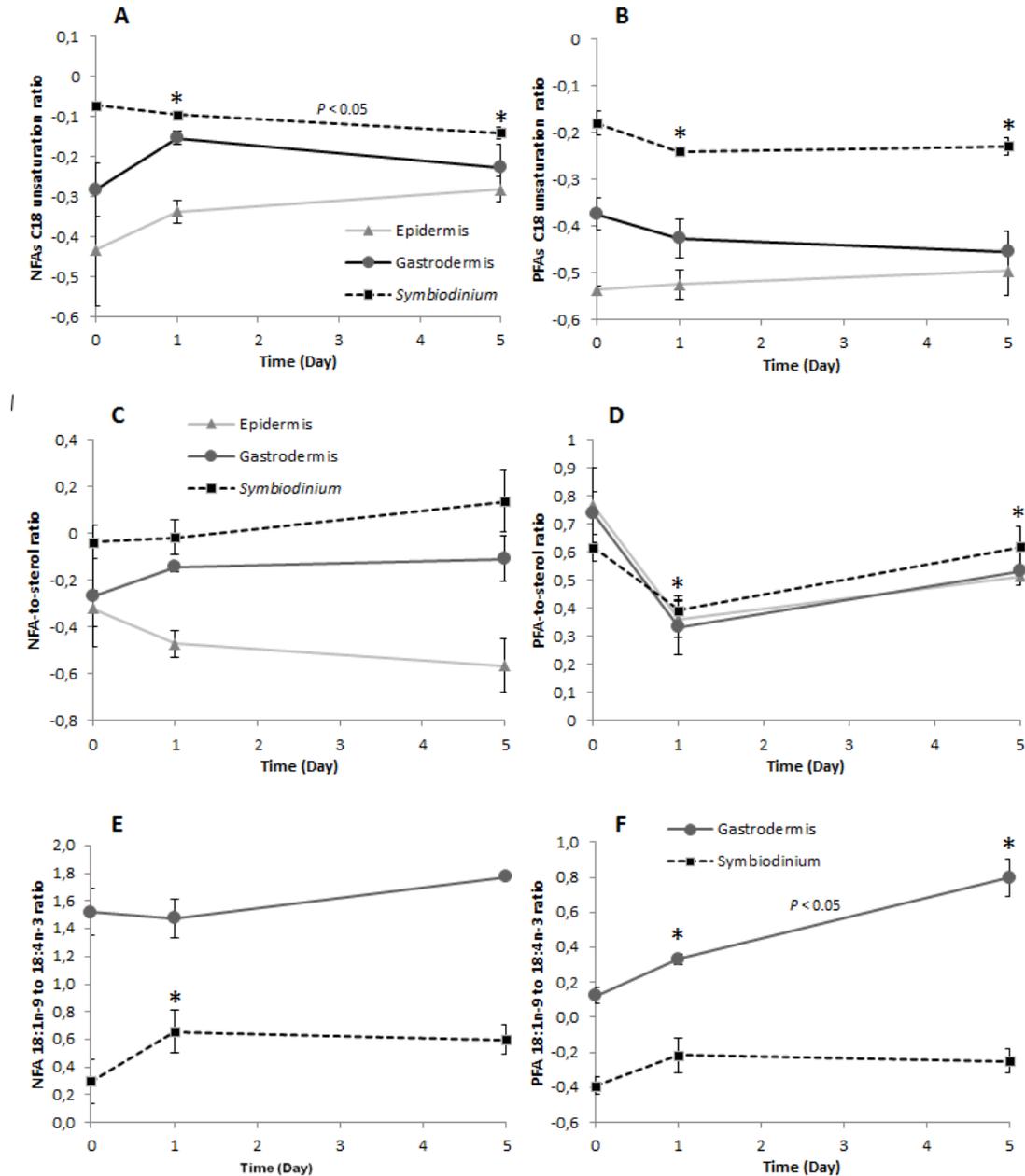
### Short-term thermal stress

We investigated the effect of short-term hyperthermal stress on the FA composition in animal tissues (epidermis and gastrodermis) and symbionts. Sea anemones were exposed to an acute 10°C increase in water temperature from 19°C to 29°C for 5 days. Indeed, in the Mediterranean Sea, average mean sea surface temperatures range from 14°C in winter to 24°C in summer, but average maximum temperatures of 29.6°C have been recorded (Garrabou et al. 2009). The symbiont density was monitored during the stress experiment to assess host bleaching, and showed no difference at day 1, with a slight decrease for *Symbiodinium* at day 5 (80% of d0 symbiont density, Figure S1). We focused on three thermal stress indicators to evaluate the *A. viridis* stress response in terms of lipid composition for each lipid class, membrane constituting lipids (PFAs and sterols) and storage lipids (NFAs). No significant variation in lipid composition due to sampling (tentacle removal) was observed in the control specimen.

The first indicator was the C18 unsaturation ratio, defined by Equation 1, which described the degree of FA unsaturation within the C18 series.

$$\text{Equation 1: } C18 \text{ unsaturation degree} = \frac{\sum \text{unsaturated C18 FAs}}{\sum C18 \text{ FAs}}$$

The results are presented in Figure 5.



**Figure 5: Lipid indicators of thermal stress.** Variations in the C18 unsaturation ratio (sum of unsaturated C18 fatty acids to total C18 fatty acids) in response to short-term hyperthermal stress, based on the equation 1; (A) neutral lipid fatty acids (NFAs) and (B) polar lipid fatty acids (PFAs) C18 unsaturation ratio in epidermis, gastrodermis, and *Symbiodinium* fractions of *A. viridis*. Variations in the fatty acid (FA)/sterol ratio in response to short-term hyperthermal stress, calculated from the mass of FAs and the mass of sterols obtained from each sample; (C) neutral lipid fatty acids (NFAs) and (D) polar lipid fatty acids (PFAs) to sterol ratio in epidermis, gastrodermis, and *Symbiodinium* fractions of *A. viridis*. Variations in the 18:1n-9/18:4n-3 ratio in response to short-term hyperthermal stress. (A) neutral lipid fatty acids (NFAs) and (B) polar lipid fatty acids (PFAs) 18:1n-9/18:4n-3 ratio in gastrodermis, and *Symbiodinium* fractions of *A. viridis*. Log-transformed data. The results are given as means ± SEM, n=3. Significant values: one-way test followed by Tukey post-hoc test; \* different from d0, P<0.05 different between d1 and d5.

Exposure to thermal stress resulted in a significant decrease in the NFA C18 unsaturation degree in *Symbiodinium* cells ( $P = 0.043$ , one-way test; Figure 5A). In contrast, this ratio tended to increase in animal tissues, mostly at day 1 (Figure 5A; epidermis and gastrodermis). Regarding PFAs (Figure 5B), the C18 unsaturation ratio remained stable in epidermis, while it decreased significantly in symbionts ( $P = 0.046$ , one-way test) and, to a lesser extent, in gastrodermis ( $P = 0.052$ , one-way test).

The NFA- or PFA-to-sterol ratio was the second indicator chosen to evaluate thermal stress. The NFA-to-sterol ratio reflected variations in energy reserves over membrane lipids, while the PFA-to-sterol ratio indicated modifications in membrane components. These ratios displayed different patterns for storage lipids (Figure 5C) and membrane lipids (Figure 5D). While no significant modifications were noted for the NFA-to-sterol ratios (Figure 5C), at day 1 in *Symbiodinium* cells we observed a marked decrease in the PFA-to-sterol ratio (Figure 5D), which seemed to come back to its initial value at day 5 ( $P = 0.048$ , one-way test;  $P < 0.05$ , Tukey post-hoc test; Figure 5D). Epidermis followed the same trend and was significant at a different  $P$ -value ( $P = 0.096$ , one-way test;  $P < 0.05$ , Tukey post-hoc test)

We also monitored variations in the 18:1n-9 to 18:4n-3 ratio in both NFA and PFA prepared from gastrodermal and *Symbiodinium* cells. This indicator was not calculated for epidermis because 18:4n-3 was under the detection limit. Values of this ratio were much higher for NFAs than for PFAs (0.2 to 1.8 and -0.4 to 0.8, respectively, log transformed data), due to a greater 18:1n-9 concentration in storage lipids (Figures 5E and F). Regarding the storage lipid fraction, the NFA 18:1n-9 to 18:4n-3 ratio displayed a significant increase at day 1 in *Symbiodinium* cells (Figure 5E;  $P = 0.037$ , one-way test;  $P < 0.05$ , Tukey post-hoc test), while it remained stable in gastrodermis. In contrast, the PFA 18:1n-9 to 18:4n-3 ratio, which is a qualitative indicator of membrane lipids, strongly increased in gastrodermis over a time course of exposure to high temperatures (Figure 5F;  $P = 0.040$ , one-way test;  $P < 0.05$ ; Tukey post-hoc test). An increase of this ratio was also observed in *Symbiodinium* cells at day 5 ( $P = 0.051$ , one-way test;  $P < 0.05$ ; Tukey post-hoc test).

## 4. Discussion

### Polar lipids constitute the main lipid class in *A. viridis*

The total lipid content found in *A. viridis* tentacles (17% of the dry weight) was in accordance with previous quantifications of total lipids extracted from temperate symbiotic sea anemones (Harland et al. 1991). These values ranged from 5 to 20% of the dry weight, whereas estimations from non-symbiotic sea anemones were lower, ranging from 5 to 9% of the dry weight (Harland et al. 1991). Tropical symbiotic cnidarians, however, displayed higher total lipid contents representing 12 to 37% of their dry weight (Harland et al. 1993; Yamashiro et al. 1999; Imbs et al. 2010b). In corals, lipids are the main source of stored

energy and symbiotic dinoflagellates largely contribute to coral health by translocating part of their lipids to their host (Patton and Burris 1983; Treignier et al. 2009; Imbs et al. 2014). In *A. viridis* tissues, lipids were more concentrated in *Symbiodinium* (23.5% of lipid per dry weight) than in the animal cell layers (14.1% to 16.9% in epidermis and gastrodermis, respectively), indicating that *Symbiodinium* may be the main site of lipid production within the holobiont.

The lipid composition of epidermis, gastrodermis, and hosted *Symbiodinium* was determined for the first time in the sea anemone *A. viridis*. Each cellular compartment (epidermal, gastrodermal) and *Symbiodinium* cells can be isolated without cross-contamination (Ganot et al. 2011; Dani et al. 2014). The same lipid classes were found in both animal cell layers and *Symbiodinium*. The lipid class distribution was characterized by the dominance of PLs, which ranged from 81.9 to 86.5% of total lipids, and by small amounts of WEs, FFAs, DGs and TGs. This is, to our knowledge, the highest amount of PLs found so far in symbiotic cnidarians, in which PL proportions ranging from 14 to 56% have been documented (Patton et al. 1977; Yamashiro et al. 1999; Imbs et al. 2010b; Imbs et al. 2014). This high PL content is generally found in polar non-symbiotic cnidarians, such as *Diphyes antartica* (Nelson et al. 2000). Most PLs, such as phospholipids and glycolipids, constitute the building blocks of eukaryotic membranes lipid bilayers. Differences in PL composition have been observed in several *Symbiodinium* cultures and field corals in response to environmental changes, mostly an increase in sea water temperature (Tchernov et al. 2004; Bachok et al. 2006; Tolosa et al. 2011; Kneeland et al. 2013). These studies suggested that PLs are involved in biochemical adaptations associated with thermal tolerance in both *Symbiodinium* cells and their coral hosts. A comparison of lipid profiles between aposymbiotic (bleached) and symbiotic specimens of the sea anemone *Aiptasia pallida* also suggested that a subset of PLs are involved in the symbiotic interaction with *Symbiodinium* (Garrett et al. 2013). Therefore, the high proportion of PLs found in *A. viridis* may be related to the hosted *Symbiodinium* ("temperate A" clade), or may be explained by the necessity for these temperate sea anemones to regularly cope with environmental changes, such as temperature increases in tide pools or seasonal temperature changes.

In contrast to many symbiotic corals, *A. viridis* contain fewer NLs (2.6 to 5.2% of total lipids), such as TGs and WEs (Yamashiro et al. 1999; Imbs et al. 2006). Indeed, the NL content in corals varies with environmental conditions, such as nutrient availability, light and temperature, and usually ranges from 50% to 65% of total lipid per dry tissue weight. NLs are mostly used for energy production and are partly stored in lipid droplets in coral gastrodermal cells (Kellogg and Patton 1983; Luo et al. 2009; Peng et al. 2011). Recent studies have suggested that lipid droplets accumulated in *Symbiodinium* may be transferred to the host gastrodermal cells (Luo et al. 2009; Peng et al. 2011; Weng et al. 2014). Nevertheless, such lipid droplet structures were seldom encountered in *A. viridis* using transmission electron microscopy (data not shown). This observation, which was correlated with the low amount of NLs, may be explained by the stability in the

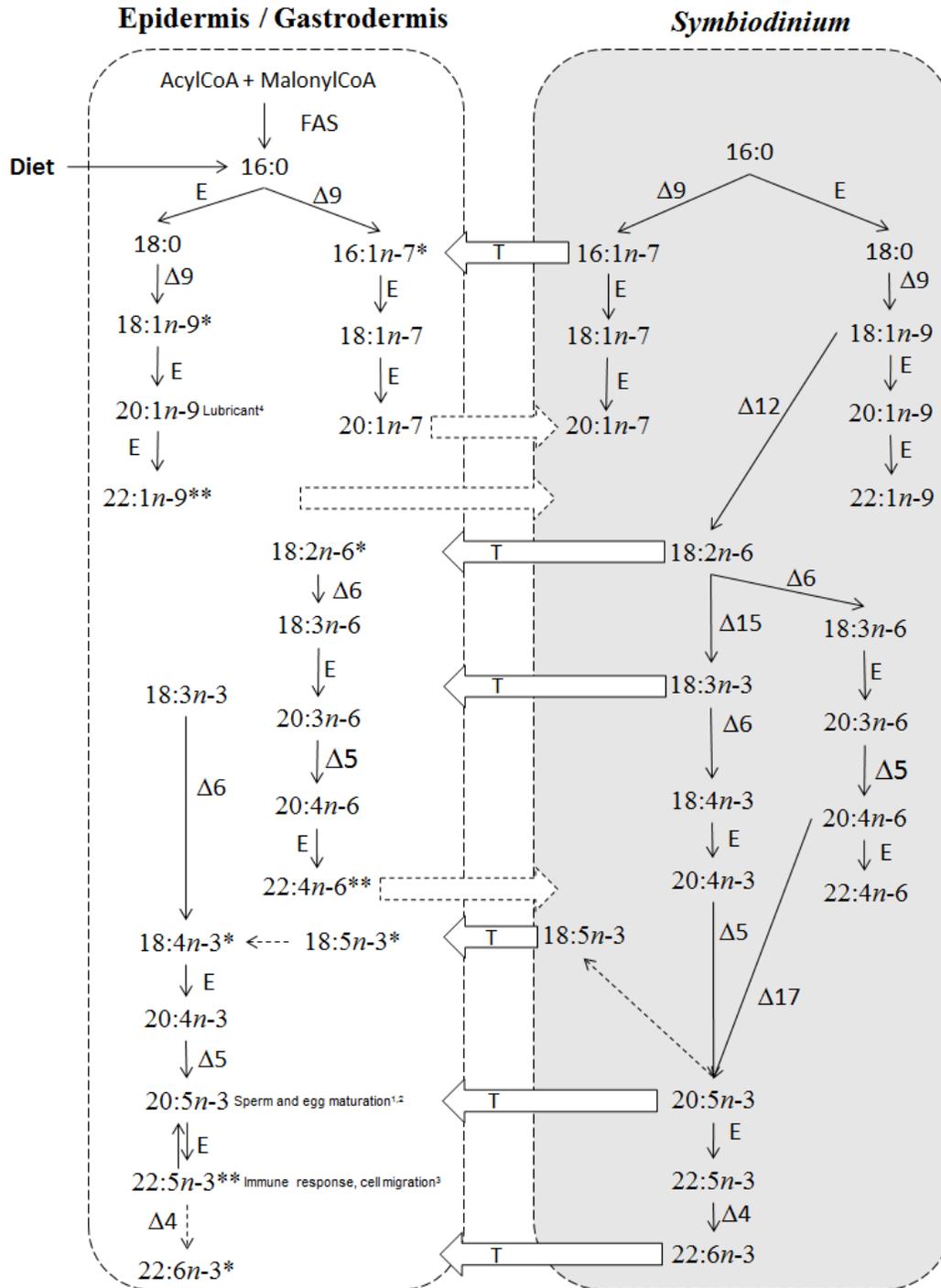
availability of nutrients from dietary sources or from symbionts, in Mediterranean Sea anemones compared to tropical corals.

*A. viridis* also contained high proportions of sterols, that were differentially distributed among tissues, with epidermis having more sterols (15.5% of total lipids) than gastrodermis and isolated *Symbiodinium* cells (11.5% and 8.4% of total lipids respectively,  $P < 0.05$ , one-way test). Many other cnidarian species have a high sterol content (7 to 15% of total lipids), although these organisms have not been shown to synthesize sterols *de novo*. Indeed, analysis of the cnidarian genomes available so far were found lack some of the genes that encode critical enzymes required for *de novo* synthesis from glycolytic intermediates (Baumgarten et al. 2015; Tarrant et al. 2009; Yamashiro et al. 1999). Cnidarians must therefore obtain cholesterol directly through dietary intake or from dinoflagellate-synthesized sterols that are then converted into cholesterol. Cholesterol was the main sterol found in all tissues. The dominance of cholesterol has already been observed in dinoflagellates (Mansour et al. 1999; Volkman 2003). A variety of sterols, including specific dinoflagellate-synthesized sterols, were detected in addition to cholesterol. Although part of the sterol production was expected to be assumed by dinoflagellates, the high sterol content within epidermis suggests that cnidarians may have cellular mechanisms that regulate the uptake, trafficking, and conversion of dinoflagellate-synthesized sterols in cells. A potential lipid/sterol transporter was recently identified in both *A. viridis* and *Aiptasia* (Dani et al. 2014; Lehnert et al. 2014). In *A. viridis*, this protein is localized at the symbiosome membrane complex surrounding *Symbiodinium* and is proposed to play a role in the symbiotic interaction (Dani et al. 2014). These findings supported the probable active transport of lipids/sterols from dinoflagellate symbionts to their host. However, the biological function of most of these sterols is still unknown, although some were assumed to have important physiological roles, such as steroid signaling (Tarrant 2005; Tarrant et al. 2009; Garrett et al. 2013).

### **FA composition differs between animal cell layers and *Symbiodinium***

The FA composition was slightly different between PLs and NLs. PUFAs were more abundant than MUFAs in PLs, which was expected as multiple unsaturations are essential for membrane fluidity in both cnidarian cells and *Symbiodinium* (Tchernov et al. 2004). PUFA/MUFA ratios were also in accordance with those described in other cnidarians (Yamashiro et al. 1999).

The issues discussed in this section are supported by Figure 6, which summarizes the results, and describes possible pathways of FA biosynthesis in *A. viridis* cells and in *Symbiodinium*, as well as possible transfers of FAs between the symbiotic partners, according to FA identifications and quantifications within the different cell compartments. The proposed biosynthetic FA pathways are in accordance with the previous results of Imbs et al. (2010a) and Dunn et al. (2012). Table 5 summarizes the principal FAs discussed in the text, with their main distribution in sea anemones.



**Figure 6: FA biosynthesis.** Possible fatty acid (FA) biosynthesis pathways in cnidarian cells and *Symbiodinium*, and potential transfers of FAs between the symbiotic partners. FAS, fatty acid synthase;  $\Delta$ , desaturase; E, elongase; T, documented (continuous arrow) and potential (dotted arrow) transfers. \*, more concentrated in gastrodermis than in epidermis; \*\*, more concentrated in animal tissues than in *Symbiodinium* cells. Putative roles of FAs: <sup>1</sup>, Bishop and Kendrick 1980; <sup>2</sup>, Pernet et al. 2002; <sup>3</sup>, Kaur et al. 2011; <sup>4</sup>, Miyazaki et al. 2001.

**Table 5: Main fatty acids discussed in this study.** Specific fatty acids discussed in the text, their presence in host (epidermis and gastrodermis) and symbiont, putative functions and associated references.

Fatty acid	Main distribution	Note	Reference
18:2n-6	G, S	gastrodermis signature,	Bachok et al. 2006;
18:4n-3	G, S	transfer from <i>Symbiodinium</i> <i>Symbiodinium</i> signature,	Dunn et al. 2012 Ghioni et al. 2001;
20:5n-3	E, G, S	transfer from <i>Symbiodinium</i> sperm and egg maturation,	Imbs et al. 2010b Pernet et al. 2002;
22:5n-3	E, G	symbiosis epidermis signature, immune response and cell migration	Treignier et al. 2008 Kaur et al. 2011

E, epidermis; G, gastrodermis; S, *Symbiodinium*

The main NFAs extracted from animal cell layers (epidermis and gastrodermis) were 16:0 and 18:0, while 16:0, 16:1n-7 and 18:1n-9 prevailed in *Symbiodinium* cells. Since these later FAs are known to be synthesized by dinoflagellates (Leblond and Chapman 2000), these results gave additional clues about the efficiency and specificity of the tissue separation that was performed in this study. Palmitate in animal cells is *de novo* synthesized from glucose, but also derives from dietary sources, or from *Symbiodinium*, as in the case of symbiotic cnidarians. Chain elongation and desaturation of 16:0 and subsequent FAs may occur to yield longer chain FAs of the n-7 and n-9 series (Miyazaki and Ntambi 2008). In *A. viridis*, 18:1n-9 was twofold more abundant in NLs from gastrodermis and *Symbiodinium* than in NLs from epidermis, and this MUFA may be transferred from *Symbiodinium* to host cells. More surprisingly, 20:1n-7, 20:1n-9 and 22:1n-9 predominated in animal cells (epidermis and gastrodermis), but were also found in *Symbiodinium*. Dinoflagellates usually do not possess long chain MUFAs, such as 20:1n-7, 20:1n-9 and 22:1n-9 (Mansour et al. 1999). The presence of such MUFAs in *Symbiodinium* may therefore result from their transfer from *A. viridis*. MUFAs have diverse and crucial roles in organisms. Apart from being incorporated in more complex lipids, they can act as mediators of signal transduction, cellular differentiation, and metabolic homeostasis. In addition, 20:1n-9 is the main MUFA found in another class of lipids in rodents, i.e. 1-alkyl-2,3-diacylglycerols, which are known to be lubricants and to prevent the evaporation of moisture from the skin and eyeball (Miyazaki et al. 2001). These diacylglycerols may therefore participate in the same process in sea anemones, as they have to protect themselves from water evaporation during low tides, e.g. by producing mucus (Bythell and Wild 2011).

The most abundant PFA was 20:5n-3 in both epidermis and gastrodermis, whereas *Symbiodinium* PFAs were dominated by 16:0 and 20:5n-3. The latter is essential for sperm and egg maturation in cnidarians (Bishop and Kenrick 1980; Pernet et al. 2002). Moreover, PUFAs contribute to membrane fluidity. Free living dinoflagellate PUFAs are usually dominated by 22:6n-3 over 20:5n-3 (Mansour et al. 1999; Leblond and

Chapman 2000; Mansour et al. 2003). The relatively high content of 20:5n-3 found in *Symbiodinium* cells may therefore reflect their symbiotic state, as reported in other corals (Zhukova and Titlyanov 2003; Treignier et al. 2008). *A. viridis* cells also contained high amount of 16:0, 18:0, and 22:5n-3, which can be retro-converted into 20:5n-3 in animals (Kaur et al. 2011). Animals are completely dependent on plants (or algae in this case) for providing the two major precursors of n-6 and n-3 FAs, 18:2n-6 and 18:3n-3, which are called essential FAs (Papina et al. 2003; Bachok et al. 2006; Dunn et al. 2012). Moreover, the FCA analysis highlighted differences between epidermis and gastrodermis in terms of PFA content, and showed that 18:2n-6 contributed to a gastrodermis signature, suggesting a FA transfer of 18:2n-6 from *Symbiodinium* to gastrodermal cells. The PUFAs 18:3n-6, 18:4n-3, and 18:5n-3, which are mainly synthesized by *Symbiodinium*, were already suggested to be lipid markers of coral symbionts (Papina et al. 2003; Imbs et al. 2010b). In fishes, 18:5n-3 can be rapidly converted to 18:4n-3, which is the precursor of longer PUFAs of the n-3 series (Ghioni et al. 2001). Consequently, we assumed that the high amount of 20:5n-3 and 22:5n-3 in animal tissues was the result of a transfer from *Symbiodinium* of either of these FAs or their respective precursors, 18:5n-3 and 18:4n-3. The same observations and hypotheses have been reported with regard to other symbiotic cnidarian species (Papina et al. 2003; Treignier et al. 2008; Imbs et al. 2010b; Imbs et al. 2014). While animals have a limited capacity to convert 22:5n-3 to 22:6n-3, *Symbiodinium* can directly produce 22:6n-3 using its  $\Delta 4$ -desaturase. We therefore propose that the PUFA 22:6n-3 was also transferred from *Symbiodinium* to *A. viridis* gastrodermal cells (Figure 6), where it may be used or further metabolized, as only traces were found in epidermis (Table 4). Interestingly, a role of these PUFAs in coral reproduction and larval dispersion has also been hypothesized because the main PUFAs found in non-symbiotic eggs and larvae of the coral *Goniastrea retiformis* were 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3, which were probably derived from *Symbiodinium* cells hosted in the adult colony (Figueiredo et al. 2012). Further investigations are needed to determine the biological roles of these n-3 PUFAs in symbiotic cnidarians. PUFAs of the n-6 series, such as 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-6 and 22:4n-6, may be produced by cnidarians or their dinoflagellate symbionts (Dunn et al. 2012). We have quantified higher amounts of 20:4n-6 and 22:4n-6 in *A. viridis* cell layers, especially in epidermis, than in *Symbiodinium*. The same observations were reported in other cnidarians species, such as the coral *Montipora digitata* (Imbs et al. 2014). Nevertheless, neither 20:4n-6 nor 22:4n-6 were found in free-living marine dinoflagellates or in *Symbiodinium* cultures (Suzuki et al. 2003). Our results therefore suggested that PUFAs may also be transferred from the cnidarian host to its dinoflagellate symbionts. Moreover, the FCA analysis clearly showed that gastrodermal tissue was linked with *Symbiodinium* cells in terms of overall PFA contents, while the epidermal tissue appeared to have a more specific signature. Indeed, some PFAs of symbiont origin, such as 18:2n-6 or 22:6n-3, displayed a gastrodermal signature. The host-symbiont lipid regulation seems more specifically focused on symbiont FA transfers to the host gastrodermal tissues. These results are in accordance with previous investigations on host-symbiont FA transfers, from lipid droplets (Peng et al. 2011) or active transport by proteins (Dani et al. 2014).

## **A. *viridis* lipids are affected by a short-term hyperthermal stress**

Lipid metabolism is known to be affected by a thermal stress event in symbiotic cnidarians (Bachok et al. 2006, Fitt et al. 2009, Imbs et al. 2012). A relatively high level of C18 PUFAs, such as 18:3n-3, 18:4n-3 or 18:5n-3, has been found in symbiotic cnidarians (Papina et al. 2003), compared to non-symbiotic species (Imbs et al. 2009) or bleached individuals (Bachok et al. 2006). Lipid sensitivity to thermal stress can be evaluated through specific indicators, such as FA unsaturation degrees or ratios between lipid classes (Tchernov et al. 2004; Kneeland et al. 2013). The C18 unsaturation ratio was correlated with *Symbiodinium* thermal sensitivity and bleaching (Tchernov et al. 2004). A shift in the PUFA content in both stressed cnidarians and cultured *Symbiodinium* has been demonstrated, but none of these studies examined its patterns in separated host tissues (epidermis and gastrodermis) and symbionts during thermal stress.

Exposure of *A. viridis* to hyperthermal stress resulted in a decrease in the C18 unsaturation ratio for *Symbiodinium* NFAs and PFAs, as already observed in different *Symbiodinium* spp. strains (Kneeland et al. 2013). In *A. viridis*, the PFA C18 unsaturation ratio in gastrodermis (symbiont containing tissue) decreased over the course of the thermal stress. This was correlated with a substantial increase in the 18:1n-9 to 18:4n-3 ratio, mainly supported by the drop in 18:4n-3 relative quantity. Such results have been reported for cultured *Symbiodinium* strains, e.g. a lower 18:1n-9 to 18:4n-3 ratio was reported for thermally sensitive *Symbiodinium* strains as compared to thermally tolerant ones (Tchernov et al. 2004). Production of reactive oxygen species (ROS) at elevated temperatures is thought to oxidize *Symbiodinium* membrane lipids (Tchernov et al. 2004), and is known to be a significant contribution to cnidarian bleaching (Downs et al. 2002). Since reactive oxidation affects unsaturated fatty acids, modulation of the PUFA concentration in thylakoid membranes enhances their thermal stability (Murakami et al. 2000). The rapid loss of PUFAs during thermal stress could be explained by ROS attack or by the reduction in symbiont metabolic activity and lipid transfers. Indeed, lipid peroxidation products were observed as early as day 1 in heat-stressed *A. viridis* tissues and isolated symbionts in a similar stress experiment (Richier et al. 2005). Nevertheless, a significant loss of symbionts was not observed at day 5 (Figure S1), and was only quantified after 10 days of thermal stress (Moya et al. 2012; Dani et al. 2014).

Sterols are linked to saturated FAs (SAFAs) within membranes (Pitman et al. 2004). The total FA-to-sterol ratio was described as being a useful indicator to investigate thermal stress (Kneeland et al. 2013). In *A. viridis*, the sterol concentration was stable over the 5 days of exposure to high temperature. The FA-to-sterol ratio was thus highly impacted by the FA concentrations, which displayed high modifications, mostly in PFA fractions. Indeed, we observed a stress-induced depletion of PFAs compared to sterols in *Symbiodinium* at day 1, and to a lesser extent in epidermis. This decrease in PFA concentration was correlated with results from the other indicators (18:1n-9 to 18:4n-3 and C18 unsaturation ratios), that all reflected the loss of PUFAs. Such results have already been highlighted in corals and cultured *Symbiodinium* in response to thermal stress (Bachok et al. 2006; Kneeland et al. 2013).

Interestingly, most indicators displayed significant modifications at day 1. These results suggested that thermal stress induced a rapid modification in lipid metabolism, especially PUFAs and their incorporation into membranes. Transcriptomic analyses have been performed previously on *A. viridis* specimens under the same experimental conditions (Moya et al. 2012). These data also highlighted a strong but transient transcriptional response at day 1. Among the most differentially expressed genes, we found many annotated genes involved in FA metabolism (Moya et al 2012). Nevertheless, the pattern of most lipid indicators at day 5 suggested that sea anemones were able to acclimate to high temperature, at least temporarily. Overall, these results suggested that lipid and FA metabolism were strongly regulated in the *A. viridis-Symbiodinium* spp. symbiosis. Induction of thermal stress resulted first in a decrease in FA unsaturation, possibly attributed to ROS attack (Tchernov et al. 2004; Richier et al. 2005) and/or modifications in gene expression (Moya et al. 2012), but not in symbiont loss.

## 5. Conclusion

Lipids have multiple roles in regulating the symbiotic interaction between a cnidarian host and its dinoflagellate symbionts. For example, lipids may be involved in fulfilling energy requirements, signaling, communication, membrane fluidity and remodeling. Characterization of lipid and FA compositions of *A. viridis* epidermal, gastrodermal and hosted *Symbiodinium* cells suggested that some lipid translocations may occur from *Symbiodinium* to *A. viridis*, but also the other way round. Such metabolite transfers have been the focus of extensive studies but lipid translocations have seldom been demonstrated. While several lines of evidence are in favor of such transfers, further studies are still needed to gain further insight into how these translocations occur (from lipid droplet production, as well as active transport of lipids), and how they are regulated during stress events. For example, we demonstrated that lipid metabolism was not uniformly regulated within the holobiont during short-term thermal stress. Gastrodermal and *Symbiodinium* cells were highly impacted. We observed a decreased unsaturation rate in FAs of both NLs and PLs soon after thermal stress induction, probably due to the reduction in lipid translocation from symbionts to animal cell layers. We also observed a marked decrease in the PFA-to-sterol ratio, which resulted from the loss of PUFAs.

The ecological importance of cnidarian-dinoflagellate symbiosis is largely recognized, and massive bleaching phenomena due to global warming has prompted the study of early physiological responses to stress in order to better understand and prevent bleaching episodes. The results presented in this study highlighted a short-term response in terms of lipid regulation during stress, several days before the beginning of massive symbiont loss, and mostly focused on symbiotic tissues. Indeed, the PFA-to-sterol ratio can be used as a useful indicator to investigate thermal stress consequences at the onset of cnidarian bleaching. Nevertheless, the role of specific lipid compounds in symbiotic cnidarian physiology remains to be investigated in closer detail. For example, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry

imaging (MALDI-MSI) will be used to study the distribution of lipids affected by a thermal stress and to gain insight into their putative biological roles (Kopp et al. 2015).

## Acknowledgments

We thank the anonymous reviewers for their constructive comments, which helped us to improve the manuscript. We are very grateful to David Manley for editing this manuscript. We thank the University of Nice for its support (BQR2009 Message), which initiates this study. This work has also been supported by the French ANRJCJC grant ANR-12-JSV7-0009-01 (inSIDE project).

## References

- Ackman R (1981) Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods in Enzymology* 72:205-252
- Al-Moghrabi S, Allemand D, Couret JM, Jaubert J (1995) Fatty acids of the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*: effect of light and feeding. *J Comp Physiol B* 165:183-192
- Bachok Z, Mfilinge P, Tsuchiya M (2006) Characterization of fatty acid composition in healthy and bleached corals from Okinawa, Japan. *Coral Reefs* 25:545-554
- Baumgarten S, Simakov O, Esherick LY, Liew YJ, Lehnert EM, Michell CT, Li Y, Hambleton EA, Guse A, Oates ME, Gough J, Weis VM, Aranda M, Pringle JR, Voolstra CR (2015) The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* doi:10.1073/pnas.1513318112
- Benzécri JP (1973) *L'analyse des données*, Tome 2 Dunod, Paris
- Bergé J-P, Barnathan G (2005) Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. In: Ulber R, Gal Y (eds) *Marine Biotechnology I*, vol 96. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 49-125.
- Bishop D, Kenrick J (1980) Fatty acid composition of symbiotic zooxanthellae in relation to their hosts *Lipids* 15:799-804 doi:10.1007/BF02534368
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917
- Boutry J, Saliot A, Barbier M (1979) The diversity of marine sterols and the role of algal bio-masses; from facts to hypothesis. *Experientia* 35:1541-1543
- Bythell JC, Wild C (2011) Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 408:88-93
- Christie W (1982) *The analysis of complex lipids*. Pergamon Press: New York,
- Clarke K, Green R (1988) Statistical design and analysis for a 'biological effects' study. *Marine Ecology Progress Series* 46:213-226
- Crossland CJ, Barnes DJ, Cox T, Devereux M (1980) Compartmentation and turnover of organic carbon in the Staghorn coral *Acropora formosa* *Marine Biology* 59:181-187 doi:10.1007/BF00396866
- Dani V, Ganot P, Priouzeau F, Furla P, Sabourault C (2014) Are Niemann-Pick type C proteins key players in cnidarian–dinoflagellate endosymbioses? *Molecular Ecology* 23:4527-4540
- Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76:229-261
- Downs CA, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemiss J, Woodley CM (2002) Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine* 33:533-543

- Dubois N, Barnathan G, Gouygou J-P, Bergé J-P (2009) Gas chromatographic behavior of fatty acid derivatives for mass spectrometry on low-polarity capillary columns. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111:688-697
- Dunn SR, Thomas MC, Nette GW, Dove SG (2012) A lipidomic approach to understanding free fatty acid lipogenesis derived from dissolved inorganic carbon within cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *PloS one* 7:e46801
- Figueiredo J, Baird AH, Cohen MF, Flot JF, Kamiki T, Meziane T, Tsuchiya M, Yamasaki H (2012) Ontogenetic change in the lipid and fatty acid composition of scleractinian coral larvae. *Coral Reefs* 31:613-619
- Fitt WK, Pardy RL, Littler MM (1982) Photosynthesis, respiration, and contribution to community productivity of the symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 61:213-232
- Furla P, Bénazet-Tambutté S, Jaubert J, Allemand D (1998) Functional polarity of the tentacle of the sea anemone *Anemonia viridis*: role in inorganic carbon acquisition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 274:R303-R310
- Ganot P, Moya A, Magnone V, Allemand D, Furla P, Sabourault C (2011) Adaptations to endosymbiosis in a cnidarian-dinoflagellate association: differential gene expression and specific gene duplications. *PLoS genetics* 7:e1002187
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, Bally M, Chevaldonné P, Cigliano M, Díaz D, Harmelin J.-G, Gambi M and Kersting D (2009) Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global change biology*, 15, 1090-1103.
- Garrett TA, Schmeitzel JL, Klein JA, Hwang JJ, Schwarz JA (2013) Comparative lipid profiling of the cnidarian *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate symbiont. *PloS one* 8:e57975
- Gates RD, Hoegh-Guldberg O, McFall-Ngai MJ, Bil KY, Muscatine L (1995) Free amino acids exhibit anthozoan "host factor" activity: they induce the release of photosynthate from symbiotic dinoflagellates in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:7430-7434
- Ghioni C, Porter AEA, Sadler IH, Tocher DR, Sargent JR (2001) Cultured fish cells metabolize octadecapentaenoic acid (all-cis  $\delta$ 3,6,9,12,15-18:5) to octadecatetraenoic acid (all-cis  $\delta$ 6,9,12,15-18:4) via its 2-trans intermediate (trans  $\delta$ 2, all-cis  $\delta$ 6,9,12,15-18:5). *Lipids* 36:145-153
- Grover R, Maguer J-F, Reynaud-Vaganay S, Ferrier-Pages C (2002) Uptake of ammonium by the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: effect of feeding, light, and ammonium concentrations. *Limnology and Oceanography* 47:782-790
- Harland AD, Fixter LM, Davies PS, Anderson RA (1991) Distribution of lipids between the zooxanthellae and animal compartment in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*: Wax esters, triglycerides and fatty acids. *Mar Biol* 110:13-19
- Harland AD, Navarro JC, Spencer Davies P, Fixter LM (1993) Lipids of some Caribbean and Red Sea corals: total lipid, wax esters, triglycerides and fatty acids. *Mar Biol* 117:113-117
- Hiraga Y, Shikano T, Widiyanti T, Ohkata K (2008) Three new glycolipids with cytolytic activity from cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Natural Product Research* 22:649-657
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatziolos ME (2007) Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318:1737-1742
- Imbs A, Demina O, Demidkova D (2006) Lipid class and fatty acid composition of the boreal soft coral *Gersemia rubiformis*. *Lipids* 41:721-725
- Imbs A, Demidkova D, Dautova T, Latyshev N (2009) Fatty Acid Biomarkers of Symbionts and Unusual Inhibition of Tetracosapolyenoic Acid Biosynthesis in Corals (Octocorallia) *Lipids* 44:325-335 doi:10.1007/s11745-008-3266-2
- Imbs A, Yakovleva I, Latyshev N, Pham L (2010a) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in zooxanthellae and polyps of corals. *Russian Journal of Marine Biology* 36:452-457
- Imbs AB, Latyshev NA, Dautova TN, Latypov YY (2010b) Distribution of lipids and fatty acids in corals by their taxonomic position and presence of zooxanthellae. *Marine Ecology Progress Series* 409:65-75
- Imbs AB, Yakovleva IM, Dautova TN, Bui LH, Jones P (2014) Diversity of fatty acid composition of symbiotic dinoflagellates in corals: Evidence for the transfer of host PUFAs to the symbionts. *Phytochemistry* 101:76-82

- Jeong HJ, Du Yoo Y, Kim JS, Seong KA, Kang NS, Kim TH (2010) Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean science journal* 45:65-91
- Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ (2011) Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress in Lipid Research* 50:28-34
- Kellogg RB, Patton JS (1983) Lipid droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Mar Biol* 75:137-149
- Kneeland J, Hughen K, Cervino J, Hauff B, Eglinton T (2013) Lipid biomarkers in *Symbiodinium* dinoflagellates: new indicators of thermal stress. *Coral Reefs* 32:923-934
- Kopp C et al. (2015) MALDI-MS and NanoSIMS imaging techniques to study cnidarian–dinoflagellate symbioses. *Zoology* 118(2):125-131
- Lê S, Josse, J. & Husson, F. (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25:1-18
- LeBlanc DC (2004) *Statistics: concepts and applications for science*. Jones & Bartlett Learning
- Leblond JD, Chapman PJ (2000) Lipid class distribution of highly unsaturated long chain fatty acids in marine dinoflagellates. *Journal of Phycology* 36:1103-1108
- Lehnert EM, Mouchka ME, Burriesci MS, Gallo ND, Schwarz JA, Pringle JR (2014) Extensive Differences in Gene Expression Between Symbiotic and Aposymbiotic Cnidarians. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 4:277-295
- Linebach JA, Tesch BP, Kovacsiss LM (2014) *Nonparametric statistics for applied research*. Springer
- Luo Y-J, Wang LH, Chen WN, Peng SE, Tzen JC, Hsiao YY, Huang HJ, Fang LS, Chen CS (2009) Ratiometric imaging of gastrodermal lipid bodies in coral–dinoflagellate endosymbiosis. *Coral Reefs* 28:289-301
- Mansour MP, Volkman JK, Jackson AE, Blackburn SI (1999) The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *Journal of Phycology* 35:710-720
- Mansour MP, Volkman JK, Blackburn SI (2003) The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture *Phytochemistry* 63:145-153 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00052-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00052-9)
- Miller CB, Morgan CA, Prahl F, Sparrow MA (1998) Storage lipids of the copepod *Calanus finmarchicus* from Georges Bank and the Gulf of Maine. *Limnology and Oceanography* 43:488-497
- Miyazaki M, Kim H-J, Man WC, Ntambi JM (2001) Oleoyl-CoA Is the Major de Novo Product of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Isoform and Substrate for the Biosynthesis of the Harderian Gland 1-Alkyl-2,3-diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* 276:39455-39461
- Miyazaki M, Ntambi JM (2008) Chapter 7 - Fatty acid desaturation and chain elongation in mammals. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*. Elsevier, San Diego, pp 191.
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *Journal of Lipid Research* 5:600-608
- Moya A, Ganot P, Furla P, Sabourault C (2012) The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Molecular Ecology* 21:1158-1174 doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05458.x
- Muller-Parker G, Cook C, D'Elia C (1990) Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pallida*. *Marine Ecology Progress Series* 60:283-290
- Murakami Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Kodama H, Iba K (2000) Trienoic Fatty Acids and Plant Tolerance of High Temperature *Science* 287:476-479 doi:10.1126/science.287.5452.476
- Muscatine L (1967) Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and tridacna and its control by the host. *Science* 156:516-519
- Muscatine L, Cernichiari E (1969) Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. *The Biological Bulletin* 137:506-523
- Nelson M, Phleger C, Mooney B, Nichols P (2000) Lipids of gelatinous antarctic zooplankton: Cnidaria and Ctenophora *Lipids* 35:551-559 doi:10.1007/s11745-000-555-5
- Oku H, Yamashiro H, Onaga K, Iwasaki H, Takara K (2002) Lipid distribution in branching coral *Montipora digitata*. *Fisheries Science* 68:517-522
- Papina M, Meziane T, van Woesik R (2003) Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 135:533-537
- Patton J, Abraham S, Benson A (1977) Lipogenesis in the intact coral *Pocillopora capitata* and its isolated zooxanthellae: evidence for a light-driven carbon cycle between symbiont and host. *Mar Biol* 44:235-247

- Patton J, Burris J (1983) Lipid synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar Biol* 75:131-136
- Peng S-E, Chen W-NU, Chen H-K, Lu C-Y, Mayfield AB, Fang L-S, Chen C-S (2011) Lipid bodies in coral–dinoflagellate endosymbiosis: Proteomic and ultrastructural studies. *Proteomics* 11:3540-3555
- Pernet V, Gavino V, Gavino G, Anctil M (2002) Variations of lipid and fatty acid contents during the reproductive cycle of the anthozoan *Renilla koellikeri* *J Comp Physiol B* 172:455-465 doi:10.1007/s00360-002-0268-x
- Pitman MC, Suits F, MacKerell AD, Feller SE (2004) Molecular-Level Organization of Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids in a Phosphatidylcholine Bilayer Containing Cholesterol *Biochemistry* 43:15318-15328
- Ramos R, González-Solís J (2012) Trace me if you can: the use of intrinsic biogeochemical markers in marine top predators. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10:258-266
- Richier S, Furla P, Plantivaux A, Merle P-L, Allemand D (2005) Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress *Journal of Experimental Biology* 208:277-285
- Sahu A, Jain D, Paliwal C, Ghosh T, Patidar S, Bhattacharya S, Mishra S (2013) Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry* 89:53-58
- Sargent J, Bell M, Henderson R, Tocher D (1990) Polyunsaturated fatty acids in marine and terrestrial food webs. *Animal nutrition and transport processes* 1:11-23
- Suzuki M, Watanabe K, Fujiwara S, Kurasawa T, Wakabayashi T, Tsuzuki M, Igguchi K, Yamori T (2003) Isolation of peridinin-related norcarotenoids with cell growth-inhibitory activity from the cultured dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a symbiont of the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*, and analysis of fatty acids of the dinoflagellate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51:724-727
- Tarrant AM (2005) Endocrine-like signaling in cnidarians: current understanding and implications for ecophysiology. *Integrative and comparative biology* 45:201-214
- Tarrant AM, Reitzel AM, Blomquist CH, Haller F, Tokarz J, Adamski J (2009) Steroid metabolism in cnidarians: Insights from *Nematostella vectensis*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 301:27-36
- Tchernov D, Gorbunov MY, de Vargas C, Narayan Yadav S, Milligan AJ, Häggblom M, Falkowski PG (2004) Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13531-13535
- Teece MA, Estes B, Gelsleichter E, Lirman D (2011) Heterotrophic and autotrophic assimilation of fatty acids by two scleractinian corals, *Montastraea faveolata* and *Porites astreoides*. *Limnology and Oceanography* 56:1285
- Tolosa I, Treignier C, Grover R, Ferrier-Pagès C (2011) Impact of feeding and short-term temperature stress on the content and isotopic signature of fatty acids, sterols, and alcohols in the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*. *Coral reefs* 30:763-774
- Treignier C, Grove R, Ferrier-Pagès C, Tolosa I (2008) Effect of light and feeding on the fatty acid and sterol composition of zooxanthellae and host tissue isolated from the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*. *Limnology and Oceanography*:2702-2710
- Treignier C, Tolosa I, Grover R, Reynaud S, Ferrier-Pagès C (2009) Carbon isotope composition of fatty acids and sterols in the scleractinian coral *Turbinaria reniformis*: Effect of light and feeding. *Limnology and Oceanography* 54:1933-1940
- Tytler E, Davies PS (1984) Photosynthetic production and respiratory energy expenditure in the anemone *Anemonia sulcata* (Pennant) *Journal of experimental marine biology and ecology* 81:73-86
- Volkman J, Nichols P (1991) Applications of thin layer chromatography-flame ionization detection to the analysis of lipids and pollutants in marine and environmental samples. *JPC Journal of planar chromatography-Modern TLC* 4:19-26
- Volkman J (2003) Sterols in microorganisms *Appl Microbiol Biotechnol* 60:495-506
- Wakefield T, Farmer M, Kempf S (2000) Revised description of the fine structure of in situ "zooxanthellae" genus *Symbiodinium*. *The Biological Bulletin* 199:76-84
- Wang L-H, Lee H-H, Fang L-S, Mayfield AB, Chen C-S (2013) Fatty Acid and Phospholipid Syntheses Are Prerequisites for the Cell Cycle of *Symbiodinium* and Their Endosymbiosis within Sea Anemones *PLoS ONE* 8:e72486 doi:10.1371/journal.pone.0072486
- Weng L-C, Pasaribu B, Ping Lin I, Tsai C-H, Chen C-S, Jiang P-L (2014) Nitrogen Deprivation induces lipid droplet accumulation and alters fatty acid metabolism in symbiotic dinoflagellates isolated from *Aiptasia pulchella*. *Sci Rep* 4:5777
- Whitehead L, Douglas A (2003) Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host. *Journal of Experimental Biology* 206:3149-3157

Yamashiro H, Oku H, Higa H, Chinen I, Sakai K (1999) Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 122:397-407

Zeileis A, Wiel MA, Hornik K, Hothorn T (2008) Implementing a class of permutation tests: The coin package. *Journal of Statistical Software* 28:1-23

Zhukova NV, Titlyanov EA (2003) Fatty acid variations in symbiotic dinoflagellates from Okinawan corals. *Phytochemistry* 62:191-195

**Supplementary data**

**Table S1:** Pairwise comparisons. ANOSIM (analysis of similarity) test on neutral lipid fatty acid (NFA) signatures between epidermal and gastrodermal tissues of *A. viridis*, and *Symbiodinium* (n=3).

**Global test**

**NFA**

Sample statistic (Global R): 0.564

Significance level of sample statistic: 1.4% (0.014)

Number of permutations: 280

Number of permuted statistics greater than or equal to global R: 4

**Pairwise tests**

Groups	R statistic	Significance level %	Possible permutations	Actual permutations	Number >= observed
Epidermis, Gastrodermis	0.185	30	10	10	3
Epidermis, <i>Symbiodinium</i>	0.667	10	10	10	1
Gastrodermis, <i>Symbiodinium</i>	0.778	10	10	10	1

**Table S2:** Pairwise comparisons. ANOSIM (analysis of similarity) test on polar lipid fatty acid (PFA) signatures between epidermal and gastrodermal tissues of *A. viridis*, and *Symbiodinium* (n=3).

**Global test**

**PFA**

Sample statistic (Global R): 0.86

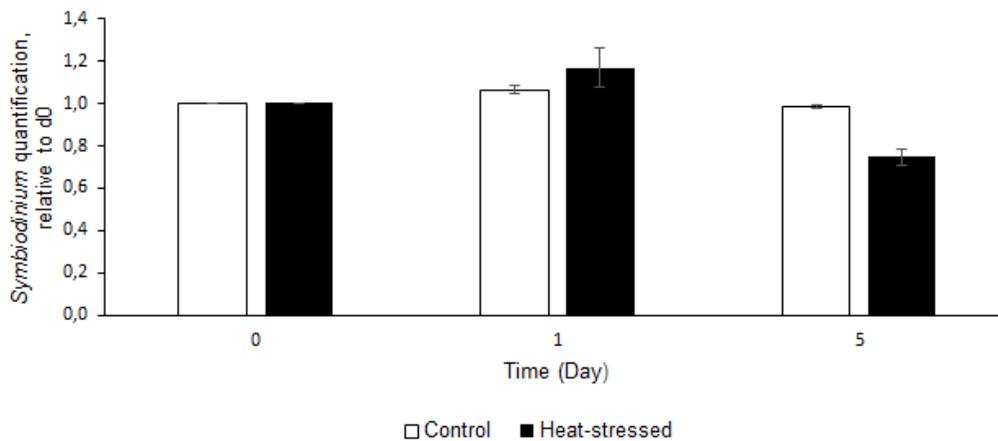
Significance level of sample statistic: 0.4% (0.004)

Number of permutations: 280

Number of permuted statistics greater than or equal to global R: 1

**Pairwise tests**

Groups	R statistic	Significance level %	Possible permutations	Actual permutations	Number >= observed
Epidermis, Gastrodermis	0.741	10	10	10	1
Epidermis, <i>Symbiodinium</i>	1	10	10	10	1
Gastrodermis, <i>Symbiodinium</i>	0.963	10	10	10	1



**Figure S1:** *Symbiodinium* abundance quantified for control and heat-stressed specimens at day 0, day 1 and day 5. Data (number of *Symbiodinium* cells) were normalized by the sample protein concentration. The results (means ± SEM) are expressed as a percentage relative to the d0 value. N = 2 for control specimens and n=4 for heat-stressed specimens.

## Annexe 10 : publication n°3

### Publication n°3 (soumise à *Symbiosis*)

#### **Proteomics and metabolomics provide insight into the *Symbiodinium-Anemonia* symbiotic interaction**

Johana Revel<sup>1,2,8\*</sup>, Vincent Dani<sup>1,2,8\*</sup>, Fabrice Priouzeau<sup>1,2,8</sup>, Mohamed Mehiri<sup>3,8</sup>, Lionel Massi<sup>3,8</sup>, Laure Capron<sup>3,8</sup>, Maxence Wisztorski<sup>4,9</sup>, Dounia Mouajjah<sup>4,9</sup>, Kévin Le Brigand<sup>5,8</sup>, Virginie Magnone<sup>5,8</sup>, Sophie Pagnotta<sup>6</sup>, Sandra Lacas-Gervais<sup>6</sup>, Marjolijn Mertz<sup>7,8,9</sup>, Pascal Barbry<sup>5,8</sup>, Michel Salzet<sup>4,9</sup>, Cécile Sabourault<sup>1,2,8,a</sup>

<sup>1</sup> Université de Nice-Sophia-Antipolis, UMR7138, Equipe Symbiose Marine, F-06108 Nice, France

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR7138, F-75005, Paris, France

<sup>3</sup> Université de Nice Sophia Antipolis, UMR7272, Institut de Chimie de Nice, F-06108, Nice, France

<sup>4</sup> Université de Lille 1, Inserm U-1192, Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59655, Villeneuve D'Ascq, France

<sup>5</sup> Université de Nice-Sophia-Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, F-06560, Sophia-Antipolis, France

<sup>6</sup> Université de Nice-Sophia-Antipolis, Centre Commun de Microscopie Appliquée, F-06108 Nice, France

<sup>7</sup> Université de Nice-Sophia-Antipolis, Institut de Biologie Valrose, F-06108 Nice, France

<sup>8</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, F-75005 Paris, France

<sup>9</sup> Institut national de la santé et de la recherche médicale, F-75013 Paris, France

\* these authors contributed equally to the work

Correspondence: Cecile Sabourault, UMR7138 Evolution Paris Seine, Equipe Symbiose Marine, 28 Avenue Valrose, BP71, 06108 Nice Cedex 02, France

Fax: 33 492 076 863 ; E-mail: Cecile.Sabourault@unice.fr

*Additional key words:* cnidarian-dinoflagellate interaction, proteomics, metabolomics, bleaching, symbiosome

**Abstract (150-250)**

The sea anemone *Anemonia viridis* hosts its photosynthetic dinoflagellate symbionts (*Symbiodinium* spp.) within gastrodermal cells. Symbionts are mainly acquired by a phagocytosis process and are maintained in a symbiotic entity, which is referred to as the symbiosome. The host-derived perisymbiont membrane, or symbiosome membrane, is central to the metabolic exchanges between the two partners. In order to investigate the host-symbiont interface, we used shotgun proteomics and metabolomics to identify proteins and metabolites involved in the symbiotic interaction. Symbiosomes with or without perisymbiont membrane were prepared and we identified 202 proteins that were overexpressed in intact symbiosomes, including proteins involved in recognition, cytoskeletal remodeling, metabolic exchanges and stress response. Characterization and distribution of metabolites differentially expressed between healthy symbiotic and bleached sea anemones allowed the identification of metabolites potentially involved in the interaction, such as betaines and phospholipids. These results indicated that the recruitment of proteins at the symbiosome membrane is a complex and dynamic process. Proteomics and metabolomics results demonstrated that both host and symbionts seemed to contribute to shape the host-symbiont interface. Moreover, the symbiosome membrane is involved in many cellular and molecular processes that underlie the symbiotic interaction.