



HAL
open science

Étude de la capacité de réponse au stress à l'échelle cellulaire du Cnidaire symbiotique *Anemonia viridis*

Pauline Cotinat

► **To cite this version:**

Pauline Cotinat. Étude de la capacité de réponse au stress à l'échelle cellulaire du Cnidaire symbiotique *Anemonia viridis*. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6003 . tel-04099820

HAL Id: tel-04099820

<https://theses.hal.science/tel-04099820>

Submitted on 17 May 2023

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Étude de la capacité de réponse au stress
à l'échelle cellulaire du Cnidaire symbiotique
Anemonia viridis

Pauline COTINAT

IRCAN UMR 7284

Équipe Réponse au Stress, Régénération & Longévité

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Interactions
moléculaires et cellulaires
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Paola Furla,
Stéphanie Barnay-Verdier

Soutenue le : 30 Janvier 2023

Devant le jury, composé de :

Jenifer Croce, Dr, CNRS, Rapporteur

Philippe Lebaron, Pr., SU, Rapporteur

Denis Allemand, Pr., CSM, Examineur

Pierre Frenco, Pr., UCA, Examineur

Stéphane Roberty, Dr., Liège Université,
Examineur

Denis Pech, SO.F.I.A. Cosmétiques, Examineur

Paola Furla, Pr, UCA, Directrice de thèse

Stéphanie Barnay-Verdier, MCU HDR SU,

Co-Directrice de thèse

Étude de la capacité de réponse au stress à l'échelle cellulaire du Cnidaire symbiotique *Anemonia viridis*

Composition du jury

Président du jury :

Denis Allemand, Professeur, Centre Scientifique de Monaco

Rapporteurs :

Jenifer Croce, Chargée de recherche HDR, CNRS

Philippe Lebaron, Professeur, Sorbonne Université

Examineurs :

Pierre Frendo, Professeur, Université Côte d'Azur

Stéphane Roberty, Professeur associé, Liège Université

Denis Pech, Docteur en pharmacie, SO.F.I.A Cosmétiques

Paola Furla, Professeure, Université Côte d'Azur (directrice de thèse)

Stéphanie Barnay-Verdier, Maître de conférences HDR, Sorbonne Université (co-directrice de thèse)

Étude de la capacité de réponse au stress à l'échelle cellulaire du Cnidaire symbiotique *Anemonia viridis*

Au regard du rôle écologique majeur des Cnidaires symbiotiques dans l'écosystème marin côtier, il est essentiel de développer des approches cellulaires pour évaluer les capacités de résistance de ces organismes à différents stress. Ainsi, l'objectif de cette thèse a été de caractériser la réponse des cellules d'un Cnidaire symbiotique, l'anémone de mer, *Anemonia viridis*, à des stress extrinsèques liés à la pression anthropique, et intrinsèques liés aux contraintes de la vie en symbiose. En effet, le succès évolutif de la symbiose chez les Cnidaires est basé sur l'activité photosynthétique du symbiote (une microalgue de la famille des Symbiodiniacées), qui présente aussi des contraintes, comme une exposition journalière du tissu animal à des conditions pro-oxydantes du fait de la production d'O₂ lors de la photosynthèse.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la capacité de réponse des cellules en culture d'*A. viridis*, à un stress lié à la pollution par des produits solaires. Un test innovant d'écotoxicologie marine *in vitro* basé sur le suivi de paramètres cellulaires, tels que la viabilité et la croissance, a permis d'évaluer l'écotoxicité de plusieurs types de produits solaires, à savoir : 1) des matières premières (e.g. filtres UV), Avobenzon et Benzophenone-3, présentant des EC₅₀ en accord avec la littérature ; 2) des blocs de formulation et 3) des produits finis présentant une large gamme de réponses, validant la sensibilité de cette approche pour évaluer la toxicité de produits solaires sur l'écosystème marin côtier. Grâce à ce test et en alliant une stratégie préventive d'écoconception au sein de l'entreprise SOFIA Cosmétique, nous avons participé à la formulation d'une gamme de produits solaires plus écoresponsables.

Puis, nous avons analysé la capacité d'*A. viridis* à répondre à des conditions pro-oxydantes par des approches *in vivo* et *in vitro*. Des spécimens entiers et des cultures cellulaires ont été soumis à 200 et 500µM H₂O₂ pendant 7 jours, puis nous avons mesuré des paramètres de santé globale (état symbiotique, viabilité et croissance cellulaire) et des biomarqueurs de stress (capacité antioxydante, dommages protéiques). À l'échelle de l'organisme entier, les deux concentrations d'H₂O₂ n'ont pas affecté la survie et les tissus animaux ont montré une grande résistance aux traitements. Aucun blanchissement n'a été observé chez ces individus symbiotiques, seul le compartiment des symbiotes a présenté des dommages protéiques oxydatifs après une exposition à 500µM H₂O₂, malgré une augmentation de la capacité antioxydante globale. L'approche *in vitro* a montré une grande capacité intrinsèque des cellules animales à faire face à des conditions pro-oxydantes, bien que nous ayons observé des différences de tolérance aux deux traitements à l'H₂O₂ : 200µM d'H₂O₂ induit une seulement une diminution de la croissance cellulaire, alors que 500µM d'H₂O₂ induit un état de stress caractérisé par une diminution de la viabilité cellulaire et un arrêt drastique de la croissance cellulaire après 7 jours de traitement.

Enfin, nous avons étudié la sénescence cellulaire induite par ces traitements sur une durée de 1 à 28 jours ou de façon répétée. Aucun traitement n'a induit de sénescence illustrant une capacité de résilience remarquable des cellules.

Les travaux menés dans cette thèse ont ainsi validé l'utilisation de la culture cellulaire d'un Cnidaire symbiotique comme modèle biologique expérimental pour appréhender des questions fondamentales et appliquées. Ils ont par ailleurs permis i) le développement d'un projet entrepreneurial basé sur la commercialisation du test d'écotoxicité marine *in vitro* et ii) d'ouvrir la voie vers la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires liés à la capacité de résistance des Cnidaires symbiotiques à un stress oxydant. Ces futures investigations à l'échelle cellulaire seront des atouts majeurs pour la compréhension des processus de longévité des Cnidaires.

Mots clés

Culture cellulaire ; Stress oxydant ; Symbiose ; Crèmes solaires ; Sénescence ; Peroxyde d'hydrogène

Study of the stress response capacity at the cellular level of the symbiotic Cnidaria

Anemonia viridis

The objective of this thesis was to characterize the response of the cells of a symbiotic Cnidaria, the sea anemone, *Anemonia viridis*, to extrinsic stresses related to the anthropic pressure of coastal areas, and intrinsic stresses related to the constraints of living in symbiosis. Indeed, the evolutionary success of symbiosis in Cnidaria is based on the photosynthetic activity of the symbiont (a microalga of the Symbiodiniaceae family), which also presents constraints, such as a daily exposure of the animal tissue to pro-oxidant conditions due to the production of O₂ during photosynthesis.

We were first interested in the response capacity of cultured *A. viridis* cells to a stress related to pollution by solar products. An innovative *in vitro* marine ecotoxicology assay based on the monitoring of cell parameters, such as viability and growth, allowed us to evaluate the ecotoxicity of several types of sunscreen products, namely: 1) raw materials, namely the UV filters Avobenzone and Benzophenone-3, with EC₅₀ values in agreement with the literature; 2) formulation blocks and 3) finished products with a wide range of responses, validating the sensitivity of this approach to assess the toxicity of sunscreen products on the coastal marine ecosystem. Thanks to this test and by combining a preventive strategy of eco-design within the company SO.F.I.A Cosmétiques, we participated in the formulation of a range of more eco-responsible sunscreen products.

Subsequently, we analyzed the ability of *A. viridis* to respond to pro-oxidant conditions by *in vivo* and *in vitro* approaches. Whole specimens and cell cultures were subjected to 200 and 500 μM H₂O₂ for 7 days, and then we measured global health parameters (symbiotic status, cell viability and growth) and stress biomarkers (antioxidant capacity, protein damage). At the whole organism level, both H₂O₂ concentrations did not affect survival and no bleaching was observed. Only the symbiont compartment exhibited oxidative protein damage after a 7-day exposure to 500 μM H₂O₂, despite an increase in overall antioxidant capacity. The *in vitro* approach showed a high intrinsic capacity of animal cells to cope with pro-oxidative conditions, although we observed differences in tolerance: 200 μM H₂O₂ induced only a decrease in cell growth with complete resilience, whereas 500 μM H₂O₂ induced a stress state characterized by a decrease in cell viability, a drastic arrest of cell growth after 7 days of treatment, and partial resilience.

Finally, we observed an absence of irreversible senescence phenotype (lysosomal β-galactosidase activity) in cultured *A. viridis* cells following continuous (from 24 hours to 28 days) or repeated H₂O₂ treatments, as well as following resilience periods of several weeks. Similarly, an ionizing treatment up to 50 Gy did not induce senescence.

During this work, we validated the use of a symbiotic Cnidaria cell culture as an experimental biological model to address fundamental and applied issues. This work paved the way for i) the development of an entrepreneurial project based on the commercialization of the *in vitro* marine ecotoxicity assay and ii) the characterization of molecular and cellular mechanisms related to the stress resistance capacity of symbiotic Cnidaria. These future investigations at the cellular scale will be major assets for the understanding of the longevity processes of Cnidaria.

Keywords

Cell culture ; Oxidative stress ; Symbiosis ; Sunscreens ; Senescence ; Hydrogen peroxide

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en premier lieu à mes deux directrices de thèse, qui ont formé l'équipe de choc la plus complémentaire et la plus efficace dont j'aurais pu rêver pour m'amener au bout de ce projet de thèse. Paola et Stéphanie, merci de m'avoir motivée et inspirée, merci pour ces trois années, et les quelques prochaines.

Je tiens à grandement remercier les membres de mon jury de thèse : merci à Jenifer Croce et Philippe Lebaron d'avoir accepté de prendre le temps d'être rapporteurs de mon manuscrit, et merci à Denis Allemand, Pierre Frendo, Stéphane Roberty et Denis Pech de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de soutenance de thèse.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse, Pierre Frendo et Rémi Dumollard, pour vos précieux conseils et remarques, et de m'avoir aidée à remettre en perspective mon projet et mes résultats.

Un immense merci à toute mon équipe « Réponse au Stress, Régénération & Longévité », et spécialement à Eric Röttinger de m'y avoir accueillie pendant ces trois années. Pour n'oublier personne : Stéphanie, Paola, Thamilla, Aldine, Didier, Clara, Marta, Nora, Nicolas, Renaud, Adrien, Megan, Aurore, Rita, Keyla, Elisabeth. Merci à toutes et tous pour l'ambiance, les pauses-café, les choses à grignoter et à partager, les phrases bizarres écrites sur des Post-its et affichées sur le mur de la honte, les déjeuners de Noël et le Secret Santa, les soirées Blind-Test et tout le reste.

Steph, toujours motivée pour une pause-café au soleil, souvent tentée par un trajet en voiture, bonne occasion de décrocher de la journée, mais aussi de papoter, ragoter et rigoler, je ne te remercierai jamais assez d'avoir toujours eu le bon mot au bon moment quand tu sentais la pression monter ou le moral baisser. Merci d'avoir été si disponible et prête à t'arracher les cheveux avec moi sur des traitements de données, des calculs tout bêtes, mais pas si simples. Merci pour tes expressions bizarres, que je suis presque prête à adopter dans mon vocabulaire, si jamais un jour j'arrive à les comprendre (que vient faire un cochon-dinde sur un vélo-patinette ?).

Paola, merci d'être (un peu trop ?) disponible et de répondre à mes mails, même à cinq heures et demi du matin. Merci pour ton énergie et ton optimisme à toute épreuve, même quand plus rien n'est certain, pas même la composition de mon jury de thèse. Merci de m'avoir nourri intellectuellement, mais aussi littéralement, à grands paquets de Baiocchi et de vitello tonnato. Merci depuis le tout premier cours de licence, Mme Furla.

Clara, merci d'avoir été à mes côtés au commencement de plusieurs gros projets (du style, une thèse ET une start-up...) et merci pour toutes ces conversations au coin d'une hotte ou dans un taxi couleur aubergine, en coupant des tentacules dans la longueur en râlant, en nettoyant des aquariums en râlant, en faisant plein de choses, mais toujours en râlant...

Tham-tham, mille mercis pour tes conseils et ton temps, merci d'avoir répondu à mes questions techniques, même les plus bêtes, mais surtout d'avoir toujours ri à mes jeux de mots, même les plus nazes... Je sais que je ne surpasserai jamais les tiens !

Merci à la team sportive (Steph, Paola, Clara, Tham, Marta, Megan et même Renaud !!), merci pour les lundis midi à suer et le reste de la semaine à être courbaturées.

Merci à Nicolas et Renaud d'avoir su mettre l'ambiance dans mon bureau ! Nico, désolée que tu sois arrivé dans l'équipe pendant cette période de ma thèse, et merci d'avoir réussi à me divertir et me faire rire, et d'avoir été le Saint-Nicolas de l'équipe !

Une pensée pour les « anciens » de l'équipe : pour l'ambiance musicale un peu douteuse dans le labo, merci Maxence ; pour les discussions intéressantes dans le bureau, merci Joao ; pour les conseils statistiques et les Post-its collés partout sauvagement, merci Barbara.

Et je pense à tous mes « PhD buddies » dans l'équipe, qui ont connu ou vont connaître ces mêmes périodes de fin de stress et pouvoir évaluer leur résistance au stress, courage Adrien, Megan, Aurore, Rita & Elisabeth.

Un merci au personnel de l'IRCAN croisé le midi à la salle de déjeuner du 7ème ou aux séminaires internes du mardi midi. Un grand merci à Ludovic Cervera pour sa formation et ses conseils en cytométrie, merci à Isabelle Bourget pour l'utilisation de l'irradiateur.

Je voudrais infiniment remercier tous celles et ceux qui m'ont fait découvrir le monde des Cosmétiques, de la formulation jusqu'à l'aspect réglementaire et toutes ces considérations qui me font regarder ma crème solaire différemment chaque été, à savoir toute l'équipe de chez SO.F.I.A. Cosmétiques.

Merci à mon équipe du Pôle Innovation, Denis, Anna et Mathilde, pour toutes nos discussions, pour la surprise le matin de découvrir un nouveau sac de feuilles d'olivier, pour les challenges de chaque nouvel actif à imaginer...

Et un grand merci pêle-mêle à Nicolas, Anne-Laure, Anaïs & Anaïs, Marylise, Ye, Corinne, sans oublier toute l'équipe Marketing et Commerciale...

Je n'aurai pas de mot assez fort pour remercier ma famille, mes parents, mes sœurs, mes beaux-frères, mes nièces et neveux d'amour... Vous êtes les soleils de ma vie, merci pour ces dimanches réunis à passer du bon temps, merci pour les encouragements et l'amour, merci pour la fierté dans vos yeux.

Un merci à ma belle-famille, pour qui je suis restée l'éternelle stagiaire.

Merci pour le soutien moral, les discussions et apéros, les weekends au soleil et les sorties et randos qui font aérer l'esprit, en vrac à Jean-Vincent, Loïc, Eugenio, Khalil, Camille et Dorian, Lorraine.

Merci à Emmanuel, sans qui la « Viridis Team » ne serait pas arrivée jusque-là, et s'appellerait sûrement encore la « Viridis Team ».

Ma Mégane, la plus « Perfect » des amies, je sais que tu as une très bonne excuse pour ne pas assister à ma soutenance de thèse, alors amuse-toi bien au pays des caribous et prends soin de ta belle Ambre (et merci d'avance à Yvan de bien s'occuper de tes deux princesses).

Mon Edouard, mon pilier, ma motivation, ma fierté. Merci de m'avoir soutenue, motivée, et épaulée, et d'avoir eu confiance en moi quand je n'en avais plus beaucoup moi-même. Mais aussi, merci pour tout ce temps passé à régler les bugs de tabulations, numérotations et renvois sur Word, sans toi cette thèse aurait peut-être le fond, mais clairement pas la forme. Un peu comme moi, finalement.

Merci à tous ceux que j'ai oubliés, mais qui ont croisé ma route au cours de cette aventure. Enfin, merci à tous ceux qui liront cette thèse, en partie ou en entier.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	9
SOMMAIRE	13
TABLE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX	20
PRÉAMBULE.....	21
CHAPITRE 1.INTRODUCTION GÉNÉRALE	29
1.1 L'environnement marin : un écosystème riche, mais en danger	29
1.1.1 Impact des changements climatiques	30
1.1.2 Impacts des activités anthropiques et des pollutions associées.....	32
1.2 Le phylum des cnidaires.....	34
1.2.1 Caractéristiques générales	35
1.2.2 Propriétés remarquables des Cnidaires	36
1.3 Les Cnidaires face aux perturbations.....	43
1.4 Le modèle d'étude : <i>Anemonia viridis</i>	45
1.5 Objectifs de la thèse.....	47
CHAPITRE 2.RÉPONSE DES CELLULES D'ANEMONIA VIRIDIS À UN STRESS EXTRINSÈQUE : LES PRODUITS SOLAIRES.....	49
2.1 Introduction	49
2.1.1 La pollution des océans par les produits solaires	50
2.1.2 Les solutions possibles pour réduire la pollution cosmétique.....	58
2.2 Objectif n°1 : Utilisation d'un test d'écotoxicité marine <i>in vitro</i> pour des analyses de l'impact de produits cosmétiques	63
2.2.1 Matériel et Méthodes.....	63
2.2.2 Résultats et discussion.....	66
2.3 Objectif n°2 : La création d'une gamme de solaires à faible écotoxicité.....	70
2.3.1 Matériel et méthodes	72
2.3.2 Résultats et discussion.....	73
2.4 Discussion générale.....	77
2.4.1 Le rôle des tests d'écotoxicologie pour des allégations environnementales	78
2.4.2 Perspectives des tests d'écotoxicité marine pour la Cosmétique	79

CHAPITRE 3. RÉPONSE INTRINSÈQUE DE CELLULES D'ANEMONIA VIRIDIS FACE À DES CONDITIONS PRO-OXYDANTES..... 83

3.1 Introduction	83
3.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leurs conséquences.....	83
3.1.2 L'H ₂ O ₂ dans le milieu marin.....	86
3.1.3 Objectifs des travaux.....	91
3.2 Démarche expérimentale.....	91
3.3 Résultats et discussion	93
3.4 Publication associée : Cotinat et al. 2022.....	96

CHAPITRE 4. LE VIEILLISSEMENT CELLULAIRE CHEZ LE MODÈLE ANEMONIA VIRIDIS 107

4.1 Introduction	107
4.1.1 Vieillessement et longévité.....	107
4.1.2 La théorie radicalaire du vieillissement	109
4.1.3 Le vieillissement chez les Cnidaires	109
4.2 Objectifs des travaux et approche expérimentale.....	111
4.3 Matériel et méthodes	112
4.3.1 Matériel biologique	112
4.3.2 Traitements <i>in vitro</i> à l'H ₂ O ₂	112
4.3.3 Traitements aux rayons X	113
4.3.4 Mesure des paramètres vitaux cellulaires.....	113
4.3.5 Marquage de la sénescence	113
4.4 Résultats	114
4.4.1 Effets à long terme de traitements 24 heures et 7 jours à l'H ₂ O ₂	114
4.4.1 Effets de traitements continus ou répétés à l'H ₂ O ₂	116
4.4.2 Effets de traitements aux rayons X	117
4.5 Discussion et perspectives	119

CHAPITRE 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 123

5.1 Le test d'écotoxicité marine <i>in vitro</i> : un nouvel outil pour l'évaluation de la pollution du milieu marin	123
5.1.1 Les applications écotoxicologiques et industrielles du test.....	124
5.1.2 Analyse fonctionnelle des modes d'action des polluants.....	124
5.1.3 Toxicité des polluants dans le contexte du réchauffement climatique	125

5.2	La résistance au stress oxydant d'<i>Anemonia viridis</i> et l'implication de la symbiose	126
5.2.1	L'origine de la résistance intrinsèque cellulaire d' <i>A. viridis</i>	126
5.2.2	Le choix du peroxyde d'hydrogène et ses limites	128
5.2.3	Les mécanismes de résistance impliqués	128
5.3	Les enjeux de l'étude du vieillissement chez les Cnidaires	129
	BIBLIOGRAPHIE	131

TABLE DES FIGURES

Figure 1.1. Répartition des récifs coralliens dans les océans mondiaux (crédit : Hugo Ahlenius, 2008, UNEP/GRID-Arendal, http://www.grida.no/resources/7197).....	30
Figure 1.2. Impact de l’augmentation de CO ₂ dans l’atmosphère sur la chimie du carbone dissous dans l’eau de mer (Kleypas, 2019)	32
Figure 1.3. Les activités humaines et leurs conséquences sur l’environnement marin.....	33
Figure 1.4. Phylogénie des Cnidaires (Bosch et al., 2017)	35
Figure 1.5. Représentation schématique du plan d’organisation de la forme polype ou méduse d’un Cnidaire.....	35
Figure 1.6. Organisation tissulaire et cellulaire d’un Cnidaire symbiotique. (A) Représentation schématique de l’architecture tissulaire d’un Cnidaire (Furla and Allemand, 2009) – (B) Projection 2D de toutes les cellules identifiées chez un individu adulte de <i>S. pistillata</i> , les couleurs correspondant aux différents types cellulaires (Levy et al., 2021) ..	36
Figure 1.7. Symbiodiniacées du genre <i>Philozoon</i> extraites d’ <i>Anemonia viridis</i> en culture	39
Figure 1.8. Vue schématique des échanges nutritionnels entre les deux partenaires de la symbiose (adapté depuis Davy et al., 2012).....	41
Figure 1.9. Évolution temporelle de l’oxygène dissous à l’intérieur d’un tentacule d’ <i>Anemonia viridis</i> pendant un cycle lumière (LUM) / obscurité (OBSC.). La normoxie est représentée par une ligne pointillée (adapté depuis Richier et al., 2003).....	42
Figure 1.10. Exemples de facteurs de stress auxquels sont soumis les organismes marins (Adapté depuis Apprill, 2020).....	44
Figure 1.11. Spécimens d’ <i>Anemonia viridis</i> en aquarium (A) ou en milieu naturel (B) (Crédits photos : Pauline Cotinat (A) et Alexis Pey (B)).....	46
Figure 2.1. Composition d’une crème solaire ; les pourcentages sont approximatifs (Adapté depuis https://cen.acs.org/business/consumer-products/What-in-sunscreen-and-how-does-it-protect-your-skin-from-the-sun-rays/99/i27 – Copyright © 2022 American Chemical Society).	50

Figure 2.2. Mode d'action des filtres UV organiques et inorganiques pour la protection de la peau face aux rayonnements solaires (adapté depuis Berbel Manaia et al., 2013).	51
Figure 2.3. Résumé des principaux avantages de la culture cellulaire d' <i>Anemonia viridis</i> pour des tests d'écotoxicologie	63
Figure 2.4. Effet de différentes concentrations d'avobenzone (A) et de benzophénone-3 (B) sur la croissance cellulaire de cellules d' <i>A. viridis</i> en culture après 7 jours de traitement. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$	67
Figure 2.5. Effet de différents mélanges de filtres M1, M2 et M3 sur la viabilité cellulaire (A) et la croissance cellulaire (B) de cellules d' <i>A. viridis</i> en culture après 7 jours de traitement. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$	68
Figure 2.6. Effet de différentes crèmes solaires du commerce P1, P2 et P3 sur la viabilité cellulaire (A) et la croissance cellulaire (B) de cellules d' <i>A. viridis</i> en culture après 7 jours de traitement. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$	69
Figure 2.7. Effets de deux produits de protection solaire (une texture crème et une texture huile) sur la viabilité et la croissance cellulaire des cultures d' <i>A. viridis</i> après 7 jours de traitement. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$	74
Figure 2.8. Effets de crèmes solaires contenant un filtre UV minéral (TiO_2 ou ZnO) et d'une crème solaire contenant un mélange de filtres organiques sur la viabilité et la croissance cellulaire des cultures d' <i>A. viridis</i> après 7 jours de traitement. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$	75
Figure 2.9. Effets comparatifs de deux crèmes solaires sur la viabilité et la croissance cellulaire des cultures d' <i>A. viridis</i> après 7 jours de traitement. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$	76
Figure 2.10. Exemples de logos et labels utilisés par des marques de cosmétiques sur des crèmes solaires dans le commerce.....	79
Figure 3.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène et étapes de la réduction de l'oxygène (schéma tiré de Migdal and Serres, 2011).....	84
Figure 3.2. Réaction de Mehler au sein des chloroplastes des cellules photosynthétiques. PSI : Photosystème I ; SOD : superoxyde dismutase ; APX : ascorbate peroxydase.	85
Figure 3.3. Résumé de la démarche expérimentale.....	92
Figure 3.4. Les deux types de réponses rencontrés chez les cultures cellulaires d' <i>A. viridis</i> en fonction des traitements à l' H_2O_2 imposés.....	95

Figure 4.1. Exemples de marqueurs de vieillissement à l'échelle cellulaire (adapté depuis López-Otín et al., 2013)	107
Figure 4.2. Caractéristiques phénotypiques des cellules sénescents (Roux and Bischof, 2019)	108
Figure 4.3. Trajectoires démographiques de deux espèces de Cnidaires. La mortalité relative (rouge) et fécondité (bleu) en fonction de l'âge sont mises à l'échelle par rapport à leur moyenne. Adapté depuis (Jones et al., 2014).....	110
Figure 4.4. Démarche expérimentale menée dans ce chapitre.	112
Figure 4.5. Effet à long terme de traitements à l'H ₂ O ₂ sur les paramètres cellulaires des cultures d' <i>A. viridis</i> . Traitements de 24 heures (A et B) ou 7 jours (C et D) à 0µM H ₂ O ₂ (contrôle ; courbe grise), 200µM H ₂ O ₂ (courbe orange) ou 500µM H ₂ O ₂ (courbe rouge) ; mesure de la viabilité (A et C) et la croissance (B et D) cellulaires des cultures d' <i>A. viridis</i> . Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001.	114
Figure 4.6. Mesure de la sénescence au sein des cultures cellulaires d' <i>A. viridis</i> suite aux traitements H ₂ O ₂ . Mesure de la β-galactosidase lysosomale après un traitement H ₂ O ₂ de 24h et une phase de résilience de 56j (A) ou après un traitement de 7j et une phase de résilience de 56j (B) : contrôle 0µM (histogramme gris), 200µM (histogramme orange) ou 500µM (histogramme rouge). L'activité de la β-galactosidase lysosomale a été mesurée par marquage fluorescent des populations cellulaires. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * p < 0.05 ; ** p < 0.01.	115
Figure 4.7. Effet de traitements continu ou répété à 200µM d'H ₂ O ₂ sur les paramètres cellulaires des cultures d' <i>A. viridis</i> . Traitement continu: (A) et (B), courbe orange ; traitement répété (C) et (D), courbe verte ; mesure de la viabilité (A) et (C) ; mesure de la croissance (B) et (D). Les hachures bleues représentent les périodes de traitement à l'H ₂ O ₂ , et les courbes grises les conditions contrôles. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * p < 0.05.	117
Figure 4.8. Résultat représentatif de la mesure de l'activité de β-galactosidase lysosomale dans les cultures cellulaires d' <i>A. viridis</i> suite au traitement continu à 200µM d'H ₂ O ₂ . Analyse par cytométrie en flux de populations de cellules d' <i>A. viridis</i> non traitées (A) ou traitée à 200µM d'H ₂ O ₂ (B) après un traitement continu de 28 jours. Ces analyses issues d'une expérience	

indépendante sont représentatives des expériences menées sur tous les points de cinétique. Le pentagone représente la fenêtre d'analyse dans laquelle les cellules fluorescentes (P3) sont mesurées. 117

Figure 4.9. Effets de traitements aux rayons X sur les paramètres vitaux des cultures cellulaires d'*A. viridis*. La viabilité (A) et la croissance (B) cellulaires ont été mesurées 5 jours après le traitement sur une gamme de 10 à 50Gy. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 118

Figure 4.10. Mesure de la sénescence au sein des cultures cellulaires d'*A. viridis* suite aux traitements aux rayons X. Les cellules ont été soumises à des radiations ionisantes de 10Gy, 25Gy ou 50Gy. L'activité de la β -galactosidase lysosomale a été mesurée par marquage fluorescent des populations cellulaires. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. 119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 – Exemple d'études des effets de crèmes solaires et de filtres UV sur les organismes marins présentées par ordre chronologique 54

Tableau 3.1 – Effets de traitements à l' H_2O_2 sur différentes espèces animales et végétales marines 89

PRÉAMBULE

1. Contexte et objectifs de la thèse

Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre trois partenaires, un laboratoire de recherche public, une entreprise privée et une doctorante, par le biais d'un dispositif CIFRE (convention industrielle de formation par la recherche). Ce dispositif, mis en place par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, permet non seulement de conduire des recherches sur les sujets traités par le laboratoire, mais également de contribuer aux processus d'innovation d'une entreprise par l'application de cette recherche.

Ainsi, l'entreprise SO.F.I.A Cosmétiques basée à Carros (06) et le laboratoire de l'IRCAN (Institute of Research on Cancer and Aging of Nice) ont établi un contrat de collaboration de recherche, sur lequel reposait mon projet de thèse.

Fondée en 1989 par le Dr Alexandre Dingas, la société SO.F.I.A Cosmétique est spécialisée dans la sous-traitance de produits cosmétiques, et en particulier dans la formulation et la fabrication de produits de protection solaire. Équipée d'un laboratoire d'innovation interne, l'entreprise possède depuis sa création une forte ambition de développement de produits toujours plus performants et innovants, illustrée par le développement d'actifs cosmétiques originaux et diversifiés.

Les recherches menées à l'IRCAN sont quant à elles tournées vers la compréhension des mécanismes biologiques liés au vieillissement ou aux cancers, avec une attention particulière portée sur le rôle joué par le stress, qu'il soit lié à l'environnement ou au mode de vie. Au sein de l'équipe « Réponse au stress, régénération et longévité » dirigée par Dr Eric Röttinger, l'accent est porté sur l'étude des capacités remarquables d'animaux marins de la famille des Cnidaires. Par la compréhension des mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques impliqués, l'équipe s'applique ainsi à comprendre les processus soutenant cette grande capacité de régénération et de résistance aux stress ainsi que leur longévité accrue.

La collaboration entre les partenaires de cette thèse CIFRE repose sur deux grands objectifs liés à l'innovation et à la recherche fondamentale :

1/ Le développement et la formulation de produits solaires écoresponsables :

Afin de répondre aux attentes des clients et des consommateurs des produits cosmétiques, la société SO.F.I.A Cosmétiques s'est donné pour objectif de pouvoir appliquer l'allégation « formulation respectueuse de l'océan » en formulant des produits dont les performances, la tolérance et l'innocuité sont garanties, tout en respectant des principes de biodégradabilité et de diminution de l'impact sur l'environnement marin. Dans ce cadre, mon travail s'est porté aussi bien sur les premières étapes de formulation avec la sélection des matières premières que sur les tests d'écotoxicité des produits finis qui permettent d'atteindre l'objectif d'écoresponsabilité visé.

2/ La détermination des mécanismes de résistance au stress et de vieillissement cellulaire chez les Cnidaires :

Les Cnidaires (e.g. coraux, anémones de mer, méduses...) sont des organismes marins qui, au regard des propriétés remarquables qu'ils présentent en termes de capacité de régénération extrême ou de longévité, sont devenus des modèles d'étude attractifs et émergents pour mieux comprendre et appréhender des processus biologiques tels que le vieillissement. Grâce à ces nouveaux modèles, on peut envisager d'établir un lien entre les capacités de régénération, la résistance au stress, et les mécanismes de vieillissement. Le second objectif de la thèse a ainsi été d'investiguer les impacts de conditions liés au stress sur l'homéostasie cellulaire d'un Cnidaire. Ces travaux ont fait l'objet :

- d'une publication scientifique : Cotinat, P., Fricano, C., Toullec, G., Röttinger, E., Barnay-Verdier, S*, & Furla, P*. (2022). Intrinsically High Capacity of Animal Cells From a Symbiotic Cnidarian to Deal With Pro-Oxidative Conditions. *Frontiers in physiology*, 76. * co-dernier auteur
- d'une présentation orale lors du congrès "15th International Coral Reef Symposium" à Brême (Allemagne) du 3 au 8 Juillet 2022 intitulée : Intrinsically High Capacity of Animal Cells From a Symbiotic Cnidarian to Deal With Pro-Oxidative Conditions.

Le temps de travail de la thèse s'est organisé autour de ces deux grands objectifs, et au sein des deux établissements partenaires de la CIFRE avec une répartition de mon temps de présence définie comme suit au cours des trois années : 2 jours en entreprise et 3 jours au

laboratoire au cours de la première année ; 1 jour en entreprise et 4 jours au laboratoire au cours de la deuxième année ; et 5 jours au laboratoire au cours de la troisième année.

2. Activités au sein de l'entreprise

La société SO.F.I.A Cosmétique dispose non seulement d'un laboratoire de formulation, mais également d'un pôle Innovation, dont l'objectif est la création de produits cosmétiques innovants via, par exemple, la recherche d'actifs d'origine naturelle. Ce pôle est supervisé par Denis Pech, docteur en pharmacie. Dans le cadre de mon projet de thèse, c'est au sein de ce pôle que se sont déroulées mes activités en entreprise. Mon cursus universitaire en biologie ainsi que ma démarche scientifique m'ont permis de participer activement au développement de produits de protection solaire écoresponsables en m'initiant à toutes les étapes de création du produit.

Premières étapes de la formulation cosmétique

Le choix des matières premières est un aspect primordial dans l'élaboration d'un produit cosmétique. Dans le cadre de la formulation de produits écoresponsables, le choix de chaque substance doit prendre en compte non seulement l'innocuité cutanée et l'objectif de texture et de sensorialité attendu par le client, mais aussi son impact potentiel sur l'environnement. L'une de mes missions, au sein du pôle Innovation, a été au travers d'une analyse bibliographique, de mettre en évidence les composés qui présentaient des risques aussi bien pour la santé humaine que pour l'environnement, comme les perturbateurs endocriniens, et de les bannir de la formulation.

En parallèle afin d'effectuer un suivi des formulations et de leurs modifications, en fonction des différents tests effectués tout au long du processus de fabrication (e.g. tests de stabilité ou d'efficacité), j'ai également été formée à l'utilisation du logiciel de gestion des formules de laboratoire (Coptis). Ce logiciel permet d'accéder en temps réel aux différents essais effectués par les formulateurs pour chacun des projets ainsi qu'aux résultats obtenus en termes de performance ou de stabilité. J'ai ainsi pu effectuer des comparatifs entre les compositions et caractéristiques des différents essais dont j'ai ensuite testé la cytotoxicité.

Recherche de composés d'intérêt en cosmétique

L'un des objectifs du pôle Innovation de SO.F.I.A Cosmétiques est l'identification de molécules actives biosourcées à intérêt cosmétique. Le choix de l'entreprise

s'est porté sur les extraits végétaux, car la démarche est tournée vers la naturalité et l'origine écoresponsable des matières premières, tout en visant des actions très variées (antioxydantes, antibactériennes, ou encore photoprotectrices) pour la peau et le consommateur.

La stratégie a été de privilégier une origine locale et la réutilisation de déchets issus de l'agriculture pour favoriser la tendance au recyclage. L'exemple le plus typique de notre région est l'utilisation de feuilles d'olivier, considérées comme des biodéchets par les producteurs d'olives, mais connues depuis des millénaires pour leurs propriétés diverses, aussi bien antibactériennes qu'antioxydantes. Les extraits de feuilles d'olivier sont en effet riches en composés phénoliques, et particulièrement en hydroxytyrosol et oleuropéine, qui leur confèrent un pouvoir antimicrobien et antioxydant (De Leonardis et al., 2008; Alzweiri and Al-Hiari, 2013). Le laboratoire du Pôle Innovation a ainsi élaboré d'un protocole innovant d'extraction de molécules actives issues de végétaux et plus particulièrement de feuilles d'olivier, en privilégiant une extraction enzymatique qui permet d'éviter l'utilisation de solvants et de garantir un extrait aux qualités conservées (Figure P.1).



Figure P.1. Principe de l'extraction enzymatique d'une matière première végétale.

Vulgarisation et documents de communication

En parallèle de mes activités en lien direct avec l'innovation et la formulation, j'ai aussi pu prendre part à la rédaction de documents aussi bien techniques qu'à visée de communication. J'ai ainsi contribué à la constitution de dossiers règlementaires et l'élaboration de fiches de caractéristiques de matières premières ou de produits finis ; ces documents nécessitent de compiler l'identification de la substance ou du mélange, la composition exacte,

l'identification des dangers associés, ou encore les précautions de manipulation et de stockage à prendre en compte. J'ai aussi participé à l'élaboration de plaquettes et catalogues à destination des clients de SO.F.I.A Cosmétiques, mais également à la rédaction de textes de vulgarisation, destinés à un plus large public, et visant à expliquer l'action des molécules présentes dans les produits cosmétiques sur la peau (e.g. sur les mécanismes de vieillissement ou les pathologies cutanées).

3. Activités complémentaires au travail de recherche et projets d'après-thèse

Afin de répondre au premier objectif de ma thèse concernant la formulation de produits solaires écoresponsables, j'ai, en complément de mes activités au sein de l'entreprise, utilisé une technologie innovante développée au sein du laboratoire. Cette technologie repose sur l'utilisation de cultures cellulaires de Cnidaire, établies au laboratoire au cours des dix dernières années (Barnay-Verdier et al., 2013; Ventura et al., 2018; Fricano et al., 2020). Elle consiste en un test d'écotoxicité marine *in vitro* qui permet d'évaluer l'impact d'un produit sur l'écosystème marin. Son application possible aux produits cosmétiques, et plus particulièrement aux produits solaires, a été initiée en 2017 avec l'entreprise SO.F.I.A Cosmétiques.

Ce test, qui a été perfectionné, a pu montrer une fiabilité, une répétabilité et une adaptabilité à différents types de produits ou de molécules testés, et a fait l'objet d'un dépôt d'invention à l'INPI sous forme d'une enveloppe SOLEAU en 2019 (protection d'un savoir-faire). Ce test permet, via la mesure des paramètres cellulaires *in vitro*, d'évaluer l'impact que peuvent avoir des matières premières ou des produits finis sur le biota récifal côtier lors du relargage potentiel de ces produits en mer.

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai donc réalisé des tests d'écotoxicité marine *in vitro* afin de participer au développement et la formulation de produits solaires écoresponsables de l'entreprise SO.F.I.A Cosmétiques.

Cette expérience en entreprise m'a permis de prendre la mesure du besoin des industriels de répondre à la demande grandissante des consommateurs de voir sur le marché des produits plus respectueux de l'environnement, et dans le cas particulier des produits solaires plus respectueux de l'environnement marin. Les industriels sont donc à la recherche de solutions innovantes leur permettant d'évaluer leurs efforts et les accompagner dans le développement de produits plus respectueux de l'environnement.

C'est face à cette demande des industriels de pouvoir proposer des allégations environnementales robustes et soutenues par des arguments scientifiques que la voie de valorisation de cette technologie par la création d'une start-up a émergé. En tant que porteuse du projet, j'ai entamé des démarches pour me former dans le domaine de l'entrepreneuriat. J'ai ainsi choisi, au cours de mes trois années de thèse, d'axer mon plan de formation doctorale vers la création d'entreprise et sa direction afin d'être totalement opérationnelle à la fin de ma thèse.

Formations professionnalisantes

La formation doctorale s'accompagne d'heures de formation professionnalisantes que j'ai choisi d'axer sur l'innovation et les voies de valorisation de la recherche par la création d'entreprise. J'ai eu ainsi l'opportunité de participer aux formations « Créer ou reprendre une entreprise après la thèse » (12 heures en première année) et « La Communication en entreprise » (6 heures en troisième année) proposées par l'Université Côte d'Azur. En parallèle, j'ai également été accompagnée par des structures spécialisées dans l'entrepreneuriat et l'innovation dans le monde de la recherche. Mon projet a ainsi été sélectionné par le CNRS Innovation pour suivre le programme RISE (promotion octobre 2020), qui propose un accompagnement individuel pour le développement de son projet (business plan, étude de marché...) ainsi que pour l'élaboration de dossiers de concours et de demandes auprès d'investisseurs ou de pouvoirs publics (i.e. BPI France). Dans ce cadre, j'ai été intégrée au programme Deeptech Founders de Collective Ventures, une formation de six mois comprenant des sessions d'enseignement, des partages d'expériences avec des mentors entrepreneurs, un accompagnement personnalisé et des sessions de groupes.

En complément, afin de mieux connaître le marché des cosmétiques et de ses tendances j'ai suivi la formation Ecoformulation en Cosmétiques (Pôle Terralia-Pass, 28 mai 2020), j'ai participé aux Journées d'Échanges Scientifiques et Techniques sur la Protection Solaire (Association COSMED, 25 septembre 2020) ainsi qu'au colloque Innovations in Cosmetics (My Blue CosmET-IC, 10-12 mars 2021).

Concours et bourses

Afin d'appuyer mon projet entrepreneurial, j'ai candidaté à des concours et des bourses destinés aux doctorants ou jeunes docteurs qui ont un projet de création d'entreprise à partir d'une technologie issue de la recherche.

J'ai ainsi été lauréate en 2021 du concours d'innovation i-PhD organisé par BPI France. Ce prix est accompagné d'une bourse (Bourse French Tech) qui participe aux dépenses de la start-up du lauréat en termes d'accompagnement juridique, de communication (participation à des salons, élaboration du site internet...) ou de développement commercial en général. Ce prix donne également accès à un accompagnement en groupe et individualisé, ainsi qu'à un réseau de mentors et d'investisseurs, et permet de participer à des événements qui proposent des activités en lien avec le projet de développement entrepreneurial.

J'ai également obtenu le premier prix de la Bourse Entrepreneuriat Étudiant 2021 de la Fondation de l'Université Côte d'Azur, dont le but est d'aider au développement du business du lauréat.

Enfin, le projet a été sélectionné, en décembre 2021, par l'Incubateur PACA-Est pour un accompagnement ciblé, renforcé d'une aide financière pour l'établissement et le développement et de la future start-up.

4. Conclusion

Ce manuscrit se veut être à l'image de ma thèse, à l'interface entre laboratoire de recherche et entreprise, mêlant recherche fondamentale et appliquée.

Ma formation doctorale s'est vue complétée d'un aspect très transversal qui s'est avéré prendre une place grandissante au cours de ces trois années, et qui m'amène aujourd'hui à envisager la valorisation des travaux de recherche de manière plus large, allant de la publication scientifique au transfert d'une technologie issue de la recherche pour des applications dans plusieurs secteurs, à commencer bien sûr par le domaine de la cosmétique.

La prise de conscience des consommateurs sur l'impact des crèmes solaires sur l'environnement marin pousse aujourd'hui de plus en plus d'industriels à mettre en place une démarche d'écoresponsabilité dans la formulation de leurs produits. La volonté d'accompagner les industriels dans cette démarche et de participer à l'élaboration de produits ayant de moins en moins d'impact sur l'environnement marin côtier a été l'un des moteurs pour la mise au point d'une solution biotechnologique innovante. Enfin, d'avoir l'opportunité d'utiliser des travaux et technologies issus de la recherche fondamentale dans un cadre industriel et d'en voir les applications commerciales et sociétales a été un aspect très valorisant de mon projet de thèse.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 L'environnement marin : un écosystème riche, mais en danger

La richesse de l'environnement marin, aussi bien en termes de biodiversité que de quantité de biomasse n'est plus à prouver. Les océans recouvrent plus de 70% de la surface de Terre et constituent le plus grand habitat de vie sur la planète (1 370 millions de km³). Il abrite plus de 226 000 espèces eucaryotes connues, mais on considère qu'entre 1/3 et 2/3 des espèces vivantes ne sont pas encore décrites (Appeltans et al., 2012). De plus, on inventorie entre 1300 et 1500 nouvelles espèces chaque année (Bouchet, 2006). Les biomasses associées sont considérables, avec environ 6.6 gigatonnes de carbone, à 80% représentées par les animaux, protistes, et bactéries (Bar-On and Milo, 2019).

La vie étant apparue dans les océans il y a environ 3 800 milliards d'années, les organismes qui y vivent sont donc la conséquence d'une évolution très ancienne. On compte par exemple 12 phyla d'animaux n'ayant jamais quitté l'océan et donc représentés exclusivement dans le milieu marin (Boeuf, 2007).

Au-delà d'abriter une biodiversité remarquable, l'océan joue un rôle primordial dans la régulation du climat de la planète, notamment en absorbant plus de 97% du rayonnement solaire et en fournissant la majorité de la vapeur d'eau présente dans l'atmosphère (Hoegh-Guldberg et al., 2014). L'océan interagit également avec l'atmosphère en absorbant et émettant différents gaz, tel que le dioxyde de carbone atmosphérique. Les rôles de l'océan sur le plan environnemental ne sont ainsi plus à prouver, mais il est important de préciser également son rôle économique. L'ONU estime en effet que la valeur combinée de toutes les ressources marines et de leur utilisation par l'Homme s'établit aux alentours de 7 billions de dollars par an. La valeur économique de l'océan est telle qu'on estime que plus de 3 milliards de personnes vivent des services et des ressources de l'océan (ONU).

Lorsque l'on prend en compte l'importance de l'environnement marin, son rôle de régulateur climatique, la biodiversité qu'il héberge, ou encore le nombre de services écosystémiques et économiques qu'il offre, on met alors en évidence l'urgence de mesurer les dangers qui le menacent, et tout particulièrement les impacts du changement climatique et des pollutions marines qui mettent en péril son équilibre.

Parmi les écosystèmes marins les plus emblématiques mis en danger par les changements climatiques et les pollutions anthropiques, les récifs coralliens ont une importance écologique qui n'est plus à démontrer. En effet, même si les récifs ne représentent que 0.2% de la surface des océans mondiaux (Figure 1.1), ils offrent un abri et une zone de reproduction à entre 1/4 à 1/3 de toutes les espèces marines (Knowlton et al., 2010).

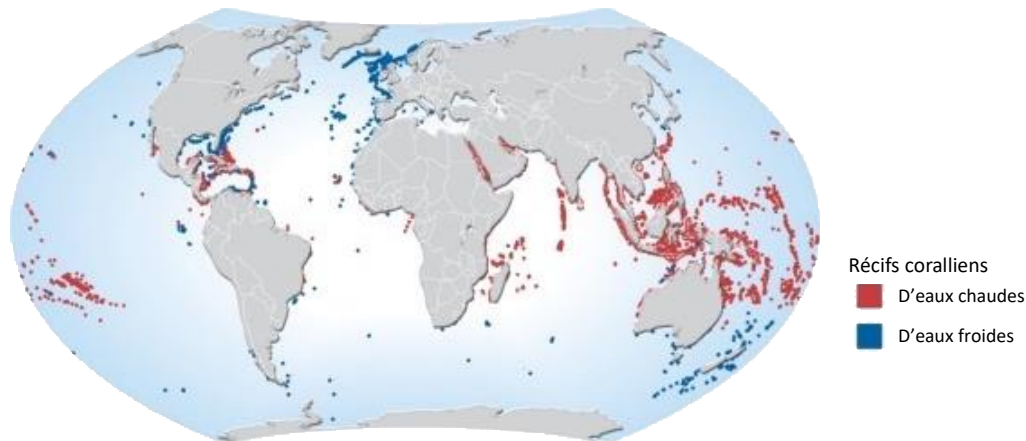


Figure 1.1. Répartition des récifs coralliens dans les océans mondiaux (crédit : Hugo Ahlenius, 2008, UNEP/GRID-Arendal, <http://www.grida.no/resources/7197>)

Par ailleurs, on estime que les services rendus par les récifs coralliens valent environ 33 billions de dollars par an (Costanza et al., 1997). Ils fournissent non seulement une protection des zones littorales, mais également une source de nourriture et de produits naturels pour environ 500 millions de personnes qui en dépendent pour leur alimentation ou leurs revenus (Hoegh-Guldberg et al., 2017).

1.1.1 Impact des changements climatiques

Les « changements climatiques » sont définis par les variations des conditions météorologiques mondiales sur le long terme. Ces modifications peuvent être d'origine naturelle, mais celles rencontrées depuis le début du XIXe siècle sont la conséquence de l'activité humaine, et notamment des rejets de gaz à effets de serre dans l'atmosphère *via* l'utilisation de combustibles fossiles. Ces dérèglements climatiques ont des conséquences à l'échelle planétaire avec des effets connus sur les océans tels que l'augmentation des températures moyennes, l'acidification du pH océanique, la montée du niveau des eaux comme des modifications des courants marins (Cooley et al., 2022). Les deux principaux aspects que nous détaillons ici sont l'augmentation des températures moyennes et l'acidification du pH océanique.

1.1.1.1 Augmentation de la température des océans

Parmi les phénomènes de changements globaux, le plus connu du grand public est le « réchauffement climatique ». Celui-ci pourrait entraîner au cours du prochain siècle une augmentation de la température de la surface des océans jusqu'à 3.2°C, même si les modélisations de l'évolution sont sujettes à une importante variabilité (Masson-Delmotte et al., 2021). Des températures océaniques élevées auront des conséquences allant de l'échelle moléculaire à celle de l'écosystème tout entier, à commencer par des changements des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer. En effet, la température de l'eau conditionne par exemple la solubilité de l'oxygène, qui sera plus faible dans une eau plus chaude, ayant alors un impact sur l'ensemble des espèces vivantes dépendantes de l'oxygène dissous. L'augmentation des températures moyennes de la mer peut également renforcer la stratification et empêcher les mélanges verticaux, privant de nutriments les zones profondes où la production primaire n'est pas présente (Behrenfeld et al., 2006). Les effets néfastes sur les producteurs primaires étant aussi démontrés, comme une baisse de la présence et de la productivité du phytoplancton (Roxy et al., 2016), cela suggère des conséquences également sur l'ensemble de la chaîne trophique qui en dépend.

L'un des effets emblématiques du réchauffement des océans est le blanchissement corallien que l'on peut observer dans les récifs (Lesser, 2011). Ce phénomène se définit par une disparition des microalgues symbiotiques qui sont abritées au sein des coraux, conduisant ainsi à la perte de leur couleur. Ce phénomène fragilise alors l'écosystème récifal et a des conséquences sur la biodiversité associée (Hughes et al., 2018).

Enfin, le réchauffement des eaux océaniques aura aussi des répercussions sur les activités humaines et l'économie, car une diminution de la biodiversité marine impacte aussi bien la pêche que l'aquaculture, ainsi que la santé humaine (Patz et al., 2006).

1.1.1.2 Acidification des océans

Les changements climatiques actuels sont principalement dus aux émissions, par les activités humaines depuis le XIXe siècle, de gaz à effet de serre, et notamment des rejets de dioxyde de carbone (CO₂). L'océan, en interagissant avec l'atmosphère, absorbe une grande partie de ce CO₂ et le dissout. Cette absorption du CO₂ par l'océan induit une modification de son pH et de la chimie des carbonates (Figure 1.2), entraînant l'altération de processus biologiques à l'échelle moléculaire et physiologique (i.e. perturbation de la biocalcification) ou

populationnelle (i.e. modifications des structures de communautés planctoniques, proliférations de blooms d'algues toxiques...) (O'Connor et al., 2007; Doney et al., 2020; Bown, 2022).

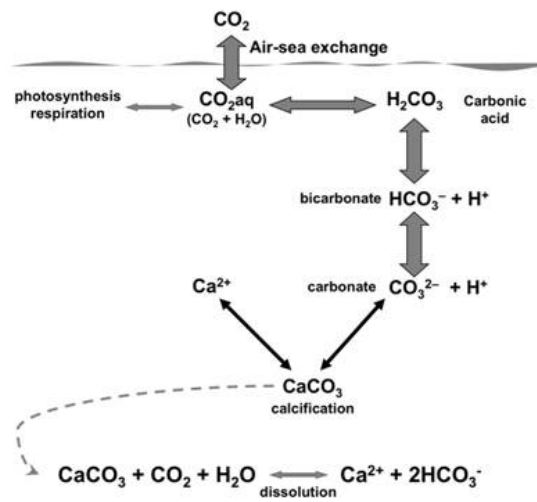


Figure 1.2. Impact de l'augmentation de CO₂ dans l'atmosphère sur la chimie du carbone dissous dans l'eau de mer (Kleypas, 2019)

On sait aujourd'hui qu'une acidification des océans conduit à une fragilisation des coquilles de nombreux mollusques (Nienhuis et al., 2010; Parker et al., 2013) ainsi qu'à une diminution de la sécrétion de squelette chez des coccolitophores (Beaufort et al., 2011). En réduisant la quantité de carbonates dans l'eau de mer, composé nécessaire à la formation de squelette chez les coraux, l'acidification mène également à la fragilisation des coraux constructeurs de récifs (Krief et al., 2010; Allemand and Osborn, 2019). Les organismes non calcifiants montrent quant à eux des réponses variées : alors que les anémones de mer semblent résister à des changements de pH importants (Ventura et al., 2016), les méduses peuvent voir leur nage, leur taux de croissance ou leur taille globale diminuées, subissant ainsi des effets sur leur reproduction ou leur efficacité de prédation (voir pour revue Chuard et al., 2019).

1.1.2 Impacts des activités anthropiques et des pollutions associées

1.1.2.1 La diversité des menaces liées aux pollutions

De nombreuses activités humaines conduisent à des pollutions côtières (Figure 1.3). Parmi elles, les activités industrielles peuvent mener à des rejets de divers polluants chimiques, à l'image de l'industrie agroalimentaire dont les produits phytosanitaires sont susceptibles d'impacter les océans après ruissellement. On peut citer également toutes les activités de loisir liées au tourisme, qui conduisent au rejet de produits cosmétiques ou plastiques par exemple

(voir pour revue Landrigan et al., 2020), mais aussi à des pollutions moins visibles comme la pollution sonore plus particulièrement liée aux activités nautiques ou de pêche (voir pour revue Di Franco et al., 2020).

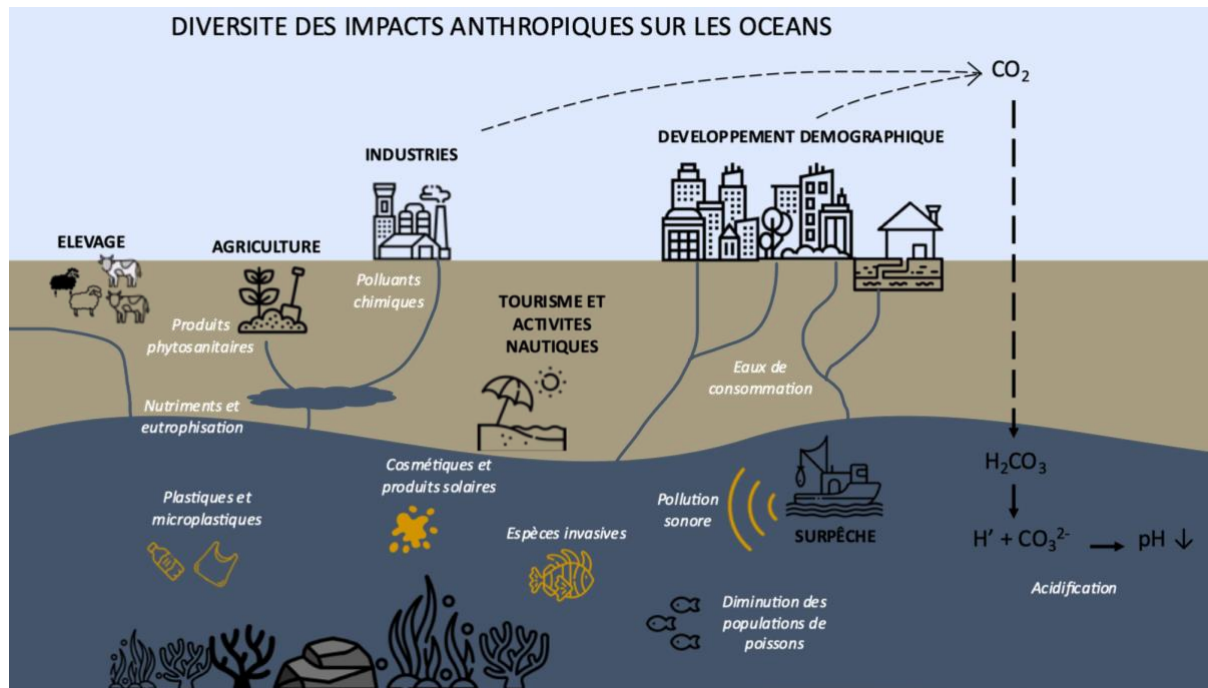


Figure 1.3. Les activités humaines et leurs conséquences sur l'environnement marin.

Les activités anthropiques telles que l'élevage ou l'agriculture peuvent avoir également d'autres conséquences sur les écosystèmes marins comme un apport excessif de nutriments dans les habitats marins conduisant à une eutrophisation localisée ayant pour impact une recrudescence des blooms de méduses. En effet, l'accumulation abondante de nutriments favorise une croissance dense d'algues et d'autres organismes, dont la décomposition provoque des hypoxies localisées, favorisant la prolifération de méduses plus tolérantes à ce type d'environnement pauvre en oxygène (Dubinsky and Stambler, 1996; Richardson et al., 2009).

Parmi les pollutions les plus visibles et les plus médiatiquement traitées, on peut citer la pollution plastique, représentant entre 19 et 23 millions de tonnes de déchets rejetés dans les eaux planétaires chaque année, dont environ 2,5 millions de tonnes finissent leur vie en mer après avoir été transportés par les rivières (Lebreton et al., 2017), représentant ainsi 85% des déchets marins. L'ampleur de cette pollution, illustrée par la formation d'un « septième continent » ou la présence de déchets plastiques jusqu'au fond de la fosse des Mariannes et dans la banquise de l'Arctique (Peeken et al., 2018; Jamieson et al., 2019), montre des effets très variés sur toute la chaîne trophique. Par exemple, les déchets de grande taille peuvent causer

des blessures voire la mort de nombreux animaux, et notamment de tortues marines (Mrosovsky et al., 2009; De Wit and Bigaud, 2019), tandis que les microplastiques (fragments de moins de 5mm) ont de grandes probabilités de se faire ingérer par des espèces à différents niveaux de la chaîne alimentaire et de s’y bioaccumuler (Wright et al., 2013).

1.1.2.2 La pollution par les produits cosmétiques

Le tourisme côtier représente le secteur de l’industrie touristique ayant la plus forte croissance (763 millions de touristes côtiers en 2004 ; Honey and Krantz, 2007), ce qui implique non seulement le développement de lourdes infrastructures, mais également une augmentation de la pollution de l’eau de mer par diverses sources. Des exemples importants récemment mis en cause sont les produits solaires. Ces écrans solaires sont des mélanges complexes de plusieurs composés qui protègent la peau des rayons ultraviolets (UV), dans la gamme UVA (320-400 nm) et/ou UVB (290-320 nm), afin de minimiser leurs effets délétères sur la santé humaine. Leur utilisation généralisée entraîne la libération potentielle de grandes quantités de produits de protection solaire et de leurs ingrédients dans les zones côtières. Par exemple, on estime qu’entre 4 000 et 6 000 tonnes de crèmes solaires sont rejetées par an en mer à proximité de zones récifales (Danovaro et al., 2008).

Parmi les composants des crèmes solaires, les filtres UV ont montré des effets néfastes à de nombreux niveaux et sur de nombreuses espèces, et notamment sur les écosystèmes récifaux, allant de l’inhibition de croissance de bactéries marines au blanchissement aigu de coraux tropicaux en passant par une diminution de l’activité photosynthétique de microalgues (e.g. Danovaro et al., 2008; Giraldo et al., 2017; Mao et al., 2017; Lozano et al., 2020). Lors de mes travaux, je me suis tout particulièrement intéressée à l’impact de ce type de pollution, et plus particulièrement ses effets à l’échelle cellulaire sur une anémone de mer emblématique des écosystèmes marins côtiers (voir CHAPITRE 2).

1.2 Le phylum des cnidaires

Le phylum des Cnidaires comprend plus de 11 000 espèces répertoriées (World Register of Marine Species), toutes issues de milieux aquatiques et en majorité marins. Les Cnidaires constituent un groupe d’animaux apparus il y a environ 500 millions d’années et ont aujourd’hui une aire de répartition très large, des eaux froides de l’Arctique à l’équateur, de la surface aux profondeurs. Ils sont répartis en cinq grandes classes (Figure 1.4) : les Anthozoaires

(qui n'existent que sous la forme fixée dite polype) regroupant les anémones de mer, coraux et gorgones, et 4 autres classes (Staurozoaires, Cubozoaires, Scyphozoaires et Hydrozoaires) comprises dans le groupe des Médusoaires et qui quant à elles alternent entre forme fixée et mobile (dite méduse).

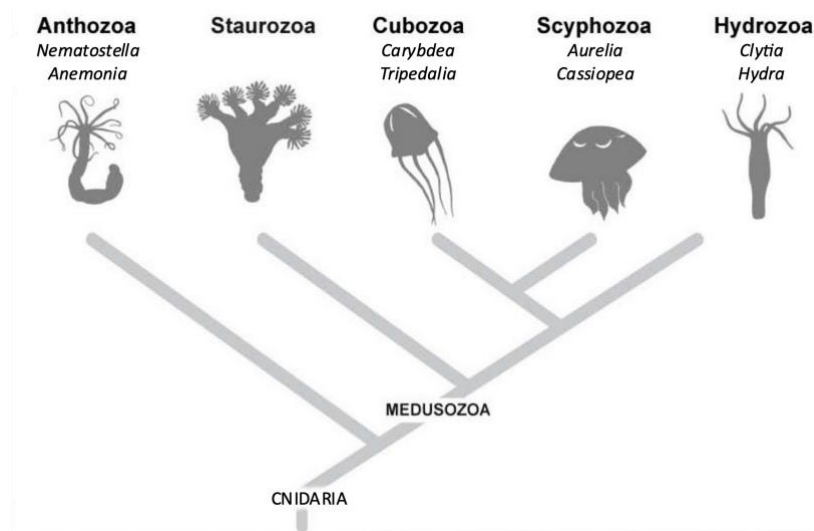


Figure 1.4. Phylogénie des Cnidaires (Bosch et al., 2017)

1.2.1 Caractéristiques générales

Ces invertébrés aquatiques à l'anatomie relativement simple présentent une symétrie radiaire et sont constitués de deux tissus (i.e. organismes diploblastiques), l'épiderme qui fait face au milieu extérieur et le gastroderme qui fait face à la cavité gastrovasculaire (Figure 1.5), séparés par une couche de tissu conjonctif, la mésoglée, composée majoritairement de collagène. Les Cnidaires possèdent une seule ouverture qui leur sert à la fois de bouche et d'anus, et qui est entourée d'un nombre variable de tentacules (Figure 1.5).

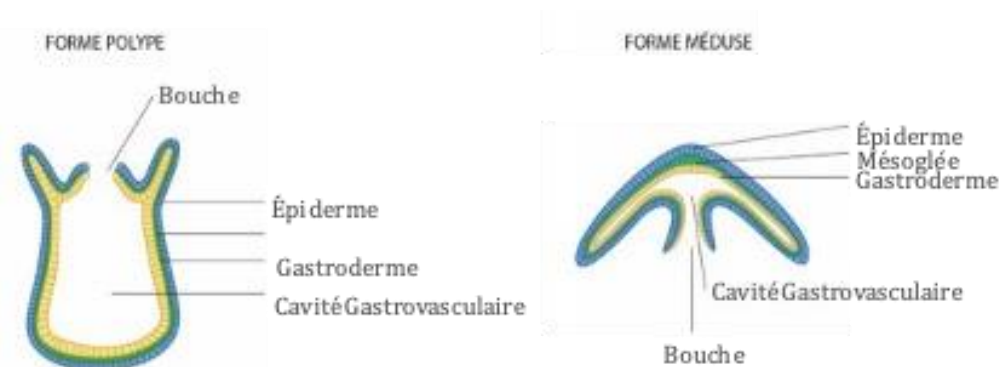


Figure 1.5. Représentation schématique du plan d'organisation de la forme polype ou méduse d'un Cnidaire.

Malgré la « simplicité » de cette architecture, ces deux tissus présentent une grande diversité de types cellulaires (Figure 1.6), illustrée récemment par des analyses « single-cell transcriptomics » sur le corail *Stylophora pistillata* et l'anémone de mer *Nematostella vectensis* (Sebé-Pedrós et al., 2018; Levy et al., 2021), révélant des types cellulaires tels que des cellules épithéliales, interstitielles, myoépithéliales, nerveuses, sécrétrices ou bien encore sensorielles. Les Cnidaires sont également caractérisés par la présence au sein de l'épiderme de cellules qui leur sont spécifiques, les cnidocytes, cellules urticantes utilisées pour la prédation, l'adhésion et la défense, et qui renferment de puissantes toxines (Tardent, 1995). Chez certains Cnidaires, des cellules du gastroderme abritent des microalgues photosynthétiques, communément appelées zooxanthelles, dans le cadre d'une relation symbiotique que nous traiterons au cours de ce chapitre.

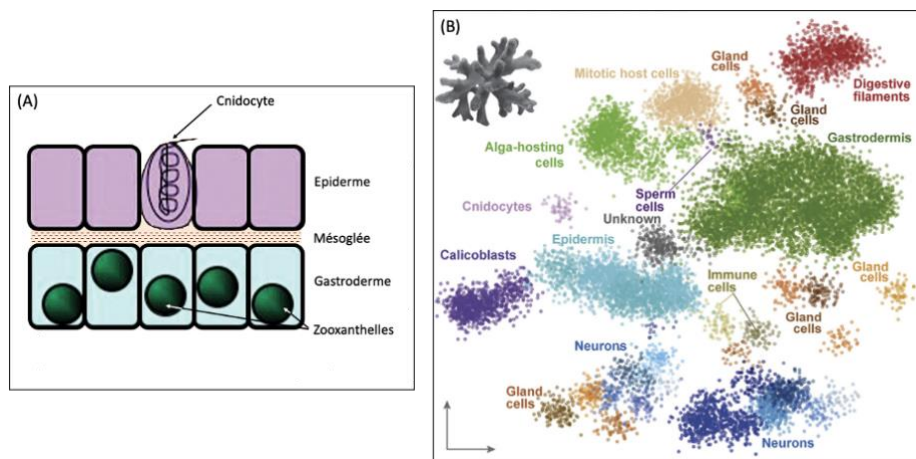


Figure 1.6. Organisation tissulaire et cellulaire d'un Cnidaire symbiotique. (A) Représentation schématique de l'architecture tissulaire d'un Cnidaire (Furla and Allemand, 2009) – (B) Projection 2D de toutes les cellules identifiées chez un individu adulte de *S. pistillata*, les couleurs correspondant aux différents types cellulaires (Levy et al., 2021)

1.2.2 Propriétés remarquables des Cnidaires

1.2.2.1 Un riche arsenal chimique

Les organismes marins sont connus pour produire un grand nombre de molécules d'intérêt. On compte en effet environ 5000 molécules issues d'organismes marins qui sont à la base de médicaments, et d'autres qui ont encore investiguées aujourd'hui pour leurs propriétés antimicrobiennes ou anticancéreuses par exemple (Carroll et al., 2019; Laguionie-Marchais et al., 2022). Le phylum des Cnidaires constitue une source importante de produits naturels. En effet des milliers de métabolites ont été identifiés, dont 7406 sont répertoriés sur la base de données Marin Lit (<https://marinlit.rsc.org>, en date de Septembre 2022). Ces métabolites

secondaires jouent des rôles très variés, allant de la défense contre les prédateurs dans le cas des nombreuses toxines identifiées dans les cnidocytes (e.g. Shiomi et al., 1997; Kass-Simon and Scappaticci, Jr., 2002), jusqu'à la communication intraspécifique à des fins de synchronisation de la reproduction chez certaines espèces de corail (Morse and Morse, 1991).

Par ailleurs, l'extraction et la caractérisation de protéines membranaires de la méduse *Rhizostoma pulmo* ont montré de significatives propriétés antioxydantes (De Domenico et al., 2019), tandis que le collagène extrait de cette même méduse est par exemple utilisé dans la recherche pour fabriquer des milieux de cultures cellulaires (Mearns-Spragg et al., 2020).

Chez les Actiniaires en particulier, des extraits protéiques obtenus à partir de l'anémone de mer *Anemonia viridis* ont également montré des effets cytotoxiques et antiprolifératifs sur différentes souches de cellules cancéreuses humaines (Bulati et al., 2016), tandis que des composés isolés de l'anémone *Heteractis aurora* ont montré des effets antibactériens et anti-oxydants (Thangaraj et al., 2018).

1.2.2.2 Capacité de régénération et longévité

La capacité de régénération, définie comme un remplacement d'une partie du corps ou d'un organe, est très répandue chez les animaux, mais variable selon les espèces (Bely and Nyberg, 2010; Reddy et al., 2019). En effet, même si dans chaque phylum, on retrouve des espèces capables de régénérer une structure du corps, cette capacité peut diminuer avec l'âge de l'individu, et les structures régénérées sont très diverses, de la queue des lézards au cœur des poissons téléostéens, en passant par les pattes de certains arthropodes ou encore le foie chez les mammifères. Les Cnidaires se démarquent par le caractère extrême de leur capacité de régénération, et ce, tout au long de leur cycle de vie, comme illustré par exemple chez les anémones de mer qui sont capables de régénérer leurs tentacules ou leur corps entier après amputation (voir pour revue Röttinger, 2021). L'hydre *Hydra vulgaris* possède même la capacité de recréer un organisme entier à partir de cellules dissociées et constitue l'exemple le plus ancien de régénération animale (Trembley et al., 1744; Lovas and Yuste, 2022).

Les Cnidaires possèdent par ailleurs une autre caractéristique remarquable, à savoir leur longévité extrême. En effet, certaines espèces au sein du phylum ont montré des durées de vie exceptionnellement longues par rapport aux observations faites chez d'autres métazoaires (voir pour revue Petralia et al., 2014). On peut citer l'exemple de coraux profonds dont on a estimé l'âge à plus de 4200 ans via leur vitesse de croissance (Roark et al., 2009), ou encore

des anémones de mer ayant été gardées vivantes en captivité pendant plus de 90 ans sans aucun signe visible de vieillissement (Comfort, 1979). Plus exceptionnel encore, la méduse *Turritopsis sp.*, communément appelée « la méduse immortelle », est capable d'inverser son cycle de vie pour revenir d'un stade de méduse sexuellement mature au stade larvaire de polype colonial (Piraino et al., 1996; Pascual-Torner et al., 2022).

Le vieillissement est un mécanisme complexe commun à l'ensemble du vivant (voir pour revue Jones et al., 2014), et définit par l'accumulation progressive de dommages moléculaires et cellulaires, notamment issus de stress oxydants, conduisant à des déficiences fonctionnelles, des maladies chroniques et finalement à la mort de l'individu. Le vieillissement se caractérise par plusieurs indicateurs à différentes échelles, tels qu'une instabilité génétique, un rétrécissement des télomères ou encore l'occurrence de sénescence cellulaire (López-Otín et al., 2013), caractérisée principalement par un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, il a été suggéré chez l'hydre une absence de sénescence (Martínez, 1998), ce qui pourrait expliquer en partie la longévité remarquable de ces organismes. Il est également suggéré que la longévité observée chez ces organismes soit associée à leur capacité de régénération, qui nécessite en effet la présence tout au long de leur vie de cellules pluripotentes ayant un potentiel de renouvellement élevé et continu (Boehm et al., 2012). Ces cellules souches pourraient ainsi être à l'origine non seulement de cette capacité de régénération extrême ainsi que de leur importante longévité.

Ainsi, les Cnidaires présentent des caractéristiques remarquables qui en font des espèces modèles de choix pour l'étude du vieillissement (Galliot et al., 2006; Technau and Steele, 2011; He et al., 2019a; Amiel et al., 2021).

1.2.2.3 La capacité de vie en symbiose entre les Cnidaires et les Dinoflagellés

Le succès évolutif des Cnidaires, qui leur permet de coloniser des eaux zones oligotrophes pauvres en nutriments, est en grande partie assuré par une vie en association avec des microalgues photosynthétiques, appartenant au phylum des Dinoflagellés.

a. *Le symbiote : un Dinoflagellé photosynthétique*

Les Dinoflagellés symbiotiques appartiennent à la famille des Symbiodiniacées, des protistes unicellulaires d'environ 5 – 15 µm de diamètre, de couleur jaune ou brune en raison de leurs pigments photosynthétiques (Figure 1.7). De forme sphérique, ils possèdent deux

flagelles pour le déplacement, un longitudinal et un transversal, présents uniquement quand l'organisme se trouve sous sa forme libre, et non à l'état symbiotique. La famille des Symbiodiniacées comprend au moins 10 genres différents (LaJeunesse et al., 2018).

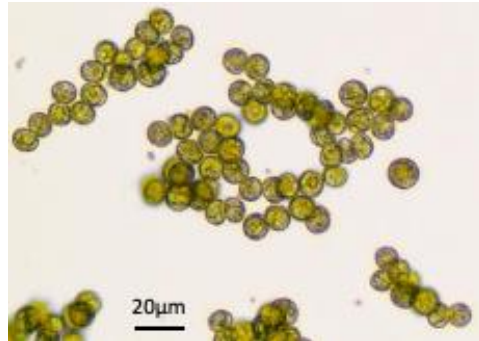


Figure 1.7. Symbiodiniacées du genre *Philozoon* extraites d'*Anemonia viridis* en culture

b. Localisation, acquisition et perte des symbiotes

Chez les Cnidaires, les Symbiodiniacées symbiotiques sont localisées à l'intérieur de cellules qui composent le gastroderme. Le nombre de zooxanthelles présentes par cellule animale, appelé la Densité Cellulaire Spécifique (DCS), est généralement d'une à deux zooxanthelles par cellule de l'hôte, mais cela peut varier au sein du tissu ou selon les espèces (Muscatine et al., 1998). On peut en effet trouver des cellules à une DCS supérieure à trois, ce qui illustre la grande capacité de plasticité morphologique des cellules animales, dont la taille est moins importante que celle d'une zooxanthelle (de 2 à 10 μm de diamètre pour les cellules animales, excluant les cnidocytes, contre environ 10 μm pour une microalgue, Rosental et al., 2017; Ventura et al., 2018; Nowotny et al., 2021).

L'acquisition des symbiotes chez les Cnidaires se fait à la fois de façon verticale lors de la reproduction sexuée ou asexuée, ou de façon horizontale depuis le milieu extérieur (Schwarz et al., 2002; Barneah et al., 2004). Dans le premier cas, certains symbiotes sont présents dans les gamètes, ce qui assure la présence de symbiotes d'origine maternelle chez la descendance. Dans le cas d'une acquisition depuis le milieu extérieur, l'animal peut, aussi bien au stade larvaire qu'au stade adulte, ingérer les zooxanthelles, qui seront alors stockées dans les cellules du gastroderme de l'hôte (Davy et al., 2012). Le processus d'établissement de la symbiose consiste en trois grandes étapes, du contact entre les cellules des deux partenaires, puis l'internalisation du symbiote par phagocytose et l'établissement d'une relation fonctionnelle stable.

L'association symbiotique, bien que nécessaire au maintien de nombreux écosystèmes, peut se révéler fragile et se rompre lors de perturbations environnementales. Le terme « blanchissement » décrit la perte de pigmentation des Cnidaires symbiotiques, qui traduit alors une perte des zooxanthelles contenues dans le tissu animal (Brown, 1997). Ce processus peut être temporaire et suivi par une récupération des symbiotes (du milieu ou par prolifération des zooxanthelles persistant dans le tissu), si les conditions environnementales redeviennent favorables. Cependant, si la perturbation est trop aigüe ou perdure, cet état blanchi conduit à la mort de l'individu.

c. *Les bénéfices mutuels de la vie en symbiose*

La symbiose Cnidaires-Dinoflagellés est une relation mutualiste largement basée sur les échanges trophiques entre les deux partenaires. Ainsi, les Dinoflagellés transfèrent jusqu'à 95% de leur production photosynthétique à leur hôte (Muscatine, 1990; Davy et al., 2012), sous forme de glucose, glycérol, acides organiques, acides aminés, ou encore lipides (voir pour revue Davy et al., 2012). Cet apport trophique participe de manière essentielle au métabolisme, à la croissance, ou encore la reproduction de l'hôte. La présence du symbiote permet ainsi aux Cnidaires de coloniser de nombreux habitats, y compris des eaux pauvres en nutriments.

En échange, le symbiote a accès aux nutriments issus des déchets métaboliques de son hôte et de leur absorption du milieu extérieur par l'hôte. Il y trouve ainsi sa source d'azote, de phosphore et de carbone inorganique (Figure 1.8 ; voir pour revue Weis, 2008). Par ailleurs, sa localisation à l'intérieur des cellules du gastroderme lui garantit également un accès constant à la lumière et un refuge contre l'herbivorie (Davy et al., 2012).

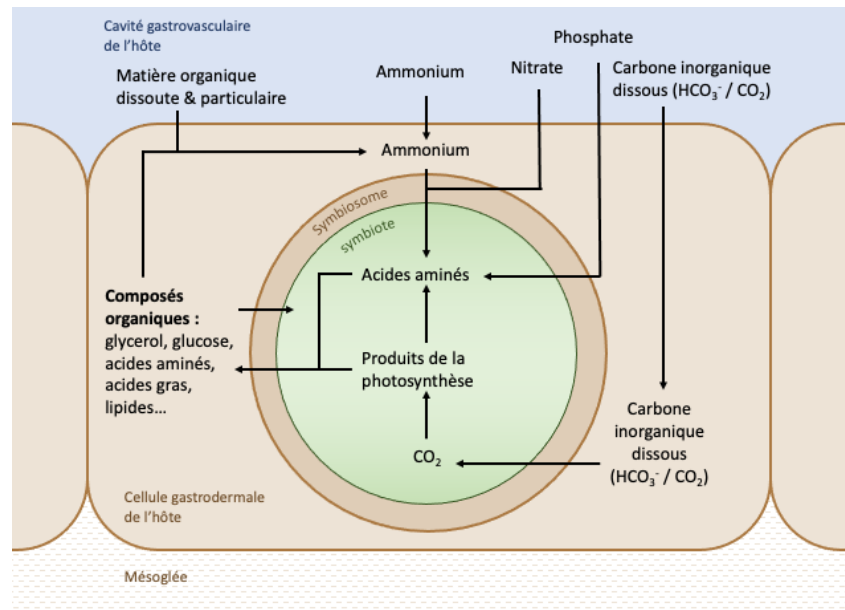


Figure 1.8. Vue schématique des échanges nutritionnels entre les deux partenaires de la symbiose (adapté depuis Davy et al., 2012)

d. *Les contraintes de la symbiose*

- Effet des UV

La vie en symbiose avec un organisme photosynthétique nécessite de vivre dans un environnement lumineux et donc d'être soumis à des rayonnements solaires en plus grandes quantités qu'un organisme non symbiotique. Cela a pour conséquence d'exposer les Cnidaires symbiotiques à d'importantes quantités de rayonnements ultra-violet (UV) et aux impacts que cela peut avoir sur l'organisme.

En effet, une exposition aux UV induit non seulement une détérioration des lipides et protéines, mais également d'importants dommages à l'ADN (Häder and Sinha, 2005). Chez l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima*, il a été montré une augmentation de l'expression de gènes liés au métabolisme et à l'apoptose après une exposition aux UV (Richier et al., 2008). Des études ont également montré que des niveaux d'UVB affectent l'activité photosynthétique et la croissance, mais inhibent également l'assimilation de l'azote et le métabolisme du phytoplancton (El-Sayed et al., 1996). Ce sont ainsi les deux partenaires de la symbiose qui peuvent potentiellement être impactés par des rayonnements UV trop intenses, ce qui nécessite la mise en place de stratégies de protection efficaces. Parmi elles, on citera la présence de Mycosporine-like amino acids (MAAs) dont les Cnidaires et leurs symbiotes ont pu montrer une grande diversité (Banaszak et al., 2006) et qui sont considérés comme des filtres solaires

naturels (voir pour revue Geraldès and Pinto, 2021). On peut citer également les pocilloporines, une famille de protéines GFP-like, qui comptent parmi leur fonction la capacité à convertir des rayonnements UV en lumière utile pour la photosynthèse (Dove et al., 2001).

- L'hyperoxie intracellulaire

La présence de la zooxanthelle à l'intérieur même des cellules du gastroderme de l'animal impose à ce tissu d'être exposé à des quantités d'oxygène fluctuantes au cours de la journée, en fonction de la production photosynthétique du symbiote. Ainsi, l'anémone de mer *Anemonia viridis* se retrouve en état d'hyperoxie à chaque cycle de lumière (Richier et al., 2003; Figure 1.9), et les coraux peuvent connaître des variations de quantité d'oxygène allant d'une hypoxie complète (la nuit) à une importante saturation en oxygène de jour (Shashar et al., 1993).

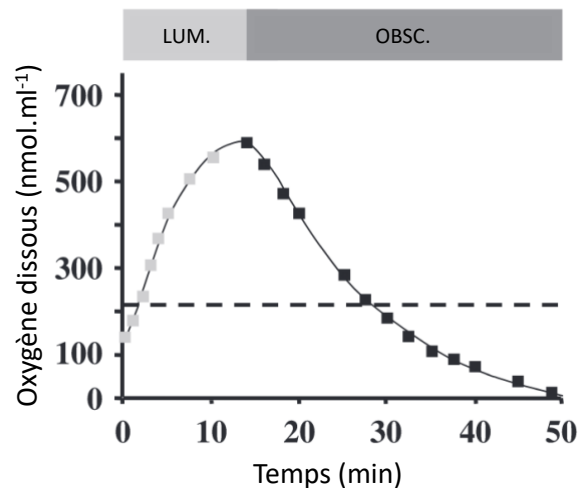


Figure 1.9. Évolution temporelle de l'oxygène dissous à l'intérieur d'un tentacule d'*Anemonia viridis* pendant un cycle lumière (LUM.) / obscurité (OBSC.). La normoxie est représentée par une ligne pointillée (adapté depuis Richier et al., 2003).

Chez la plupart des vertébrés, une telle hyperoxie induirait de la mort cellulaire via nécrose, ce qui suggère chez les Cnidaires symbiotiques une adaptation à supporter ces importantes quantités d'oxygène (Saikumar et al., 1998). En effet, la production d'oxygène conduit à la création d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), molécules causant de nombreux dommages à l'échelle cellulaire et pouvant placer les organismes dans un état de stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre entre la quantité d'ERO produites et les défenses mises en place chez l'individu (Migdal and Serres, 2011). Parmi les ERO, nous pouvons citer l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou encore le radical hydroxyle.

Chez les organismes vivants, on différencie les défenses antioxydantes selon deux catégories, les défenses non enzymatiques et les défenses enzymatiques. Concernant les Cnidaires, les défenses non enzymatiques sont principalement représentées par les caroténoïdes (Krinsky and Lenhoff, 1965), pigments responsables de la couleur rouge, orange ou jaune des végétaux et capables de piéger certaines formes de radicaux libres (l'oxygène singulet et les radicaux peroxydes ; Stahl and Sies, 2003). D'autres molécules jouent également un rôle dans la défense antioxydante des Cnidaires, comme les MAAs ou des GFP-like (Banaszak et al., 2006; Palmer et al., 2009). L'arsenal de défenses antioxydantes enzymatiques des Cnidaires symbiotiques est particulièrement développé. Par exemple, chez l'anémone de mer symbiotique *A. viridis*, on observe une grande diversité de classes de superoxyde dismutases (enzymes prenant en charge l'anion superoxyde ; Richier et al., 2003) et de glutathion peroxydases (enzymes de détoxification du peroxyde d'hydrogène ; Pey et al., 2017). Ce fort potentiel antioxydant pourrait ainsi expliquer la tolérance des Cnidaires symbiotiques à des transitions importantes entre hyperoxie et hypoxie au cours de la journée (Furla et al., 2005). Par ailleurs, Merle et al. (2007) ont montré que les activités des catalases, autre enzyme de détoxification du peroxyde d'hydrogène, étaient essentielles pour le maintien de l'état symbiotique.

Ainsi, au regard de ces études, nous pouvons nous demander si le développement des propriétés antioxydantes chez les Cnidaires symbiotiques est lié à la présence de la zooxanthelle et découlerait d'une adaptation aux conditions pro-oxydantes imposées par la symbiose. Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude de la résistance des Cnidaires à des conditions pro-oxydantes et une introduction détaillée aux concepts liés à la production des ERO et au stress oxydant sera fournie dans le CHAPITRE 3.

1.3 Les Cnidaires face aux perturbations

Le stress, qui se définit comme une perturbation de l'homéostasie d'un organisme, impacte l'ensemble du monde vivant et peut être provoqué aussi bien par un facteur biotique qu'abiotique. Les écosystèmes marins et notamment les récifs coralliens sont concernés par de nombreux stress (Figure 1.10), comprenant à la fois les facteurs de stress habituels liés aux modifications anormales des facteurs abiotiques de l'océan (les paramètres physico-chimiques tels qu'une variation de température, de pH ou de nutriments), mais également les facteurs de stress biotiques liés au cycle de vie de l'organisme ainsi qu'aux interactions intra- et inter-

espèces. Enfin, à cela s'ajoutent des facteurs plus récents, généralement en conséquence d'activités humaines, tels que des rejets de déchets ou de pollutions diverses.

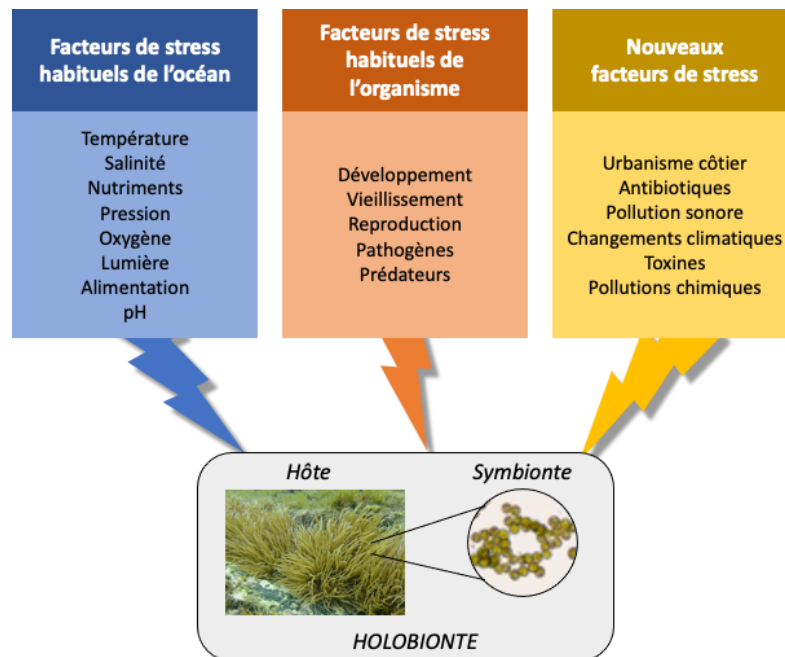


Figure 1.10. Exemples de facteurs de stress auxquels sont soumis les organismes marins (Adapté depuis Apprill, 2020)

Parmi les facteurs de stress subis par les coraux, l'impact de l'enrichissement en nutriments et des activités humaines dans leur globalité sont largement étudiés dans la communauté scientifique (Ouédraogo et al., 2021), en ciblant notamment la bioaccumulation de produits chimiques au sein des coraux, l'impact sur leur physiologie voire la mortalité qui en résulte. De par leur répartition globale au sein des océans, les écosystèmes coralliens sont exposés à des polluants très variés, allant des rejets d'hydrocarbures lors de leur extraction à proximité des récifs, aux pesticides provenant des écoulements terrigènes et des affluents, en passant par l'utilisation de cyanure au cours de certaines méthodes de pêche en Asie (Tkachenko, 2017). S'ajoutent à ces stress chimiques les destructions directes des récifs coralliens, par le biais de l'utilisation d'explosifs pour la pêche, ou encore les dégâts liés aux ancres des bateaux ou à la plongée récréative associés tous deux au tourisme croissant dans les zones abritant des récifs coralliens. Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude de la résistance des Cnidaires à des polluants provenant de l'utilisation de crèmes solaires lors des activités récréatives marines et une introduction détaillée aux concepts liés à ces pollutions sera fournie dans le CHAPITRE 2.

Par ailleurs, la plupart des Cnidaires, de par leur relation symbiotique, subissent les effets des agents stressants d'autant plus fortement que la condition de stress peut provenir à la fois de l'animal et de son symbiote algal, ce qui pourra affecter non seulement les deux partenaires, mais également la relation symbiotique en elle-même (Bénard et al., 2020). En effet, des conditions de stress peuvent impacter les relations symbiotiques à plusieurs niveaux, à commencer par une modification de la composition en microalgues au sein de l'hôte, pouvant alors procéder à un remaniement entre les souches différentes de Dinoflagellés (Berkelmans and van Oppen, 2006; Lewis et al., 2019). Il est également montré qu'un état de stress chez l'un des deux partenaires peut conduire à la rupture de la symbiose, l'algue hébergée par l'animal devenant alors un « parasite nutritionnel » et étant alors éliminé de la cellule hôte, comme c'est le cas lors d'une augmentation de la température de l'eau, qui induit un blanchissement généralisé (Weis, 2008).

En outre, l'état symbiotique peut jouer un rôle dans la réponse au stress de l'hôte voire de l'holobionte, c'est-à-dire de l'organisme symbiotique entier, comprenant l'animal et son symbiote. En effet, maintenir la diversité symbiotique pourrait permettre de minimiser l'impact du réchauffement climatique chez les coraux selon différents modèles prédictifs (Baskett et al., 2009). Également, la résistance à un stress thermique peut dépendre chez les coraux de la souche de dinoflagellés qu'ils abritent (Silverstein et al., 2015) ; en effet, les coraux abritant des dinoflagellés ayant montré une meilleure tolérance à la chaleur semblent mieux résister à leur tour à des augmentations de température (Baker et al., 2004). Des modifications de l'abondance de souches de dinoflagellés thermorésistantes sont observées pendant les périodes de stress, illustrant le phénomène de « blanchissement adaptatif » dont sont capables les coraux pour remplacer leurs symbiotes par des souches plus adaptées (Baker, 2001; Lewis et al., 2019), même si cette solution pourrait ne pas être efficace sur des stress à long terme (Coffroth et al., 2010).

1.4 Le modèle d'étude : *Anemonia viridis*

Le modèle choisi pour cette étude est l'anémone de mer symbiotique *Anemonia viridis* (Figure 1.11), présente dans des environnements tempérés, du pourtour méditerranéen jusqu'à la Manche. Chaque individu est un polype d'une dizaine de centimètres de haut, pouvant se reproduire de façon asexuée (par fission) ou sexuée (par fécondation externe), et dont la durée de vie peut s'étendre jusqu'à plusieurs décennies (Chintiroglou and Koukouras, 1992).

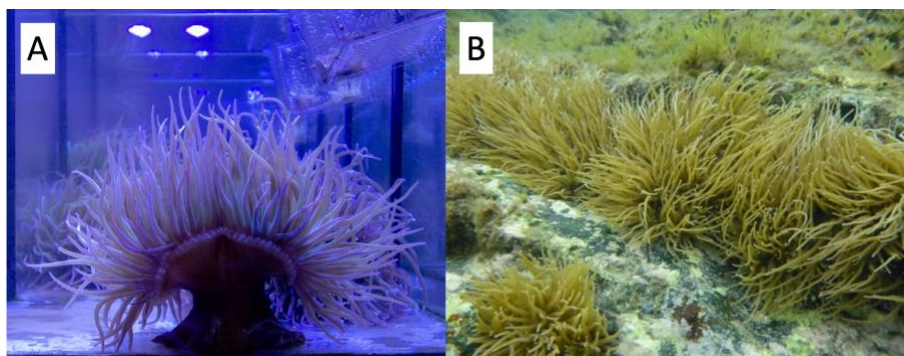


Figure 1.11. Spécimens d'*Anemonia viridis* en aquarium (A) ou en milieu naturel (B) (Crédits photos : Pauline Cotinat (A) et Alexis Pey (B))

Cette espèce vit en symbiose avec un Symbiodiniaceae tempéré du genre *Philozoon* (LaJeunesse et al., 2021) et est devenue dans la communauté scientifique un modèle très étudié, aussi bien sur les domaines écologique que physiologique. Il s'agit en effet d'une espèce utilisée couramment pour l'étude de la symbiose, sa physiologie (e.g. Furla et al., 1998; Venn et al., 2009) ou sa rupture (Merle et al., 2007), mais également pour l'étude de sa réponse au stress. En effet, celle-ci a été investiguée dans le cas d'un choc thermique, où des événements apoptotiques, des marqueurs de stress et des paramètres cellulaires ont été suivis (Richier et al., 2006; Ventura et al., 2018), ainsi que la modification de l'expression de gènes liés à la symbiose au cours du stress (Ganot et al., 2011; Moya et al., 2012). Cette espèce emblématique des écosystèmes marins côtiers constitue un organisme sentinelle, en nous permettant d'utiliser sa sensibilité aux polluants et sa réponse aux stress environnementaux pour étudier les effets de modifications climatiques et écologiques (e.g. Lozano-Bilbao et al., 2020).

Aussi, des extraits issus de spécimens d'*A. viridis* ont été étudiés pour leurs propriétés d'intérêt biomédical (Bulati et al., 2016), et des études métabolomiques concernant à la fois l'animal et son symbiote ont été menées permettant de caractériser le contenu lipidique de ce modèle (Revel et al., 2016), en faisant alors une espèce charnière pour des extractions de molécules bioactives. Enfin, comme indiqué plus haut, plusieurs de ses défenses antioxydantes ont été en grande partie caractérisées, et leur diversité mise en évidence : glutathion peroxydase (Pey et al., 2017), superoxydes dismutases (Hawkrigde et al., 2000; Richier et al., 2003; Plantivaux et al., 2004) ou encore les catalases (Merle et al., 2007).

À ce jour, très peu de génomes complets sont disponibles chez les Cnidaires, comme c'est le cas pour *Nematostella vectensis* (Sullivan et al., 2006) et pour *Acropora digitifera* (Ying et al., 2019). De premières études ont d'ores et déjà mené à des ébauches du génome d'*A. viridis*

(Urbarova et al., 2018), et actuellement le laboratoire est engagé dans l'obtention d'un génome complet d'*A. viridis* (Projet MOORE 2020-2023).

Enfin, depuis 2013, des cultures cellulaires primaires issues du gastroderme d'*A. viridis* ont été établies au sein de l'équipe (Barnay-Verdier et al., 2013), ce qui a fourni un outil *in vitro* particulièrement pertinent pour caractériser la réponse à des stress (Ventura et al., 2018; Fricano et al., 2020). Cette technologie novatrice, couplée à l'obtention de cultures cellulaires de sa microalgue symbiotique *Phlozoon sp.* (Fricano et al. en préparation), ouvre d'intéressantes perspectives pour étudier les deux partenaires de la symbiose à l'échelle cellulaire.

Ainsi, les connaissances de la physiologie et de l'écologie de cette espèce, couplées à l'obtention d'un outil biotechnologique permettant d'évaluer des réponses à l'échelle cellulaire, font d'*A. viridis* un modèle d'étude pertinent pour les objectifs de cette thèse.

1.5 Objectifs de la thèse

Lors de ce travail de thèse, je me suis intéressée aux capacités de réponse au stress des Cnidaires symbiotiques à l'échelle cellulaire, en utilisant le modèle d'étude *A. viridis*. Ce travail s'est articulé autour de deux grands volets :

- 1- *La capacité de réponse face à des stress extrinsèques*, tels que des polluants chimiques (CHAPITRE 2). Pour cela, les caractéristiques de résistance et sensibilité à des produits cosmétiques ont été déterminées par le biais d'analyses d'écotoxicité, ayant pour objectif le développement de produits de protection solaire plus éco-responsables vis-à-vis de l'environnement marin.
- 2- *La capacité de réponse face à des stress intrinsèques*, tels que des conditions pro-oxydantes liées à la vie en symbiose. Pour cela, j'ai étudié la réponse des cellules animales de Cnidaires soumises à un agent oxydant, l' H_2O_2 (CHAPITRE 3), et son impact potentiel sur le vieillissement cellulaire (CHAPITRE 4).

CHAPITRE 2. RÉPONSE DES CELLULES D'*ANEMONIA VIRIDIS* À UN STRESS EXTRINSÈQUE : LES PRODUITS SOLAIRES

2.1 Introduction

Les zones côtières présentent de fortes activités anthropiques parmi lesquelles le tourisme, l'agriculture ou l'industrie. L'environnement marin côtier se trouve ainsi de plus en plus confronté à des pollutions issues de ces activités humaines, notamment par l'utilisation de produits phytosanitaires, pharmaceutiques ou encore cosmétiques.

La population humaine mondiale vivant sur des zones côtières devrait connaître une augmentation de 50 à 122% entre 2030 et 2060 (Neumann et al., 2015), et le tourisme côtier qui vient s'y ajouter, représente quant à lui un secteur à forte croissance (Honey and Krantz, 2007). L'ensemble de ces changements conduira donc à une augmentation des rejets de polluants (hydrocarbures, plastique, rejets industriels, etc.) et des dégradations liées par exemple aux ancrages de bateau ou à la plongée récréative. La Méditerranée subit également les effets d'un tourisme de masse, concentrant plus de 30% du tourisme mondial et subissant les conséquences d'une importante activité de croisières, causant des pollutions d'hydrocarbures, des dégradations mécaniques et des rejets de particules fines et de suies (Shrestha et al., 2010).

Face à ce constat, il devient nécessaire de développer des solutions pour mieux mesurer l'impact des activités anthropiques sur les organismes marins et plus particulièrement sur les écosystèmes côtiers, afin de limiter le rejet de substances qui peuvent nuire à la biodiversité marine.

Ainsi, les objectifs des travaux présentés dans ce chapitre sont :

(i) l'étude de la gamme de réponses de cellules issues de l'anémone de mer *A. viridis* face à différentes pollutions d'origine cosmétique, de la matière première au produit fini. Pour cela nous avons utilisé un test d'écotoxicité *in vitro* développé au sein du laboratoire et dont le savoir-faire a été déposé sous forme d'une enveloppe SOLEAU (n° DSO2019003244; 2019).

(ii) l'utilisation de ce test pour limiter l'impact de produits solaires sur l'environnement marin et permettre le développement de formulations cosmétiques dans le cadre de la démarche d'écoresponsabilité de l'entreprise SO.F.I.A Cosmétiques.

2.1.1 La pollution des océans par les produits solaires

2.1.1.1 Crèmes solaires et filtres UV

Un produit cosmétique est défini comme toute substance ou tout mélange destinés à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (en particulier la peau ou les cheveux) dans le but de les nettoyer, parfumer ou protéger (Ministère de la Santé et de la Prévention ; <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/autres-produits-de-sante/article/produits-cosmetiques>).

Parmi ces produits, la catégorie des produits de protection solaire concerne toutes les crèmes, lotions ou huiles dont le but est de protéger la peau des effets nuisibles des rayonnements du soleil (UVA et UVB). L'utilisation des produits solaires par le grand public est recommandée par les organismes de santé publique, car ils jouent un rôle important dans la prévention des cancers de la peau (Sander et al., 2021). Aujourd'hui un cancer diagnostiqué sur trois est un cancer de la peau, ce qui représente entre 2 et 3 millions de cancers cutanés dans le monde (Organisation Mondiale de la Santé).

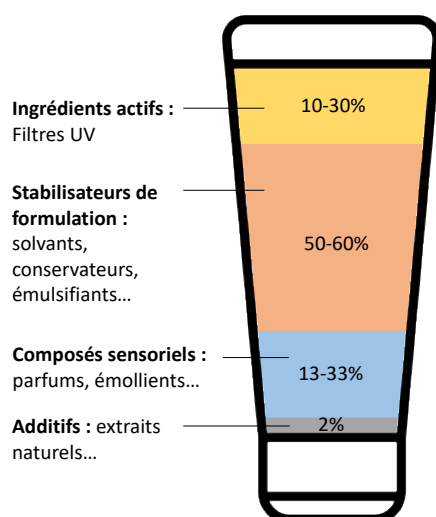


Figure 2.1. Composition d'une crème solaire ; les pourcentages sont approximatifs (Adapté depuis <https://cen.acs.org/business/consumer-products/What-in-sunscreen-and-how-does-it-protect-your-skin-from-the-sun-rays/99/i27> – Copyright © 2022 American Chemical Society).

Les produits solaires sont composés de plusieurs familles de molécules, différenciées selon leur fonction : protection contre les UV, stabilisation du produit ou modification de la texture du produit fini (Figure 2.1). Les composés qui donnent aux produits solaires leur rôle de protection de la peau face aux rayonnements solaires sont la catégorie des filtres UV. Ils peuvent représenter jusqu'à 30% de la composition du produit fini, et il en existe aujourd'hui deux types majoritairement utilisés dans l'industrie cosmétique : les filtres organiques (dits « chimiques ») et les filtres inorganiques (dits « minéraux »). Ils se différencient par leur composition et leur mode d'action. Les premiers sont composés de molécules synthétiques dont le rôle est de réagir avec les rayonnements UV et de les absorber à la place de la peau, tandis que les filtres inorganiques sont quant à eux composés de micro ou nanoparticules de minéraux (de zinc, de titane, de fer ou d'argile par exemple), dont la fonction est de réfléchir les UV pour qu'ils n'atteignent pas la peau (Figure 2.2).

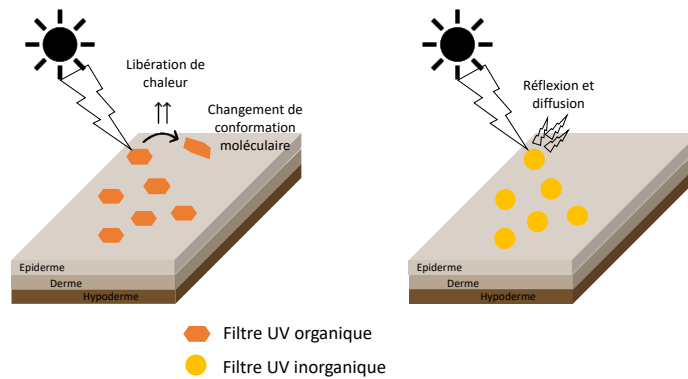


Figure 2.2. Mode d'action des filtres UV organiques et inorganiques pour la protection de la peau face aux rayonnements solaires (adapté depuis Berbel Manaia et al., 2013).

Les filtres UV sont régulièrement remis en cause pour leur innocuité auprès de la santé des utilisateurs. Certains filtres UV organiques tels que les benzophénones ou les dérivés du camphre sont soupçonnés d'avoir une activité de perturbation endocrinienne (voir pour revue Krause et al., 2012). De plus, la plupart de ces composés sont considérés comme des agents photosensibilisants potentiels, qui peuvent être responsables d'allergie de contact.

L'agence nationale des médicaments et des produits de santé (ANSM) joue un rôle dans la régulation des ingrédients autorisés à entrer dans la composition des produits cosmétiques et peut en retirer certains de la liste afin de garantir la sécurité des utilisateurs. Les décisions de retirer ou non un composé de la liste autorisée sont proposées par la Commission européenne sur l'avis des experts européens indépendants du Comité Scientifique pour la sécurité du Consommateur (CSSC). De nouveaux règlements sont ainsi publiés régulièrement

afin d'interdire l'utilisation de produits à risques tels qu'un risque cancérogène, mutagène et reprotoxique (CMR), comme cela a été le cas avec la publication du Règlement N° 358/2014 du 9 avril 2014 (<http://data.europa.eu/eli/reg/2014/358/oj>) interdisant l'utilisation des parabènes dans les produits cosmétiques. En ce qui concerne les filtres UV, la stratégie de la Commission Européenne a été de créer une liste des molécules autorisées à entrer dans la composition de produits cosmétiques, qui comporte actuellement 34 produits référencés (<http://data.europa.eu/88u/dataset/cosmetic-ingredient-database-list-of-uv-filters-allowed-in-cosmetic-products>).

2.1.1.2 Les impacts des crèmes solaires sur l'environnement marin

L'accroissement du tourisme induit une plus forte exposition de l'écosystème marin côtier à une pollution due aux crèmes solaires, puisqu'on estime qu'entre 4 000 et 6 000 tonnes de crèmes solaires sont rejetées en mer chaque année (Danovaro et al., 2008).

L'impact potentiel des crèmes solaires (en particulier des filtres UV) sur l'environnement n'est investigué que depuis ces deux dernières décennies (cf. Tableau 2.1). Par exemple, il a pu être montré un effet des filtres UV minéraux, tels que le dioxyde de titane (TiO₂), sur la croissance des microalgues phytoplanctoniques d'eau douce (Hund-Rinke and Simon, 2006). Dans l'environnement marin, une étude de 2008 montre, quant à elle, que des crèmes solaires impactent les récifs coralliens en induisant leur blanchissement (Danovaro et al., 2008; McCoshum et al. 2016). De plus, Tovar-Sánchez et al. (2013) ont identifié un impact négatif de crèmes solaires sur la croissance de la diatomée *Chaetoceros gracilis*. Les effets de plusieurs filtres organiques et inorganiques ont été plus particulièrement mesurés sur l'ensemble de la chaîne trophique. Concernant les filtres inorganiques tels que le dioxyde de titane (TiO₂) et l'oxyde de zinc (ZnO), il a été mesuré une diminution de la croissance de microalgues (Miller et al., 2010), une inhibition de la photosynthèse des Dinoflagellés symbiotiques des coraux (Fel et al., 2019), un blanchissement corallien (Jovanović and Guzmán, 2014; Corinaldesi et al. 2018) et même une mortalité chez un poisson de récif (Barone et al., 2019). Concernant les filtres organiques, le benzophénone-3 (BP3) et l'octocrylène (OC) semblent être les composés les plus toxiques pour les organismes marins et en particulier pour les coraux, induisant du blanchissement, des altérations du métabolisme et de la fonction mitochondriale, ainsi que de la mortalité (Danovaro et al., 2008; Downs et al., 2016; Stien et al., 2018, 2020; He et al. 2019; Wijgerde et al. 2020). L'impact des filtres organiques n'est pas seulement restreint à la population corallienne : des effets négatifs ayant été observés aussi chez

différentes espèces de bactéries marines, chez des eucaryotes, chez des organismes filtreurs, chez des crustacés (Paredes et al., 2014; Giraldo et al., 2017; Mao et al., 2017; Lozano et al., 2020; Thorel et al., 2020 ; cf. Tableau 2.1). De plus, il a pu être mesuré une bioaccumulation de filtres UV organiques chez la moule, *Mytilus galloprovincialis* (Picot Groz et al., 2014), tout comme chez un mammifère marin, le dauphin franciscain (Gago-Ferrero et al., 2013).

Tableau 2.1 – Exemple d'études des effets de crèmes solaires et de filtres UV sur les organismes marins présentées par ordre chronologique

Espèces ciblées	Produits testés	Effets observés	Références
Coraux : <i>Acropora sp.</i> <i>Stylophora pistillara</i> <i>Millepora complanata</i>	Crèmes solaires du commerce, Filtres UV : ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, benzophenone-3, ethylhexylsalicylate, avobenzone, 4-methylbenzylidene camphor	- Blanchissement total des coraux durs en 96h - Perte de pigments photosynthétiques et d'intégrité membranaire chez les zooxanthelles relarguées - Augmentation de l'abondance de virus	Danovaro et al., 2008
Phytoplancton : <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Skeletonema marinoi</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Isochrysis galbana</i>	Filtres UV : TiO ₂ , ZnO	Pas d'effet du TiO ₂ , mais diminution de la croissance par le ZnO	Miller et al., 2010
Diatomée : <i>Chaetoceros gracilis</i>	Crèmes solaires du commerce	Diminution de la croissance	Tovar-Sánchez et al., 2013
Phytoplancton : <i>Isochrysis galbana</i> Moule méditerranéenne : <i>Mytilus galloprovincialis</i> Oursin commun : <i>Paracentrotus lividus</i> Crustacé : <i>Siriella armata</i>	Filtres UV : 4-methylbenzylidene-camphor, benzophenone-3, benzophenone-4, 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate	Toxicité de tous les composés, mais EC ₅₀ très variables selon le modèle testé	Paredes et al., 2014
Corail : <i>Montastraea faveolata</i>	Filtre UV : TiO ₂	- Blanchissement - Induction du gène HSP70	Jovanović and Guzmán, 2014

Corail : <i>Stylophora pistillata</i>	Filtre UV : benzophenone-3	- Réduction du mouvement ciliaire et déformation morphologique de la planula - Blanchissement et mortalité	Downs et al., 2016
Anémone : <i>Aiptasia sp.</i> Corail : <i>Xenia sp.</i>	Crèmes solaires	- Diminution de la croissance des colonies - Réduction du nombre de polypes	McCoshum et al., 2016
Microalgue marine : <i>Isochrysis galbana</i> Moule méditerranéenne : <i>Mytilus galloprovincialis</i> Oursin commun : <i>Paracentrotus lividus</i>	Filtres UV : octocrylene, ethylhexyl dimethyl p-aminobenzoic acid	- Toxicité pour les trois modèles (EC10 entre 26 et 127µg/L) - Division cellulaire de la microalgue très impactée	Giraldo et al., 2017
Algue : <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Cyanobactérie : <i>Microcystis aeruginosa</i>	Filtre UV : benzophenone-3	- Absorption des composés par les deux espèces - Diminution de la croissance et réduction de la teneur en chlorophylle	Mao et al., 2017
Corail : <i>Acropora sp.</i>	Filtres UV : TiO ₂ , ZnO	- Blanchissement et enrichissement en microbes	Corinaldesi et al., 2018
Corail : <i>Pocillopora damicornis</i>	Filtre UV : octocrylene	- Fermeture des polypes - Accumulation dans les tissus et transformation par le métabolisme en acides gras conjugués	Stien et al., 2018
Poisson : <i>Sparus aurata</i>	Filtre UV : benzophenone-3	Perturbation du métabolome du foie et du plasma	Ziarrusta et al., 2018

Coraux : <i>Seriatopora caliendrum</i> <i>Pocillopora caliendrum</i>	Filtres UV : 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, octocrylène, benophénone-1/3/4/8	- Effet sur la colonisation des larves - Blanchissement des larves - Mortalité des larves - Rétractation des polypes	He et al., 2019
Corail : <i>Stylophora pistillata</i>	Filtres UV : avobenzone, ethylhexyl triazone, drometrizole trisiloxane, terephthalylidene dicamphor sulfonic acid, octocrylene, ZnO	- Dommages à l'activité photosynthétique des symbiotes et diminution de l'efficacité photosynthétique maximale - Effet plus important avec le ZnO	Fel et al., 2019
Poisson : <i>Amphiprion ocellaris</i>	Crèmes solaires du commerce contenant les filtres UV : benzophenone-3, TiO ₂	- Mortalité - Impact sur le comportement (perturbation de la nage et du nourrissage)	Barone et al., 2019
Corail : <i>Pocillopora damicornis</i>	Filtres UV : octocrylene, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol, benzophenone-3, butyl methoxydibenzoylmethane, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, 2-Ethylhexyl salicylate, homosalate, bis- ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, diethylhexyl butamido triazone, ethylhexyl trizaone	- Modification du métabolome - Altération de la fonction mitochondriale	Stien et al., 2020
Coraux : <i>Stylophora pistillata</i> <i>Acropora tenuis</i>	Filtre UV : benzophenone-3	- Mortalité - Impact sur la photosynthèse	Wijgerde et al., 2020
Bactéries marines : 27 différentes espèces	Filtres UV : benzophenone-3 (BP-3), ethylexylmethoxycinnamate, octocrylene, 4-methylbenzylidene camphor, homosalate	- Inhibition de la croissance bactérienne	Lozano et al., 2020

Crustacé : <i>Artemia salina</i> Microalgue : <i>Tetraselmis sp.</i>	Filtres UV : benzophenone-3 (BP-3), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (BEMT), butyl methoxydibenzoylmethane (BM), methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (MBBT), 2-ethylhexyl salicylate (ES), diethylaminohydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), diethylhexyl butamido triazone (DBT), ethylhexyl triazone (ET), homosalate (HS), octocrylene (OC)	- HS, BM and OC montrent une toxicité sur <i>A. salina</i> (entre 54 et 88% de mortalité mesurée) - HS, BP-3 and ES induisent une réduction de la croissance de <i>Tetraselmis sp.</i>	Thorel et al., 2020
Coraux (Larves) : <i>Leptastrea purpurea (Lp)</i> <i>Tubastraea faulkneri (Tf)</i> <i>Acropora digitifera (Ad)</i> <i>Acropora millepora (Am)</i>	Filtre UV : benzophenone-3 (BP-3)	-Mortalité larvaire -Fixation des larves au substrat -Sensibilités différentes : Ad>Lp>Am>	Miller et al., 2022

2.1.2 Les solutions possibles pour réduire la pollution cosmétique

Au regard de l'importance des produits solaires en matière de santé publique, leur interdiction ou la diminution de leur utilisation ne constitue pas une réponse pertinente, mais doit au contraire pousser à trouver des solutions pour minimiser l'impact de ces produits sur l'environnement marin. Ces solutions peuvent être préventives ou proactives.

2.1.2.1 Solutions préventives

La première solution pour limiter l'impact des pollutions cosmétiques dans le milieu marin est de limiter la biodisponibilité de ces composés une fois relargués en mer. Pour cela, la stratégie peut être de se tourner vers une texture plus résistante à l'eau afin d'éviter le relargage des composants de la crème après l'application cutanée. Plusieurs options sont possibles pour cela, comme de choisir une formulation anhydre (sous forme d'huile ou de stick solide par exemple), de créer des émulsions « eau dans huile » pour augmenter l'affinité du produit avec la peau, ou encore d'ajouter des agents filmogènes tels que des polymères pour créer une couche hydrophobe à la surface de la peau (Rigano, 2014).

La formulation et le choix des matières premières sont ensuite des étapes clés de la création d'un produit cosmétique écoresponsable. L'écoconception est une tendance qui prend de l'ampleur dans l'industrie cosmétique (Pense-Lheritier, 2013) ; elle se définit par une prise en compte systématique des aspects environnementaux lors de la conception et le développement de produits afin d'en réduire les impacts environnementaux au long de leur cycle de vie (Norme AFNOR NF X30-264). Une pré-évaluation écotoxicologique peut par exemple être mise en place dans le cadre d'une démarche d'écoconception afin de s'informer de la toxicité connue des matières premières entrant dans la composition du produit solaire. L'utilisation de bases de données est très utile dans ce cas, comme celles mises en place par des entreprises de conseil en écotoxicologie (i.e. Toxiplan) ou les méthodes de calcul d'un score hypothétique en amont des formulations (Kunze et al., 2021). Cependant, cette prospection reste limitée aux données déjà existantes concernant les risques associés à l'utilisation de ces substances chimiques au regard de l'environnement.

Les réglementations mises en place dans le domaine de la cosmétique varient fortement entre les pays, pouvant aller de l'autorisation obligatoire pour chaque matière première mise sur le marché comme en Chine (<https://marketing-chine.com/reglementation->

[des-produits-cosmetiques-en-chine](#) consulté le 30/10/2022) à l'interdiction de certaines substances spécifiques en cas de suspicion d'impact négatif (i.e. Règlement Européen : CE No 1223/2009). Certains territoires ont ainsi pris la décision radicale d'interdire toute vente, utilisation ou importation de produits cosmétiques contenant certains filtres UV décriés. C'est le cas à Hawaï, où le conseil du comté de Maui a adopté à l'unanimité un projet de loi concernant l'interdiction de l'utilisation des filtres solaires non minéraux oxybenzone et méthoxycinnamate d'éthylhexyle. Par ailleurs, Palau a été le premier pays du monde à interdire tous les ingrédients de crèmes solaires soupçonnés d'être toxiques pour les récifs coralliens dès 2018 (<https://www.palau.gov.pw/the-republic-of-palau-adopts-the-worlds-strictest-national-sunscreen-standard>). Les filtres UV tels que l'octocrylène et l'oxybenzone, ainsi que des conservateurs, sont ainsi placés sur une liste rouge et interdits d'usage dans le pays. La stratégie choisie par ces pays est basée sur le principe de précaution. Cela pousse ainsi les entreprises du marché cosmétique à s'adapter le plus en amont possible à ces changements de réglementations.

Toujours dans un but de suivre les réglementations présentes et futures instaurées dans de nombreux pays, les industries cosmétiques mettent au point par ailleurs de nombreuses innovations, parmi lesquelles la technologie de la micro-encapsulation. Celle-ci repose sur une méthode d'enrobage d'un principe actif au sein d'une microparticule jouant le rôle d'enveloppe de protection. La capsule peut alors être conçue dans le but de libérer le produit à un moment souhaité de l'utilisation, ou bien de le garder encapsulé afin d'éviter tout passage transdermique ou relargage direct dans le milieu. De nombreux industriels se tournent vers cette solution également pour l'amélioration de la stabilité du produit dans le temps, car la micro-encapsulation protège les principes actifs, dont les filtres UV, de la photodégradation et de la formation de dérivés nocifs pour l'utilisateur ou l'environnement (Downs et al., 2021).

Enfin, on peut se préoccuper de la fin de vie du produit dans le milieu aquatique en mesurant sa biodégradabilité. Une substance est dite biodégradable si, sous l'action d'organismes vivants (bactéries), elle peut se décomposer en éléments divers sans effet nuisible pour l'environnement. L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) décrit deux méthodes standardisées pour mesurer la biodégradabilité en eau de mer de produits chimiques dans la ligne directrice OCDE 306 (OCDE, 1992). Ce sont ces deux protocoles, utilisant soit une méthode de « flacon agité » soit de « flacon fermé » pour mesurer la dégradation des composés dans de l'eau de mer naturelle, qui sont majoritairement mis en place chez les industriels afin d'obtenir un pourcentage maximal de biodégradabilité pour leur produit.

2.1.2.2 Solutions proactives

D'autres solutions s'offrent aux industriels de la Cosmétique. Elles sont ici définies comme proactives, et se basent sur une quantification précise de l'impact du produit sur des organismes marins ou sur des méthodes analytiques pour identifier spécifiquement la présence de certains polluants (Muralikrishna and Manickam, 2017).

L'environnement marin étant le plus grand puits de polluants de la planète, les premiers essais de surveillance de la pollution marine remontent maintenant à plusieurs décennies, via l'utilisation d'une espèce généralement utilisée comme bio-indicateur, la moule marine, *Mytilus edulis* (Goldberg, 1975). Depuis, des protocoles normalisés ont été proposés, appelés bioessais. Les bioessais marins sont diversifiés tant en termes de modèles, tels que des espèces végétales (macro et microalgues), des invertébrés (moules, oursins, crevettes, etc.) ou des poissons (voir pour revue Anderson et al., 2016), qu'en stades de développement (de l'embryon à l'adulte). Actuellement, ces méthodes d'évaluation reposent sur l'exposition d'une espèce donnée à un polluant, suivie de la mesure de paramètres tels que leur taux de survie, leur croissance, ou encore la mesure de biomarqueurs chimiques et moléculaires (Rosner et al., 2021). Aujourd'hui les seuls tests d'écotoxicité de produits solaires sur les animaux marins sont réalisés sur des organismes vivants, de la larve à l'adulte (cf Tableau 2.1).

Même s'ils permettent une mesure directe de l'impact de polluants sur des organismes modèles, les tests d'écotoxicité sur animaux ont toutefois certaines limites, aussi bien techniques qu'éthiques (Walker, 2008). Tout d'abord, la variabilité qu'implique l'utilisation de plusieurs individus peut se révéler très importante selon les espèces utilisées (Rosner et al., 2021), de même que le coût biologique que cela représente lorsque les paramètres mesurés impliquent le sacrifice des individus. Ces fortes contraintes ont été prises en compte ces dernières années tant au niveau national qu'euro péen afin de limiter l'utilisation et le sacrifice d'animaux dans le cadre de bioessais. L'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) recommande ainsi dans le cadre de la réglementation REACH d'éviter l'utilisation d'animaux pour les essais et de rechercher des solutions alternatives. Par ailleurs, en 2015 l'ONU a établi des Objectifs de Développement Durable (ODD) concernant la protection et la conservation des Océans (ODD14) et visant à réduire, voire bannir l'utilisation d'animaux prélevés dans le milieu marin évitant ainsi une atteinte à la biodiversité marine déjà menacée par les activités anthropiques.

a. *Les tests in vitro comme alternative écoresponsable*

Pour pallier aux limites que montrent les tests d'écotoxicologie couramment utilisés, les approches *in vitro* semblent être une alternative pertinente. L'utilisation de cultures cellulaires ou de cellules isolées permet d'accéder à une échelle plus fine de la réponse à un polluant, tout en offrant de nombreux avantages en termes de disponibilité, de reproductibilité et de coûts (Bols et al., 2005). Tout d'abord d'un point de vue éthique et environnemental, les tests *in vitro* sont particulièrement pertinents, car évitant le sacrifice d'organismes vivants. Ils sont également généralement plus faciles à mettre en œuvre et offrent des résultats plus fiables. En effet, ces tests sont réalisés sur des populations homogènes de cellules permettant de se dédouaner totalement de la variabilité individuelle inhérente aux tests sur organismes vivants. En effet, ces modèles biologiques simplifiés permettent d'effectuer des tests dans des conditions contrôlées et sans l'influence de paramètres environnementaux ni de la complexité des traits de vie de l'animal (sexe, période de reproduction, âge...).

Concernant les tests *in vitro* d'écotoxicologie marine, les seuls bioessais existants sont basés sur une analyse dose-réponse d'un polluant sur des cultures de microalgues ou de bactéries marines (i.e. Norme ISO 10253:2016, Norme ISO 11348-1:2007). Ces tests tirent profits de la facilité et rapidité de culture de ces organismes ainsi qu'un faible coût de mise en œuvre.

Sur les invertébrés marins, ce n'est que plus récemment qu'ont débuté des essais pour mettre au point des modèles d'étude *in vitro*. Plusieurs travaux se sont succédé pour aboutir à la mise en cultures de cellules issues de crustacés, éponges ou encore d'holothurie (Odintsova and Khomenko, 1991; Odintsova et al., 1994; Pomponi et al., 1998; Walton and Smith, 1999; de Caralt et al., 2007; Hu et al., 2008; Vandepas et al., 2017; Rodriguez Hernandez, 2020). Cependant, aucune lignée cellulaire d'invertébré marin n'est disponible à ce jour (voir pour revue Cai and Zhang, 2014). En effet, on observe encore régulièrement des proliférations de contaminants (Grasela et al., 2012), mais également un arrêt de la division environ 24 à 72h après la mise en culture, probablement à cause du manque de connaissances en termes de besoins nutritifs et de facteurs de croissance essentiels à des cellules marines en culture (Rinkevich, 1999, 2005, 2011).

b. *Les tests d'écotoxicité in vitro sur les cultures cellulaires de Cnidaires*

Les Cnidaires sont une famille d'animaux représentatifs des écosystèmes marins côtiers, et sont donc l'une des cibles des pollutions marines liées notamment aux produits solaires. C'est pourquoi il semble primordial de mettre au point un outil *in vitro* permettant d'effectuer des bioessais sur ces modèles et ainsi mieux évaluer les impacts de polluants sur ces organismes sentinelles.

Les premiers essais portant sur des Cnidaires ont concerné dans les années 90 l'anémone de mer *Aiptasia pulchella* (Gates and Muscatine, 1992) et ont abouti à une dissociation de cellules viables pendant quelques heures *in vitro*. Depuis, d'autres travaux ont permis d'obtenir des cellules en culture d'une durée de vie de quelques jours à quelques semaines (Frank et al., 1994; Kopecky and Ostrander, 1999; Khalesi et al., 2008; Huete-Stauffer et al., 2015; Kawamura et al., 2021), mais aucune lignée cellulaire n'a pu voir le jour à la suite de ces avancées.

Néanmoins, l'établissement d'une culture cellulaire primaire à partir de tentacules d'une anémone de mer méditerranéenne, *Anemonia viridis* (Barnay-Verdier et al., 2013), a représenté un progrès très encourageant et a ouvert la voie vers de nouvelles approches. En effet, cet outil *in vitro* mis au point en interne dans notre laboratoire a montré de nombreux avantages pour une utilisation en bioessai (Figure 2.3). Parmi ces avantages, on peut souligner une durée de vie des cultures de plusieurs mois, la capacité à mener des analyses fonctionnelles par la mesure de paramètres cellulaires et biochimiques (Ventura et al., 2018), ainsi que la possibilité de cryopréserver ce matériel biologique et de le rendre accessible en continu (Fricano et al., 2020). Enfin une caractérisation fine des primo-cultures a permis d'établir que les cellules obtenues, de morphologie homogène, ont une signature moléculaire d'origine gastrodermique (Ventura, 2016; Ventura et al., 2018).

L'ensemble de ces données nous a amenés à nous tourner vers cet outil pour mettre au point un procédé de test d'écotoxicité marine *in vitro* applicable aux produits cosmétiques.

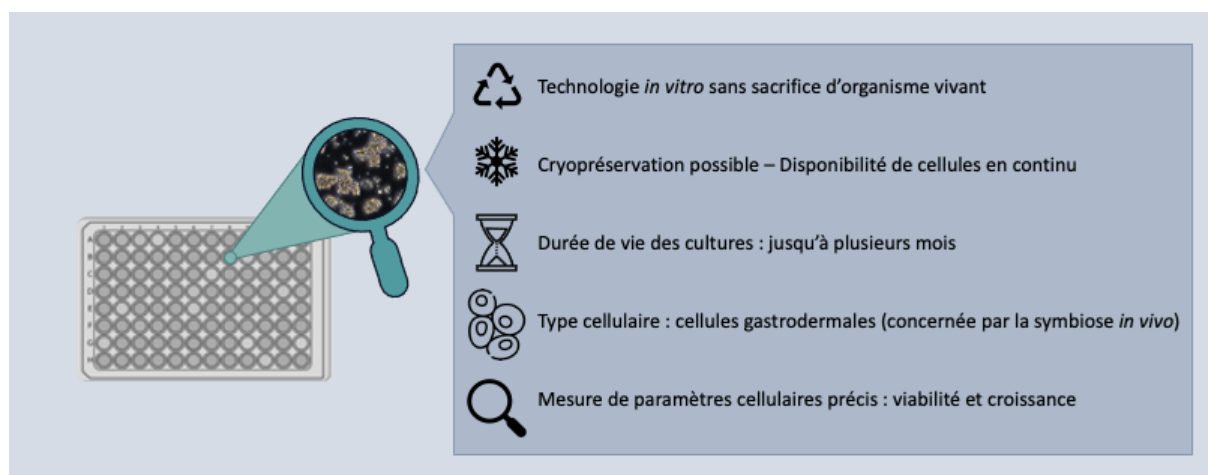


Figure 2.3. Résumé des principaux avantages de la culture cellulaire d'*Anemonia viridis* pour des tests d'écotoxicologie

2.2 Objectif n°1 : Utilisation d'un test d'écotoxicité marine *in vitro* pour des analyses de l'impact de produits cosmétiques

Avant mon arrivée en thèse, un protocole de test de cytotoxicité *in vitro* basé sur la culture cellulaire d'*A. viridis* avait été établi (savoir-faire protégé par une Enveloppe Soleau n°DSO2019003244). Mon principal objectif a alors été de valider ce protocole, par l'obtention de preuves de concept, en tant que test d'écotoxicité marine *in vitro* pour appréhender l'impact de produits issus de l'industrie cosmétique, tels que des produits solaires, sur l'écosystème récifal. Pour cela il a fallu définir des protocoles expérimentaux pour nous permettre de tester différents types de produits, de la matière première au produit fini, différentes textures et compositions, afin d'évaluer l'applicabilité de ce test en tant que bioessai.

2.2.1 Matériel et méthodes

2.2.1.1 Test de cytotoxicité

Le savoir-faire associé à ce test est protégé depuis 2019 par une Enveloppe Soleau (numéro DSO2019003244). Certains détails de la méthodologie utilisée ne seront donc pas dévoilés dans ce manuscrit.

Brièvement, le test repose sur l'utilisation de cultures primaires de cellules isolées à partir de tentacules de spécimens d'*A. viridis* maintenus en aquarium au laboratoire. Les animaux sont élevés à une température de 20°C +/- 0,5°C ; une barre de LED (aquarium LED

450nm-Deckey) a fourni de la lumière à un éclairage constant de $100\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les anémones sont nourries 2 fois par semaine avec des huîtres.

Les cellules sont cultivées en chambres de culture à une température de $20^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ dans un milieu de culture adapté par le laboratoire à partir du milieu commercial GIM (Grace Insect Medium ; GIBCO) (Ventura et al., 2018).

Les cellules en culture sont incubées en présence des différents produits selon une cinétique définie de 7 jours, permettant de mener une analyse complète de paramètres cellulaires : viabilité et croissance (Ventura et al., 2018; Fricano et al., 2020). Pour chaque expérience un contrôle, correspondant aux cellules en condition similaire sans le produit testé, a été effectué.

Les matières premières, les filtres UV organiques avobenzone et benzophenone-3, ont été achetées chez SIGMA-ALDRICH. Pour ces deux filtres, la gamme des concentrations testées pour établir l' EC_{50} s'est basée i) sur la concentration maximale de dissolution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma-Aldrich), et correspondant à la concentration la plus haute de la gamme, ii) sur des données de la littérature (concentrations retrouvées dans le milieu marin, concentrations testées lors de tests d'écotoxicologie sur d'autres modèles d'étude), et iii) sur les indications des industriels sur les concentrations utilisées dans les produits solaires. L'avobenzone a donc été testé entre 0 et 100mg/L et le benzophenone-3 entre 0 et 10mg/L

Les mélanges de filtres ont été fournis par un fabricant de cosmétiques dans le cadre de prestations réalisées par le laboratoire ; en raison de secret industriel et de propriété intellectuelle des résultats de tests, la composition de ces mélanges nous est inconnue et ils seront anonymisés par les dénominations « M1, M2 et M3 ». Les crèmes solaires commerciales (produits finis) proviennent de prestations réalisées par le laboratoire, mais également de produits achetés dans le commerce. Parmi les différents produits testés, certains peuvent être lipophiles ou hydrophiles, en fonction de leur composition. Afin d'assurer une dissolution maximale de chacun des produits dans le milieu de culture et aux concentrations finales définies, différents solvants ont donc dû être utilisés : le DMSO et le dioxane (Sigma-Aldrich). Une concentration maximale de 1% de chacun de ces solvants dans le milieu de culture a été ajoutée en condition contrôle (i.e. les cellules cultivées sans traitement) afin de s'assurer de leur innocuité.

Pour les formulations (mélanges de filtres UV) ou les produits finis, une seule concentration, définie comme la concentration maximale estimée (CME) pouvant se retrouver dans l'environnement marin côtier, a été testée. Cette CME prend en compte la quantité de produit solaire déposée sur la peau, suivant les recommandations de la Food and Drug Administration (FDA), correspondant à $2\text{g}/\text{cm}^2$ et la quantité estimée être relarguée dans le milieu marin, à savoir un quart du produit appliqué soit $0,5\text{mg}/\text{cm}^2$ (Danovaro et al., 2008). Pour les mélanges de filtres, suivant la concentration finale utilisée dans le produit fini (à l'indication du fournisseur), un calcul de proportionnalité a été appliqué à la CME pour définir la concentration à tester.

Tous les tests ont été réalisés sur $n \geq 3$ expériences indépendantes (i.e. réplicats biologiques). Et pour chaque condition, au moins $n \geq 3$ puits (i.e. réplicats techniques) ont été testés.

2.2.1.2 Traitement des données

Pour chaque matière première testée, une concentration efficace EC_{50} , correspondant à la concentration en substance qui engendre un effet différent de 50% par rapport au témoin/contrôle, a été calculée. En l'occurrence, ici, l' EC_{50} correspond à la concentration à laquelle on observe une diminution de 50% de la croissance cellulaire.

Les résultats de viabilité et de croissance sont donnés sous forme de moyenne calculée sur tous les puits testés pour chacune des conditions. Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio par rapport à la valeur moyenne des puits contrôles, fixée arbitrairement à 1. L'erreur standard à la moyenne a ensuite été calculée selon la formule suivante :

$$esm = \frac{Sd}{\sqrt{n}}$$

esm : écart de la moyenne de l'échantillon
par rapport à la moyenne de la population

Sd : écart-type de l'échantillon

n : taille de l'échantillon

2.2.1.3 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sous R par des tests Anova ou Kruskal-Wallis, suivis des tests post-hoc respectifs Tukey et Dunn en fonction ou pas de la normalité de la distribution des données. La normalité de la distribution des données a été testée par un test Shapiro-Wilk, et par un test d'homoscédasticité des variances de Bartlett. La *p value* du test (correspondant à une condition par rapport à son contrôle) est représentée par des * sur les graphiques, * correspondant à $p < 0,05$, ** à $p < 0,01$ et *** à $p < 0,001$.

2.2.2 Résultats et discussion

Des tests ont tout d'abord été effectués avec des matières premières couramment utilisées dans les cosmétiques, à savoir deux filtres UV organiques : avobenzone et benzophénone-3 (Figure 2.4). Aucune mortalité cellulaire n'a été détectée pour ces deux filtres jusqu'à leur maximum de solubilité dans le DMSO. Ces deux produits ont cependant montré un effet significatif sur la croissance cellulaire des cultures d'*A. viridis* après 7 jours de traitement. L' EC_{50} de chacun des filtres UV a été mesuré à 1,46mg/L (soit environ 4,7 μ M) pour l'avobenzone et 1mg/L (soit environ 4.4 μ M) pour le benzophénone-3. Bien que peu d'études aient été menées sur l'effet de ces filtres chez les Cnidaires, nos résultats mettent en évidence une sensibilité du test qui est en accord avec la littérature. Par exemple pour l'avobenzone, Fel et al. (2019) ont montré un effet à partir de 1mg/L sur la photosynthèse de microcolonies du corail *Stylopholora pistillata* et une mortalité dès 5mg/L. Les études menées sur différentes espèces de corail (microcolonies adultes ou larves) ont quant à elles permis de mesurer une concentration létale de 50% (LC_{50}) du benzophénone-3 comprise entre 1 et 3mg/L (Downs et al. 2016 ; He et al. 2019 ; Stien et al. 2020). À titre de comparaison, il a été montré une toxicité de l'avobenzone induisant de la mort cellulaire par apoptose sur des cellules humaines à partir de 10 μ M et une réduction de leur prolifération à partir de 5 μ M, expliquant sa limitation par la Commission européenne à 5% du produit fini (Yang et al., 2018). Également, l'avobenzone provoque une réaction inflammatoire chez des cellules humaines (O'Keefe et al., 2016) et montre une concentration de 50% d'inhibition de croissance (IC_{50}) sur des kératinocytes à 0.36 μ M (Hayden et al., 2005). En ce qui concerne le benzophénone-3, il est autorisé jusqu'à 6% du produit fini aux États-Unis et 10% en Europe. Sur des lignées cellulaires humaines, il a été démontré une activité de perturbation endocrinienne du benzophénone-3 à partir de 0.01 μ M (Kim and Choi, 2014).

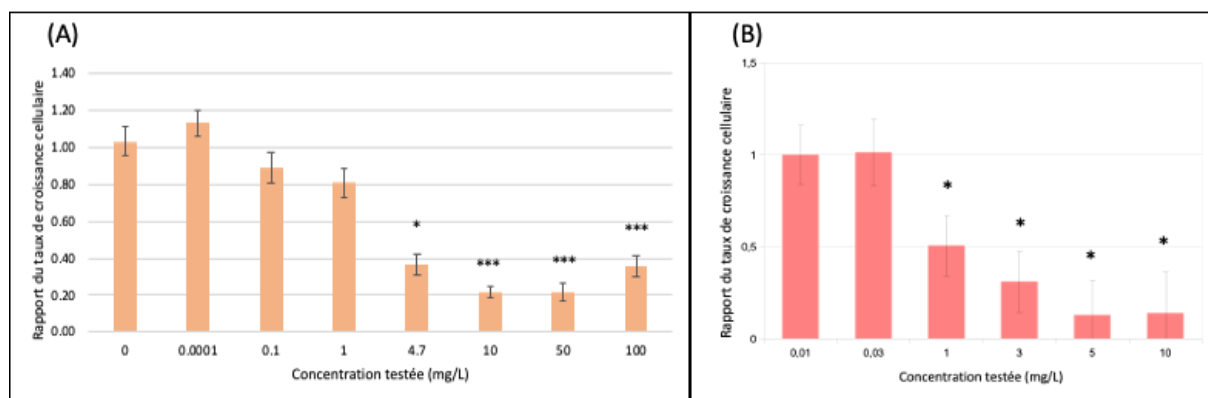


Figure 2.4. Effet de différentes concentrations d'avobenzone (A) et de benzophénone-3 (B) sur la croissance cellulaire de cellules d'*A. viridis* en culture après 7 jours de traitement. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Des tests sur des blocs de formulation, composés de mélanges de filtres UV (dont nous ne connaissons pas la composition) et fournis par un fabricant de produits cosmétiques, ont également été réalisés. Dans la Figure 2.5, sont présentés comme exemple représentatif des différentes expériences menées sur des blocs de formulation, les résultats obtenus sur 3 mélanges de filtres UV différents (M1, M2, M3). Les trois mélanges testés ne présentent aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire (Figure 2.5 A). Cependant, ces mélanges ont montré des effets significatifs plus ou moins drastiques sur la croissance cellulaire (Figure 2.5 B), allant d'une inhibition de 80% pour le mélange M2 à 44% pour le mélange M3. Le mélange M1 induit quant à lui une inhibition intermédiaire de 60% de la croissance cellulaire par rapport au contrôle.

L'utilisation de tests de toxicité sur des mélanges de molécules reste une stratégie peu utilisée dans le domaine de l'écotoxicologie et notamment pour les fabricants de cosmétiques. Pourtant, il a été montré que les effets combinés de plusieurs matières premières peuvent révéler des effets additifs voire des synergies, comme c'est le cas pour l'impact de pesticides (Nørgaard and Cedergreen, 2010) ou encore précisément pour l'impact de plusieurs filtres UV combinés (Park et al., 2017) sur le crustacé *Daphnia magna*, mais également sur le poisson-zèbre (Cahova et al., 2021). Une étude montre également des interactions entre des filtres UV et des bisphénols, molécules issues de l'industrie du plastique et fortement susceptibles de se retrouver en contact avec les crèmes solaires (Kudłak et al., 2022), illustrant l'intérêt d'un test applicable à des produits finis dans le domaine de la cosmétique, où l'on crée des formulations avec plusieurs types de molécules aux fonctions différentes et aux potentielles interactions et synergies.

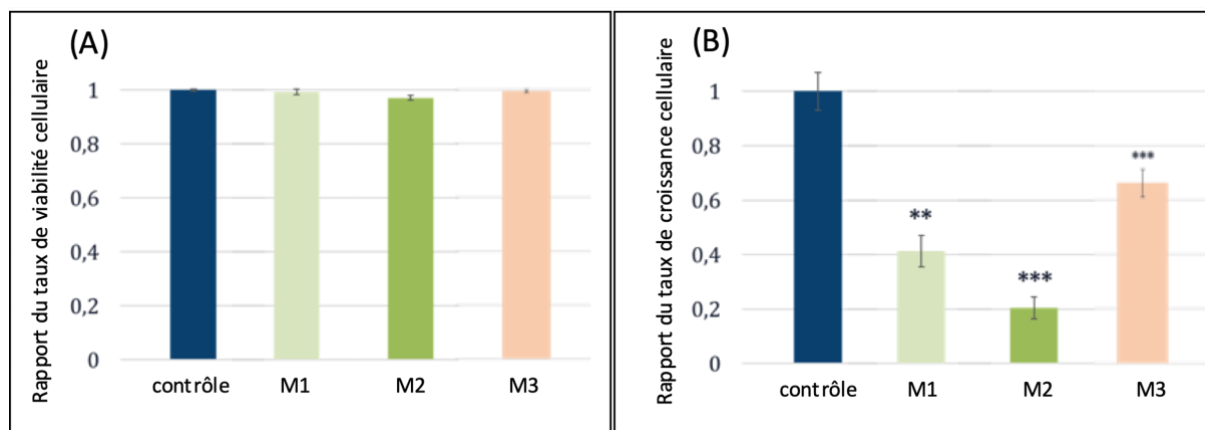


Figure 2.5. Effet de différents mélanges de filtres M1, M2 et M3 sur la viabilité cellulaire (A) et la croissance cellulaire (B) de cellules d'*A. viridis* en culture après 7 jours de traitement. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Notre objectif étant de pouvoir appliquer ce test d'écotoxicité marine *in vitro* pour appréhender l'effet de produits solaires sur l'écosystème récifal, nous avons étendu notre étude à des produits finis. Ainsi, nous avons effectué des tests sur plusieurs produits solaires achetés dans le commerce. Les trois produits testés ont été sélectionnés au regard des allégations écoresponsables qui leur étaient associées, à savoir respectivement « Respect de la peau et de l'océan » (P1), « Respectueux l'environnement marin » (P2), ou encore « Testé en condition marine » (P3).

Les résultats pour ces trois produits ont montré des réponses très contrastées (Figure 2.6). En effet, le produit P1 a montré un effet significatif sur les deux paramètres cellulaires, diminuant de 15% la viabilité et de 66% la croissance cellulaire, tandis que le produit P3 n'a montré aucun effet significatif sur les deux paramètres. Le produit P2 a quant à lui montré un effet intermédiaire, diminuant de 19% la viabilité cellulaire, mais ne montrant qu'un effet non significatif sur la croissance cellulaire. Ces résultats soulignent ainsi le besoin de bioessais robustes en appui aux allégations proposées par les producteurs.

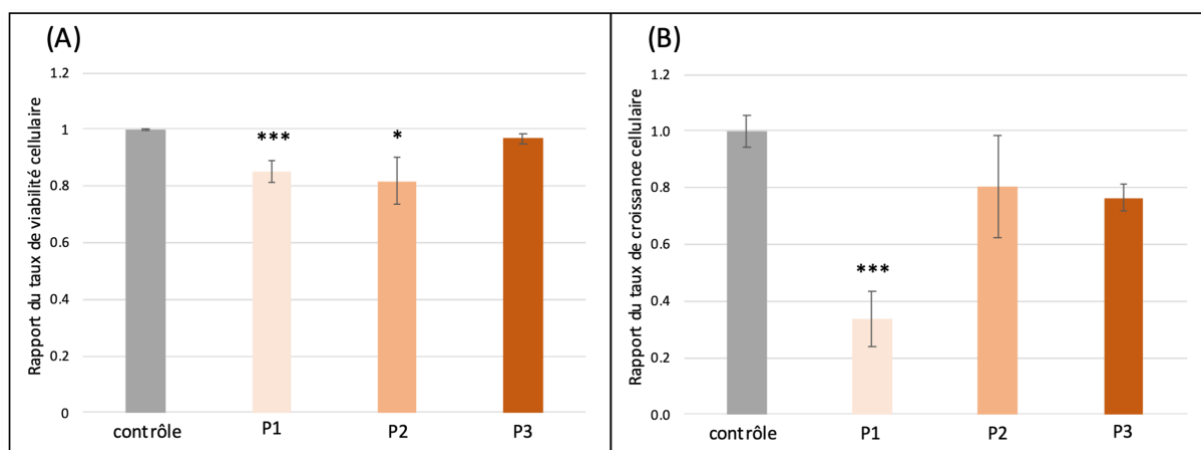


Figure 2.6. Effet de différentes crèmes solaires du commerce P1, P2 et P3 sur la viabilité cellulaire (A) et la croissance cellulaire (B) de cellules d'*A. viridis* en culture après 7 jours de traitement. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Les résultats obtenus nous ont permis de valider notre test d'écotoxicité *in vitro* comme une nouvelle approche innovante pour évaluer l'impact sur l'écosystème récifal de différents types de produits, tels que des produits cosmétiques solaires. En effet, notre test présente une sensibilité et une reproductibilité suffisantes et nécessaires pour identifier des produits ou matières ayant une écotoxicité forte (effet significatif sur la viabilité et la croissance), et ceux ayant un impact limité. Ce sont les critères requis pour valider une méthode d'analyse d'écotoxicité robuste et pertinente.

La gamme de réponses s'est révélée assez précise pour nous permettre de calculer des EC_{50} sur plusieurs matières premières couramment utilisées dans les formulations cosmétiques, mais également de mesurer l'effet de mélange de filtres UV, voire de produits finis déjà commercialisés et utilisés par les consommateurs. De plus, la reproductibilité du test a pu être validée au regard des résultats obtenus sur les différentes expériences indépendantes.

Par ailleurs, ce test s'est révélé applicable à une grande variété de produits, ce qui n'est pas le cas aujourd'hui de la plupart des tests utilisés dans l'écotoxicologie ou qu'on peut trouver dans la littérature. En effet, à l'exception de quelques rares études (Danovaro et al., 2008; Tovar-Sánchez et al., 2013; Barone et al., 2019), ce sont majoritairement des matières premières qui sont testées sur des modèles marins. Le test mis au point dans cette étude est quant à lui adapté à plusieurs types de produits, offrant ainsi la possibilité de tester des produits complexes afin de prendre en compte les effets combinés voire les synergies qui peuvent se produire, mais également de faciliter les choix au moment de la conception d'un produit en comparant directement plusieurs blocs de formulations tels que des mélanges différents de filtres UV.

En outre, les résultats obtenus avec des crèmes solaires d'ores et déjà commercialisées, avec des allégations relatives à leur impact sur l'environnement marin, ont été très contrastés (Figure 2.6), posant alors des questions sur les arguments environnementaux qui y étaient associées. En effet, ces trois produits sont porteurs d'arguments commerciaux qui laissent penser qu'une démarche d'écoconception a été entreprise chez le fabricant, mais sans nécessairement être associée à des résultats de tests d'écotoxicologie. En effet, les allégations sont généralement basées sur une analyse *in silico* des matières premières utilisées voire simplement par l'absence d'utilisation de molécules décriées pour leur impact potentiel sur l'environnement marin sans apporter de preuve de l'innocuité du produit. En l'absence actuelle de réglementation quant à la toxicité sur l'environnement marin des produits commercialisés, seule une démarche volontaire de la part des industriels permet au consommateur d'être éclairé sur l'impact de ses produits cosmétiques. Cela pose logiquement des questions quant à la fiabilité des allégations apposées aux produits cosmétiques et illustre le besoin de tests robustes pour obtenir des arguments écoresponsables solides et garantir aux consommateurs la démarche du fabricant.

Après avoir validé la pertinence et la robustesse du test d'écotoxicité *in vitro* basé sur les cultures cellulaires d'*A. viridis*, l'objectif a été de le placer au cœur d'une démarche complète de création de produits solaires écoresponsables au sein de l'entreprise SO.F.I.A Cosmétiques.

2.3 Objectif n°2 : La création d'une gamme de solaires à faible écotoxicité

Face au constat de l'augmentation des pollutions et les dangers que les cosmétiques représentent pour les écosystèmes marins côtiers, l'objectif des industriels est de développer des gammes de cosmétiques solaires qui n'impactent pas l'environnement marin dans lequel ils sont susceptibles de finir leur vie. Le second objectif de ce chapitre a été d'identifier des solutions à chaque étape de développement d'un produit et d'y coupler un test d'écotoxicité marine robuste afin d'atteindre une toxicité minimale des produits finis et ainsi créer une gamme de produits solaires à faible écotoxicité marine. Cela a été fait dans le cadre de mes missions au sein de l'entreprise SO.F.I.A Cosmétiques dans le cadre du développement d'un produit solaire écoresponsable. Les produits cosmétiques sont développés par le laboratoire SO.F.I.A Cosmétiques en sélectionnant rigoureusement les ingrédients afin qu'ils respectent plusieurs critères. Ils doivent avoir une innocuité non seulement pour la santé de l'utilisateur,

mais également pour l'environnement dans lequel ils pourraient être présents après utilisation. La biodégradabilité du produit est également testée et doit être optimale. Les produits cosmétiques doivent respecter un cahier des charges précis de performance quant à la tolérance cutanée, l'efficacité en termes de protection solaire et de résistance à l'eau. La conservation du produit doit également être garantie et n'avoir recours qu'aux seuls conservateurs « listés », à savoir autorisés par le Règlement Cosmétique. Enfin, ce strict cahier des charges doit être complété par les volontés du client quant à la sensorialité et les attentes du consommateur final.

Une étude bibliographique a écarté l'utilisation de plusieurs filtres UV, dont les benzophénones, l'éthylhexyl methoxycinnamate, l'octocrylène, ou encore les dérivés du benzyldène camphre, qui ont tous montré des effets néfastes sur plusieurs modèles marins, et plus particulièrement sur les coraux (voir Tableau 2.1). Les quantités de filtres UV utilisés dans les formulations dépendaient de la protection solaire (SPF) attendue. Les choix concernant tous les autres types d'ingrédients en dehors des filtres UV ont été déterminés par les membres de l'équipe R&D de SO.F.I.A Cosmétiques.

Les produits cosmétiques et plus particulièrement les écrans solaires peuvent prendre différentes formes, en fonction de l'effet recherché en termes de sensorialité et de confort d'utilisation, et en fonction des attentes des consommateurs finaux. Ainsi, même si les produits solaires prennent en majorité la forme d'émulsions et donc de crèmes, des produits à différentes textures sont aujourd'hui développés, plus ou moins liquides pour être utilisés en spray par exemple, mais également des huiles et des sticks solides. En dehors des considérations de sensorialité de la texture du produit et des volontés commerciales, le choix du formulateur pour créer un produit solaire sous forme d'huile, de crème ou de stick par exemple peut dépendre du niveau de protection solaire voulu (Couteau et al., 2016).

La stratégie de SO.F.I.A Cosmétiques a été à la fois préventive, par le choix de matières premières et par une formulation écoconçue, mais également proactive par l'utilisation du test d'écotoxicité *in vitro* mis au point au cours de l'Objectif n°1. Dans le cadre de mes missions, afin de déterminer l'impact environnemental de produits solaires, j'ai entrepris des approches comparatives pour évaluer : (i) si le type de filtre UV pouvait influencer la toxicité d'un produit fini ; (ii) si les textures les plus courantes sur le marché, la crème et l'huile, avaient un impact différent; (iii) si le type de filtre UV (organique ou inorganique) seul pouvait avoir une influence sur la toxicité finale.

2.3.1 Matériel et méthodes

2.3.1.1 Produits testés

Plusieurs comparatifs ont été effectués entre différents produits de protection solaire afin de déterminer le rôle de différents paramètres sur l'impact environnemental des formulations. Les produits ont été formulés par l'équipe R&D de SO.F.I.A Cosmétiques ; en raison de secret industriel et de propriété intellectuelle des résultats de tests, la composition de ces produits ne sera pas communiquée et ils seront anonymisés dans les résultats de ces travaux.

Dans un premier temps, deux types de textures de produits solaires ont été comparés, à savoir une crème et une huile aux compositions semblables (contenant toutes les deux un mélange de filtres organiques).

Par la suite, une crème solaire contenant un mélange de filtres organiques (nommée « Organique ») a été comparée à deux crèmes solaires contenant des filtres UV minéraux différents, à savoir du TiO₂ pour l'une (nommée « TiO₂ ») et du ZnO pour l'autre (nommée « ZnO »), afin de déterminer si le type de filtre UV utilisé a une influence sur le résultat du test d'écotoxicologie. Il est néanmoins précisé que, bien que leur SPF final était comparable, la composition précise des trois types de crème ne nous a pas été communiquée.

Enfin, deux formulations qui avaient été sélectionnées pour leurs résultats en termes de performance (même SPF, conservation, biodégradabilité, etc.) ont fait l'objet d'une comparaison sur le plan écotoxicologique afin de déterminer la version ayant le moins d'impact et qui sera ensuite commercialisée. Dans ce contexte, les deux formulations étaient connues et ne différaient que par l'un des filtres solaires utilisés dans le mélange de filtres : la Formulation 1 contenait du TiO₂ et la Formulation 2 contenait à la place du Ethylhexyl Triazone, un filtre organique aussi commercialisé sous le nom de Uvinul T150. D'autres filtres organiques (ici non cités), identiques dans les deux formulations venaient compléter les deux produits finis.

2.3.1.2 Tests d'écotoxicologie sur cellules d'*Anemonia viridis*

Le protocole de test est le même que celui décrit précédemment dans la partie 2.2 de ce chapitre, suivant le savoir-faire associé.

2.3.1.3 Rédaction des rapports d'études

Pour chacun des groupes de produits testés, un rapport d'étude est rédigé et fourni à l'équipe R&D de SO.F.I.A Cosmétiques afin que des choix puissent être faits quant à une validation d'un produit pour le client ou la reformulation d'un produit pour qu'il atteigne un objectif.

Chaque rapport d'étude comprend un rappel des méthodes employées, un descriptif des produits testés et des références associées, ainsi que tous les résultats des tests sur ces produits. Les valeurs de viabilité et croissance cellulaires sont ainsi présentées sous forme de tableaux, accompagnés des graphes associés et des informations quant à la significativité statistique des différences observées par rapport au contrôle.

2.3.2 Résultats et discussion

2.3.2.1 Comparatif de types de texture

Afin de comparer deux des principales textures que peuvent avoir les produits solaires, nous avons procédé au test de cytotoxicité selon les mêmes conditions, de la dissolution du produit à la phase de traitement des cellules.

Les tests ont montré un effet faible, mais significatif pour les deux produits testés sur la viabilité cellulaire après 7 jours de traitement (Figure 2.7). La différence observée entre la condition contrôle et le produit « Crème » dans le cas de la viabilité cellulaire ne représente une diminution que d'environ 4%, ce qui peut sembler négligeable face à la diminution de près de 13% qu'induit le produit « Huile ». De plus, nous n'avons observé un effet significatif sur la croissance cellulaire qu'après le traitement avec le produit « Huile », la réduisant de 64%. Ces résultats suggèrent ainsi un impact plus important de la texture huile par rapport à une émulsion en crème.

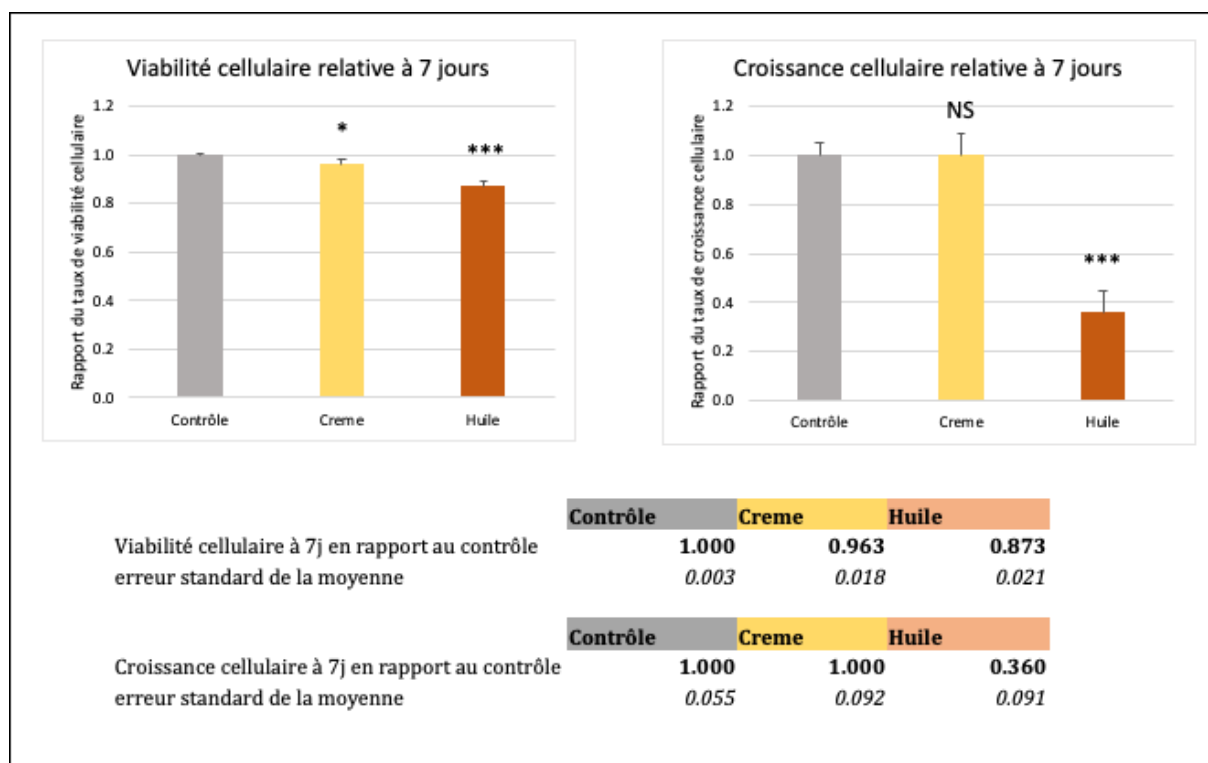


Figure 2.7. Effets de deux produits de protection solaire (une texture crème et une texture huile) sur la viabilité et la croissance cellulaire des cultures d'*A. viridis* après 7 jours de traitement. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

2.3.2.2 Comparatif de formulations avec filtres minéraux ou filtres organiques

Les deux types de filtres UV, organiques ou inorganiques, ont montré dans la bibliographie des effets néfastes sur l'environnement ou des organismes marins. Le protocole employé dans cette étude permet de comparer les formulations cosmétiques contenant les deux types de filtres UV en les testant dans les mêmes conditions et sur le même modèle biologique. Les crèmes contenant les filtres UV minéraux ont eu des résultats similaires sur le modèle, à savoir une mortalité de 67% et de 57% (respectivement pour la crème contenant du TiO_2 et celle contenant du ZnO) et un arrêt total de la croissance après 7 jours de traitement (Figure 2.8). La crème contenant un mélange de filtres organiques n'a quant à elle pas montré d'effet sur la viabilité cellulaire après 7 jours de traitement, mais a réduit significativement de 40% la croissance cellulaire après le traitement. Ces résultats montrent donc un effet plus important des crèmes contenant des filtres UV minéraux sur les paramètres cellulaires testés, et se différencient peu entre eux dans leur impact cytotoxique. Ce résultat est cependant à nuancer par le fait que d'autres composants peuvent différer entre les crèmes et être impliqués dans les différences observées.

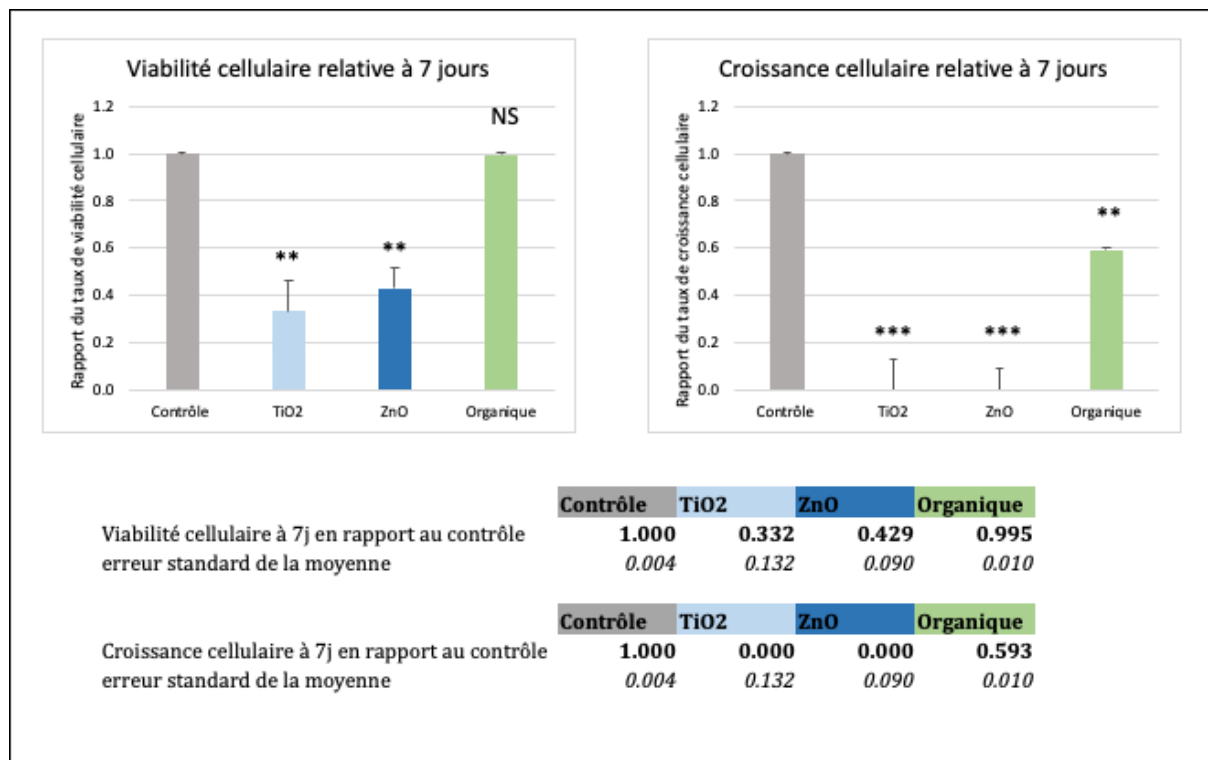


Figure 2.8. Effets de crèmes solaires contenant un filtre UV minéral (TiO₂ ou ZnO) et d'une crème solaire contenant un mélange de filtres organiques sur la viabilité et la croissance cellulaire des cultures d'*A. viridis* après 7 jours de traitement. ** p<0.01; *** p<0.001

2.3.2.3 Le cas d'une reformulation

Au cours de ma thèse, j'ai été directement impliquée dans le choix d'une formulation éco-responsable par l'analyse de deux crèmes dont la composition ne différait que par la présence d'un filtre minéral ou organique. Les deux formulations avaient néanmoins été sélectionnées pour leurs performances et pour leur respect du cahier des charges imposé. La Formulation 1, contenant un mélange de filtres organiques et du TiO₂, a montré une réduction de la viabilité cellulaire d'environ 32% et une réduction de la croissance cellulaire d'environ 57%, tandis que la Formulation 2, contenant uniquement un mélange de filtres organiques, n'a pas montré d'effet significatif sur la viabilité cellulaire, mais une diminution de la croissance de 45% (Figure 2.9).

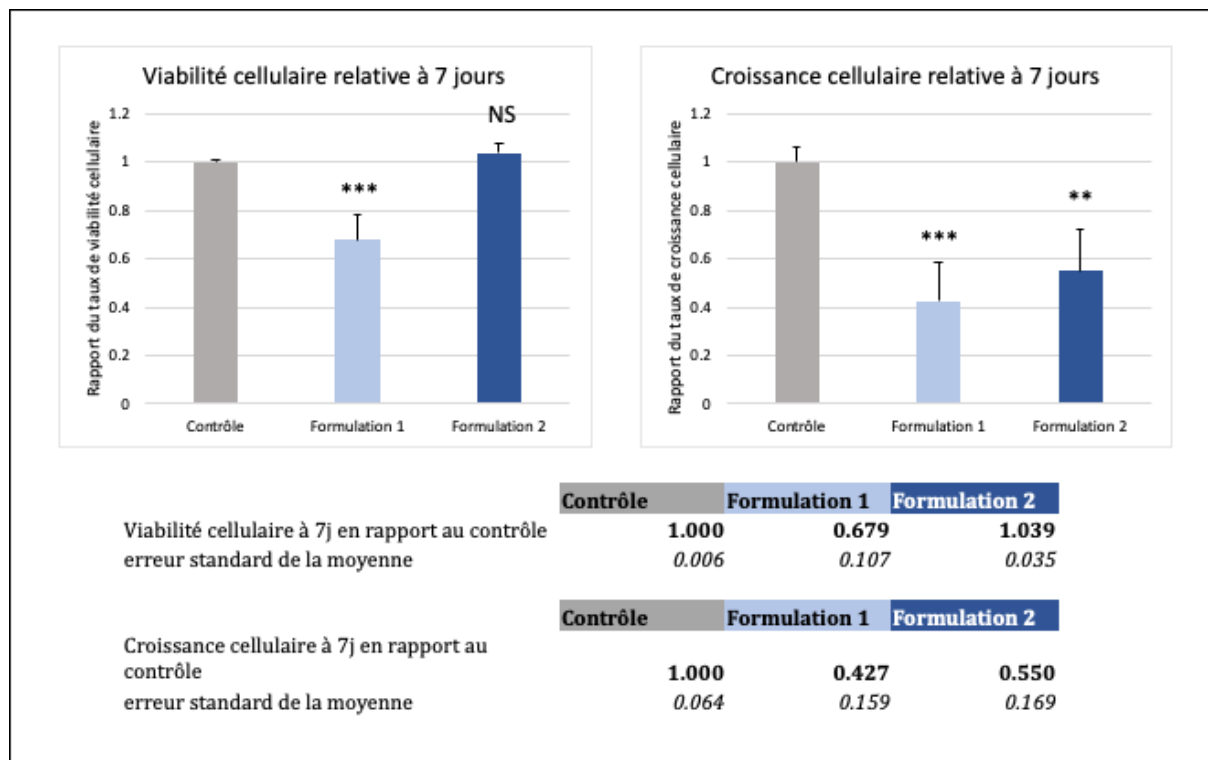


Figure 2.9. Effets comparatifs de deux crèmes solaires sur la viabilité et la croissance cellulaire des cultures d'*A. viridis* après 7 jours de traitement. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Les effets des filtres minéraux sont assez variables en fonction des espèces modèles et des protocoles (cf. Tableau 2.1). Ainsi, le TiO_2 et le ZnO ont tendance à induire du blanchissement chez les coraux (Jovanović and Guzmán, 2014; Corinaldesi et al., 2018), mais peu d'effet sur le phytoplancton, avec seulement le ZnO qui induit une diminution de leur croissance (Miller et al., 2010). Nos résultats montrant un impact plus important des crèmes contenant des filtres minéraux par rapport à celles contenant un mélange de filtres organiques divergent de ceux obtenus sur le poisson-clown par exemple, où un traitement à l'oxybenzone montrait une mortalité et des effets comportementaux beaucoup plus importants qu'avec un traitement au TiO_2 (Barone et al., 2019). Toutefois, même si elles ont obtenu de meilleurs résultats concernant leur toxicité, les crèmes contenant un mélange de filtres organiques ont tout de même induit un état de déséquilibre chez les cellules, illustré ici par une réduction de croissance (Figure 2.8 et Figure 2.9).

L'utilisation du test d'écotoxicologie marine a permis à SO.F.I.A Cosmétiques d'effectuer des choix de formulations et de justifier l'utilisation de certaines matières premières. En effet, la recherche bibliographique et la veille réglementaire ont été complétées de résultats concrets concernant la toxicité de plusieurs formulations et la stratégie comparative utilisée a permis à l'équipe de formulation de l'entreprise de se tourner vers un mélange de

filtres UV organiques moins toxiques que les filtres UV minéraux testés, ainsi que vers une texture crème qui montrait également moins d'impact qu'une huile. Enfin, une fois les principaux paramètres et composants choisis, le produit fini donnant de meilleurs résultats écotoxicologiques a été sélectionné parmi la pré-sélection des deux produits répondant au cahier des charges attendu.

Les résultats des tests ont ainsi permis de renforcer la démarche d'écoresponsabilité de l'entreprise en appuyant la création d'une gamme de produits solaires à faible toxicité sur l'environnement marin tout en prenant en compte le cahier des charges concernant l'innocuité, la sensorialité et les attentes du consommateur. Des allégations environnementales robustes ont ainsi été créées et l'appellation « Low Tox » peut être apposée sur les produits, ce qui garantit que ceux-ci ont été testés sur un modèle représentatif de l'écosystème récifal et ont fait l'objet d'une démarche éco-responsable pour en limiter l'impact.

2.4 Discussion générale

L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre ont tout d'abord permis non seulement de valider l'utilisation de cultures primaires de cellules d'*A. viridis* pour un test d'écotoxicologie fiable, efficace, et fournissant une large gamme de réponses face à des polluants, mais également de prouver son efficacité dans le cadre d'études d'écotoxicité de produits cosmétiques. La première étape de mise au point du test a mis en évidence une autre voie de valorisation d'une technologie issue du laboratoire de recherche en dehors de son utilisation d'origine dans le cadre de la recherche fondamentale (Barnay-Verdier et al., 2013; Ventura et al., 2018). La deuxième étape a été d'obtenir une preuve de concept dans un domaine industriel, ce qui a été le cas grâce aux produits solaires et aux cosmétiques en général, pour lesquels le test a montré d'importants avantages (durée courte, pas de sacrifice d'organisme vivant, disponibilité des cellules en continu, adapté aux matières premières comme aux produits finis). Enfin, la dernière étape qui consistait à inclure ce test dans la conception de produits solaires plus écoresponsables a permis la formulation d'une gamme de solaires plus respectueuse de l'environnement au sein de la société SO.F.I.A. Cosmétiques.

Même si le nombre d'études portant sur l'impact des crèmes solaires continue d'augmenter de pair avec la prise de conscience des consommateurs (Carve et al., 2021), les industriels font face à un manque de solutions efficaces et accessibles pour mesurer l'impact de leurs produits sur l'environnement, et plus particulièrement sur les espèces marines. Le test

utilisé dans cette étude apparaît ainsi comme une solution répondant à un besoin dans le marché de la Cosmétique et ouvre la voie vers une commercialisation plus large de cette solution, via la création d'une start-up qui offrirait ce service à un plus grand nombre d'industriels de différents domaines, ainsi qu'aux acteurs de la biosurveillance et du suivi de qualité des eaux de mer.

2.4.1 Le rôle des tests d'écotoxicologie pour des allégations environnementales

L'impact des filtres UV sur les coraux et organismes associés est un sujet de plus en plus investigué dans la littérature, et une attention toute particulière est donnée à ce sujet dans les médias grand public depuis plusieurs années, conduisant à une sensibilisation de la population à l'impact de leurs activités sur l'environnement marin. Ainsi, la pollution plastique ou chimique est fortement associée dans l'esprit du grand public à des images fortes telles que des récifs coralliens blanchis, ou des déchets plastiques formant un continent à part entière dans le Pacifique (Henderson and Green, 2020).

Cette prise de conscience s'illustre par l'intérêt grandissant que montrent les consommateurs de produits cosmétiques pour les produits bio ou écoresponsables, souvent catégorisés sous l'appellation « Produits Verts », et dont la part de marché est en expansion dans le monde (Cervellon and Carey, 2011). Il a été montré en effet que la sensibilisation à l'environnement aura un impact sur les tendances aussi bien de consommation des acheteurs, mais aussi sur les choix des producteurs (Amberg and Fogarassy, 2019), car la présence de labels écologiques sur les produits montre un impact positif sur le comportement d'achat (Rahbar and Abdul Wahid, 2011; Jaiswal et al., 2021).

En outre, le choix du consommateur se révèle être sensible aux informations indiquées sur les packagings, et tout particulièrement aux allégations environnementales (D'Souza et al., 2006), c'est pourquoi de nombreuses marques de cosmétiques font le choix d'apposer des logos ou labels sur les produits (Figure 2.10), sans toujours apporter de réponses claires sur l'impact réel du produit sur l'environnement en général et les écosystèmes marins en particulier. Or, la législation qui jusqu'alors n'avait que très peu encadré l'utilisation d'allégations environnementales s'est récemment durcie en interdisant les appellations imprécises ou portant à confusion. Ainsi, l'ajout en 2020 au Code l'Environnement de l'Article L541-9-1, interdit depuis janvier 2022 « de faire figurer sur un produit ou un emballage les mentions “ biodégradable ”, “ respectueux de l'environnement ” ou toute autre mention équivalente ». Il

est désormais nécessaire d'apporter des arguments fondés et basés sur une approche scientifique. Lors de cette étude, nous avons effectivement démontré des divergences entre les allégations apportées pour certains produits et les résultats de cytotoxicité mesurés, renforçant la conclusion que l'utilisation de tests d'écotoxicologie semble être la solution idéale pour une meilleure connaissance de l'impact d'un produit.



Figure 2.10. Exemples de logos et labels utilisés par des marques de cosmétiques sur des crèmes solaires dans le commerce.

2.4.2 Perspectives des tests d'écotoxicité marine pour la Cosmétique

Malgré la pertinence des tests d'écotoxicologie existants et les progrès qui sont faits dans ce domaine, ceux-ci montrent encore plusieurs limites. Tout d'abord, la plupart des tests d'écotoxicologie sur espèces marines existants à ce jour sont effectués sur des filtres UV (Tableau 2.1). Cela ne prend donc généralement en compte ni les autres matières premières des formulations cosmétiques, ni les effets combinés de plusieurs molécules.

Les crèmes solaires sont constituées en grande partie de stabilisateurs de formulations et de conservateurs, dont le rôle va être de garantir la durabilité dans le temps du produit, de sa texture et de son efficacité. Leur rôle est certes essentiel pour garantir la sécurité des utilisateurs, mais leur danger pour l'environnement n'est pas à minimiser. Les parabènes sont par exemple une famille de conservateurs très courants dans les cosmétiques, car très efficaces pour prévenir les proliférations microbiologiques, mais suspectés de causer des allergies et d'être des perturbateurs endocriniens (Andersen, 2008). On soupçonne également qu'ils puissent avoir des impacts sur l'environnement de par leur fonction antibactérienne et antifongique, ce qui suggère l'importance d'investiguer l'écotoxicologie de toutes les familles de composants des produits solaires. En outre, si l'on considère l'effet cumulatif que peuvent avoir certains produits pharmaceutiques ou cosmétiques chez l'Homme (Boxall et al., 2012; Sarigiannis and Hansen, 2012), on peut s'attendre à retrouver un effet similaire lorsque les organismes marins

sont confrontés à des mélanges de molécules tels que des produits cosmétiques, voire obtenir un effet plus important que celui attendu si l'on cumule les effets individuels de chaque composant (Park et al., 2017; Cahova et al., 2021). Il semble ainsi important de mesurer l'impact du produit fini, tel qu'il est commercialisé et utilisé, pour prendre en compte l'intégralité des composants et leurs risques individuels, tel que réalisé dans cette étude.

En outre, le cycle de vie d'un produit cosmétique ne se termine pas par son utilisation par le consommateur, mais également par son vieillissement et sa dégradation, aussi bien avant l'utilisation qu'une fois relargué dans le milieu, voire même après son absorption par des espèces marines. La photodégradation que subissent les filtres UV conduit par exemple à la formation de sous-produits pouvant présenter des menaces pour la santé humaine ou de l'environnement (Santos et al., 2012), voire de produits à la toxicité encore plus importante que leur forme d'origine, comme c'est le cas pour les produits de la dégradation de l'avobenzone survenant dans les eaux chlorées des piscines par exemple (Lebedev et al., 2020). La dégradation de l'octocrylene peut quant à elle survenir directement dans les tissus des coraux soumis à cette pollution et former des conjugués d'acides gras, induisant une bioaccumulation de ces composés et un dérèglement du métabolisme de ces individus (Stien et al., 2018).

Par ailleurs, l'un des paramètres importants à définir lors du choix du test d'écotoxicologie est le modèle biologique ciblé. Le but de ce type d'étude est d'être représentative de la biodiversité de l'écosystème choisi, à savoir pour notre étude des récifs coralliens. Le choix d'un modèle biologique comme l'anémone de mer est pertinent pour cibler la réponse d'un Cnidaire symbiotique caractéristique de l'écosystème récifal, mais il semble nécessaire de le coupler à d'autres modèles afin d'évaluer les différents niveaux trophiques impliqués. Plusieurs études ont d'ores et déjà montré que les microalgues semblent également subir des dommages à la suite de traitements avec des filtres UV (diminution de croissance, perte de biomasse, toxicité en présence de rayonnements UV ...; cf Tableau 2.1). C'est pourquoi l'une des pistes envisagées au sein du laboratoire est l'utilisation des microalgues symbiotiques d'*A. viridis* (*Philozoon sp.*), elles aussi maintenues en culture et utilisées à des fins de recherche fondamentale (Zamoum and Furla, 2012). Au laboratoire, des tests de dose-réponse, des calculs d'EC₅₀ et des mesures d'effets sur la croissance de *Philozoon sp.* ont été mis en application avec différents produits cosmétiques et montrent des résultats robustes et complémentaires au test sur *A. viridis* (Nora Sadoun, résultats non publiés). La possibilité de tester un même produit non seulement sur les cellules animales, mais également sur les symbiotes associés permettrait d'illustrer l'impact du produit à différentes échelles trophiques.

Cette approche complémentaire permettrait finalement de prendre en compte les deux partenaires de la symbiose Cnidaire-Dinoflagellé à la base de tout l'écosystème récifal.

Enfin, les paramètres à mesurer doivent être pertinents pour avoir une idée précise de l'impact réel de la pollution, mais plusieurs 'endpoints' peuvent être couplés afin d'obtenir une plus grande finesse de résultats. Parmi eux, nous proposons d'analyser la capacité de résilience des cellules en culture à la suite de l'exposition au polluant. Ce paramètre permet d'évaluer la réversibilité des impacts mesurés et appréhender l'impact du produit dans un contexte plus écologiquement réaliste, où la dynamique côtière implique un brassage périodique du milieu. De plus, en complément des paramètres cellulaires mesurés dans notre étude, à savoir la viabilité et la croissance cellulaires, nous pouvons envisager d'y coupler l'étude de paramètres biochimiques (i.e. état redox des cellules), génétiques (i.e. modifications transcriptomiques et épigénétiques) ou métaboliques et métabolomique (i.e. impact sur fonctionnement mitochondrial ou plus généralement sur les voies de biosynthèse intracellulaires), afin d'avoir une vision plus complète du mode d'action des polluants sur notre modèle.

Enfin, dans ma perspective entrepreneuriale, je souhaiterais développer cette approche *in vitro* pour l'étude de l'impact d'autres substances issues du monde industriel (tels que les substances antifoulings ou encore les plastiques et leurs additifs) et aider ainsi de nouveaux secteurs industriels à développer une démarche écoresponsable.

CHAPITRE 3. RÉPONSE INTRINSÈQUE DE CELLULES D'ANEMONIA VIRIDIS FACE À DES CONDITIONS PRO-OXYDANTES

3.1 Introduction

3.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leurs conséquences

Au cours de leur vie et de leur métabolisme, les cellules sont confrontées à des flux d'oxygène (ou de dioxygène O_2), molécule indispensable à la production d'énergie chez la plupart des organismes aérobies. L'oxygène n'est cependant pas une molécule inerte et sa présence induit la production de nombreuses molécules dérivées, appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Au sein des cellules eucaryotes, les molécules d'oxygène sont prises en charge au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale où une réaction de phosphorylation oxydative se produit. Celle-ci consiste en un processus de couplage entre : i) le transfert d'électrons (oxydation) jusqu'à un accepteur final, l'oxygène, et ii) la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique Pi (phosphorylation). Au sein de la chaîne respiratoire, les électrons proviennent des équivalents réduits $NADH, H^+$ et $FADH_2$ issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides). Lors de ces processus, une partie de l'oxygène reste partiellement réduite et conduit à la production des ERO, espèces plus réactives que l'oxygène dont elles proviennent (Figure 3.1).

Parmi les ERO produites, on trouve l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($HO\cdot$). Au sein des cellules, la production d'ERO est limitée par l'action d'enzymes antioxydantes : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) peut ainsi être pris en charge par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sera alors directement transformé en eau via l'action de la catalase ou de la glutathion peroxydase. Sans ce bouclier antioxydant, la réaction de Fenton conduit à la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyle ($HO\cdot$), la forme la plus réactive des ERO (Figure 3.1). Les ERO sont généralement bien pris en charge au sein de la cellule, aussi bien par les enzymes citées précédemment (Figure 3.1), mais également par des molécules de défenses antioxydantes

telles que la vitamine E et C, ou encore certains pigments, comme les caroténoïdes par exemple (Halliwell and Gutteridge, 2015).

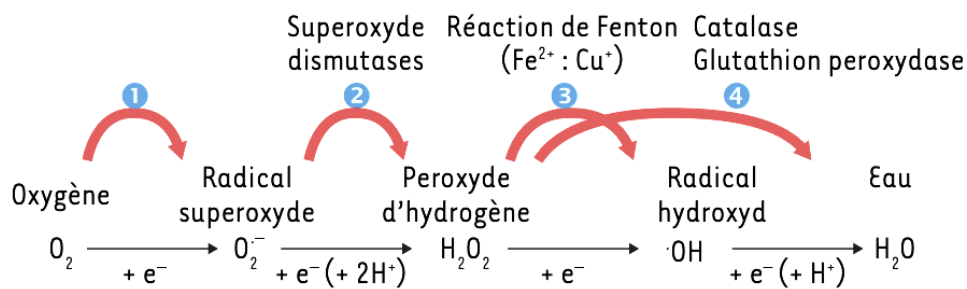


Figure 3.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène et étapes de la réduction de l'oxygène (schéma tiré de Migdal and Serres, 2011)

Cependant, une surproduction des ERO ou une diminution des capacités antioxydantes de la cellule peut conduire à un stress oxydant, caractérisé par une accumulation de dommages au sein des différents composants cellulaires (Asada, 1999). On peut ainsi observer : i) une peroxydation des lipides conduisant à la formation d'aldéhydes ou de cétones, pouvant réagir à leur tour avec les acides aminés des protéines (Grimsrud et al., 2008) ; ii) une carbonylation des protéines, définie comme une fixation de dérivés carbonylés sur les protéines, provoquant une altération de leur fonction ; iii) des lésions de l'ADN, provoquant des mutations lors de la réplication, ou des cassures de l'ADN, initiant des processus de mort cellulaire par le biais d'arrêts du cycle cellulaire, de mécanismes d'apoptose ou encore de nécrose (Ryter et al., 2007).

Enfin, l'accumulation de dommages oxydatifs provoqués par les ERO est soupçonnée d'être impliquée dans les mécanismes de vieillissement et de maladies liées à l'âge (Harman, 1956). On peut en effet observer une accumulation de molécules oxydées avec l'âge des individus, et il a été montré que la durée de vie du nématode *Caenorhabditis elegans* a pu être prolongée en lui évitant des dommages oxydatifs *via* une supplémentation alimentaire en antioxydants (Ishii et al., 2004 ; voir pour revue Labuschagne and Brenkman, 2013). Le lien entre stress oxydant et vieillissement sera abordé plus particulièrement dans le CHAPITRE 4 de ces travaux de thèse.

Chez les organismes photosynthétiques, une deuxième source majoritaire de ERO provient de la chaîne de transfert d'électrons chloroplastique. La photosynthèse consiste en la production de composés organiques, associée à une libération d'oxygène, à partir de composés inorganiques, tels que le CO₂ et H₂O, et d'énergie lumineuse. La réaction d'oxydoréduction qui

prend place au sein de l'organisme photosynthétique, appelée réaction de Hill, répond à l'équation suivante :



Cette production de dioxygène par les organismes photosynthétiques pendant les périodes lumineuses conduit à de grandes variations de la quantité d'oxygène à l'intérieur des cellules. Dans des conditions hyperoxiques, la réduction de l'oxygène par le photosystème lors de la réaction de Mehler, génère de l'anion superoxyde qui est converti en H_2O_2 par une superoxyde dismutase chloroplastique (Figure 3.3). Les cellules photosynthétiques disposent alors d'un arsenal de défenses antioxydantes (telles que des catalases et des ascorbate peroxydases) permettant la prise en charge de l' H_2O_2 , évitant alors la mise en place un état oxydant (voir pour revue Foyer, 2018).

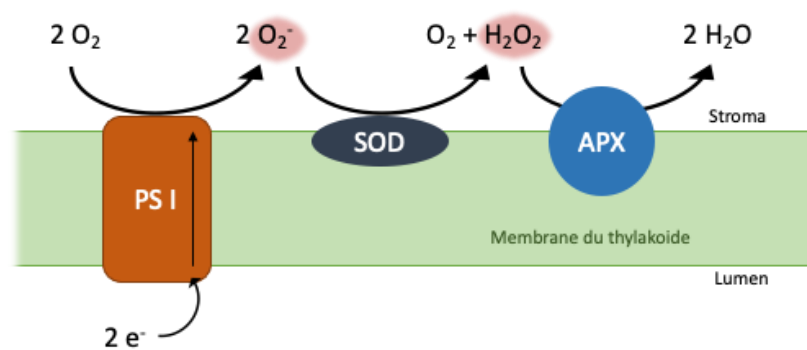


Figure 3.2. Réaction de Mehler au sein des chloroplastes des cellules photosynthétiques. PSI : Photosystème I ; SOD : superoxyde dismutase ; APX : ascorbate peroxydase.

Les ERO jouent toutefois un rôle paradoxal au sein du vivant, jouant d'importants rôles physiologiques, y compris dans des voies de signalisation essentielles telles que la réponse immunitaire, l'entrée en apoptose ou en sénescence cellulaire, participant ainsi au bon fonctionnement métabolique des organismes. En effet, nombre de gènes et de facteurs de transcription sont régulés par l'état redox des cellules et des processus d'oxydation réversibles peuvent être nécessaires à l'activation des protéines (voir pour revue Dröge, 2002). Par exemple, l' H_2O_2 est impliqué dans des voies de signalisation telles que la voie des MAP Kinases, essentielle dans les processus de division et prolifération cellulaire (Guyton et al., 1996). Par ailleurs, des études sur la toxicité de l' H_2O_2 , menées sur des cultures cellulaires de mammifère, ont permis de démontrer le rôle paradoxal de cette ERO. En effet, si de faibles quantités d' H_2O_2 peuvent générer une stimulation de la croissance cellulaire, des concentrations

plus élevées provoquent au contraire des arrêts permanents de croissance pouvant conduire jusqu'à une entrée en apoptose (Davies, 1999; Xiang et al., 2016).

3.1.2 L'H₂O₂ dans le milieu marin

Parmi les ERO, nous allons nous intéresser dans cette partie à l'une des espèces les plus présentes dans l'eau de mer et impliquée dans de nombreux processus biologiques, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ses caractéristiques sont liées à ses propriétés physico-chimiques. En effet, l'H₂O₂ est une molécule à la durée de vie relativement longue (de 1 à 2,5 jours en milieu aqueux), soluble dans les milieux aqueux et lipidiques, et capable ainsi de diffuser rapidement à travers les membranes (Smith et al., 2005). Enfin, sa dégradation donne naissance à l'espèce radicalaire la plus réactive, le radical hydroxyle HO·, multipliant les effets négatifs d'une surproduction d'H₂O₂.

3.1.2.1 L'occurrence d'H₂O₂ dans le milieu marin

Présent à l'état naturel dans tous les réservoirs d'eau douce et dans l'eau de mer, l'H₂O₂ a été mesuré pour la première fois dans l'océan en 1966 (Baalén and Marler, 1966). C'est l'ERO présente en plus grande quantité dans l'océan, naturellement présente dans les eaux de surface à des concentrations comprises entre 30 et 400 nmol/L (Abele-Oeschger et al., 1997; Morris et al., 2022).

La principale source d'H₂O₂ dans le milieu marin découle de la photooxydation par les rayons UV de la matière organique dissoute (Draper and Crosby, 1983), capable d'absorber des photons puis de réduire le dioxygène dissout en radical superoxyde (O₂^{·-}), qui sera rapidement transformé en H₂O₂. Les concentrations en H₂O₂ dans l'eau de mer sont ainsi grandement corrélées à la quantité de matière organique dissoute, ainsi qu'à la quantité de rayonnements solaires.

Par ailleurs, une source secondaire d'H₂O₂ provient de sa diffusion à partir d'organismes marins. Issu du métabolisme, l'H₂O₂ libéré peut refléter une condition de stress ou une stratégie de protection. Chez certains organismes marins photosynthétiques comme des cyanobactéries, la saturation de la chaîne de transport d'électrons par une trop grande quantité d'oxygène ou une carence en fer (jouant un important rôle d'accepteur d'électrons) induit une surproduction d'H₂O₂ et donc son relargage vers le milieu marin grâce à son importante capacité de diffusion (Latifi et al., 2005). Par ailleurs, certains organismes utilisent l'H₂O₂

comme un métabolite secondaire de défense contre les prédateurs ou les pathogènes (McDowell et al., 2014). Chez le corail *Stylophora pistillata*, il a été par exemple montré qu'une libération d' H_2O_2 se produit à la suite de stimuli chimiques et physiques lors de la prédation, et que de rapides augmentations de concentration d' H_2O_2 pouvant atteindre plus de $60\mu\text{M}$ peuvent être mesurées à la surface du polype (Armoza-Zvuloni et al., 2016; Ousley et al., 2022).

3.1.2.2 Une production intrinsèque d' H_2O_2 : les symbioses photosynthétiques

Dans le cadre des symbioses photosynthétiques, la relation trophique entre les deux partenaires repose sur l'activité photosynthétique du symbiote, ce qui impose aux deux partenaires de subir les contraintes de conditions hyperoxiques et donc pro-oxydantes.

C'est le cas de la symbiose Cnidaires-Dinoflagellés, où la production de dioxygène par le symbiote pendant les périodes lumineuses conduit à de grandes variations de la quantité d'oxygène à l'intérieur des cellules de l'hôte animal, allant d'une hypoxie la nuit ($\sim 1\%$ pO_2) jusqu'à un état hyperoxique la journée (60% pO_2) (Shashar et al., 1993; Richier et al., 2003). En parallèle à cette hyperoxie diurne, Dykens et al. (1992) ont mesuré une production de ERO au sein des tissus du Cnidaire. Parmi les ERO identifiées, l' H_2O_2 s'est révélé être l'un des sous-produits de la photosynthèse des zooxanthelles (Suggett et al., 2008; Armoza-Zvuloni and Shaked, 2014; Ousley et al., 2022). Par ses propriétés apolaires, l' H_2O_2 diffuse à travers les membranes cellulaires et peut alors atteindre les cellules de l'hôte animal, les exposant à d'importantes conditions pro-oxydantes de façon intrinsèque. Par ailleurs, une surproduction d' H_2O_2 est d'ailleurs montrée chez des zooxanthelles exposées à des conditions de stress de température ou de lumière (Roberty et al., 2015; Dimond et al., 2017).

3.1.2.3 L'effet de l' H_2O_2 sur les organismes marins

En raison de son temps de résidence relativement long dans le milieu aquatique (jusqu'à 10 jours), l' H_2O_2 est l'une des ERO les plus accessibles à mesurer *in situ* et est souvent utilisé comme indicateur de la présence d'autres ERO (Morris et al., 2022). Les effets répertoriés de l' H_2O_2 sur les organismes marins varient selon les espèces et les concentrations utilisées (Tableau 3.1). L' H_2O_2 peut ainsi modifier la composition en pigments ou induire de la mort cellulaire chez des microalgues (Darehshouri et al., 2008; Hussain et al., 2019), ou affecter le métabolisme respiratoire du mollusque *Nacella concinna* (Abele et al., 1998). Chez les Cnidaires en particulier, plusieurs études ont montré des effets de l' H_2O_2 sur des coraux ou des anémones de mer, illustrant des impacts sur la reproduction (Ross et al., 2017), le

métabolisme (Higuchi et al., 2009a, 2009b, 2012), ou encore sur la capacité de régénération, et pouvant même conduire à la mort des individus (Darehshouri et al., 2008; Vavilala et al., 2015; Friedman et al., 2018). La tolérance au stress oxydant induit par l' H_2O_2 a été étudiée également chez l'hydre, où il a été montré une diminution du bourgeonnement après des traitements non létaux à l' H_2O_2 ($200\mu\text{M}$ d' H_2O_2 pendant 2 jours) et une modification de la résistance en fonction de la nutrition des individus (Tökölyi et al., 2014). L'effet paradoxal de l' H_2O_2 se révèle également chez ce modèle où la mise en place de la régénération, après blessure, nécessite une production d' H_2O_2 (Haval et al., 2020).

Tableau 3.1 – Effets de traitements à l'H₂O₂ sur différentes espèces animales et végétales marines.

Espèce ciblée	Condition testée	Effets observés	Référence
Coraux : - <i>Porites astreoides</i> - <i>Favia fragum</i> - <i>Acropora palmata</i> - <i>Orbicella franksi</i>	0, 10, 100, 1000µM d'H ₂ O ₂	- Réduction de la métamorphose des larves et modifications de la colonisation (accélération ou réduction selon les espèces) - Inhibition de la fertilisation des gamètes	Ross et al., 2017
Corail : - <i>Galaxea fascicularis</i>	0, 0.3, 3.0µM H ₂ O ₂	- Diminution du taux de production primaire - Taux de calcification et de respiration impactés	Higuchi et al., 2009a
Corail : - <i>Galaxea fascicularis</i>	0, 0.3, 3.0µM H ₂ O ₂	- Diminution de la quantité de zooxanthelles - Augmentation de l'activité de la catalase	Higuchi et al., 2012
Corail : - <i>Goniastrea aspera</i>	0, 0.3, 3.0µM H ₂ O ₂	- Diminution de la photosynthèse et de la calcification	Higuchi et al., 2009b
Anémone de mer : - <i>Nematostella vectensis</i>	163µM H ₂ O ₂	- Diminution du nombre de tentacules - Impact sur le taux de régénération (diffère selon la lignée clonale)	Friedman et al., 2018
Mollusque : - <i>Nacella concinna</i>	3 – 5µM H ₂ O ₂	- Diminution de la consommation d'oxygène - Dommages au lysosome	Abele et al., 1998

Algue verte : - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	2 – 588µM H ₂ O ₂	- Diminution de la photosynthèse - Diminution de la croissance	Drábková et al., 2007
Diatomée : - <i>Navicula seminulum</i>			
Cyanobactérie : - <i>Microcystis aeruginosa</i>			
Microalgue : - <i>Micrasterias denticulata</i>	250, 500µM H ₂ O ₂	- Induction de mort cellulaire	Darehshouri et al., 2008
Microalgue (dinoflagellé) : - <i>Lingulodinium polyedrum</i>	0 – 900µM H ₂ O ₂	- Formation de cystes et diminution du niveau de peroxydation des lipides - Diminution de l'activité de la superoxyde dismutase mais augmentation de l'activité de l'ascorbate peroxydase	Ganini et al., 2013
Microalgue : - <i>Synechococcus aeruginosus</i>	1 – 25mM H ₂ O ₂	- Effet sur la composition en pigments	Hussain et al., 2019
Microalgue : - <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2 – 50mM H ₂ O ₂	- Induction de mort cellulaire - Augmentation de l'activité de la SOD et de la CAT et de la Caspase-3 - Up-régulation de gènes codant pour la Mn-SOD, la CAT et l'APX	Vavilala et al., 2015

3.1.3 Objectifs des travaux

Au regard de l'environnement pro-oxydant dans lequel évoluent les cellules des Cnidaires symbiotiques, nous nous sommes intéressés aux capacités de résistance de l'holobionte (à savoir de l'organisme symbiotique entier, comprenant l'animal et son symbiote) aux ERO. Pour cela nous avons choisi de travailler sur des conditions pro-oxydantes induites par un traitement à l' H_2O_2 . En effet, sa présence naturelle dans l'eau de mer, sa production diurne par les symbiotes et ses propriétés de diffusion ont font un candidat pertinent pour étudier l'étendue de la sensibilité de l'hôte Cnidaire à cette ERO. L'objectif de ce chapitre a donc été de caractériser la réponse à des conditions pro-oxydantes chez l'anémone de mer *A. viridis*, et ce à différentes échelles allant de l'holobionte jusqu'à l'échelle cellulaire. Nous avons ainsi testé l'hypothèse selon laquelle la capacité de résistance aux conditions pro-oxydantes chez cet animal aurait une origine intrinsèque et ne dépendrait pas de la présence du symbiote. Cette approche comparative et à l'échelle cellulaire, innovante chez les Cnidaires, a permis d'élucider l'impact de l' H_2O_2 dans l'équilibre redox de l'holobionte et des cellules animales en culture ainsi que dans la rupture de la symbiose.

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue en 2022 dans *Frontiers in Physiology* (Cotinat et al. 2022). La démarche expérimentale et les résultats sont résumés ci-dessous en complément de l'article présenté dans son intégralité à la fin de ce chapitre.

3.2 Démarche expérimentale

Pour répondre à l'objectif de ce chapitre, nous avons comparé la résistance à un stress pro-oxydant de l'anémone de mer *A. viridis*, *in vivo* dans son état symbiotique ainsi qu'*in vitro* via l'utilisation des primo-cultures du gastroderme obtenues au laboratoire. Chez les organismes entiers symbiotiques, la taille des tentacules des spécimens utilisés a permis de prélever facilement d'importantes quantités de biomasse et de séparer mécaniquement les différents tissus qui le composent. Nous avons ainsi pu effectuer des analyses ciblées et comparatives sur le gastroderme, l'épiderme ou les zooxanthelles (*in hospite*) des organismes symbiotiques ainsi que sur des primo-cultures de gastroderme (Figure 3.2).

Les conditions pro-oxydantes ont été induites par l'ajout de H_2O_2 dans des aquariums expérimentaux contenant des individus symbiotiques ou dans le milieu de culture de cellules

cultivées *in vitro*. Au regard de la littérature, les anémones en aquarium ont été soumises à deux concentrations d'H₂O₂ (200µM et 500µM), des dommages à l'ADN ayant été observés à partir de 200µM chez l'anémone de mer symbiotique *Anthopleura elegantissima* et une mortalité totale à partir de 180µM chez l'anémone de mer non symbiotique, *Nematostella vectensis* (Mitchelmore and Hyatt, 2004; Friedman et al., 2018). Par ailleurs, une gamme de 100µM à 1mM a été appliquée aux cellules en culture, incluant les mêmes traitements que pour l'animal entier. L'ensemble de ces traitements a été maintenu pendant 24 heures ou 7 jours. La Figure 3.3 illustre la démarche expérimentale utilisée.

À la suite des traitements, l'impact de l'H₂O₂ a été suivi par la mesure de l'état de santé : i) survie et densité en symbiotes des individus entiers ; ii) viabilité et croissance cellulaires des primo-cultures (Figure 3.3). En parallèle, plusieurs biomarqueurs de stress et de l'état redox ont été mesurés sur des extraits protéiques issus de chacune des conditions testées : i) la capacité antioxydante totale (ou TOSC pour « total oxidative scavenging capacity ») ; ii) le taux de carbonylation des protéines ; iii) le taux d'ubiquitination des protéines. Ainsi, ce sont non seulement les défenses antioxydantes (TOSC), mais également les dommages directs aux protéines (carbonylation) et les effets indirects liés à la dégradation des protéines endommagées (ubiquitination) qui sont mesurées.

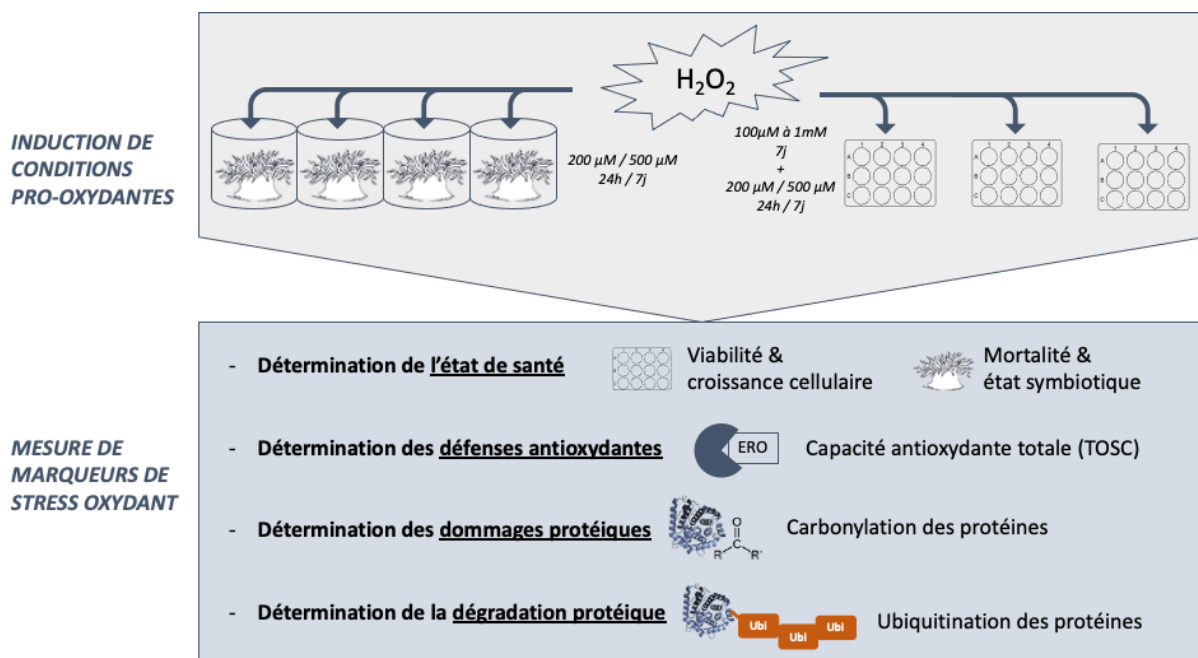


Figure 3.3. Résumé de la démarche expérimentale.

3.3 Résultats et discussion

Concernant les organismes entiers (holobionte), les deux concentrations d' H_2O_2 n'ont pas affecté la survie et les tissus animaux ont montré une grande résistance à ces deux traitements. De plus, aucun blanchissement n'a été observé, même après une exposition de 7 jours à $500\mu\text{M}$ d' H_2O_2 . La communauté scientifique ayant suggéré un rôle des ERO dans les processus menant au blanchissement chez les Cnidaires symbiotiques, nos résultats semblent disculper cette ERO spécifique d'y être impliquée. Cependant, de manière contre-intuitive, ce sont les zooxanthelles (symbiotes) qui se sont montrées les plus sensibles à l'exposition à l' H_2O_2 , avec une apparition de dommages protéiques oxydatifs, malgré une augmentation de la capacité antioxydante totale.

Les essais *in vitro* ont permis de mettre en évidence une grande capacité intrinsèque des cellules animales isolées à faire face aux conditions pro-oxydantes, bien que nous ayons observé des différences de tolérance entre les traitements à l' H_2O_2 , la concentration de $200\mu\text{M}$ d' H_2O_2 correspondant au seuil de tolérance des cellules animales, car aucun déséquilibre sur l'état redox n'a été observé et seule une diminution de la croissance cellulaire a été mesurée. À l'inverse, la concentration de $500\mu\text{M}$ d' H_2O_2 a induit un état de stress, caractérisé par une diminution de la viabilité cellulaire dès 1 jour et un arrêt drastique de la croissance cellulaire après 7 jours, conduisant à une capacité de résilience incomplète après le traitement.

La haute capacité de résistance mise en évidence dans cette étude peut s'expliquer par l'important arsenal enzymatique anti-oxydant des Cnidaires symbiotiques, comprenant des glutathion peroxydases, des superoxyde dismutases ou encore des catalases (Hawkrige et al., 2000), toutes jouant un rôle dans la détoxification des différentes ERO. L'étendue et l'efficacité de cet arsenal pourraient être issues de mécanismes d'adaptation liés à la vie en symbiose. Par exemple chez l'anémone de mer symbiotique, *Anthopleura elegantissima*, il a été observé une activité plus importante de ses superoxydes dismutases (SOD), enzymes participant à l'élimination de l'anion superoxyde (O_2^-), que chez les individus non symbiotiques (Dykens and Shick, 1984). Par ailleurs, le nombre d'isoformes différentes de SOD est plus important chez l'anémone de mer symbiotique *A. viridis* (sept isoformes) que chez l'anémone de mer non symbiotique *Actinaria schmidti* qui n'en possède que trois (Richier et al., 2003; Furla et al., 2005). De plus, les enzymes catalase et glutathion peroxydase, toutes deux impliquées dans la dégradation de l' H_2O_2 au sein des cellules, sont représentées par une large variété d'isoformes chez *A. viridis* (Merle et al., 2007; Pey et al., 2017). Ces observations suggèrent que les

organismes symbiotiques auraient développé des mécanismes d'adaptation au stress oxydant plus importants que les organismes non symbiotiques (Richier et al., 2005).

Par ailleurs, les voies de défenses non enzymatiques impliquées sont quant à elles encore peu étudiées, et souvent résumées à la présence de vitamine C (acide ascorbique) ou E (α -tocophérol) (Regoli and Giuliani, 2014). Les Cnidaires représentent une importante source de molécules actives et de métabolites secondaires aux rôles très variés, allant d'actions antimicrobiennes à des propriétés anticancéreuses (Carroll et al., 2019; Laguionie-Marchais et al., 2022). On peut ainsi émettre l'hypothèse que des métabolites secondaires ayant un rôle antioxydant puissent aussi être mis en jeu dans la réponse de ces organismes. Ces potentielles molécules d'intérêt pourraient être identifiées : (i) d'une part par le biais d'analyses métabolomiques non ciblées par une comparaison du profilage métabolomique d'extraits d'*A. viridis* en condition de stress ou en condition contrôle, (ii) ou d'autre part par des approches ciblées, à partir de standards comme les acides aminés analogues de la mycosporine (Geraldès and Pinto, 2021), le glutathion, ou encore la nicotinamide (Hillyer et al., 2016).

L'utilisation de l'outil *in vitro* pour caractériser la résistance à une condition pro-oxydante à l'échelle cellulaire a permis de mettre en évidence les différentes stratégies mises en place en fonction des concentrations d' H_2O_2 utilisées (Figure 3.4). En effet, cette étude a mis en évidence une stratégie de défense après un traitement à $200\mu M$ d' H_2O_2 , caractérisée par une diminution de la croissance cellulaire, sans conséquence sur la viabilité, et associée à une capacité de résilience totale, suggérant une entrée en quiescence des cellules dans ces conditions. Cet état « dormant » caractérisé par un arrêt de croissance des cellules, qui sont toutefois capables de maintenir leur métabolisme et de reprendre par la suite leur cycle cellulaire (Clopton and Saltman, 1995; Stuart and Brown, 2006), peut effectivement correspondre à la mise en place d'une stratégie de défense de la cellule pour faire face à un stress.

Le traitement à $500\mu M$ d' H_2O_2 a révélé quant à lui les limites de la résistance des cellules du gastroderme en culture. En effet, ce traitement a induit un arrêt total de croissance cellulaire associé à une diminution importante de la viabilité. Ces effets drastiques peuvent être interprétés comme une stratégie de « sacrifice / suicide » au sein de la population afin d'éliminer les cellules qui sont les plus endommagées et de permettre ainsi la survie des cellules les plus résistantes (Davies, 2000). La mise en place de processus d'apoptose est l'un des mécanismes fréquemment observés lors de ces stratégies de suicide cellulaire.

De plus, des populations de cellules qui atteignent leur limite de résistance aux conditions pro-oxydantes, illustrée par exemple par un arrêt de croissance, pourraient par ailleurs s'engager vers un processus de sénescence cellulaire. Ce processus répondant à une théorie connue dans la communauté scientifique sous le nom de « théorie radicalaire du vieillissement » (Harman, 1956). Dans cette théorie, la dégénérescence liée à l'âge des organismes serait la conséquence d'une accumulation de dommages suite à des stress oxydants répétés au cours de la vie des individus. Les résultats observés, dans notre modèle d'étude, sur le taux de croissance cellulaire à la suite des traitements à l' H_2O_2 ouvrent des perspectives encourageantes vers la caractérisation des mécanismes de vieillissement cellulaire chez les Cnidaires. En effet, chez ces organismes, considérés comme présentant une sénescence « négligeable » (Finch, 1990, 2009), peu d'études au niveau cellulaire ont été menées pour comprendre les processus mis en jeu dans leur exceptionnelle longévité, voire immortalité.

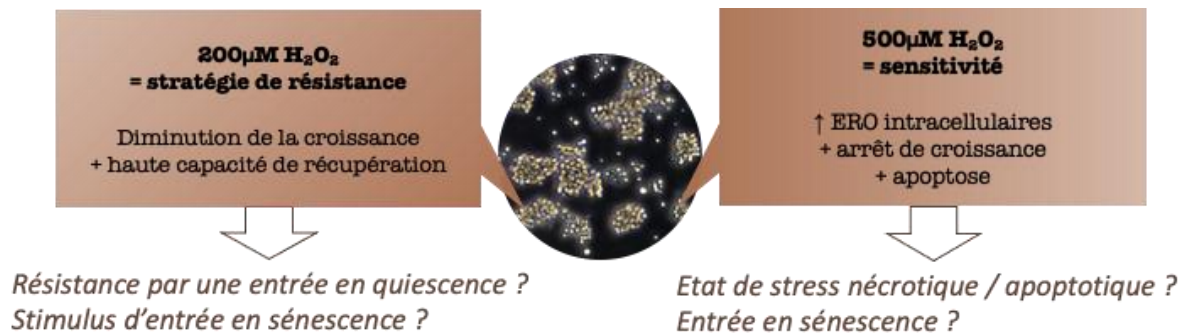


Figure 3.4. Les deux types de réponses rencontrées chez les cultures cellulaires d'*A. viridis* en fonction des traitements à l' H_2O_2 imposés.



Intrinsically High Capacity of Animal Cells From a Symbiotic Cnidarian to Deal With Pro-Oxidative Conditions

Pauline Cotinat^{1,2}, Clara Fricano^{1,2†}, Gaëlle Toullec^{1†}, Eric Röttinger^{1,2},
Stéphanie Barnay-Verdier^{1,2,3§} and Paola Furla^{1,2*§}

¹ CNRS, INSERM, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice, Université Côte d'Azur, Nice, France, ² Institut Fédératif de Recherche – Ressources Marines (MARRES), Université Côte d'Azur, Nice, France, ³ UFR 927, Sorbonne Université, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Davide Seveso,
University of Milano-Bicocca, Italy

Reviewed by:

Tingting Xiang,
University of North Carolina
at Charlotte, United States
John Robert Finnerty,
Boston University, United States

*Correspondence:

Paola Furla
paola.furla@unice.fr

† Present address:

Gaëlle Toullec,
Laboratory for Biological
Geochemistry, School of Architecture,
Civil and Environmental Engineering,
Ecole Polytechnique Fédérale
de Lausanne, Lausanne, Switzerland

‡ These authors have contributed
equally to this work

§ These authors share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Aquatic Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 20 November 2021

Accepted: 10 January 2022

Published: 10 February 2022

Citation:

Cotinat P, Fricano C, Toullec G,
Röttinger E, Barnay-Verdier S and
Furla P (2022) Intrinsically High
Capacity of Animal Cells From
a Symbiotic Cnidarian to Deal With
Pro-Oxidative Conditions.
Front. Physiol. 13:819111.
doi: 10.3389/fphys.2022.819111

The cnidarian-dinoflagellate symbiosis is a mutualistic intracellular association based on the photosynthetic activity of the endosymbiont. This relationship involves significant constraints and requires co-evolution processes, such as an extensive capacity of the holobiont to counteract pro-oxidative conditions induced by hyperoxia generated during photosynthesis. In this study, we analyzed the capacity of *Anemonia viridis* cells to deal with pro-oxidative conditions by *in vivo* and *in vitro* approaches. Whole specimens and animal primary cell cultures were submitted to 200 and 500 μM of H_2O_2 during 7 days. Then, we monitored global health parameters (symbiotic state, viability, and cell growth) and stress biomarkers (global antioxidant capacity, oxidative protein damages, and protein ubiquitination). In animal primary cell cultures, the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were also evaluated under H_2O_2 treatments. At the whole organism scale, both H_2O_2 concentrations didn't affect the survival and animal tissues exhibited a high resistance to H_2O_2 treatments. Moreover, no bleaching has been observed, even at high H_2O_2 concentration and after long exposure (7 days). Although, the community has suggested the role of ROS as the cause of bleaching, our results indicating the absence of bleaching under high H_2O_2 concentration may exculpate this specific ROS from being involved in the molecular processes inducing bleaching. However, counterintuitively, the symbiont compartment appeared sensitive to an H_2O_2 burst as it displayed oxidative protein damages, despite an enhancement of antioxidant capacity. The *in vitro* assays allowed highlighting an intrinsic high capacity of isolated animal cells to deal with pro-oxidative conditions, although we observed differences on tolerance between H_2O_2 treatments. The 200 μM H_2O_2 concentration appeared to correspond to the tolerance threshold of animal cells. Indeed, no disequilibrium on redox state was observed and only a cell growth decrease was measured. Contrarily, the 500 μM H_2O_2 concentration induced a stress state, characterized by a cell viability decrease from 1 day and a drastic cell growth arrest after 7 days leading to an uncomplete recovery after treatment. In conclusion, this study highlights the overall high capacity of cnidarian cells to cope with H_2O_2 and opens new perspective to investigate the molecular mechanisms involved in this peculiar resistance.

Keywords: *Anemonia viridis*, *in vitro* cell cultures, oxidative stress, hydrogen peroxide, cnidarian

INTRODUCTION

The evolutionary success of symbiotic cnidarians is based on a mutualism with dinoflagellates of the family Symbiodiniaceae. The symbionts, living inside the gastrodermal host cells, find a protected and stable environment and benefit from inorganic compounds provided by the animal cells (e.g., nitrogen, phosphorus, and sulfate) for their photosynthetic activity. Conversely, the animal host benefits from the organic compounds produced by algal photosynthesis (e.g., glucose and subsequently amino-acids, lipids) and largely transferred from the alga to the animal cell (Davy et al., 2012). This partner cooperation allows autotrophy to the animal host, leading to the colonization of oligotrophic waters by the symbiotic holobiont.

Concomitantly with those advantages, some constraints appear, especially the photosynthetic-dependent production of oxygen in the animal tissue. Such oxygen production causes diurnal hyperoxia condition in a symbiotic cnidarian, leading to a pro-oxidant state with reactive oxygen species (ROS) overproduction (Dykens et al., 1992; Richier et al., 2003; Saragosti et al., 2010; Shaked and Armoza-Zvuloni, 2013). Both partners have the pathways for cross-regulating the intracellular redox state, especially by ROS detoxication through a full suite of antioxidant enzymes to avoid cellular damages (Shick and Dykens, 1985; Richier et al., 2003, 2005; Plantivaux et al., 2004; Furla et al., 2005; Merle et al., 2007; Pey et al., 2017).

The study of ROS sensitivity in these organisms is also of environmental interest. Environmental perturbations (especially variations in temperature and UV radiation) induce oxidative stress that may lead in extreme cases to symbiosis breakdown, a process commonly called bleaching. Thus, under stressful oxidative conditions, Symbiodiniaceae can be eliminated from or exit the host through different cellular processes, like exocytosis, cell detachment, necrosis or apoptosis (see for review Suggett and Smith, 2020). Oxidative stress is known to induce specific cellular damages such as DNA modification (DNA adducts), lipid peroxidation and protein oxidation. In symbiotic cnidarians, several biochemical biomarkers (e.g., protein carbonylation, lipid peroxidation, and protein ubiquitination) were validated in studies following imbalances between ROS overproduction and antioxidant defenses during environmental stress, resulting in the disruption of the symbiotic association (e.g., Lesser and Farrell, 2004; Richier et al., 2006; Pey et al., 2011).

Among ROS, hydrogen peroxide (H₂O₂) is a relatively stable chemical formed from O₂ and is naturally present in the aquatic systems (Ndungu et al., 2019) with concentrations ranging from 0.3 μM in the water column to 4 μM in intertidal areas (Abele-Oeschger et al., 1997). It originates from marine biota (Hansel and Diaz, 2021) or is carried by the rain (Cooper et al., 1987). In all the organisms, intracellular H₂O₂ levels can reach tens of micromolar and is generated during normal cellular metabolism (i.e., photosynthesis and respiration) playing crucial roles in the intracellular signaling such as hypoxic signal transduction, cell differentiation and proliferation as well as for immune responses (Halliwell et al., 2000; Apel and Hirt,

2004; Giorgio et al., 2007). At high production levels, the H₂O₂ effect can be mitigated by several antioxidant defenses including peroxidases, catalases, thioredoxin reductase, peroxiredoxins, and glutathione S-transferases family enzymes which can lead to rapidly decreasing intracellular H₂O₂ concentrations. However, if cellular redox homeostasis cannot be maintained, H₂O₂ leads to reversible and irreversible oxidative modifications of proteins (e.g., carbonylation), enhancing protein ubiquitination and subsequent proteasome activation. In addition, cell cycle arrest or apoptosis could also be observed (see for review Fulda et al., 2010). Although the impact of H₂O₂ has been more widely investigated in mammalian cells and particularly in tumor cells (see for review Lennicke et al., 2015), studies have shown a similar impact in marine invertebrates, such as bivalves or polychaetes (Abele-Oeschger et al., 1994; McDonagh and Sheehan, 2006, 2007; Da Rosa et al., 2008; Friedman et al., 2018; Nguyen, 2020).

In the coral symbiont, H₂O₂ has been shown to be a by-product of photosynthesis processes (Suggett et al., 2008; Armoza-Zvuloni and Shaked, 2014). Thanks to its cell-permeable properties, H₂O₂ may diffuse from algal to animal host cells. Interestingly, some studies reported a release of H₂O₂ from non-stressed corals (Armoza-Zvuloni and Shaked, 2014) and an extracellular production by the dynamics of the superoxide anion (Saragosti et al., 2010). Therefore, due to their symbiosis lifestyle, animal host cells are daily exposed to H₂O₂, raising the question of their intrinsic potential to resist a massive influx of H₂O₂. Nevertheless, in excess, ROS (including H₂O₂) cause negative impact (mostly on protein and lipids) on the symbiont, leading to photosynthesis impairment, even if no bleaching phenomenon is induced (Higuchi et al., 2009; Roberty et al., 2015, 2016).

Anemonia viridis is a temperate sea anemone deeply studied as biological model of the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. Its enzymatic antioxidant properties, tissue distribution and regulation have been intensively investigated (Hawkridge et al., 2000; Richier et al., 2003, 2005; Plantivaux et al., 2004; Merle et al., 2007; Ganot et al., 2011; Pey et al., 2017). In addition, the sensitivity of *A. viridis* to thermal and UV stresses has been well described and some mechanisms of bleaching have been decrypted, including oxidative stress and apoptosis (Richier et al., 2006; Moya et al., 2012). Recently, we succeeded in the establishment of primary cell cultures from *A. viridis* exhibiting a gastrodermal signature (Barnay-Verdier et al., 2013; Ventura et al., 2018; Fricano et al., 2020). Thus, to test the hypothesis of an intrinsic resistance of animal cells to H₂O₂, we exposed *A. viridis* specimens and primary cell cultures at the same H₂O₂ concentrations (200 and 500 μM) during the same periods of time (24 h and 7 days), and compared the respective responses. For each treatment, we monitored global health parameters (symbiotic state, viability and cell growth) and stress biomarkers (global antioxidant capacity, oxidative protein damages, and protein ubiquitination). This allowed us to assess the cnidarian cell susceptibility to H₂O₂ exposure, highlighting the putative influence of the tissue organization or/and of the presence of symbionts.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material

Anemonia viridis Specimens

Specimens of *A. viridis* (Forsk. 1775) were collected (prefectural authorization n107; 28 February 2019) from “Plage des ondes,” Antibes, France, (43°33'17" N, 7°07'17.7" E), and maintained in a closed-circuit aquarium with artificial seawater (ASW, Prodbio Expert Reef Salt) at 36–38‰ at 18.0 ± 0.5°C with weekly water changes. A LED bar (450 nm—Deckey LED aquarium) provided light at a constant saturating irradiance of 100 μmol m⁻²s⁻¹ (measured using a special sensor QSL-100, Biospherical Instruments Inc., San Diego, CA, United States) on a 12 h:12 h (light:dark) photoperiod. Sea anemones were fed once a week with oysters.

Gastrodermal Primary Cell Cultures

Independent primary cell cultures were obtained from different *A. viridis* individuals and maintained as described in Ventura et al. (2018) and Fricano et al. (2020). Briefly, cells were cultured in the dark in a thermo-regulated incubator (POL-EKO-APARATURA, Poland) at 20.0 ± 0.5°C. The optimized culture medium was replaced weekly and consisted of 20% GMIM (Gibco, Carlsbad, CA, United States), 5% fetal bovine serum (FBS; PAA/GE Healthcare, Chicago, IL, United States), 1% kanamycin (100 μg/mL, Sigma-Aldrich), 1% amphotericin B (2.5 μg/mL; Interchim, Montluçon, France), 1% antibiotic antimycotic solution (Sigma-Aldrich), 1% L-glutamate (Sigma-Aldrich), and 71% of filtered ASW. The medium was adapted in respect to the Mediterranean Seawater characteristics (i.e., salinity 40 ppt and pH 8.1).

Hydrogen Peroxide Experimental Design

In vivo Experiments

Eight specimens of *A. viridis* were kept individually in 5 L tanks under controlled conditions. Six tentacles were cut from each specimen after 24 h and 7 days to assess the control condition. For 200 and 500 μM H₂O₂ treatments, a solution of H₂O₂ (Sigma-Aldrich) was added in each tank (200 μM for four of them and 500 μM for the four others). After 24 h and 7 days of treatment, six tentacles were cut from each specimen to assess the treatment condition. All tentacles from the different time points and conditions were longitudinally opened and the gastroderm (containing the dinoflagellates) was manually separated from the epiderm. A centrifugation at 1,000 × g for 5 min was used to separate the gastrodermal compartment from the dinoflagellates fraction (Richier et al., 2003).

In vitro Experiments

The cell response to H₂O₂ treatment was assessed on at least three independent primary cell cultures. Cells seeded in 12-well plates were exposed to H₂O₂ treatment (Sigma-Aldrich) starting with a dose-response experiment (between 0 and 2 mM) for 7 days. Another set of experiments was performed by incubating cells to 0 (control), 200 and 500 μM H₂O₂ for short term (1, 2, and 6 h) or long term (1 day or 7 days) exposure. We then conducted resilience experiments by reseeded the treated cells in their normal culture medium for 7 days to assess their recovery

capacity. Three wells, for each condition and time point, were used for all analyses.

Symbiotic State Assessment of *A. viridis* Specimens

The density of the endosymbionts from the genus *Philozoan* sp. (LaJeunesse et al., 2021) was assessed according to Zamoum and Furla (2012). Briefly, two tentacles were cut from each animal before and after H₂O₂ treatment in each condition (0, 200, or 500 μM H₂O₂) and then put in 2 M solution of NaOH and incubated at 37°C for 1 h to dissolve all animal tissue. To determine symbiont density, three replicate samples were counted using a modified Neubauer hemocytometer (Sigma-Aldrich). The remaining extract was used to determine the protein content from which we normalized symbiont density.

Protein Extractions

Gastrodermal cells from primary cultures and the animal's epidermal and gastrodermal tissues were all separately placed in 200 μL of lysis extraction buffer (HEPES 25 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, and PMSF 2 mM) and homogenized. Tissue samples were potterized, and both tissue and cell samples were sonicated and centrifuged to obtain the cytosoluble protein content. The total protein concentration of each sample was then assessed by a Bradford assay (Bradford reagent; SIGMA-ALDRICH), using 0–2 μg/ml bovine serum albumin solutions as standard curve.

Cell Viability and Growth Rate of Cultivated Cells

Cell viability was assessed by evaluating the membrane integrity using the Evans blue method. Therefore, viable cells (unstained) and dead cells (stained) were identified and counted on a Neubauer improved hemocytometer (Sigma-Aldrich) using an optic microscope (Zeiss Axio Imager Z1). The cell viability was defined as the percentage of viable cells relative to total cells (i.e., viable and dead cells). Cell growth rate was assessed every week using the cells counts with Evans blue method, as previously described in Ventura et al. (2018) and Fricano et al. (2020). The following formula was then used to calculate the weekly growth rate:

$$\text{Growth rate} = \frac{(\text{Viable cells (d + 7)} - \text{Viable cells (d)})}{\text{Viable cells (d)}} \text{ d = day}$$

Total Oxidative Scavenging Capacity Assay

The oxygen radical scavenging activities of protein samples were determined using fluorometric assay according to Naguib (2000). Protein samples are incubated with phosphate buffer (75 mM pH 7.5), in presence of 180 nM 6-carboxyfluorescein as fluorescent probe and 36 mM AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride] as the peroxy radical generator. In the assay, Trolox [6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid] is used as antioxidant calibrator. Fluorescence recordings were performed in black microplates (96-wells Greiner Bio-One),

and fluorescence decay was measured by spectrofluorometer (Safas, Monaco) every minute for a total duration of 1 h at an excitation/emission wavelength of 520/495 nm. Relative antioxidant activities of protein samples (tested in duplicate) were measured by comparison with Trolox standard. Results were expressed in Trolox equivalents and represented in the figures as a ratio to the control condition.

Protein Carbonylation Analysis

Carbonyl content of the cytosolic extractions was measured using an ELISA assay and spectrophotometry, according to Buss et al. (1997). Protein derivatization was done by adding a dinitrophenylhydrazine (DNP) solution (10 mM in 6 M guanidine hydrochloride, 0.5 M potassium phosphate buffer) to the protein samples. The ELISA assay used anti-DNP antibody produced in rabbit (1:500; Sigma-Aldrich) and anti-rabbit Ig (1:2000; Bio-Rad). 0–100% reduced bovine serum albumin (BSA) were used as standard curve. Carbonyl content of protein samples was expressed in nanomoles per milligram of protein and was then represented in the figures as a ratio to the control condition.

Ubiquitin Conjugates Dot-Blot Analysis

Ubiquitinated proteins were assayed, according to Haas and Bright (1985), by dot-blotting 3 µg of protein samples fixed to a nitrocellulose membrane, which was incubated with primary antibody (1:1000; Mono- and polyubiquitinated conjugates recombinant monoclonal antibody; Enzo Life Sciences). The membrane was next incubated with the secondary antibody (1:5000; anti-mouse antibody; Sigma-Aldrich). After chemiluminescence revelation (ECL), levels of spot density were measured using image analysis on GeneTools (SynGene). Levels of ubiquitinated proteins were obtained after normalization by spot density measured after amido black solution staining. Results were represented in the figures as a ratio to the control condition.

Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species

Intracellular ROS were detected in cultivated cells treated or not with H₂O₂ using a sensitive fluorescent probe that penetrates the cell and, when oxidized by intracellular free radicals, binds to DNA, emitting a more intense green fluorescence (CellROX™ Green Reagent, Invitrogen). We followed the manufacturer's instructions. Briefly, 10 µL of a 500 µM solution of CellROX™ Green were added to each treated well during 30 min at room temperature in the dark. After rinsing, cells were resuspended in 200 µL of PBS 0.6 M. Samples were then analyzed by flow cytometry (CytoFLEX LX, Beckman Coulter), excited at 488 nm and detected at 515–530 nm. For data analysis, we selected the green-fluorescent cells (CellROX-positive cells) within the population of interest. The population of interest corresponds to the cell population from which the analysis has been conducted after hierarchical exclusion of debris and doublets. For each experiment, controls (i.e., untreated cells) allowed to evaluate the basal intracellular ROS level in the cell cultures.

Statistical Analysis

For all cellular and biochemical markers evaluated in this study, the effect of the different treatments was analyzed with a two-way ANOVA test or Kruskal–Wallis test followed by, respectively, a Tukey's or Dunn *post hoc*, depending on the homoscedasticity of the data set. All experiments, i.e., *in vivo* and *in vitro*, were conducted on at least three independent biological replicates.

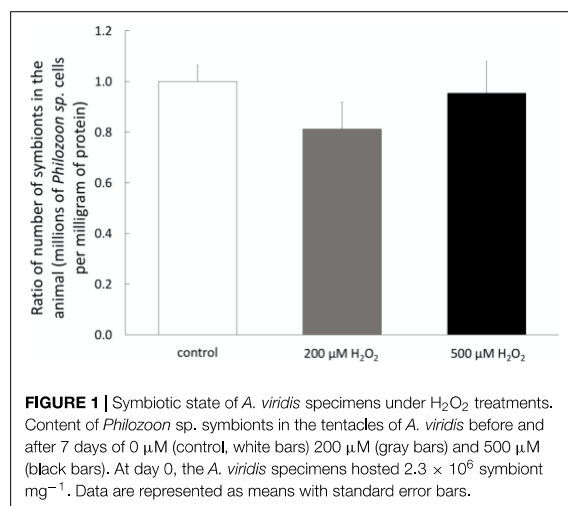
RESULTS

Hydrogen Peroxide Effects on *A. viridis* Specimens

To determine the susceptibility of *A. viridis* specimen to H₂O₂, we monitored the sign of bleaching, tissue necrosis and potential mortality during 7 days of exposure. No sign of tissue necrosis or mortality of the *A. viridis* specimens have been observed during H₂O₂ exposure. In addition, no differences in the symbiotic state have been measured since the quantity of symbionts, *Philozoan* sp. genus, per mg of protein remained the same after 7 days of treatment with both H₂O₂ concentrations (Figure 1). In addition, the sea anemones were also monitored several weeks after the treatment, and no signs of bleaching or disease were observed (data not shown).

Hydrogen Peroxide Effects on Stress Biomarkers of *A. viridis* Tissues Under Treatments

To analyze the impact of H₂O₂ at the tissue level, we assessed three biochemical stress markers (TOSC, carbonylation, and ubiquitination) known to be associated with oxidative stress conditions, in the three tissue compartments (epiderm, gastroderm, and symbiont) separately. In the epiderm, we only observed a slight but significant decrease of TOSC after 7 days of 200 µM H₂O₂ (Figures 2A–C). It is noteworthy



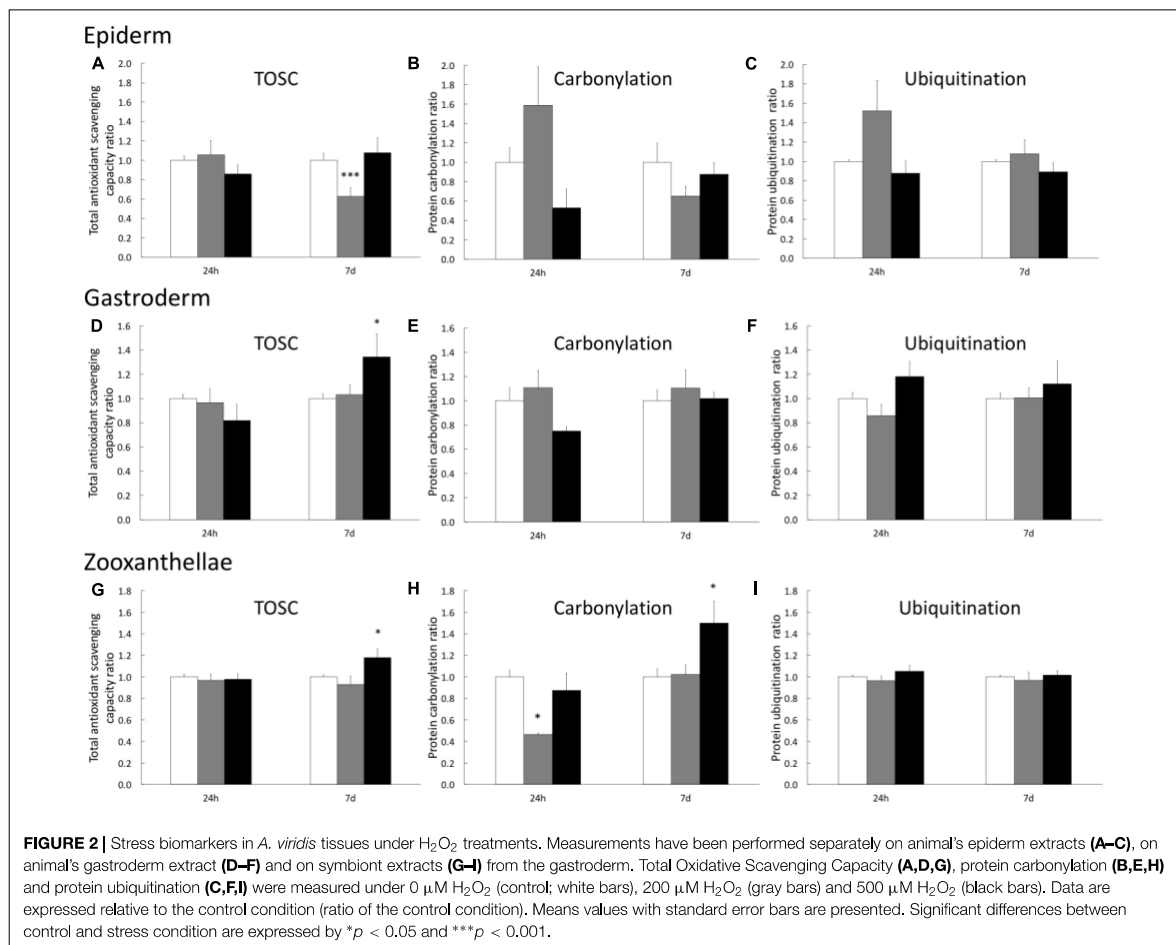


FIGURE 2 | Stress biomarkers in *A. viridis* tissues under H₂O₂ treatments. Measurements have been performed separately on animal's epiderm extracts (A–C), on animal's gastroderm extract (D–F) and on symbiont extracts (G–I) from the gastroderm. Total Oxidative Scavenging Capacity (A,D,G), protein carbonylation (B,E,H) and protein ubiquitination (C,F,I) were measured under 0 μM H₂O₂ (control; white bars), 200 μM H₂O₂ (gray bars) and 500 μM H₂O₂ (black bars). Data are expressed relative to the control condition (ratio of the control condition). Means values with standard error bars are presented. Significant differences between control and stress condition are expressed by **p* < 0.05 and ****p* < 0.001.

that after 1 day of 200 μM H₂O₂, we observed a trend of increasing protein damages (carbonylation and ubiquitination), which totally disappeared after 7 days.

In the gastrodermal compartment (i.e., animal tissue), we only observed an effect of H₂O₂ treatments after 7 days of 500 μM H₂O₂, inducing a 34% increase of TOSC (Figure 2D) which is sufficient to avoid protein damages (Figures 2E,F). Finally, the analysis on the symbiont fraction showed an increase of TOSC (17% higher than the control), associated with an increase of protein carbonylation level (50% higher than the control) after 7 days at 500 μM H₂O₂ (Figures 2G,H). No impact on symbiont protein ubiquitination has been measured (Figure 2I). Taken together these data suggest a higher capacity of cnidarian animal cells to cope with H₂O₂ and prevent protein damages compared to the algal symbiont.

Dose Response of Gastrodermal Cultivated Cells to Hydrogen Peroxide

To gain more insight in the capacity of the animal gastrodermal compartment to cope with ROS we first assessed the overall

toxicity of H₂O₂ using gastrodermal cell cultures from *A. viridis*. More precisely, we applied a range of H₂O₂ concentrations from 100 μM to 2 mM for 7 days and assessed cellular growth and viability (Figure 3). Without any treatment, the mean viability of cultivated cells was 93% ± 1.17 and the weekly growth rate was 18.7 ± 4.5. At 100 μM, no effect on viability and growth rate was observed. The first significant effects on both parameters appeared at 200 μM (10% viability and 42% growth rate decreases) and drastically exacerbated at 500 μM. With a concentration of 500 μM H₂O₂, the viability was decreased by 58% (EC₅₀ = 400.8 μM) and the growth was totally arrested. These results led us to direct further experiments toward the concentrations of 200 and 500 μM H₂O₂, where the response of the cells seemed pivotal and allowing the comparison with the *in vivo* experiments.

Hydrogen Peroxide Effects on Oxidative Status of Gastrodermal Cultivated Cells

To test whether H₂O₂ treatments induced an intracellular ROS increase, we stained cultivated cells with specific fluorescent

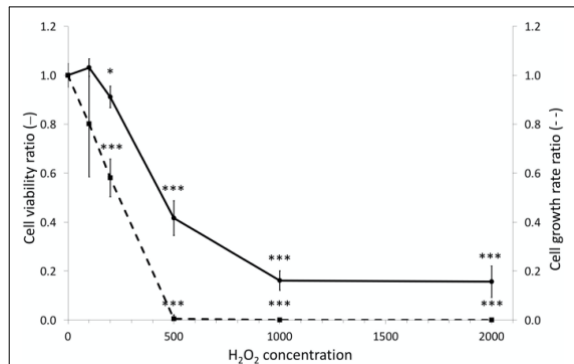


FIGURE 3 | Dose viability and growth responses of gastrodermal cultivated cells under H₂O₂ treatments. *A. viridis* gastrodermal cultivated cells were treated with H₂O₂ at different concentrations for 7 days before measuring cell viability (solid line) and cell growth rate (dashed line). Cell viability and growth rate are expressed relative to the control condition (ratio of the control condition). Means values with standard error bars are presented. Significant differences between control and stress condition are expressed by **p* < 0.05 and ****p* < 0.001.

probe (CellROXTM Green) allowing to quantify the positive cells for CellROXTM Green. The level of intracellular ROS was thus correlated to the percentage of positive cells for CellROXTM Green. Interestingly, this analysis revealed that although an increasing trend, there was no significant difference between the control (no treatment) and the cells treated with 200 μM H₂O₂, whatever the time point (Figure 4). However, there was a significant increase of ROS-positive cells (2.7 times higher in average, 11.2% vs. 4.1%) within the cells treated with 500 μM H₂O₂ from 1 h until 7 days of treatment.

Hydrogen Peroxide Effects on Cellular Parameters Under Treatments and Resilience Phase

We next wondered whether H₂O₂ exposures induce a stress at the cellular level by monitoring cellular parameters during treatments. In addition, we also evaluated the resilience capacity of treated cells by following the same parameters after a week-recovery phase. Firstly, the analysis of the cell viability, during 1–6 h of exposures, showed no impact of 200 or 500 μM H₂O₂ treatments (see Supplementary Figure 1). At 200 μM, there was only a light significant decrease in cell viability (9%) after 7 days of exposure, which was totally recovered after the resilience period (Figure 5A). At 500 μM, a 28% decrease was observed at 1 day that worsened after 7 days (58% of decrease, Figure 5A), confirming our results obtained during the dose-response assay. After a resilience period, only a partial recovery was observed (71% of the control condition), suggesting that not all the cells that survived may be able to compensate the H₂O₂-induced stress. In line with this hypothesis, the analysis of the cell population by flow-cytometry showed, after 7 days of 500 μM H₂O₂, a modification of cell-population pattern associated with a significant increase of autofluorescence (in average: 3.86% vs.

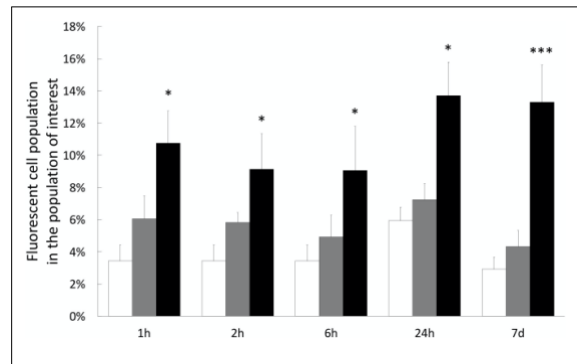


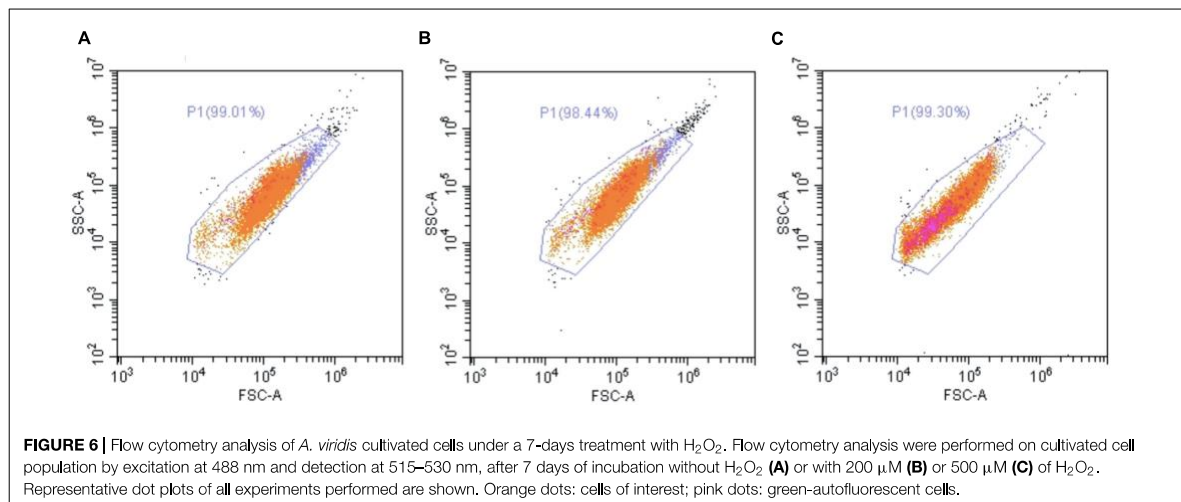
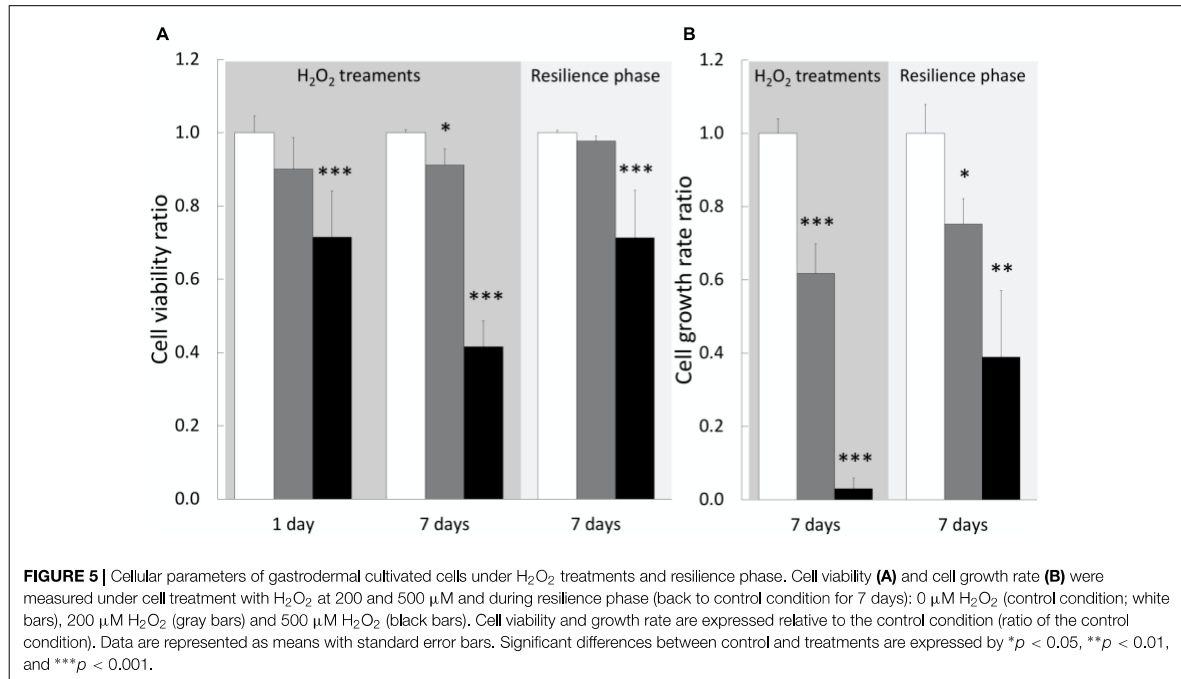
FIGURE 4 | Quantification of intracellular ROS in gastrodermal cultivated cells under H₂O₂ treatments. Intracellular content of ROS was measured by staining cells with CellROX Green Reagent after 1 h, 2 h, 6 h, 1 day, or 7 days with 0 μM H₂O₂ (control condition; white bars), 200 μM H₂O₂ (gray bars) or 500 μM H₂O₂ (black bars). Results represent the percentage of fluorescent cells (CellROX-positive cells), within the population of interest, quantified by flow cytometry. Data are represented as means with standard error bars. Significant differences between control and treatments are expressed by **p* < 0.05 and ****p* < 0.001.

0.53% for the control condition; *p*-value = 0.021; Figure 6), which could be reflecting cell apoptosis.

The growth rate measurements showed a significant impact of both treatments, 200 and 500 μM H₂O₂, with a dose-dependent response as we observed a decrease of 38 and 97%, respectively (Figure 5B). This H₂O₂ dose-dependent response was maintained after the resilience period with a partial growth rate recovery for both treatments (75 and 39% of control, respectively, for 200 and 500 μM H₂O₂). Taken together these data suggested that 200 μM H₂O₂ can be considered as the tolerance threshold of cultivated cnidarian cells while 500 μM H₂O₂ can represent a critical concentration inducing deleterious cellular injuries.

Hydrogen Peroxide Effects on Stress Biomarkers Under Treatments and Resilience Phase

To determine the cellular response induced by H₂O₂ treatments on cultivated cells we analyzed biochemical stress markers (TOSC, carbonylation, and ubiquitination). After 1–6 h of treatment, we observed no significant effect on any of the three biomarkers (Supplementary Figure 2). However, after 24 h of treatment TOSC was impaired at both 200 and 500 μM H₂O₂. A full recovery was observed after 7 days of treatment and maintained during the resilience phase (Figure 7A), suggesting an acclimation of the cells to the pro-oxidant conditions. No signs of protein damage (protein carbonylation and ubiquitination) were measured after 24 h. However, the 200 μM H₂O₂ treatment induced an increase of ubiquitinated proteins after 7 days (Figure 7C). This effect was totally abolished after the resilience period (Figure 7C). These data suggest that H₂O₂ exposures, even at 500 μM and after 7 days, didn't



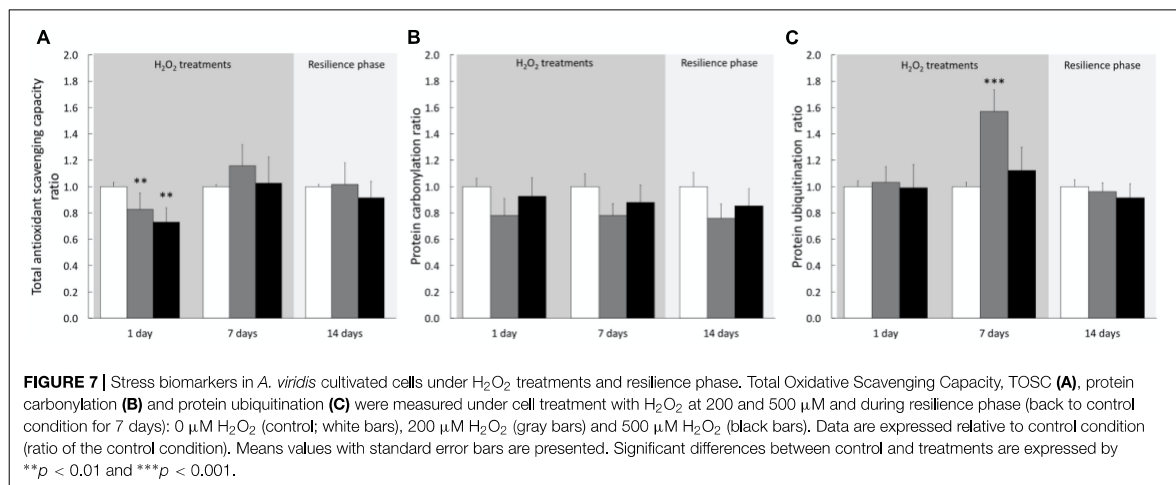
lead to persistent oxidative damages on proteins in cnidarian cultivated cells.

DISCUSSION

Extended Tolerance of Symbiotic Cnidarians to Hydrogen Peroxide

In this study, we used H₂O₂ to induce pro-oxidative condition and to investigate the stress response in the symbiotic sea

anemone *A. viridis* at both whole animal and cellular scales. The H₂O₂ concentrations used in the present study correspond to extremely high levels never measured in the seawater. However, rainwater can temporally induced increase of H₂O₂ to tens of micromolar (Ndungu et al., 2019; Jones and Lee, 2020). Benthic marine organisms from coastal areas are therefore regularly facing H₂O₂, that could lead to oxidative stress (Abele-Oeschger et al., 1997). Indeed, among ROS, H₂O₂ is the most abundant and long-lived in sea water and contrary to other ROS, H₂O₂



could rapidly diffuse across membranes (see for review Halliwell and Gutteridge, 2015).

In our study model, at both whole animal and cellular scales, 200 μM of H₂O₂ did not create a condition of stress, since very weak impact was observed in global health: no sign of mortality or bleaching on specimens (Figure 1), no intracellular ROS accumulation (Figure 4) and only very slight effect on viability after 7 days exposure in cell cultures (Figure 5). In addition, no effect was observed on any stress biomarkers we tested (Figures 2, 7). In cell cultures, we nevertheless measured a significant cellular growth arrest (Figure 5), reflecting a common feature of stress response and could be interpreted as an usual resistance mechanism (see for review Davies, 1999, 2000).

H₂O₂ usually represents a threat for most organisms. Indeed, in diverse mammalian cell lines, a cytotoxic effect of H₂O₂ could be observed from 60 μM (Coyle et al., 2006) with drastic and irreversible impacts (i.e., apoptosis and necrosis) induced at 400 μM H₂O₂ (Xiang et al., 2016). Some studies performed on marine invertebrates showed that micromolar concentrations of H₂O₂, ranging from 0.5 to 20 μM, could impact the metabolism of the whole animal. For example, a 40% drop in O₂ consumption was observed in the Polychaete *Nereis diversicolor* under 5 μM of H₂O₂ (Abele-Oeschger et al., 1994), while higher level of H₂O₂ (50 μM) can cause oxidative damages (i.e., lipid peroxidation), as observed in another Polychaete species, *Laenoereis acuta* (Da Rosa et al., 2008).

Contrasting with those results, our study highlighted an extended tolerance of symbiotic cnidarian facing even greater H₂O₂ concentrations. This resistance to H₂O₂ is, however, not a general cnidarian feature as it has been shown that concentrations exceeding 163 μM H₂O₂ caused mortality of the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis* (Friedman et al., 2018). Therefore, these results reinforced the hypothesis of the adaptation of symbiotic cnidarians to pro-oxidative conditions, due to their lifestyle with a photosynthetic symbiont. Indeed, it has been already highlighted that symbiotic cnidarians exhibited a wide diversity of biochemical antioxidant actors, compared

to non-symbiotic species (Furla et al., 2005). For instance, higher number of superoxide dismutase (SOD) isoforms was identified in the symbiotic cnidarian *A. viridis* compared to the non-symbiotic one *Actinia schmidtii*. In complement, another comparative analysis showed that the glutathione peroxidase (GPx) isoforms were less numerous in the non-symbiotic sea anemone *N. vectensis* than in the symbiotic sea anemone *A. viridis* (Pey et al., 2017). To confirm the hypothesis of the adaptative process, it will be required to extend the comparison of the antioxidant battalion between symbiotic and non-symbiotic cnidarians at multiple scales, even by including the non-enzymatic actors.

Importance of Host Cells to Hydrogen Peroxide Defense

In the present study, H₂O₂ exposure on whole organism affected mainly the endosymbiont, *Philozoan* sp. genus (Lajeunesse et al., 2021), rather than the animal host tissues. Although antioxidant defenses were stimulated after 7 days, an increase of protein carbonylation was measured in the symbiont fraction, whereas no increase was observed in the animal compartments (Figure 2). The susceptibility of free-living algae to H₂O₂ is well documented and highlighted an important heterogeneity in H₂O₂ response. For example, although the cyanobacterium *Synechococcus aeruginosus* tolerated until 2 mM H₂O₂, another cyanobacterium species, *Microcystis aeruginosa*, was affected by around 20 μM (EC50) and the diatoms *Navicula seminulum* by 200 μM (Drábková et al., 2007). Few studies have been performed on Symbiodiniaceae sensitivity to ROS and again they highlighted species-specific impacts on photosynthesis (Wietheger et al., 2015; Roberty et al., 2016). For example, cultured *Symbiodinium microadriaticum* strain showed high resistance to 1 mM H₂O₂, compared to *Fugacium kawagutii* showing drastic damage to photosystem function at the same H₂O₂ concentration (Wietheger et al., 2015). In addition, light exposure increased the photosynthesis impairment of cultured

Symbiodiniaceae from 30 min of >1 mM H₂O₂ exposure (Wietheger et al., 2015).

Protected inside the gastrodermal host cell, the endosymbiont would not have shown any signs of oxidative stress under H₂O₂ exposure, but the sensitivity assessed in our study did not confirm this assumption. This sensitivity to H₂O₂ could, however, be correlated to previous studies demonstrating that Symbiodiniaceae living *in hospite* present a reduction of the antioxidant enzymatic defenses (i.e., SOD, catalases or peroxidases) compared to the free-living condition (Lesser and Shick, 1989; Richier et al., 2005; Pey et al., 2017). Nevertheless, it has been shown that *in hospite*, Symbiodiniaceae harbor a higher surface volume of thylakoid lamellae (Lesser and Shick, 1990), increasing definitely the photosystem density and consequently the source of ROS associated with electron chain transports (Saragosti et al., 2010).

These data, in addition with measurements of H₂O₂ diffusion from the symbiont (Suggett et al., 2008; Armoza-Zyuloni and Shaked, 2014), support the conclusion that, in *in hospite*, the redox homeostasis of the symbiont is bolstered by the antioxidant defenses of the animal host cells. For example, in *A. viridis* it has been frequently observed that the animal compartment constitutes the major contributor to the holobiont antioxidant potential, with higher amount of antioxidant defenses compared to the symbiont fraction (Richier et al., 2003, 2005; Plantivaux et al., 2004; Merle et al., 2007; Pey et al., 2017). This agrees with studies performed on other symbiotic cnidarian species (Yakovleva et al., 2004; Levy et al., 2006; Krueger et al., 2015). By consequence, an experimental burst of H₂O₂ leads to more deleterious effects in the endosymbiont than in animal cells, illustrating their capacity to cope with H₂O₂.

No Bleaching Induction by Hydrogen Peroxide

Even at highest H₂O₂ exposure, no bleaching was observed neither during, nor after the exposure period in the treated *A. viridis* specimens (Figure 1). Interestingly, despite the protein damages observed in the symbiont, the equilibrium of the symbiosis was maintained. It has been largely documented in symbiotic cnidarians that stress-induced bleaching (e.g., thermal stress) is linked with the over-production of ROS by the endosymbiont, leading to significant oxidative damages in the host cells (see for review Suggett and Smith, 2020). Due to its permeable properties and its overproduction in several strains of Symbiodiniaceae exposed to thermal stress (Lesser, 1996; Suggett et al., 2008; Roberty et al., 2015), this ROS has then been suggested to be responsible of oxidative stress occurring in host cells during bleaching events. However, in this study, the absence of bleaching and of oxidative damages in host cells under H₂O₂ exposures can support the conclusion that H₂O₂ may not be the most important ROS associated with coral bleaching.

Limits of the Resistance

At cellular level, pro-oxidative condition can elicit a broad spectrum of responses from proliferation to growth arrest,

or senescence and cell death, depending on the cell capacity to overcome the stress by repairing or removing damaged molecules. The observed effect reflects the balance between intracellular pathways activated in response to the oxidative injury and can vary significantly with the concentration of the oxidant agent and the treatment exposure. In our *in vitro* study model, 500 μM of H₂O₂ induced a decrease of cell viability, particularly pronounced after 7 days of treatment and associated with a drastic growth arrest (Figure 5).

This response could be explained by a strategy of the “sacrifice” signaling pathway set up by the cells to eliminate the most damaged cell population (Davies, 2000). Indeed, a change in the cell population pattern was highlighted after 7 days at 500 μM H₂O₂ (Figure 6) and no protein damages were observed in these surviving cells (Figure 7). Nevertheless, the increase of autofluorescence measured in surviving cells after 7 days at 500 μM H₂O₂ (Figure 6) might be correlated with changes in metabolic activity of mitochondria that cells undergo during apoptosis, as it has been previously observed in mammalian cells (Levitt et al., 2006). In addition, the partial recovery of cell growth after the resilience period (Figure 5) suggested a non-reversible impact of 500 μM H₂O₂ injury on surviving cells, whose mechanisms should be deeply addressed in the future.

Finally, comparing the *in vitro* and the *in vivo* approaches, we highlighted that the sensitivity of *A. viridis* gastrodermal cells at 500 μM of H₂O₂ exposure is less pronounced in the gastrodermal tissue than in the isolated cultivated cells (Figures 2, 7). This is likely due to the contribution of the tissue organization thanks to host cell/cell communication, more efficient turnover of damaged cells and/or by a signaling pathway linked to the presence of the symbiont.

Moving forward thanks to the *in vitro* cnidarian cell culture, an ambitious perspective of this study will be to disentangle the mechanisms of H₂O₂ resistance of cnidarian cells and more specifically to assess the impact of other ROS (as the superoxide anion and the hydroxyl radical), thus contributing to decipher the adaptative tools that have evolved for a successful symbiosis stability and conversely to better understand the bleaching processes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PC did all the investigations (experimental work) and statistical analyses. CF contributed to the obtaining of cell cultures and their maintenance. CF and GT initialized the H₂O₂ experiments on cell cultures. PF and SB-V designed and supervised the research. PC, ER, SB-V, and PF wrote the manuscript. All authors read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by a doctoral fellowship (CIFRE) from SO.F.I.A Cosmétiques company and the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) to PC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly acknowledge Ludovic Cervera of the CYTOMED facility (IRCAN's Flow Cytometry Facility) that was supported by the FEDER, Ministère de l'Enseignement Supérieur, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Conseil Départemental 06, ITMO Cancer Aviesan, Cancéropole PACA, INCa, CNRS, and INSERM). The authors are also grateful to Aldine Amiel

from the ANTIAGE facility [IRCAN's Marine Invertebrate Facility for (Anti-)Aging Research] as well as Thamilla Zamoum, Brigitte Poderini, and Maxence Burtin, for the maintenance of the aquarium and the monitoring and feeding of *Anemonia viridis* specimens. Finally, the authors would like to thank particularly Thalassa Marine Research & Environmental Awareness (Patricia Ventura and Alexis Pey) for the sampling of the sea anemones.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.819111/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., and Theede, H. (1994). Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 106, 101–110. doi: 10.3354/meps106101
- Abele-Oeschger, D., Tüg, H., and Röttgers, R. (1997). Dynamics of UV-driven hydrogen peroxide formation on an intertidal sandflat. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1406–1415. doi: 10.4319/lo.1997.42.6.1406
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Armoza-Zvuloni, R., and Shaked, Y. (2014). Release of hydrogen peroxide and antioxidants by the coral *Symploca pistillata* to its external milieu. *Biogeosciences* 11, 4587–4598. doi: 10.5194/bg-11-4587-2014
- Barnay-Verdier, S., Dall'Osso, D., Joli, N., Olivré, J., Priouzeau, F., Zamoum, T., et al. (2013). Establishment of primary cell culture from the temperate symbiotic cnidarian, *Anemonia viridis*. *Cytotechnology* 65, 697–704. doi: 10.1007/s10616-013-9566-2
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., and Winterbourn, C. C. (1997). Protein Carbonyl Measurement by a Sensitive ELISA Method. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 361–366. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00104-4
- Cooper, W. J., Saltzman, E. S., and Zika, R. G. (1987). The contribution of rainwater to variability in surface ocean hydrogen peroxide. *J. Geophys. Res. Oceans* 92, 2970–2980. doi: 10.1029/JC092iC03p02970
- Coyle, C. H., Martinez, L. J., Coleman, M. C., Spitz, D. R., Weintraub, N. L., and Kader, K. N. (2006). Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 2206–2213. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.017
- Da Rosa, C. E., Bianchini, A., and Monserrat, J. M. (2008). Antioxidant responses of *Laeonereis acuta* (Polychaeta) after exposure to hydrogen peroxide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 117–121. doi: 10.1590/s0100-879x2008000200007
- Davies, K. J. (1999). The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: a New Paradigm for Oxidative Stress. *IUBMB Life* 48, 41–47. doi: 10.1080/713803463
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279–289. doi: 10.1080/713803728
- Davy, S. K., Allemand, D., and Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 229–261. doi: 10.1128/MMBR.05014-11
- Drábková, M., Admiraal, W., and Maršálek, B. (2007). Combined Exposure to Hydrogen Peroxide and Light Selective Effects on Cyanobacteria, Green Algae, and Diatoms. *Environ. Sci. Technol.* 41, 309–314. doi: 10.1021/es060746i
- Dykens, J. A., Shick, J. M., Benoit, C., Buettner, G. R., and Winston, G. W. (1992). Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. *J. Exp. Biol.* 168, 219–241. doi: 10.1242/jeb.168.1.219
- Fricano, C., Röttinger, E., Furla, P., and Barnay-Verdier, S. (2020). Cnidarian Cell Cryopreservation: a Powerful Tool for Cultivation and Functional Assays. *Cells* 9:2541. doi: 10.3390/cells9122541
- Friedman, L. E., Gilmore, T. D., and Finnerty, J. R. (2018). Intraspecific variation in oxidative stress tolerance in a model cnidarian: differences in peroxide sensitivity between and within populations of *Nematostella vectensis*. *PLoS One* 13:e0188265. doi: 10.1371/journal.pone.0188265
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., and Samali, A. (2010). Cellular Stress Responses: cell Survival and Cell Death. *Int. J. Cell Biol.* 2010:214074. doi: 10.1155/2010/214074
- Furla, P., Allemand, D., Shick, J. M., Ferrier-Pagès, C., Richier, S., Plantivaux, A., et al. (2005). The Symbiotic Anthozoan: a Physiological Chimera between Alga and Animal. *Integr. Comp. Biol.* 45, 595–604. doi: 10.1093/icb/45.4.595
- Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P., and Sabourault, C. (2011). Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association: differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *PLoS Genet.* 7:e1002187. doi: 10.1371/journal.pgen.1002187
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722–728. doi: 10.1038/nrm2240
- Haas, A. L., and Bright, P. M. (1985). The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates. *J. Biol. Chem.* 260, 12464–12473. doi: 10.1016/S0021-9258(17)38895-6
- Halliwell, B., Clement, M. V., and Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10–13. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02197-9
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th Edn. Oxford: Oxford University Press.
- Hansel, C. M., and Diaz, J. M. (2021). Production of Extracellular Reactive Oxygen Species by Marine Biota. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 13, 177–200. doi: 10.1146/annurev-marine-041320-102550
- Hawkridge, J. M., Pipe, R. K., and Brown, B. E. (2000). Localisation of antioxidant enzymes in the cnidarians *Anemonia viridis* and *Goniopora stokesi*. *Mar. Biol.* 137, 1–9. doi: 10.1007/s002270000324
- Higuchi, T., Fujimura, H., Ikota, H., Arakaki, T., and Oomori, T. (2009). The effects of hydrogen peroxide on metabolism in the coral *Goniastrea aspera*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 370, 48–55. doi: 10.1016/j.jembe.2008.11.013
- Jones, M. R., and Lee, K. (2020). Precipitation of hydrogen peroxide during winter storms and summer typhoons. *Sci. Total Environ.* 733:139377. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139377
- Krueger, T., Hawkins, T. D., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., et al. (2015). Differential coral bleaching—Contrasting the activity and response of enzymatic antioxidants in symbiotic partners under thermal stress. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 190, 15–25. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.08.012
- LaJeunesse, T. C., Wiedenmann, J., Casado-Amezúa, P., D'Ambrá, I., Turnham, K. E., Nitschke, M. R., et al. (2021). Revival of Philozoan Gedges for host-specialized dinoflagellates, 'zooxanthellae', in animals from coastal temperate

- zones of northern and southern hemispheres. *Eur. J. Phycol.* 0, 1–15. doi: 10.1080/09670262.2021.1914863
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., and Seliger, B. (2015). Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun. Signal* 13:39. doi: 10.1186/s12964-015-0118-6
- Lesser, M., and Farrell, J. (2004). Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs* 23, 367–377. doi: 10.1007/s00338-004-0392-z
- Lesser, M. P. (1996). Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis inymbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41, 271–283. doi: 10.4319/lo.1996.41.2.0271
- Lesser, M. P., and Shick, J. M. (1989). Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Mar. Biol.* 102, 243–255. doi: 10.1007/BF00428286
- Lesser, M. P., and Shick, J. M. (1990). Effects of visible and ultraviolet radiation on the ultrastructure of zooxanthellae (*Symbiodinium* sp.) in culture and in situ. *Cell Tissue Res.* 261, 501–508. doi: 10.1007/BF00313529
- Levitt, J. M., Baldwin, A., Papadakis, A., Puri, S., Xylas, J., Münger, K., et al. (2006). Intrinsic fluorescence and redox changes associated with apoptosis of primary human epithelial cells. *JBO* 11:064012. doi: 10.1117/1.2401149
- Levy, O., Achituv, Y., Yacobi, Y. Z., Stambler, N., and Dubinsky, Z. (2006). The impact of spectral composition and light periodicity on the activity of two antioxidant enzymes (SOD and CAT) in the coral *Favia favus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 328, 35–46. doi: 10.1016/j.jembe.2005.06.018
- McDonagh, B., and Sheehan, D. (2006). Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 79, 325–333. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.06.020
- McDonagh, B., and Sheehan, D. (2007). Effect of oxidative stress on protein thiols in the blue mussel *Mytilus edulis*: proteomic identification of target proteins. *Proteomics* 7, 3395–3403. doi: 10.1002/pmic.200700241
- Merle, P. L., Sabourault, C., Richier, S., Allemand, D., and Furla, P. (2007). Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 236–246. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.038
- Moya, A., Ganot, P., Furla, P., and 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. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05458.x
- Naguib, Y. M. A. (2000). A Fluorometric Method for Measurement of Oxygen Radical-Scavenging Activity of Water-Soluble Antioxidants. *Anal. Biochem.* 284, 93–98. doi: 10.1006/abio.2000.4691
- Ndungu, L. K., Steele, J. H., Hancock, T. L., Bartleson, R. D., Milbrandt, E. C., Parsons, M. L., et al. (2019). Hydrogen peroxide measurements in subtropical aquatic systems and their implications for cyanobacterial blooms. *Ecol. Eng.* 138, 444–453. doi: 10.1016/j.ecoleng.2019.07.011
- Nguyen, L. (2020). *The Effects of Photosymbiosis on Gene Expression in the Facultatively Symbiotic Coral *Astrangia poculata*, With a Focus on NF-Kappab Signaling and Antioxidant Enzymes*. Available Online at: <https://open.bu.edu/handle/2144/41678> [accessed Dec 13, 2021].
- Pey, A., Zamoum, T., Allemand, D., Furla, P., and Merle, P.-L. (2011). Depth-dependant thermotolerance of the symbiotic Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*: evidence from cellular stress markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 404, 73–78. doi: 10.1016/j.jembe.2011.05.007
- Pey, A., Zamoum, T., Christen, R., Merle, P.-L., and Furla, P. (2017). Characterization of glutathione peroxidase diversity in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Biochimie* 132, 94–101. doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.016
- Plantivaux, A., Furla, P., Zoccola, D., Garelo, G., Forcioli, D., Richier, S., et al. (2004). Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1170–1181. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.043
- Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P.-L., and Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *J. Exp. Biol.* 208, 277–285. doi: 10.1242/jeb.01368
- Richier, S., Merle, P.-L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F., and Allemand, D. (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1621, 84–91. doi: 10.1016/S0304-4165(03)00049-7
- Richier, S., Sabourault, C., Courtiade, J., Zucchini, N., Allemand, D., and Furla, P. (2006). Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *FEBS J.* 273, 4186–4198. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05414.x
- Roberty, S., Fransolet, D., Cardol, P., Plumier, J.-C., and Franck, F. (2015). Imbalance between oxygen photoreduction and antioxidant capacities in Symbiodinium cells exposed to combined heat and high light stress. *Coral Reefs* 34, 1063–1073. doi: 10.1007/s00338-015-1328-5
- Roberty, S., Furla, P., and Plumier, J.-C. (2016). Differential antioxidant response between two Symbiodinium species from contrasting environments. *Plant Cell Environ.* 39, 2713–2724. doi: 10.1111/pce.12825
- Saragosti, E., Tchernov, D., Katsir, A., and Shaked, Y. (2010). Extracellular Production and Degradation of Superoxide in the Coral *Stylophora pistillata* and Cultured Symbiodinium. *PLoS One* 5:e12508. doi: 10.1371/journal.pone.0012508
- Shaked, Y., and Armoza-Zvuloni, R. (2013). Dynamics of hydrogen peroxide in a coral reef: sources and sinks. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 118, 1793–1801. doi: 10.1002/2013JG002483
- Shick, J. M., and Dykens, J. A. (1985). Oxygen detoxification in algal-invertebrate symbioses from the Great Barrier Reef. *Oecologia* 66, 33–41. doi: 10.1007/BF00378549
- Suggett, D. J., and Smith, D. J. (2020). Coral bleaching patterns are the outcome of complex biological and environmental networking. *Glob. Chang. Biol.* 26, 68–79. doi: 10.1111/gcb.14871
- Suggett, D. J., Warner, M. E., Smith, D. J., Davey, P., Hennige, S., and Baker, N. R. (2008). Photosynthesis and Production of Hydrogen Peroxide by Symbiodinium (Pyrrhophyta) Phylotypes with Different Thermal Tolerances. *J. Phycol.* 44, 948–956. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x
- Ventura, P., Toullec, G., Fricano, C., Chapron, L., Meunier, V., Röttinger, E., et al. (2018). Cnidarian Primary Cell Culture as a Tool to Investigate the Effect of Thermal Stress at Cellular Level. *Mar. Biotechnol.* 20, 144–154. doi: 10.1007/s10126-017-9791-3
- Wietheger, A., Fisher, P. L., Gould, K. S., and Davy, S. K. (2015). Sensitivity to oxidative stress is not a definite predictor of thermal sensitivity in symbiotic dinoflagellates. *Mar. Biol.* 162, 2067–2077. doi: 10.1007/s00227-015-2736-3
- Xiang, J., Wan, C., Guo, R., and Guo, D. (2016). Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *Biomed. Res. Int.* 2016:7343965. doi: 10.1155/2016/7343965
- Yakovleva, I., Bhagooli, R., Takemura, A., and Hidaka, M. (2004). Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 721–730. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.08.016
- Zamoum, T., and Furla, P. (2012). Symbiodinium isolation by NaOH treatment. *J. Exp. Biol.* 215, 3875–3880. doi: 10.1242/jeb.074955

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Cotinat, Fricano, Toullec, Röttinger, Barnay-Verdier and Furla. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CHAPITRE 4. LE VIEILLISSEMENT CELLULAIRE CHEZ LE MODÈLE *ANEMONIA VIRIDIS*

4.1 Introduction

4.1.1 Vieillessement et longévité

Le vieillissement est un phénomène qui concerne la majorité des êtres vivants, se traduisant à l'échelle de l'individu par une diminution des capacités physiques ou physiologiques, telles qu'une baisse de la fertilité, ainsi qu'une augmentation du risque de maladies, conduisant finalement à la mort de l'individu (Jones et al., 2014).

En outre, le vieillissement s'observe à l'échelle cellulaire, où il s'illustre par des dysfonctionnements mitochondriaux, une instabilité génomique ou encore une perte de la protéostasie (Figure 4.1 ; López-Otín et al., 2013). L'accumulation de ces dérèglements induit une entrée en sénescence des cellules « vieillissantes », processus se caractérisant principalement par un **arrêt de la prolifération cellulaire**, des modifications morphologiques ou encore une altération de la lamina nucléaire (le réseau fibrillaire entourant l'ADN dans le noyau) (Roux and Bischof, 2019). Les lamines, protéines qui la composent, sont alors dégradées ce qui constitue l'un des marqueurs d'une sénescence précoce (Freund et al., 2012).

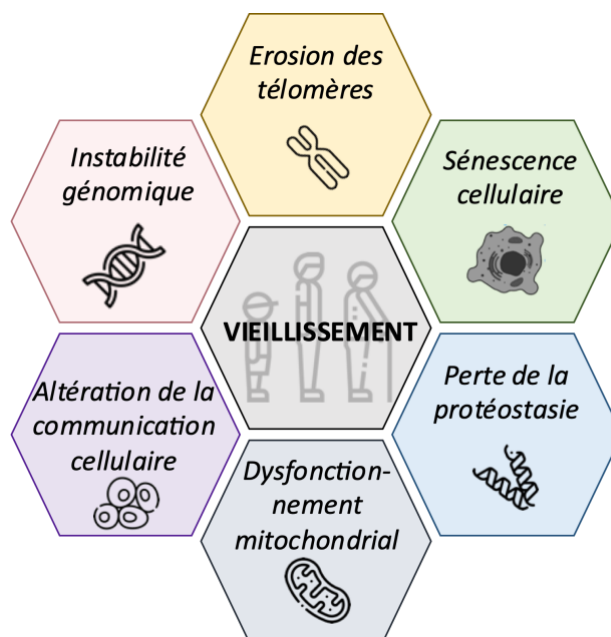


Figure 4.1. Exemples de marqueurs de vieillissement à l'échelle cellulaire (adapté depuis López-Otín et al., 2013)

De plus, une entrée en sénescence est marquée par une sortie du cycle cellulaire, à partir de laquelle plusieurs modifications cytomorphologiques et métaboliques vont se mettre en place (Figure 4.2). Des modifications morphologiques, telles qu'un aplatissement et un élargissement de la cellule et des modifications de la chromatine (i.e. création de foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF), perte de lamine B1) ainsi qu'une augmentation de l'activité de la β galactosidase lysosomiale sont associées à la phase précoce de la sénescence. Même si à cette étape on peut déjà voir une sécrétion de molécules pro-inflammatoires, c'est lors des phases de sénescence tardive qu'une inflammation chronique va se mettre en place et que les modifications morphologiques vont s'accroître.

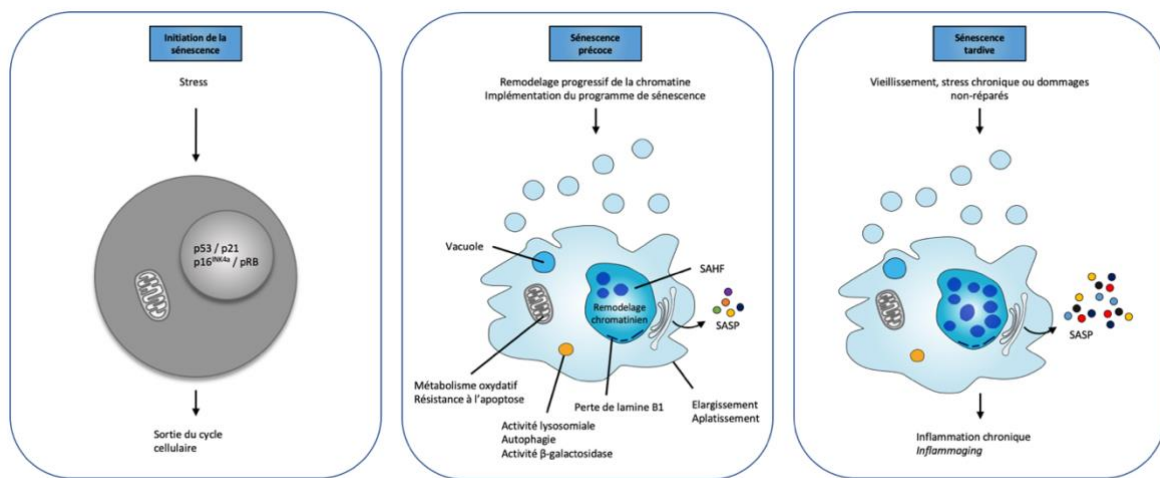


Figure 4.2. Caractéristiques phénotypiques des cellules sénescents (Roux and Bischof, 2019)

La sénescence, qui a été décrite pour la première fois dans les années 60 (Hayflick and Moorhead, 1961), est observée lors de la dégénérescence naturelle de cellules en culture après un nombre de réplifications ou un temps de culture donné, suggérant l'implication de facteurs intrinsèques. Cette cause naturelle d'entrée en sénescence, appelée alors « **sénescence répllicative** », provient d'un phénomène d'érosion télomérique, à savoir la perte progressive d'une partie de l'ADN à chaque multiplication cellulaire, et qui explique que la plupart des cellules ne peuvent se diviser indéfiniment (Gire, 2005).

D'autre part, l'entrée en sénescence cellulaire peut être la conséquence de stress extrinsèques (tels que des conditions pro-oxydantes, des rayons X, ou encore des drogues), induisant des dommages variés et accélérant alors le vieillissement naturel des cellules (Schmitt, 2007). On parle alors de « **sénescence inductible** ».

4.1.2 La théorie radicalaire du vieillissement

Comme développé précédemment dans le CHAPITRE 3, les cellules peuvent être soumises à des stress exogènes conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou espèces radicalaires, responsables de divers dommages aux constituants cellulaires. Ces dommages oxydatifs sont à l'origine de dysfonctionnements physiologiques et d'importantes lésions à l'ADN, mais sont également suspectés de s'accumuler dans l'organisme et d'induire l'entrée en sénescence des cellules impactées. Cette théorie, appelée la « théorie radicalaire du vieillissement », a été proposée dans les années 50 (Harman, 1956) et il a depuis été montré qu'une réduction des dommages oxydatifs peut effectivement mener à une augmentation de la durée de vie chez certains organismes en laboratoire (Labuschagne and Brenkman, 2013), illustrant le lien entre stress oxydant et longévité.

De plus, au cours du vieillissement, une augmentation de marqueurs spécifiques du stress oxydant peut être observée et est corrélée à un déficit en défenses antioxydantes, contribuant à appuyer le rôle du stress oxydant dans l'induction de sénescence (voir pour revue Barouki, 2006). En outre, il a été proposé qu'une meilleure capacité de résistance au stress oxydant d'un organisme ou d'une espèce puisse être un élément contribuant à une longévité plus importante (Johnson et al., 1996; Delattre et al., 2005). Comme illustré chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, où les individus à l'espérance de vie la plus longue présentaient une meilleure résistance aux ERO, y compris à l' H_2O_2 (Larsen, 1993), associée à un niveau plus élevé de défenses antioxydantes, telles qu'une plus forte activité des SOD (Vanfleteren, 1993). Par ailleurs, des individus dont la durée de vie a été expérimentalement rallongée en induisant des mutations sur des gènes impliqués dans le vieillissement (gérontogènes), présentent globalement une meilleure résistance au stress thermique ou aux UV, connus pour induire la production d'ERO (Johnson et al., 2001).

4.1.3 Le vieillissement chez les Cnidaires

Même si le vieillissement constitue un phénomène universel, certains organismes semblent échapper à cette constante. Les Cnidaires sont ainsi connus pour leur extrême longévité sans signe visible de vieillissement. On a par exemple estimé l'âge de certains coraux profonds à plus de 4200 ans (Roark et al., 2009) et des anémones de mer ont été maintenues en captivité pendant plus de 90 ans (Comfort, 1979). Il a également été montré que les marqueurs

de vieillissement, à savoir une chute de la fertilité associée à une augmentation de la mortalité avec l'âge des individus, ne sont pas observés chez l'hydre ou les gorgones (Figure 4.3 ; Jones et al., 2014).

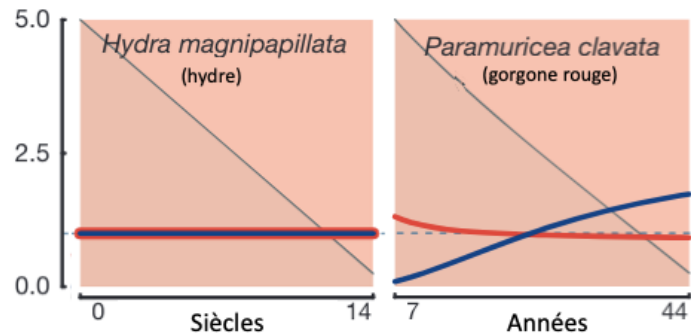


Figure 4.3. Trajectoires démographiques de deux espèces de Cnidaires. La mortalité relative (rouge) et fécondité (bleu) en fonction de l'âge sont mises à l'échelle par rapport à leur moyenne. Adapté depuis (Jones et al., 2014)

De plus, bien que les études restent limitées à l'hydre d'eau douce, cette longévité semble être liée à une absence de sénescence (Martínez, 1998) ou comme suggérée par Finch (1990, 2009) à une sénescence négligeable (« negligible senescence »). Ce terme a été proposé pour plus prudemment considérer que les marqueurs classiquement utilisés pour mettre en évidence l'entrée en sénescence chez des espèces modèles, tels que l'activité de la B-galactosidase lysosomale (Dimri et al., 1995) ou encore la perte de la lamine B1 au sein de la lamina nucléaire (Freund et al., 2012) ou le raccourcissement des extrémités télomériques n'avaient pas été appliqués aux Cnidaires, laissant en suspens la question de marqueurs adaptés à ces modèles.

Cependant, chez des souches d'hydre dont le vieillissement a été induit suite à un stress température froid (en perdant leur capacité de reproduction, Schenkelaars et al., 2018), Sun et al. (2020) ont observé par des analyses transcriptomiques l'activation de voies connues pour être impliquées dans la sénescence et le stress oxydant. De plus, des études menées au laboratoire chez le corail *Stylophora pistillata* soumis à une obscurité prolongée conduisant au blanchissement, ont mis en évidence un raccourcissement des télomères associé à une surexpression de gènes impliqués dans le stress oxydant (Rouan et al., 2022).

Enfin, il a souvent été suggéré que la longévité des Cnidaires serait étroitement liée à une autre de leurs caractéristiques remarquables, à savoir leur capacité de régénération largement conservée au cours de la vie de ces individus et qui leur offre la possibilité de reconstruire leur corps entier (Reddy et al., 2019; Röttinger, 2021). La présence de cellules

pluripotentes, ou cellules souches, tout au long de leur cycle de vie, jouerait un rôle important dans le maintien du renouvellement cellulaire nécessaire à leur capacité de régénération extrême (Schaible et al., 2014).

4.2 Objectifs des travaux et approche expérimentale

Les résultats des expériences menées dans le CHAPITRE 3 ont mis en évidence, dans les cellules en culture d'*A. viridis*, des capacités de résistance intrinsèques à des conditions pro-oxydantes, notamment au traitement à 200 μ M H₂O₂ et ce même après 7 jours. En effet, suite à ce traitement nous n'avons observé qu'un faible impact sur la viabilité, associé à une réduction de la croissance cellulaire, mais sans présence de dommage protéique oxydatif. Par ailleurs, la récupération complète des paramètres cellulaires après une période de résilience de 7 jours tend à suggérer la mise en place de mécanismes de défense suffisants pour répondre à ce traitement. Au contraire, le traitement à 500 μ M H₂O₂ induit un arrêt de croissance total associé à une réduction marquée de la viabilité, paramètres qui ne sont pas recouverts après une période de résilience de 7 jours. Ces résultats suggérant que ce traitement aurait des conséquences irréversibles sur l'homéostasie cellulaire.

L'objectif de ce chapitre a donc été de déterminer si l'arrêt de croissance induit par le traitement H₂O₂ pourrait être symptomatique d'une entrée des cellules en sénescence. Dans ce but, nous avons testé si l'utilisation d'un des marqueurs cellulaires de la sénescence (l'expression de la β -galactosidase lysosomale), permet dans notre modèle d'étude de visualiser des cellules en état de sénescence. Pour cela, nous avons suivi, dans un premier temps, le marquage de la β -galactosidase lysosomale pendant la phase de traitement pro-oxydant (200 et 500 μ M d'H₂O₂) et après une période de résilience de 56 jours (soit l'équivalent de 36 générations). Dans un deuxième temps nous avons tenté d'induire de la sénescence cellulaire par un traitement à 200 μ M d'H₂O₂ : long et continu (28 jours) ou répété (de deux semaines séparées par une période de résilience). Enfin, nous avons soumis les cellules à un traitement aux rayons X, traitement connu pour induire la sénescence chez d'autres modèles biologiques (Panganiban et al., 2013; Ji et al., 2015; Koike et al., 2021). La démarche expérimentale est illustrée dans la Figure 4.4.

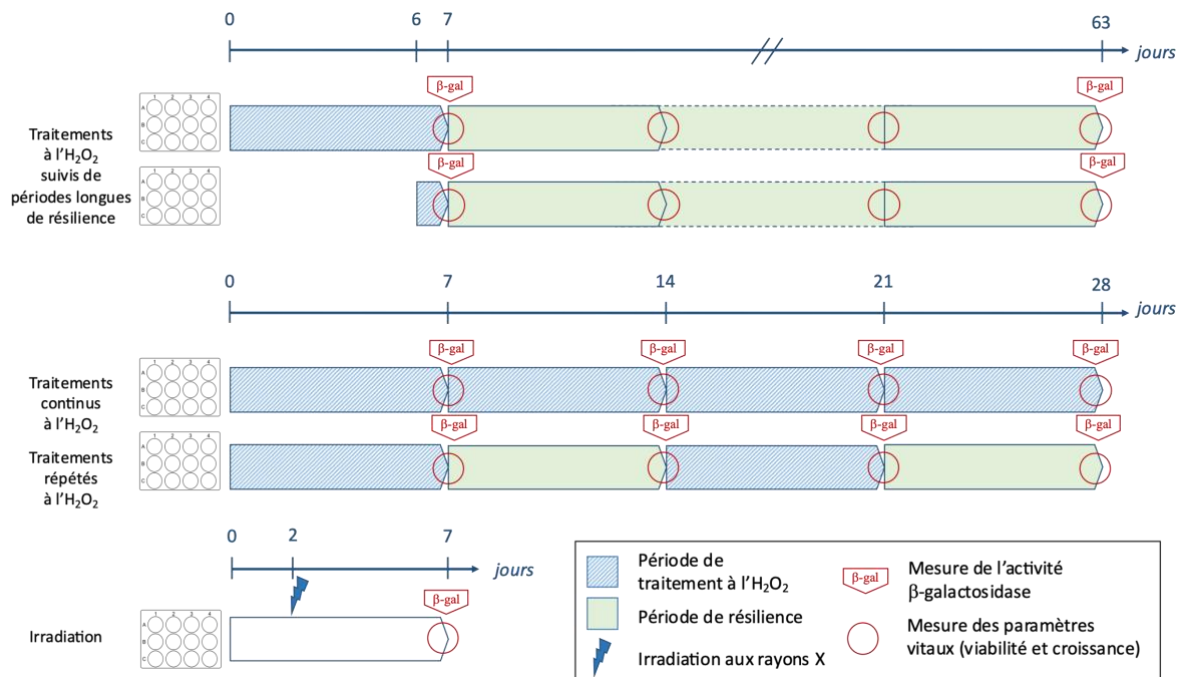


Figure 4.4. Démarche expérimentale menée dans ce chapitre.

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 Matériel biologique

Des cultures cellulaires primaires ont été obtenues à partir de différents individus d'*A. viridis* et maintenues comme décrit dans Ventura et al. (2018). Succinctement, les cellules ont été cultivées à l'obscurité dans un incubateur thermorégulé à $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Le maintien des cellules en culture est assuré par un passage hebdomadaire dans un milieu de culture optimisé pour respecter la composition de l'eau de mer méditerranéenne (à savoir une salinité de 40ppt et un pH de 8,1).

4.3.2 Traitements *in vitro* à l'H₂O₂

Les cellulesensemencées dans des plaques 12 puits ont été exposées à 0 (contrôle), 200 ou 500μM d'H₂O₂ pendant 1 ou 7 jours. Après traitement, les cellules ont été remises en culture dans un milieu sans H₂O₂ et par la suite maintenues en culture jusqu'à 56 jours après le traitement (avec un passage hebdomadaire). Une autre série d'expériences a été réalisée en exposant les cellules à 0 (contrôle) ou 200μM d'H₂O₂ soit : i) en continu pendant 28 jours, soit ii) une semaine sur deux pendant 28 jours. À la suite des différents traitements, les paramètres vitaux (viabilité et croissance cellulaires) et le marquage de la sénescence ont été mesurés. Tous

les traitements ont été réalisés sur au moins trois expériences indépendantes (c'est-à-dire sur au moins trois primo-cultures différentes).

4.3.3 Traitements aux rayons X

Des cellulesensemencées dans des plaques 12 puits ont été placées dans un irradiateur et traitées à une puissance de 7.9 Gy/min pour atteindre des valeurs finales d'irradiations de 10 à 50 Gy. Cinq jours après l'irradiation, les paramètres vitaux (viabilité et croissance cellulaires) et le marquage de la sénescence ont été mesurés. Tous les traitements ont été réalisés sur au moins trois expériences indépendantes (c'est-à-dire sur au moins trois primo-cultures différentes).

4.3.4 Mesure des paramètres vitaux cellulaires

Les paramètres vitaux des cultures ont été mesurés après les différents traitements selon la méthode décrite dans Ventura et al. (2018). Brièvement, la viabilité cellulaire a tout d'abord été évaluée par la méthode de l'Evans blue, permettant d'identifier les cellules viables (non colorées) et les cellules mortes (colorées) et de les compter sur un hémacytomètre (cellule de Neubauer modifiée). La viabilité a ainsi été définie comme le pourcentage de cellules viables par rapport aux cellules totales. Le taux de croissance a été calculé après un dénombrement via la formule suivante :

$$\text{Taux de croissance} = \frac{\text{Cellules viables (J+7)} - \text{Cellules viables J0}}{\text{Cellules viables J0}} \quad \text{où J : jour}$$

4.3.5 Marquage de la sénescence

Les cellules sénescences ont été détectées à l'aide d'une sonde fluorescente (fluorescéine) constituant une cible pour la β -galactosidase lysosomale (CellEvent™ Senescence Green Detection Kit, Invitrogen). Suivant les recommandations du fabricant, les cellules en culture ont été fixées à l'aide de paraformaldéhyde 2% puis incubées dans le mélange de tampon et de sonde fluorescente du kit CellEvent™ pendant 1h30 à température ambiante et à l'obscurité. Après rinçage, les cellules ont été re-suspendues dans 200 μ L de PBS 0.6M et ont été analysées par cytométrie en flux (CytoFLEX LX, Beckman Coulter) avec une excitation de 488nm et une détection à 515-530nm.

4.4 Résultats

4.4.1 Effets à long terme de traitements 24 heures et 7 jours à l'H₂O₂

Après un traitement de 24h à l'H₂O₂, aussi bien avec 200μM que 500μM, on observe un effet dose-réponse sur la viabilité cellulaire (réduction significative de 10 et 35 % respectivement ; Figure 4.5 A). À partir de 7 jours de résilience, on observe une récupération totale des paramètres vitaux des cultures cellulaires (Figure 4.5 A) et une absence d'impact sur la croissance cellulaire (Figure 4.5 B), et ce jusqu'à 56 jours de résilience.

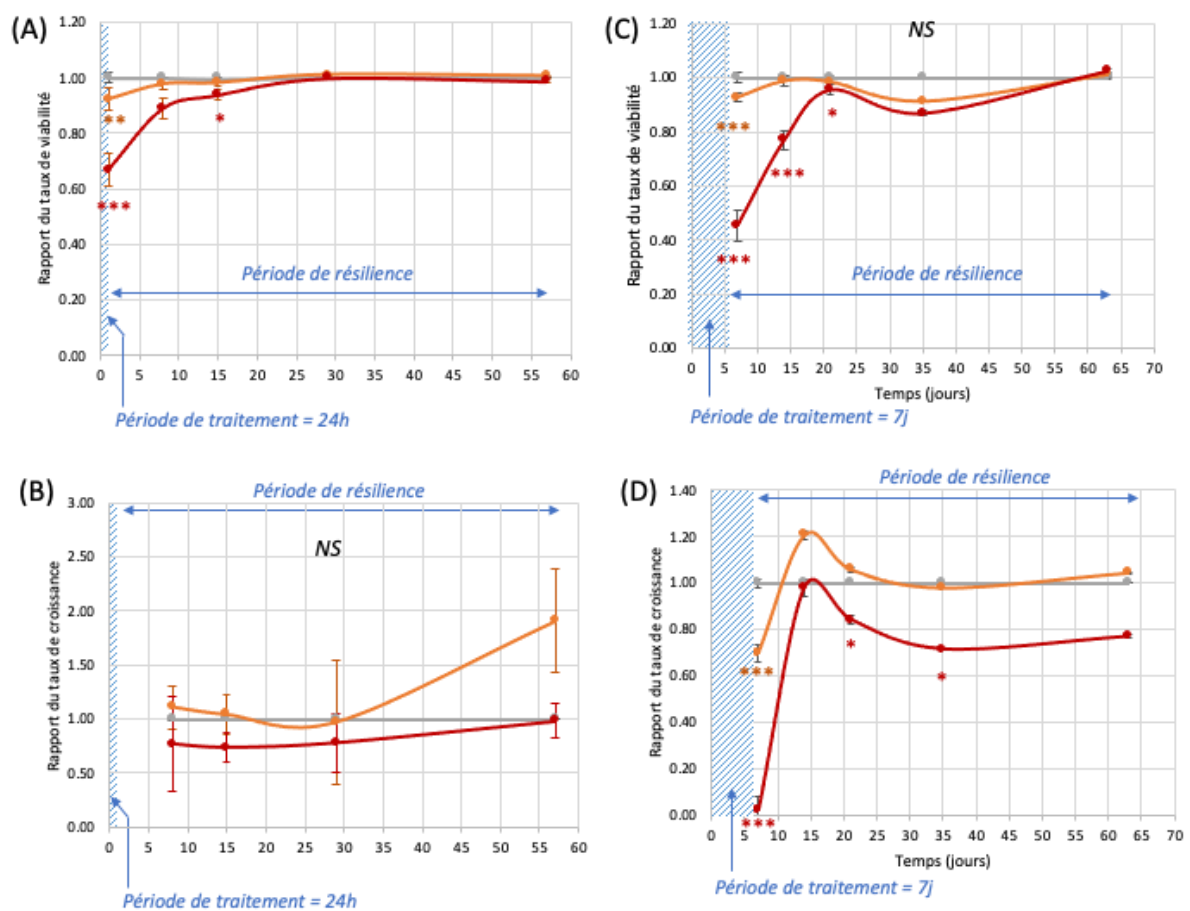


Figure 4.5. Effet à long terme de traitements à l'H₂O₂ sur les paramètres cellulaires des cultures d'*A. viridis*. Traitements de 24 heures (A et B) ou 7 jours (C et D) à 0μM H₂O₂ (contrôle ; courbe grise), 200μM H₂O₂ (courbe orange) ou 500μM H₂O₂ (courbe rouge) ; mesure de la viabilité (A et C) et la croissance (B et D) cellulaires des cultures d'*A. viridis*. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001.

Après un traitement de 7 jours à l'H₂O₂, on observe également un effet dose-réponse sur la viabilité cellulaire, plus accentué à 500μM (55% de réduction ; Figure 4.5 C). La croissance cellulaire est fortement impactée à 200μM et totalement inhibée à 500μM (Figure

4.5 D). Lors de la phase de résilience, on observe une récupération totale de la viabilité cellulaire, quel que soit le traitement préalablement subi, mais avec une cinétique plus rapide après le traitement à 200 μ M H₂O₂ (récupération totale dès 7 jours ; Figure 4.5 C). Après un traitement à 200 μ M, les cellules récupèrent un taux de croissance équivalent au contrôle (Figure 4.5 D). À l'inverse les cellules traitées avec 500 μ M H₂O₂ ne retrouvent pas le taux de croissance initial même au bout de 56 jours de résilience.

L'analyse de la β -galactosidase lysosomale a montré une augmentation de cellules sénescentes après 24 heures de traitement à 200 μ M et 500 μ M d'H₂O₂ (environ deux fois plus que dans le contrôle ; Figure 4.6 A). Après 7 jours de traitement, seules les cellules traitées à 500 μ M d'H₂O₂ présentent un niveau de sénescence significativement élevé (3,5 fois plus que le contrôle ; Figure 4.6 B). Il est important de noter que même si le taux de cellules marquées est grandement augmenté en comparaison de la condition contrôle, cela ne représente qu'une faible partie de la population totale des cellules en culture, à savoir environ 13% après un traitement à 500 μ M d'H₂O₂ pendant 7 jours, sachant que le pourcentage de cellules en sénescence dans la condition contrôle est en moyenne de $5,3 \pm 1\%$. Cependant, plus aucune augmentation de la sénescence n'est mesurée après 56 jours de résilience et ce quel que soit le traitement subi préalablement par les cellules (Figures 4.3 A et B).

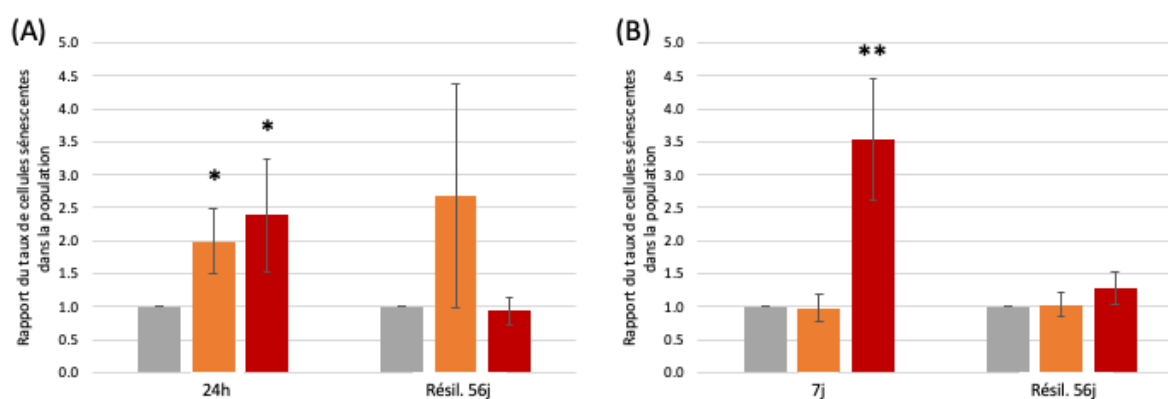


Figure 4.6. Mesure de la sénescence au sein des cultures cellulaires d'*A. viridis* suite aux traitements H₂O₂. Mesure de la β -galactosidase lysosomale après un traitement H₂O₂ de 24h et une phase de résilience de 56j (A) ou après un traitement de 7j et une phase de résilience de 56j (B) : contrôle 0 μ M (histogramme gris), 200 μ M (histogramme orange) ou 500 μ M (histogramme rouge). L'activité de la β -galactosidase lysosomale a été mesurée par marquage fluorescent des populations cellulaires. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.4.1 Effets de traitements continus ou répétés à l'H₂O₂

Au regard des résultats obtenus sur la mesure des paramètres vitaux et de la sénescence après des traitements de 7 jours à l'H₂O₂, nous avons décidé d'appliquer deux nouveaux traitements expérimentaux à 200µM H₂O₂ pour évaluer la capacité des cellules d'*A. viridis* en culture à entrer en sénescence, de façon massive et irréversible. Un traitement continu de 28 jours à 200µM H₂O₂ a un effet limité sur la viabilité au cours des trois premières semaines (environ 5% de mortalité), avec un retour aux conditions basales après 28 jours (Figure 4.7 A). L'effet sur la croissance cellulaire au cours des trois premières semaines est plus marqué avec une réduction maximale de 60% à 21 jours. Néanmoins au bout de 28 jours les cellules retrouvent leur taux de croissance initial (Figure 4.7 B). L'analyse de la β-galactosidase lysosomale n'a révélé aucune différence significative du pourcentage de cellules sénescents dans les cultures au cours de la cinétique par rapport au pourcentage mesuré dans les cultures contrôles (Figure 4.8).

Le traitement répété a montré un effet transitoire sur la viabilité et la croissance après 7 jours (5% de mortalité et 30% de réduction de la croissance ; Figure 4.7 C et D). L'absence d'impact du deuxième traitement H₂O₂ sur ces mêmes paramètres suggère un effet de pré-conditionnement induit par le premier traitement. Par ailleurs, même lors du traitement répété, aucune différence significative du pourcentage de cellules sénescents n'a été observée dans les cultures traitées par rapport à la condition contrôle, et ce tout au long de la cinétique (résultat non montré).

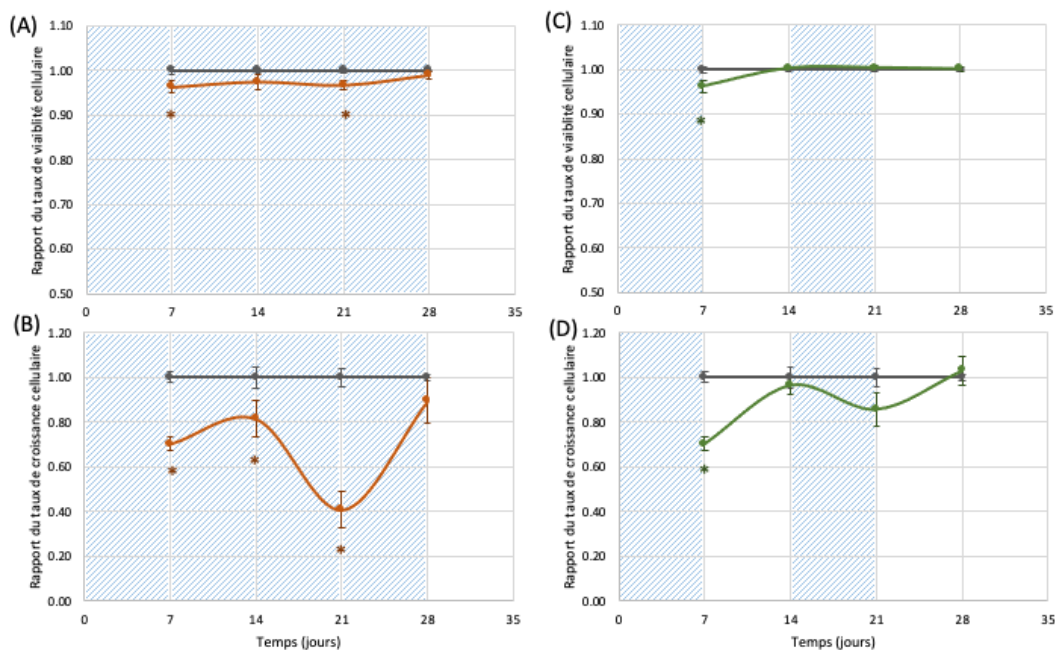


Figure 4.7. Effet de traitements continu ou répété à 200µM d'H₂O₂ sur les paramètres cellulaires des cultures d'*A. viridis*. Traitement continu: (A) et (B), courbe orange ; traitement répété (C) et (D), courbe verte ; mesure de la viabilité (A) et (C) ; mesure de la croissance (B) et (D). Les hachures bleues représentent les périodes de traitement à l'H₂O₂, et les courbes grises les conditions contrôles. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * $p < 0.05$.

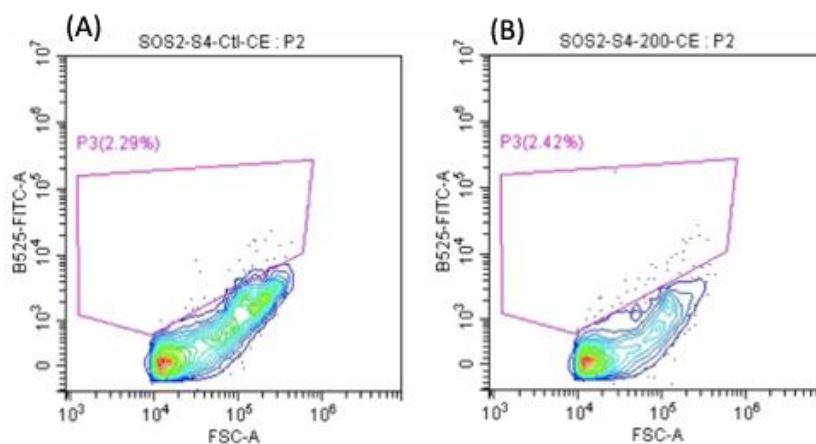


Figure 4.8. Résultat représentatif de la mesure de l'activité de β -galactosidase lysosomale dans les cultures cellulaires d'*A. viridis* suite au traitement continu à 200µM d'H₂O₂. Analyse par cytométrie en flux de populations de cellules d'*A. viridis* non traitées (A) ou traitée à 200µM d'H₂O₂ (B) après un traitement continu de 28 jours. Ces analyses issues d'une expérience indépendante sont représentatives des expériences menées sur tous les points de cinétique. Le pentagone représente la fenêtre d'analyse dans laquelle les cellules fluorescentes (P3) sont mesurées.

4.4.2 Effets de traitements aux rayons X

Les radiations ionisantes étant connues pour induire la sénescence cellulaire chez des espèces modèles, nous avons procédé à des traitements aux rayons X sur les cultures cellulaires

d'*A. viridis*, l'objectif étant d'évaluer la capacité des cellules en culture de notre modèle d'étude à entrer en sénescence massive (c'est à dire majoritaire dans la population cellulaire) et irréversible suite à un stimulus exogène (tel que les rayons X). Dans un premier temps, nous avons mesuré l'impact des différents traitements (10, 25 et 50Gy) sur les paramètres vitaux ces cellules en culture. Ainsi, seul le traitement à 50Gy a un effet significatif sur la viabilité cellulaire (réduction de 30% environ). Par ailleurs, une diminution significative de la croissance cellulaire a été mesurée à partir de 25 Gy (réduction de 62% à 25 Gy et de 51% 50 Gy ; Figure 4.9).

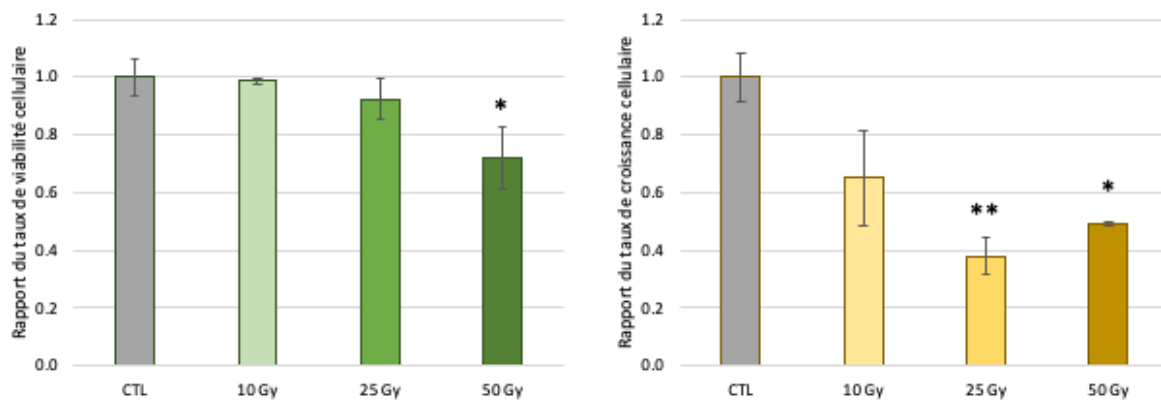


Figure 4.9. Effets de traitements aux rayons X sur les paramètres vitaux des cultures cellulaires d'*A. viridis*. La viabilité (A) et la croissance (B) cellulaires ont été mesurées 5 jours après le traitement sur une gamme de 10 à 50Gy. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Aucun des traitements aux rayons X n'a par ailleurs induit une différence significative du taux de cellules sénescentes dans les populations traitées par rapport à la condition contrôle (Figure 4.10). Ceci suggère donc que même un traitement aux rayons X de 50Gy n'induit pas de sénescence dans les cultures cellulaires d'*A. viridis*.

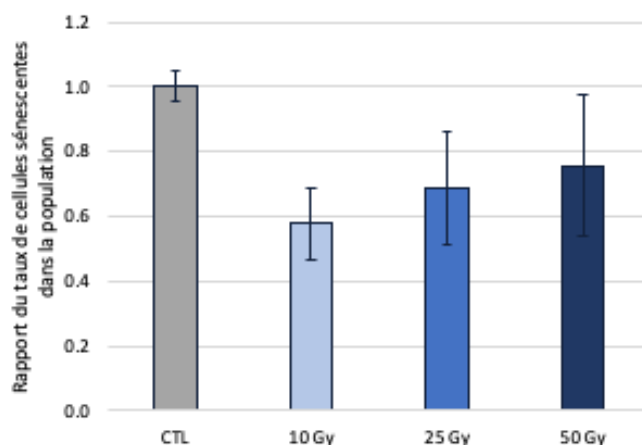


Figure 4.10. Mesure de la sénescence au sein des cultures cellulaires d'*A. viridis* suite aux traitements aux rayons X. Les cellules ont été soumises à des radiations ionisantes de 10Gy, 25Gy ou 50Gy. L'activité de la β -galactosidase lysosomale a été mesurée par marquage fluorescent des populations cellulaires. Les données sont représentées par rapport aux valeurs contrôles, et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

4.5 Discussion et perspectives

Cette étude a mis en évidence une absence de phénotype de sénescence irréversible des cellules en culture d'*A. viridis* suite à des traitements H₂O₂ continus et répétés ainsi que suite à des périodes de résilience de plusieurs semaines. Seul un marquage discret et transitoire des cellules, reflétant l'activité de la β -galactosidase lysosomale, a été observé après un traitement de 24 heures à 200 et 500 μ M d'H₂O₂, ainsi qu'après 7 jours à 500 μ M et associé à un arrêt de la croissance. Les traitements aux rayons X n'ont quant à eux pas induit de phénotype de sénescence, même après une dose à 50Gy. La résistance des cellules d'*A. viridis* aux rayonnements X est d'autant plus remarquable qu'il a été montré 56% et 87% d'entrée en sénescence dans des cellules humaines après des traitements à 4Gy et 8Gy (Ji et al., 2015), voire même après 2Gy dans des cellules de félin (Koike et al., 2021). Des traitements similaires (5Gy) sur des cellules tumorales de cerveau humain ont également mis en évidence d'importants dommages à l'ADN (Teodori et al., 2014). Néanmoins, des études menées au laboratoire sur l'anémone de mer *Nematostella vectensis* ont montré une absence de mortalité chez des individus traités à 300Gy (Amiel et al., 2019).

La potentielle absence de sénescence cellulaire induite dans notre modèle d'étude est en accord avec la théorie d'absence de vieillissement des Cnidaires (Jones et al., 2014). En effet, il a été montré dans la littérature que l'hydre est capable d'échapper à la sénescence, ne montrant aucun signe du phénotype de vieillissement avec un taux de mortalité qui reste très

bas tout le long du cycle de vie, et un taux reproduction qui ne diminue pas avec l'âge des individus (Martínez, 1998; Dańko et al., 2015). À une échelle cellulaire, cela pourrait s'expliquer par la présence continue de cellules souches qui participeraient ainsi au renouvellement infini des cellules, garantissant à ces organismes d'échapper au vieillissement, ce qui expliquerait alors leur longévité remarquable (Boehm and Bosch, 2012).

Les Cnidaires, qui semblent ainsi pouvoir « échapper » aux mécanismes de vieillissement, font partie des espèces considérées comme ayant une « sénescence négligeable ». Cette notion qui a été proposée par Finch (1990, 2009) suggère que certaines espèces, comme le rat-taupe nu ou encore le requin du Groenland par exemple, présentent une potentielle absence de sénescence associée à un risque faible de développer des maladies liées à l'âge (Stenvinkel and Shiels, 2019). La littérature a depuis suggéré que cette « sénescence négligeable » pouvait être synonyme d'une meilleure résistance au stress conférant ainsi à ces espèces une capacité exceptionnelle du maintien de leur homéostasie. Cette théorie pourrait expliquer les résultats obtenus sur notre modèle d'étude chez qui des traitements pro-oxydants n'induisent ni de dommage oxydatif ni d'entrée massive en sénescence.

Dans notre étude, le marquage choisi pour mettre en évidence une entrée en sénescence a été la mesure de l'activité de la β -galactosidase lysosomale. Cette enzyme hydrolytique résidant dans les lysosomes des cellules ne montre en effet une activité que dans les cellules sénescents, dont elle est l'un des marqueurs. Ce marqueur a été mis en évidence initialement chez un modèle de cellules humaines (Dimri et al., 1995), et a depuis été adapté et utilisé régulièrement aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, mais principalement sur des modèles de cellules humaines ou de mammifères. On peut ainsi se demander si ce type de marquage est adapté à des modèles émergents ou non conventionnels tels que les Cnidaires, qui pourraient présenter des processus de vieillissement très différents de ceux décrits chez les mammifères. Ce marquage a également été remis en cause dans un contexte *in vitro*, car il ne montrait pas de spécificité vis-à-vis de la sénescence à l'échelle cellulaire (Severino et al., 2000). En effet, le marquage semblait être grandement dépendant de la densité cellulaire dans la culture et du nombre de passages qu'elle avait connu, mais pas de l'âge de l'individu sur lequel les cellules avaient été prélevées. Cela suggère donc que l'activité de la β -galactosidase peut ne pas être pertinente pour tous les types de sénescence, à savoir répllicative ou induite, et que la mise au point d'autres marqueurs doit être considérée pour étudier la sénescence à l'échelle cellulaire chez les modèles Cnidaires. La sénescence cellulaire est en effet caractérisée par de nombreux

changements au sein des cellules, aussi bien morphologiques, que métaboliques et physiologiques, ce qui implique une grande hétérogénéité phénotypique des cellules sénescents en fonction du stimulus utilisé pour l'induire (Roux et Bischoff 2019), et nécessite donc une approche multi-marqueurs pour mettre en évidence les processus complexes de sénescence.

Même si les différents traitements imposés aux cellules en culture d'*A. viridis* n'ont pas semblé induire de sénescence, d'importantes réductions voire des arrêts de croissance ont pu être observés. Dans le cas de traitements à 200 μ M d' H_2O_2 entraînant une réduction de la croissance cellulaire d'environ 35%, une période de résilience a permis aux cellules de recouvrer leurs paramètres cellulaires initiaux, ce qui peut suggérer une entrée dans un état alternatif dormant, appelé « quiescence » (Clopton and Saltman, 1995). Il a été montré que des cellules quiescentes peuvent en effet stopper leur croissance pendant une période de stress ou de manque de nutriments par exemple, tout en maintenant leur métabolisme réduit, mais actif et en étant capables de reprendre leur cycle cellulaire lors du retour à la normale des conditions environnementales (Stuart and Brown, 2006). Même si des analyses sont à prévoir afin de montrer que les cultures cellulaires qui ont un taux de croissance diminué contiennent réellement des cellules ayant stoppé transitoirement leur cycle cellulaire (Coller et al., 2006), la capacité de résilience illustrée dans cette étude suggère qu'une stratégie de défense est mise en place au sein des cultures, participant ainsi à leur éviter un vieillissement prématuré.

CHAPITRE 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était centré sur l'étude des capacités de réponse au stress des Cnidaires symbiotiques à l'échelle cellulaire, en utilisant le modèle d'étude *A. viridis*. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la **capacité de réponse face à des stress extrinsèques**, tels que des polluants chimiques, des cellules de Cnidaires en culture (CHAPITRE 2). Cette première approche a permis de mettre en évidence l'impact de polluants chimiques utilisés dans l'industrie cosmétique, tels que les filtres UV, mais également de mélanges de filtres ou de produits finis. Ce volet s'est par ailleurs concrétisé par l'utilisation de ce test d'écotoxicité *in vitro* comme support pour la formulation de produits éco-responsables par SO.F.I.A Cosmétique, l'entreprise partenaire de cette thèse CIFRE. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude des **capacités de réponse face à des stress intrinsèques**, tels que des conditions pro-oxydantes liées à la vie en symbiose. Lors de ces travaux, nous avons ainsi démontré des propriétés remarquables de résistance à un traitement à l'H₂O₂ (CHAPITRE 3), avec comme phénotype de résistance majeur un arrêt de la croissance cellulaire dont nous avons pu montrer qu'il ne semble pas lié à une entrée en sénescence (CHAPITRE 4).

5.1 Le test d'écotoxicité marine *in vitro* : un nouvel outil pour l'évaluation de la pollution du milieu marin

Le contexte de la pollution de l'environnement marin, couplé à l'absence de tests marins non invasifs, rend urgent le développement de nouvelles méthodes d'analyse. Dans ces travaux de thèse, nous avons ainsi entrepris d'utiliser une technologie *in vitro* innovante issue d'un Cnidaire symbiotique, *Anemonia viridis*, afin de mener des études d'écotoxicologie marine appliquée à l'industrie cosmétique. Nous avons ainsi validé l'utilisation de cet outil *in vitro* sur des matières premières tels que l'avobenzène et le benzophénone-3, filtres UV largement utilisés par l'industrie cosmétique. En effet, les analyses menées sur ces matières premières par la mesure de valeurs d'EC₅₀, nous ont permis de positionner ce test innovant par rapport aux études existantes et de valider sa sensibilité et sa pertinence. De plus, ce test a permis d'appréhender l'impact de mélanges de composés (tels que des mélanges de filtres UV) ou de produits finis. Ces études permettent d'envisager deux types de perspectives, tant d'un point de vue écotoxicologique et industriel, que sur le plan de la recherche fondamentale via l'étude des mécanismes d'action des polluants sur les Cnidaires, et ce, à l'échelle cellulaire.

5.1.1 Les applications écotoxicologiques et industrielles du test

L'obtention d'une preuve de concept robuste pour notre test d'écotoxicité dans le domaine des cosmétiques nous permet d'envisager, aujourd'hui, une diversification de ses applications. En effet, l'origine des pollutions auxquelles doivent faire face les organismes marins peut être très diverse et comprendre aussi bien les crèmes solaires, mais également toutes substances relarguées dans le milieu et amenées à la mer par le biais de ses effluents (voir pour revue Patel et al., 2020). Cela concerne non seulement les substances d'origine pharmaceutique, mais aussi les polluants plastiques et tous leurs dérivés, depuis le polymère qui les constitue jusqu'aux additifs tels que les bisphénols, qui sont connus pour leur perturbation endocrinienne. De nombreux produits phytosanitaires tels que des pesticides utilisés en agriculture sont également une source de pollution majeure pour les océans. Des résultats préliminaires très encourageants ont pu montrer une sensibilité de notre test pour évaluer la toxicité d'herbicides ou de conservateurs, tels que le glyphosate ou le bisphénol A. Cela nous permet d'envisager d'étendre l'utilisation du test à de nombreux autres types de produits chimiques afin de mieux évaluer les effets de polluants encore peu étudiés dans le milieu marin, mais également de proposer une solution aux industriels pour mesurer leur impact sur l'environnement marin et les aider à créer des produits plus éco-responsables.

Cette volonté d'évaluer les impacts des molécules utilisées couramment dans l'industrie d'une part, et de mieux renseigner les consommateurs sur l'innocuité des produits vis-à-vis de l'environnement marin, m'a poussée à entreprendre un projet de création d'entreprise, afin de proposer cette solution innovante aux entreprises souhaitant avoir une démarche éco-responsable.

5.1.2 Analyse fonctionnelle des modes d'action des polluants

Notre approche basée sur la mesure des paramètres cellulaires (i.e. viabilité et croissance cellulaires) s'est révélée pertinente pour atteindre une sensibilité nous permettant d'identifier une large gamme de réponses selon les produits testés. Toutefois, nous pouvons envisager d'utiliser d'autres marqueurs afin d'effectuer des analyses plus complètes et mieux comprendre les voies moléculaires spécifiquement impactées.

Dans un premier temps, les biomarqueurs utilisés au cours de ces travaux de thèse pour suivre la réponse à des conditions pro-oxydantes induites par de l' H_2O_2 (CHAPITRE 3),

pourraient être utilisés dans le cadre d'études d'écotoxicité. En effet, il a d'ores et déjà été montré l'efficacité et la pertinence d'une approche multimarqueurs pour révéler la présence ou les effets biologiques de molécules sur des organismes marins (Amato et al., 2006), notamment *via* l'utilisation de biomarqueurs tels la peroxydation des lipides (par la formation de malonedialdéhyde par exemple), ou l'augmentation de la quantité d'enzymes antioxydantes (Smii et al., 2021).

Une stratégie complémentaire reposerait sur l'utilisation de techniques omiques (protéomique, transcriptomique...) afin de mettre en évidence des changements d'expression de gènes suite à une condition stressante et ainsi d'identifier les protéines cibles impliquées dans des réponses écotoxicologiques. Cette approche dans le domaine de l'écotoxicologie est utilisée depuis les années 2000 et permet d'atteindre une meilleure compréhension des mécanismes de résistance et de sensibilité aux polluants (Monsinjon and Knigge, 2007).

L'utilisation et le développement de cultures cellulaires dans le cas des modèles mammifères ont eu un important impact sur la recherche fondamentale et les découvertes scientifiques, en particulier grâce à l'établissement de lignées cellulaires transgéniques, par transfection ou transduction. L'obtention de lignées transgéniques de cultures d'*A. viridis* pourrait ainsi permettre d'obtenir des marqueurs spécifiques et précis de la réponse au stress de notre modèle. Pour que ces méthodes puissent être appliquées sur les cultures primaires d'*A. viridis* utilisées au laboratoire, une méthode de transfection adaptée (avec des vecteurs compatibles) doit être développée. Chez les invertébrés marins, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus à partir de cultures de cellules issues d'éponges (Pfannkuchen and Brümmer, 2009; Grasela et al., 2012), mettant ainsi en évidence des promoteurs fonctionnels ainsi que des méthodes de transformation adaptées à ces types de cellules (bombardement, lipofection). Récemment, les stratégies d'édition du génome par CRISPR/Cas9 ont montré des résultats encourageants chez plusieurs espèces de Cnidaires (Ikmi et al., 2014; Cleves et al., 2018; Sanders et al., 2018) et pourraient être appliquées à notre modèle cellulaire.

5.1.3 Toxicité des polluants dans le contexte du réchauffement climatique

Les menaces qui pèsent sur les océans et leur biodiversité constituent un challenge d'autant plus grand que leurs impacts cumulés peuvent avoir des conséquences bien plus graves qu'estimées. En effet, l'action des changements climatiques sur les océans va non seulement mener à une augmentation de la température de l'eau et à son acidification, mais pourra

également exacerber les effets des pollutions subies par les écosystèmes marins. Même si les liens entre réchauffement climatique et pollution chimique restent aujourd'hui peu connus, on peut estimer que les modifications climatiques pourront influencer la distribution des pollutions à l'échelle mondiale et entraîner une augmentation de la toxicité de certains polluants (Noyes and Lema, 2015; Cabral et al., 2019). Lorsque plusieurs agents stressants sont appliqués à des organismes, leurs interactions sont généralement synergiques, suggérant alors qu'une combinaison d'un stress climatique et d'une pollution chimique causeront des dégâts bien plus importants (Noyes and Lema, 2015). Il semble alors plus que pertinent d'adapter le test d'écotoxicité utilisé dans ces travaux afin d'estimer les impacts combinés d'un stress climatique et d'une pollution chimique. Des résultats précédemment obtenus ont permis de valider l'utilisation de la culture cellulaire d'*A. viridis* comme modèle biologique pour appréhender l'impact d'un stress hyperthermique à l'échelle cellulaire (Ventura et al., 2018). Ainsi, ce protocole pourra facilement être appliqué en combinaison d'un traitement avec divers polluants chimiques. Les approches biochimiques, omiques ou l'utilisation de lignées transgéniques, seront par ailleurs essentielles pour déchiffrer la réponse moléculaire des Cnidaires à l'échelle cellulaire.

5.2 La résistance au stress oxydant d'*Anemonia viridis* et l'implication de la symbiose

5.2.1 L'origine de la résistance intrinsèque cellulaire d'*A. viridis*

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en évidence une importante résistance aux conditions pro-oxydantes induites par un apport exogène en peroxyde d'hydrogène, et ce, aussi bien à l'échelle de l'individu qu'à l'échelle cellulaire chez notre modèle *A. viridis*. En effet, cet apport exogène n'a eu aucun impact sur l'état de santé global des individus ni de conséquence à l'échelle tissulaire. Les cellules en culture ont quant à elle réussi à gérer les afflux d'ERO intracellulaires même à la plus haute concentration testée (500 μ M d' H_2O_2), puisque les seuls effets observés sur les paramètres cellulaires ou les biomarqueurs chimiques de stress étaient partiellement réversibles après l'arrêt du traitement. Ces résultats ont par ailleurs révélé une plus grande sensibilité des symbiotes d'*A. viridis*, du genre Philozoon, face aux traitements pro-oxydants, avec l'apparition de dommages protéiques. Cela suggère une moins bonne prise en charge de l' H_2O_2 par le système de défense antioxydant

des zooxanthelles en comparaison de celui de l'hôte animal. Cette sensibilité aux ERO a déjà été démontrée chez d'autres genres de Symbiodiniaceae (Roberty et al., 2016).

L'une des principales questions soulevées par cette remarquable résistance est donc la potentielle implication de la relation symbiotique dans les mécanismes de défense d'*A. viridis*. Ainsi l'implication pourrait être directe, à savoir dépendre de la présence de la zooxanthelle pendant la condition de stress. Les Symbiodiniaceae sont en effet capables de produire des métabolites à pouvoir antioxydant, tels que le Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) (Steinke et al., 2011). Cependant, les régulations de la production de métabolites pendant les périodes pro-oxydantes, ainsi que leur potentiel transfert vers la cellule hôte sont des paramètres qui restent à démontrer. Une autre explication serait une résistance intrinsèque du phylum des Cnidaires qui aurait présenté des avantages évolutifs pour une meilleure tolérance à la présence du symbiote et d'une production d'ERO au sein de leurs cellules (Apprill, 2020). L'utilisation du modèle *A. viridis* est particulièrement adapté pour répondre à la question du rôle global de la zooxanthelle dans la réponse au stress de l'holobionte, par la possibilité d'obtenir des individus aposymbiotiques, c'est-à-dire sans leur symbiote, et de les maintenir en bonne santé en aquarium en leur fournissant un apport nutritif suffisant. C'est le cas actuellement au laboratoire, où des organismes ont été blanchis par un maintien à l'obscurité pendant plusieurs mois (en 5 mois, perte de 90% des symbiotes). On peut donc envisager d'effectuer sur ces organismes aposymbiotiques les mêmes traitements à l' H_2O_2 que ceux réalisés au cours de cette thèse. Cette étude devrait permettre de déterminer si l'hôte animal en absence de son symbiote conserve ses capacités de résistance aux conditions pro-oxydantes. Des résultats préliminaires montrent qu'un traitement à 200 μM ou 500 μM d' H_2O_2 sur une semaine n'a aucune incidence sur l'état de santé global des individus puisqu'aucune mortalité n'a été observée même des semaines après le traitement. Pour s'assurer d'une absence d'état de stress chez ces individus, des analyses complémentaires, sur les biomarqueurs de stress, sont en cours. Elles permettront de caractériser plus précisément la réponse des organismes aposymbiotiques à ces traitements et de la comparer avec celle observée sur les organismes symbiotiques et les cellules en culture.

Enfin, des analyses comparatives entre un Cnidaire symbiotique comme *A. viridis* et un Cnidaire non symbiotique nous permettraient de déterminer si les mécanismes de résistance sont communs à tous les Cnidaires ou seulement aux espèces symbiotiques. Des études à l'échelle cellulaire seraient également à envisager, nécessitant alors l'obtention de cultures cellulaires à partir d'un Cnidaire non symbiotique. L'anémone de mer *Nematostella vectensis* constitue l'un des organismes les plus pertinents pour cela. En effet, son cycle de vie est maîtrisé

en laboratoire et de nombreux outils moléculaires et génétiques sont disponibles (Röttinger, 2021). Bien qu'il ait été démontré que *N. vectensis* est plus sensible à l' H_2O_2 à l'échelle de l'organisme (Friedman et al., 2018), l'obtention d'un modèle de culture cellulaire *in vitro* à partir de *N. vectensis* permettrait de mieux comprendre quelles sont les voies impliquées dans la réponse (sensibilité vs résistance) aux conditions pro-oxydantes chez les Cnidaires.

5.2.2 Le choix du peroxyde d'hydrogène et ses limites

Parmi les agents oxydants susceptibles de créer un stress oxydant chez notre modèle de Cnidaire symbiotique, le choix s'est porté pour nos analyses sur le peroxyde d'hydrogène non seulement pour son rôle clé dans la photosynthèse en tant que sous-produit de la production d'oxygène par les zooxanthelles, mais également pour ses propriétés physico-chimiques qui en font un produit très perméable et capable de diffuser de la cellule productrice vers la cellule de l'hôte très facilement. En revanche, l'absence de réponse à l' H_2O_2 n'est peut-être pas représentative de la réponse à une condition pro-oxydante induite par une autre ERO. En effet, l' H_2O_2 ne constitue habituellement pas l'espèce la plus réactive ou la plus oxydante des ERO, contrairement au radical hydroxyle connu pour posséder un pouvoir oxydant plus puissant et pouvant ainsi créer de plus importants dommages aux cellules (Halliwell and Gutteridge, 1992). De plus, l'exposition récurrente à des concentrations allant jusqu'à $60\mu\text{M}$ H_2O_2 à la surface des polypes de Cnidaires (Ousley et al., 2022) peut vraisemblablement constituer un processus de pré-adaptation conditionnant une réponse efficace à cette ERO.

5.2.3 Les mécanismes de résistance impliqués

5.2.3.1 Identification de processus de résistance par des processus de quiescence

Même si nous avons pu au cours de ces travaux montrer une remarquable résistance cellulaire, les mécanismes impliqués restent à être élucidés. En absence de phénotype marqué de sénescence (CHAPITRE 4), nous pouvons suggérer que l'arrêt de croissance, observé après les traitements pro-oxydants, pourrait être expliqué par une entrée en quiescence des cellules. En effet, ce mécanisme consiste en un état de dormance réversible au cours duquel les cellules stoppent leur cycle cellulaire et maintiennent leur métabolisme à un taux suffisant pour être capable de reprendre leur croissance. Même si nos observations montrent que l'arrêt de croissance est effectivement transitoire et que les cellules montrent une capacité de résilience importante, il nous reste à prouver que les cellules ont bel et bien stoppé leur cycle cellulaire.

Cela pourrait se mettre en place par des techniques telles que la cytométrie en flux permettant une visualisation du cycle cellulaire grâce à un marquage à l'iodure de propidium, ou une analyse du métabolisme cellulaire (i.e. technologie Seahorse).

5.2.3.2 Identification des acteurs moléculaires de résistance

L'un des moyens pour mettre en évidence les acteurs moléculaires impliqués dans la résistance à des conditions pro-oxydantes serait une approche métabolomique, en comparant les profils des cellules stressées par rapport à une condition contrôle. Cette stratégie permettrait d'identifier des métabolites produits par la cellule pour répondre à un stress oxydant. Souvent couplée à des analyses en spectrométrie de masse, cette approche est de plus en plus utilisée dans le domaine marin. Elle a ainsi déjà permis l'identification de produits issus d'organismes marins, à intérêt pharmaceutique ou médical (Carroll et al., 2019; Reverter et al., 2020).

Toutefois, des challenges techniques inhérents à cette analyse doivent pouvoir être dépassés. On peut citer en premier lieu la nature même des métabolites produits qui peuvent présenter des niveaux de production incompatibles avec leur détection. Ou bien encore, la grande diversité chimique des métabolites produits qui peut complexifier le choix du solvant afin qu'il ait une affinité avec le plus grand nombre de molécules possible (Bayona et al., 2022). De plus, les échantillons provenant du milieu marin sont généralement très concentrés en sels, ce qui est incompatible avec plusieurs méthodes d'analyses telles que la chromatographie en phase liquide, car le sel affecte la résolution et la séparation chromatographique. Des analyses préliminaires réalisées au laboratoire en collaboration avec l'Institut de Chimie de Nice (ICN) ont en effet mis en lumière ces différents verrous, avec par exemple la quantité de métabolites d'intérêt qui semble être difficile à concentrer et à détecter, du fait de la présence d'un bruit de fond important dû aux constituants de l'eau de mer et du milieu de culture cellulaire utilisés.

5.3 Les enjeux de l'étude du vieillissement chez les Cnidaires

Au cours du CHAPITRE 4 de ce manuscrit, nous avons étudié la possibilité d'induire une entrée en sénescence des cellules en culture d'*A. viridis* à la suite de traitements pro-oxydants. Pour cela, nous avons suivi un marqueur cellulaire caractéristique d'une entrée en sénescence, à savoir la mesure de l'activité de la β -galactosidase lysosomale. L'étude menée au cours de notre travail nous a néanmoins conduits à la conclusion qu'aucun signe de sénescence à l'échelle cellulaire n'est visualisable dans nos conditions expérimentales. Ces premiers

résultats obtenus à l'échelle de la cellule chez un Cnidaire semblent être en accord avec la théorie de la sénescence négligeable chez les Cnidaires (Finch, 1990). On peut toutefois se demander si ce marqueur de sénescence cellulaire est adapté aux cellules de Cnidaires et si une analyse multi-marqueurs serait plus appropriée pour identifier ce processus au sein de notre modèle. D'ailleurs, des études récentes ont montré un raccourcissement des télomères, l'un des marqueurs qui semble être fortement lié au vieillissement (Blackburn et al., 2015), chez une espèce de corail soumise à un stress d'obscurité continu (Rouan et al., 2022). Il serait donc intéressant de pouvoir suivre la modification de la longueur des télomères dans des cultures cellulaires après l'induction d'un stress oxydant.

On peut toutefois se demander à quel point on peut affirmer que le vieillissement ne concerne pas ces animaux, alors qu'il pourrait potentiellement impliquer d'autres voies de signalisation et de processus cellulaires que ceux décrits dans les espèces modèles comme les mammifères (Lundberg et al., 2000). Des analyses approfondies du rôle de gènes liés à la sénescence, identifiés récemment chez l'hydre par une approche transcriptomique (Sun et al., 2020), seront autant d'éléments qui permettront de corroborer ou non cette théorie. Par ailleurs, une approche « single-cell transcriptomics », comparant des cultures de cellules en condition de stress à des cultures en condition contrôle, pourrait aider à l'identification de populations de cellules présentant une signature liée à la sénescence. Cette approche serait envisageable à deux titres : i) au moins trois études récentes de « single-cell transcriptomics » ont été publiées chez les Cnidaires (Sebé-Pedrós et al., 2018; Siebert et al., 2019; Levy et al., 2021; Plessier et al., 2022) ; ii) des efforts récents du laboratoire ont permis d'obtenir le séquençage complet du génome d'*A. viridis*, donnant ainsi accès aux annotations nécessaires pour l'identification des gènes d'intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., and Pörtner, H.-O. (1998). Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 120, 425–435. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10028-7.

Abele-Oeschger, D., Tüg, H., and Röttgers, R. (1997). Dynamics of UV-driven hydrogen peroxide formation on an intertidal sandflat. *Limnology and Oceanography* 42, 1406–1415. doi: 10.4319/lo.1997.42.6.1406.

Allemand, D., and Osborn, D. (2019). Ocean acidification impacts on coral reefs: From sciences to solutions. *Regional Studies in Marine Science* 28, 100558. doi: 10.1016/j.rsma.2019.100558.

Amato, E., Alcaro, L., Corsi, I., Della Torre, C., Farchi, C., Focardi, S., et al. (2006). An integrated ecotoxicological approach to assess the effects of pollutants released by unexploded chemical ordnance dumped in the southern Adriatic (Mediterranean Sea). *Marine Biology* 149, 17–23. doi: 10.1007/s00227-005-0216-x.

Amberg, N., and Fogarassy, C. (2019). Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. *Resources* 8, 137. doi: 10.3390/resources8030137.

Amiel, A. R., Foucher, K., Ferreira, S., and Röttinger, E. (2019). Synergic coordination of stem cells is required to induce a regenerative response in anthozoan cnidarians. 2019.12.31.891804. doi: 10.1101/2019.12.31.891804.

Amiel, A. R., Michel, V., Carvalho, J. E., Shkreli, M., Petit, C., and Röttinger, E. (2021). L'anémone de mer *Nematostella vectensis* - Un modèle émergent pour la recherche biomédicale : mécano-sensibilité, régénération et longévité. *Med Sci (Paris)* 37, 167–177. doi: 10.1051/medsci/2020282.

Andersen, A. (2008). Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in Cosmetic Products. *International Journal of Toxicology* 27, 1–82. doi: 10.1080/10915810802548359.

Anderson, B., Nicely, P., Gilbert, K., Kosaka, R., Hunt, J., and Phillips, B. (2016). Overview of Freshwater and Marine Toxicity Tests: A Technical Tool for Ecological Risk Assessment. *OEHHA*. Available at: <https://oehha.ca.gov/ecotoxicology/general-info/overview-freshwater-and-marine-toxicity-tests-technical-tool-ecological> [Accessed October 11, 2022].

Appeltans, W., Ah Yong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., et al. (2012). The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current Biology* 22, 2189–2202. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.036.

Apprill, A. (2020). The Role of Symbioses in the Adaptation and Stress Responses of Marine Organisms. *Annual Review of Marine Science* 12, 291–314. doi: 10.1146/annurev-marine-010419-010641.

Armoza-Zvuloni, R., Schneider, A., Sher, D., and Shaked, Y. (2016). Rapid Hydrogen Peroxide release from the coral *Stylophora pistillata* during feeding and in response to chemical and physical stimuli. *Sci Rep* 6, 21000. doi: 10.1038/srep21000.

Armoza-Zvuloni, R., and Shaked, Y. (2014). Release of hydrogen peroxide and antioxidants by the coral *Stylophora pistillata* to its external milieu. *Biogeosciences* 11, 4587–4598. doi: 10.5194/bg-11-4587-2014.

Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 601–639. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.601.

Baalen, C. V., and Marler, J. E. (1966). Occurrence of Hydrogen Peroxide in Sea Water. *Nature* 211, 951–951. doi: 10.1038/211951a0.

Baker, A. C. (2001). Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411, 765–766. doi: 10.1038/35081151.

Baker, A. C., Starger, C. J., McClanahan, T. R., and Glynn, P. W. (2004). Corals' adaptive response to climate change. *Nature* 430, 741–741. doi: 10.1038/430741a.

Banaszak, A. T., Barba Santos, M. G., LaJeunesse, T. C., and Lesser, M. P. (2006). The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337, 131–146. doi: 10.1016/j.jembe.2006.06.014.

Barnay-Verdier, S., Dall'Osso, D., Joli, N., Olivré, J., Priouzeau, F., Zamoum, T., et al. (2013). Establishment of primary cell culture from the temperate symbiotic cnidarian, *Anemonia viridis*. *Cytotechnology* 65, 697–704. doi: 10.1007/s10616-013-9566-2.

Barneah, O., Weis, V. M., Perez, S., and Benayahu, Y. (2004). Diversity of dinoflagellate symbionts in Red Sea soft corals: mode of symbiont acquisition matters. *Marine Ecology Progress Series* 275, 89–95. doi: 10.3354/meps275089.

Bar-On, Y. M., and Milo, R. (2019). The Biomass Composition of the Oceans: A Blueprint of Our Blue Planet. *Cell* 179, 1451–1454. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.018.

Barone, A. N., Hayes, C. E., Kerr, J. J., Lee, R. C., and Flaherty, D. B. (2019). Acute toxicity testing of TiO₂-based vs. oxybenzone-based sunscreens on clownfish (*Amphiprion ocellaris*). *Environ Sci Pollut Res* 26, 14513–14520. doi: 10.1007/s11356-019-04769-z.

Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381], 2006, Vol. 22, N° 3; p. 266-272.* doi: 10.1051/medsci/2006223266.

Baskett, M. L., Gaines, S. D., and Nisbet, R. M. (2009). Symbiont diversity may help coral reefs survive moderate climate change. *Ecological Applications* 19, 3–17. doi: 10.1890/08-0139.1.

Bayona, L. M., de Voogd, N. J., and Choi, Y. H. (2022). Metabolomics on the study of marine organisms. *Metabolomics* 18, 17. doi: 10.1007/s11306-022-01874-y.

Beaufort, L., Probert, I., de Garidel-Thoron, T., Bendif, E. M., Ruiz-Pino, D., Metzl, N., et al. (2011). Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature* 476, 80–83. doi: 10.1038/nature10295.

Behrenfeld, M. J., O'Malley, R. T., Siegel, D. A., McClain, C. R., Sarmiento, J. L., Feldman, G. C., et al. (2006). Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* 444, 752–755. doi: 10.1038/nature05317.

Bely, A. E., and Nyberg, K. G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol Evol* 25, 161–170. doi: 10.1016/j.tree.2009.08.005.

Bénard, A., Vavre, F., and Kremer, N. (2020). Stress & Symbiosis: Heads or Tails? *Frontiers in Ecology and Evolution* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2020.00167> [Accessed November 9, 2022].

Berbel Manaia, E., Kaminski, R., Corrêa, M., and Chiavacci, L. (2013). Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 49, 201–209. doi: 10.1590/S1984-82502013000200002.

Berkelmans, R., and van Oppen, M. J. H. (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 B: Biological Sciences* 273, 2305–2312. doi: 10.1098/rspb.2006.3567.

Blackburn, E. H., Epel, E. S., and Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350, 1193–1198. doi: 10.1126/science.aab3389.

Boehm, A.-M., and Bosch, T. C. G. (2012). Migration of multipotent interstitial stem cells in Hydra. *Zoology* 115, 275–282. doi: 10.1016/j.zool.2012.03.004.

Boehm, A.-M., Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., Klostermeier, U. C., Lopez-Quintero, J. A., et al. (2012). FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 19697–19702. doi: 10.1073/pnas.1209714109.

Boeuf, G. (2007). Océan et recherche biomédicale. *J. Soc. Biol.* 201, 5–12. doi: 10.1051/jbio:2007001.

Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., and Schirmer, K. (2005). “Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology,” in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Environmental Toxicology.*, eds. T. P. Mommsen and T. W. Moon (Elsevier), 43–84. doi: 10.1016/S1873-0140(05)80005-0.

Bosch, T. C. G., Klimovich, A., Domazet-Lošo, T., Gründer, S., Holstein, T. W., Jékely, G., et al. (2017). Back to the Basics: Cnidarians Start to Fire. *Trends in Neurosciences* 40, 92–105. doi: 10.1016/j.tins.2016.11.005.

Bouchet, P. (2006). “The magnitude of marine biodiversity,” in *The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and Technological Challenges*, 31–64.

Bown, J. (2022). The effects of ocean acidification on the establishment and maintenance of a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. doi: 10.26686/wgtn.20852398.

Boxall, A. B. A., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D. J., Choi, K., Hickmann, S., et al. (2012). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environmental Health Perspectives* 120, 1221–1229. doi: 10.1289/ehp.1104477.

Brown, B. E. (1997). Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16, S129–S138. doi: 10.1007/s003380050249.

- Bulati, M., Longo, A., Masullo, T., Vlah, S., Bennici, C., Bonura, A., et al. (2016). Partially Purified Extracts of Sea Anemone *Anemonia viridis* Affect the Growth and Viability of Selected Tumour Cell Lines. *BioMed Research International* 2016, 1–12. doi: 10.1155/2016/3849897.
- Cabral, H., Fonseca, V., Sousa, T., and Costa Leal, M. (2019). Synergistic Effects of Climate Change and Marine Pollution: An Overlooked Interaction in Coastal and Estuarine Areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16, 2737. doi: 10.3390/ijerph16152737.
- Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Svobodova, Z., and Faggio, C. (2021). Do Single-Component and Mixtures Selected Organic UV Filters Induce Embryotoxic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*)? *Water* 13, 2203. doi: 10.3390/w13162203.
- Cai, X., and Zhang, Y. (2014). Marine invertebrate cell culture: a decade of development. *J Oceanogr* 70, 405–414. doi: 10.1007/s10872-014-0242-8.
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., and Prinsep, M. R. (2019). Marine natural products. *Natural Product Reports* 36, 122–173. doi: 10.1039/C8NP00092A.
- Carve, M., Nuggeoda, D., Allinson, G., and Shimeta, J. (2021). A systematic review and ecological risk assessment for organic ultraviolet filters in aquatic environments. *Environmental Pollution* 268, 115894. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115894.
- Cervellon, M.-C., and Carey, L. (2011). Consumers' perceptions of “green”: Why and how consumers use eco-fashion and green beauty products. *Critical Studies in Fashion & Beauty* 2, 117–138. doi: 10.1386/csfb.2.1-2.117_1.
- Chi, S. I., Urbarova, I., and Johansen, S. D. (2018). Expression of homing endonuclease gene and insertion-like element in sea anemone mitochondrial genomes: Lesson learned from *Anemonia viridis*. *Gene* 652, 78–86. doi: 10.1016/j.gene.2018.01.067.
- Chintiroglou, C., and Koukouras, A. (1992). A Population of the Sea Anemone *Anemonia viridis* (FÖRSKAL, 1775) and its Associated Flora and Fauna, in the North Aegean Sea. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 77, 483–495. doi: 10.1002/iroh.19920770311.
- Chuard, P. J. C., Johnson, M. D., and Guichard, F. (2019). Ocean acidification causes mortality in the medusa stage of the cubozoan *Carybdea xaymacana*. *Sci Rep* 9, 5622. doi: 10.1038/s41598-019-42121-0.
- Cleves, P. A., Strader, M. E., Bay, L. K., Pringle, J. R., and Matz, M. V. (2018). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in a reef-building coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 5235–5240. doi: 10.1073/pnas.1722151115.
- Clopton, D. A., and Saltman, P. (1995). Low-Level Oxidative Stress Causes Cell Cycle-Specific Arrest in Cultured Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 210, 189–196. doi: 10.1006/bbrc.1995.1645.
- Coffroth, M. A., Poland, D. M., Petrou, E. L., Brazeau, D. A., and Holmberg, J. C. (2010). Environmental Symbiont Acquisition May Not Be the Solution to Warming Seas for Reef-Building Corals. *PLOS ONE* 5, e13258. doi: 10.1371/journal.pone.0013258.
- Coller, H. A., Sang, L., and Roberts, J. M. (2006). A New Description of Cellular Quiescence. *PLOS Biology* 4, e83. doi: 10.1371/journal.pbio.0040083.

Comfort, A. (1979). *The Biology of Senescence*. Elsevier.

Cooley, S., Schoeman, D., Bopp, L., Boyd, P., Donner, S., Ito, S.-I., et al. (2022). “Ocean and coastal ecosystems and their services,” in *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds. H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, M. M. B. Tignor, E. S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, et al. (Cambridge University Press).

Corinaldesi, C., Marcellini, F., Nepote, E., Damiani, E., and Danovaro, R. (2018). Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora* spp.). *Science of The Total Environment* 637–638, 1279–1285. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.108.

Costanza, R., d’Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., et al. (1997). The value of the world’s ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260. doi: 10.1038/387253a0.

Cotinat, P., Fricano, C., Toullec, G., Röttinger, E., Barnay-Verdier, S., and Furla, P. (2022). Intrinsically High Capacity of Animal Cells From a Symbiotic Cnidarian to Deal With Pro-Oxidative Conditions. *Front. Physiol.* 13, 819111. doi: 10.3389/fphys.2022.819111.

Couteau, C., Diarra, H., and Coiffard, L. (2016). Effect of the product type, of the amount of applied sunscreen product and the level of protection in the UVB range on the level of protection achieved in the UVA range. *International Journal of Pharmaceutics* 500, 210–216. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.041.

Dańko, M. J., Kozłowski, J., and Schaible, R. (2015). Unraveling the non-senescence phenomenon in Hydra. *Journal of Theoretical Biology* 382, 137–149. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.06.043.

Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., et al. (2008). Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. *Environmental Health Perspectives* 116, 441–447. doi: 10.1289/ehp.10966.

Darehshouri, A., Affenzeller, M., and Lütz-Meindl, U. (2008). Cell death upon H₂O₂ induction in the unicellular green alga *Micrasterias*. *Plant Biology* 10, 732–745. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00078.x.

Davies, K. J. (1999). The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: A New Paradigm for Oxidative Stress. *IUBMB Life* 48, 41–47. doi: 10.1080/713803463.

Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279–289. doi: 10.1080/713803728.

Davy, S. K., Allemand, D., and Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 229–261. doi: 10.1128/MMBR.05014-11.

de Caralt, S., Uriz, M. J., and Wijffels, R. H. (2007). Cell culture from sponges: pluripotency and immortality. *Trends in Biotechnology* 25, 467–471. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.08.006.

De Domenico, S., De Rinaldis, G., Paulmery, M., Piraino, S., and Leone, A. (2019). Barrel Jellyfish (*Rhizostoma pulmo*) as Source of Antioxidant Peptides. *Marine Drugs* 17, 134. doi: 10.3390/md17020134.

De Wit, W., and Bigaud, N. (2019). DE LA NATURE AUX HUMAINS : JUSQU'OU IRONT LES PLASTIQUES ? - Revue des études existantes sur l'ingestion de plastiques par les humains. *WWF*.

Di Franco, E., Pierson, P., Di Iorio, L., Calò, A., Cottalorda, J. M., Derijard, B., et al. (2020). Effects of marine noise pollution on Mediterranean fishes and invertebrates: A review. *Marine Pollution Bulletin* 159, 111450. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111450.

Dimond, J. L., Orechovesky, S., Oppenheimer, J., Rodríguez-Ramos, J., and Bingham, B. L. (2017). Photophysiology and hydrogen peroxide generation of the dinoflagellate and chlorophyte symbionts of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 489, 43–47. doi: 10.1016/j.jembe.2017.01.008.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9363–9367. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.

Doney, S. C., Busch, D. S., Cooley, S. R., and Kroeker, K. J. (2020). The Impacts of Ocean Acidification on Marine Ecosystems and Reliant Human Communities. *Annual Review of Environment and Resources* 45, 83–112. doi: 10.1146/annurev-environ-012320-083019.

Dove, S. G., Hoegh-Guldberg, O., and Ranganathan, S. (2001). Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral Reefs* 19, 197–204. doi: 10.1007/PL00006956.

Downs, C. A., DiNardo, J. C., Stien, D., Rodrigues, A. M. S., and Lebaron, P. (2021). Benzophenone Accumulates over Time from the Degradation of Octocrylene in Commercial Sunscreen Products. *Chem. Res. Toxicol.* doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00461.

Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., et al. (2016). Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 265–288. doi: 10.1007/s00244-015-0227-7.

Drábková, M., Admiraal, W., and Maršálek, B. (2007). Combined Exposure to Hydrogen Peroxide and Light Selective Effects on Cyanobacteria, Green Algae, and Diatoms. *Environmental Science & Technology* 41, 309–314. doi: 10.1021/es060746i.

Draper, W. M., and Crosby, D. G. (1983). The photochemical generation of hydrogen peroxide in natural waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 121–126. doi: 10.1007/BF01055010.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

D'Souza, C., Taghian, M., and Lamb, P. (2006). An empirical study on the influence of environmental labels on consumers. *Corporate Communications: An International Journal* 11, 162–173. doi: 10.1108/13563280610661697.

Dubinsky, Z., and Stambler, N. (1996). Marine pollution and coral reefs. *Global Change Biology* 2, 511–526. doi: 10.1111/j.1365-2486.1996.tb00064.x.

Dykens, J. A., Shick, J. M., Benoit, C., Buettner, G. R., and Winston, G. W. (1992). Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae.

Dykens, J. A., and Shick, M. J. (1984). Photobiology of the Symbiotic Sea Anemone, *Anthopleura elegantissima*: Defenses against photodynamic effects, and seasonal photoacclimatization. *The Biological Bulletin*. doi: 10.2307/1541419.

El-Sayed, S. Z., Van Dijken, G. L., and Gonzalez-Rodas, G. (1996). Effects of ultraviolet radiation on marine ecosystems. *International Journal of Environmental Studies* 51, 199–216. doi: 10.1080/00207239608711081.

Fel, J.-P., Lacherez, C., Bensetra, A., Mezzache, S., Béraud, E., Léonard, M., et al. (2019). Photochemical response of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* to some sunscreen ingredients. *Coral Reefs* 38, 109–122. doi: 10.1007/s00338-018-01759-4.

Finch, C. E. (1990). *Longevity, Senescence, and the Genome*. , eds. W. expanded, updated References, and Bibliography Chicago, IL: University of Chicago Press Available at: <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/L/bo3684707.html> [Accessed November 30, 2022].

Finch, C. E. (2009). Update on Slow Aging and Negligible Senescence – A Mini-Review. *GER* 55, 307–313. doi: 10.1159/000215589.

Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany* 154, 134–142. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.05.003.

Frank, U., Rabinowitz, C., and Rinkevich, B. (1994). In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. *Mar. Biol.* 120, 491–499. doi: 10.1007/BF00680224.

Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 23, 2066–2075. doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.

Fricano, C., Röttinger, E., Furla, P., and Barnay-Verdier, S. (2020). Cnidarian Cell Cryopreservation: A Powerful Tool for Cultivation and Functional Assays. *Cells* 9, 2541. doi: 10.3390/cells9122541.

Friedman, L. E., Gilmore, T. D., and Finnerty, J. R. (2018). Intraspecific variation in oxidative stress tolerance in a model cnidarian: Differences in peroxide sensitivity between and within populations of *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE* 13, e0188265. doi: 10.1371/journal.pone.0188265.

Furla, P., and Allemand, D. (2009). Relation de couple au soleil : l'endosymbiose Cnidaires-Dinoflagellé. *Biofutur* 299.

Furla, P., Allemand, D., Shick, J. M., Ferrier-Pagès, C., Richier, S., Plantivaux, A., et al. (2005). The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal. *Integr. Comp. Biol.* 45, 595–604. doi: 10.1093/icb/45.4.595.

Furla, P., Bénazet-Tambutté, S., Jaubert, J., and 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. doi: 10.1152/ajpregu.1998.274.2.R303.

Gago-Ferrero, P., Alonso, M. B., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M., et al. (2013). First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5619–5625. doi: 10.1021/es400675y.

Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., de Rosa, R., and Chera, S. (2006). Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17, 492–502. doi: 10.1016/j.semcd.2006.05.005.

Ganini, D., Hollnagel, H. C., Colepicolo, P., and Barros, M. P. (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide trigger redox-related cyst formation in cultures of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Harmful Algae* 27, 121–129. doi: 10.1016/j.hal.2013.05.002.

Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P., and Sabourault, C. (2011). Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association: Differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *PLoS Genet* 7, e1002187. doi: 10.1371/journal.pgen.1002187.

Gates, R. D., and Muscatine, L. (1992). Three methods for isolating viable anthozoan endoderm cells with their intracellular symbiotic dinoflagellates. *Coral Reefs* 11, 143–145. doi: 10.1007/BF00255468.

Geraldes, V., and Pinto, E. (2021). Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs): Biology, Chemistry and Identification Features. *Pharmaceuticals* 14, 63. doi: 10.3390/ph14010063.

Giraldo, A., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Vidal-Liñán, L., and Beiras, R. (2017). Ecotoxicological Evaluation of the UV Filters Ethylhexyl Dimethyl p-Aminobenzoic Acid and Octocrylene Using Marine Organisms *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis* and *Paracentrotus lividus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 72, 606–611. doi: 10.1007/s00244-017-0399-4.

Gire, V. (2005). La sénescence : Une barrière télomérique à l’immortalité ou une réponse cellulaire aux stress physiologiques ? *Med Sci (Paris)* 21, 491–497. doi: 10.1051/medsci/2005215491.

Goldberg, E. D. (1975). The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6, 111. doi: 10.1016/0025-326X(75)90271-4.

Grasela, J. J., Pomponi, S. A., Rinkevich, B., and Grima, J. (2012). Efforts to develop a cultured sponge cell line: revisiting an intractable problem. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 48, 12–20. doi: 10.1007/s11626-011-9469-5.

Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J., and Bernlohr, D. A. (2008). Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes *. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21837–21841. doi: 10.1074/jbc.R700019200.

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. J. (1996). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by H₂O₂: ROLE IN CELL SURVIVAL FOLLOWING OXIDANT INJURY (*). *Journal of Biological Chemistry* 271, 4138–4142. doi: 10.1074/jbc.271.8.4138.

Häder, D.-P., and Sinha, R. P. (2005). Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 571, 221–233. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.11.017.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters* 307, 108–112. doi: 10.1016/0014-5793(92)80911-Y.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.

Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology* 11, 298–300. doi: 10.1093/geronj/11.3.298.

Haval, G. A., Pekhale, K. D., Perween, N. A., Ghaskadbi, S. M., and Ghaskadbi, S. S. (2020). Excess hydrogen peroxide inhibits head and foot regeneration in hydra by affecting DNA repair and expression of essential genes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 34, e22577. doi: 10.1002/jbt.22577.

Hawkrige, J. M., Pipe, R. K., and Brown, B. E. (2000). Localisation of antioxidant enzymes in the cnidarians *Anemonia viridis* and *Goniopora stokesi*. *Marine Biology* 137, 1–9. doi: 10.1007/s002270000324.

Hayden, C. G. J., Cross, S. E., Anderson, C., Saunders, N. A., and Roberts, M. S. (2005). Sunscreen Penetration of Human Skin and Related Keratinocyte Toxicity after Topical Application. *SPP* 18, 170–174. doi: 10.1159/000085861.

Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

He, S., Grasis, J. A., Nicotra, M. L., Juliano, C. E., and Schnitzler, C. E. (2019a). Cnidofest 2018: the future is bright for cnidarian research. *EvoDevo* 10, 20. doi: 10.1186/s13227-019-0134-5.

He, T., Tsui, M. M. P., Tan, C. J., Ma, C. Y., Yiu, S. K. F., Wang, L. H., et al. (2019b). Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. *Environmental Pollution* 245, 462–471. doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.029.

Henderson, L., and Green, C. (2020). Making sense of microplastics? Public understandings of plastic pollution. *Marine Pollution Bulletin* 152, 110908. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.110908.

Higuchi, T., Fujimura, H., Arakaki, T., and Oomori, T. (2009a). The synergistic effects of hydrogen peroxide and elevated seawater temperature on the metabolic activity of the coral *Galaxea fascicularis*. *Mar Biol* 156, 589–596. doi: 10.1007/s00227-008-1110-0.

Higuchi, T., Fujimura, H., Ikota, H., Arakaki, T., and Oomori, T. (2009b). The effects of hydrogen peroxide on metabolism in the coral *Goniastrea aspera*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 370, 48–55. doi: 10.1016/j.jembe.2008.11.013.

Higuchi, T., Suzuki, Y., and Fujimura, H. (2012). Multiple effects of hydrogen peroxide and temperature on antioxidants and bleaching. in (Cairns, Australia).

Hillyer, K. E., Tumanov, S., Villas-Bôas, S., and Davy, S. K. (2016). Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *Journal of Experimental Biology* 219, 516–527. doi: 10.1242/jeb.128660.

Hoegh-Guldberg, O., Cai, R., Poloczanska, E. S., Brewer, P. G., Sundby, S., Hilmi, K., et al. (2014). *The Ocean*. Cambridge University Press Available at: <https://munin.uit.no/handle/10037/6969> [Accessed December 11, 2022].

Hoegh-Guldberg, O., Poloczanska, E. S., Skirving, W., and Dove, S. (2017). Coral Reef Ecosystems under Climate Change and Ocean Acidification. *Frontiers in Marine Science* 4. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2017.00158> [Accessed October 21, 2022].

Honey, M., and Krantz, D. (2007). Global Trends in Coastal Tourism. *Marine Program World Wildlife Fund Washington, DC*.

Hu, G., Wang, D., Wang, C., and Yang, K. (2008). A novel immortalization vector for the establishment of penaeid shrimp cell lines. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 44, 51–56. doi: 10.1007/s11626-007-9076-7.

Huete-Stauffer, C., Valisano, L., Gaino, E., Vezzulli, L., and Cerrano, C. (2015). Development of long-term primary cell aggregates from Mediterranean octocorals. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 51, 815–826. doi: 10.1007/s11626-015-9896-9.

Hughes, T. P., Kerry, J. T., Baird, A. H., Connolly, S. R., Dietzel, A., Eakin, C. M., et al. (2018). Global warming transforms coral reef assemblages. *Nature* 556, 492–496. doi: 10.1038/s41586-018-0041-2.

Hund-Rinke, K., and Simon, M. (2006). Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids (8 pp). *Env Sci Poll Res Int* 13, 225–232. doi: 10.1065/espr2006.06.311.

Hussain, J. M., Jeevanantham, G., Vinoth, M., Muruganatham, P., and Ahamed, A. K. (2019). Biochemical Response of Microalga *Synechococcus aeruginosus* To Hydrogen Peroxide Stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8, 97–104.

Ikmi, A., McKinney, S. A., Delventhal, K. M., and Gibson, M. C. (2014). TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the early-branching metazoan *Nematostella vectensis*. *Nat Commun* 5, 5486. doi: 10.1038/ncomms6486.

Ishii, N., Senoo-Matsuda, N., Miyake, K., Yasuda, K., Ishii, T., Hartman, P. S., et al. (2004). Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 41–46. doi: 10.1016/j.mad.2003.10.002.

Jaiswal, D., Singh, B., Kant, R., and Biswas, A. (2021). Towards green product consumption: Effect of green marketing stimuli and perceived environmental knowledge in Indian consumer market. *Society and Business Review* 17, 45–65. doi: 10.1108/SBR-05-2021-0081.

Jamieson, A. J., Brooks, L. S. R., Reid, W. D. K., Piertney, S. B., Narayanaswamy, B. E., and Linley, T. D. (2019). Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. *Royal Society Open Science* 6, 180667. doi: 10.1098/rsos.180667.

Ji, J., Tian, Y., Zhu, Y., Zhang, L., Ji, S., Huan, J., et al. (2015). Ionizing irradiation inhibits keloid fibroblast cell proliferation and induces premature cellular senescence. *J Dermatol* 42, 56–63. doi: 10.1111/1346-8138.12702.

Johnson, T. E., de Castro, E., Hegi de Castro, S., Cypser, J., Henderson, S., and Tedesco, P. (2001). Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 36, 1609–1617. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00144-9.

Johnson, T. E., Lithgow, G. J., and Murakami, S. (1996). Hypothesis: Interventions That Increase the Response to Stress Offer the Potential for Effective Life Prolongation and Increased Health. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 51A, B392–B395. doi: 10.1093/gerona/51A.6.B392.

Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., et al. (2014). Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505, 169–173. doi: 10.1038/nature12789.

Jovanović, B., and Guzmán, H. M. (2014). Effects of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on caribbean reef-building coral (*Montastraea faveolata*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1346–1353. doi: 10.1002/etc.2560.

Kass-Simon, G., and Scappaticci, Jr., A. A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. Zool.* 80, 1772–1794. doi: 10.1139/z02-135.

Kawamura, K., Nishitsuji, K., Shoguchi, E., Fujiwara, S., and Satoh, N. (2021). Establishing Sustainable Cell Lines of a Coral, *Acropora tenuis*. *Mar Biotechnol.* doi: 10.1007/s10126-021-10031-w.

Khalesi, M. K., Vera-Jiménez, N. I., Aanen, D. K., Beeftink, H. H., and Wijffels, R. H. (2008). Cell cultures from the symbiotic soft coral *Sinularia flexibilis*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44, 330–338. doi: 10.1007/s11626-008-9128-7.

Kim, S., and Choi, K. (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environment International* 70, 143–157. doi: 10.1016/j.envint.2014.05.015.

Kleypas, J. A. (2019). Climate change and tropical marine ecosystems: A review with an emphasis on coral reefs. *Cuadernos de Investigación UNED* 11, 24–35.

Knowlton, N., Brainard, R. E., Fisher, R., Moews, M., Plaisance, L., and Caley, M. J. (2010). “Coral Reef Biodiversity,” in *Life in the World’s Oceans* (John Wiley & Sons, Ltd), 65–78. doi: 10.1002/9781444325508.ch4.

Koike, M., Yutoku, Y., and Koike, A. (2021). Inhibition of Crandell-Rees Feline Kidney cell proliferation by X-ray-induced senescence. *J. Vet. Med. Sci.* 83, 798–804. doi: 10.1292/jvms.20-0679.

Kopecky, E. J., and Ostrander, G. K. (1999). Isolation and primary culture of viable multicellular endothelial isolates from hard corals. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35, 616–624. doi: 10.1007/s11626-999-0101-x.

Krause, M., Klit, A., Blomberg Jensen, M., Søbørg, T., Frederiksen, H., Schlumpf, M., et al. (2012). Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *International Journal of Andrology* 35, 424–436. doi: 10.1111/j.1365-2605.2012.01280.x.

Krief, S., Hendy, E. J., Fine, M., Yam, R., Meibom, A., Foster, G. L., et al. (2010). Physiological and isotopic responses of scleractinian corals to ocean acidification. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 4988–5001. doi: 10.1016/j.gca.2010.05.023.

Krinsky, N. I., and Lenhoff, H. M. (1965). Some carotenoids in hydra. *Comparative Biochemistry and Physiology* 16, 189–198. doi: 10.1016/0010-406X(65)90058-7.

Kudłak, B., Jatkowska, N., Liu, W., Williams, M. J., Barcelo, D., and Schiöth, H. B. (2022). Enhanced Toxicity of Bisphenols Together with UV Filters in Water: Identification of Synergy and Antagonism in Three-Component Mixtures. *Molecules* 27, 3260. doi: 10.3390/molecules27103260.

Kunze, G., Schlifke, A., Hefner, N., Jackson, E., Berg, K., Janssen, A., et al. (2021). New Method for Connecting Sunscreens with Consumers via a Relative Eco-score. *SOFW Journal* 147.

Labuschagne, C. F., and Brenkman, A. B. (2013). Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Research Reviews* 12, 918–930. doi: 10.1016/j.arr.2013.09.003.

Laguionie-Marchais, C., Allcock, A. L., Baker, B. J., Conneely, E.-A., Dietrick, S. G., Kearns, F., et al. (2022). Not Drug-like, but Like Drugs: Cnidaria Natural Products. *Marine Drugs* 20, 42. doi: 10.3390/md20010042.

LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., Jeong, H. J., Reimer, J. D., Voolstra, C. R., et al. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology* 28, 2570-2580.e6. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.008.

LaJeunesse, T. C., Wiedenmann, J., Casado-Amezúa, P., D’Ambra, I., Turnham, K. E., Nitschke, M. R., et al. (2021). Revival of Philozoon Geddes for host-specialized dinoflagellates, ‘zooxanthellae’, in animals from coastal temperate zones of northern and southern hemispheres. *European Journal of Phycology* 0, 1–15. doi: 10.1080/09670262.2021.1914863.

Landrigan, P. J., Stegeman, J. J., Fleming, L. E., Allemand, D., Anderson, D. M., Backer, L. C., et al. (2020). Human Health and Ocean Pollution. *Annals of Global Health* 86, 151. doi: 10.5334/aogh.2831.

Larsen, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8905–8909. doi: 10.1073/pnas.90.19.8905.

Latifi, A., Jeanjean, R., Lemeille, S., Havaux, M., and Zhang, C.-C. (2005). Iron Starvation Leads to Oxidative Stress in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol* 187, 6596–6598. doi: 10.1128/JB.187.18.6596-6598.2005.

Lebedev, A. T., Bavcon Kralj, M., Polyakova, O. V., Detenchuk, E. A., Pokryshkin, S. A., and Trebše, P. (2020). Identification of avobenzone by-products formed by various disinfectants in different types of swimming pool waters. *Environment International* 137, 105495. doi: 10.1016/j.envint.2020.105495.

Lebreton, L. C. M., van der Zwet, J., Damsteeg, J.-W., Slat, B., Andrady, A., and Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world’s oceans. *Nat Commun* 8, 15611. doi: 10.1038/ncomms15611.

Lesser, M. P. (2011). “Coral Bleaching: Causes and Mechanisms,” in *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*, eds. Z. Dubinsky and N. Stambler (Dordrecht: Springer Netherlands), 405–419. doi: 10.1007/978-94-007-0114-4_23.

Levy, S., Elek, A., Grau-Bové, X., Menéndez-Bravo, S., Iglesias, M., Tanay, A., et al. (2021). A stony coral cell atlas illuminates the molecular and cellular basis of coral symbiosis, calcification, and immunity. *Cell* 184, 2973-2987.e18. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.005.

Lewis, C., Neely, K., and Rodriguez-Lanetty, M. (2019). Recurring Episodes of Thermal Stress Shift the Balance From a Dominant Host-Specialist to a Background Host-Generalist Zooxanthella in the Threatened Pillar Coral, *Dendrogyra cylindrus*. *Frontiers in Marine Science* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.00005> [Accessed November 10, 2022].

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

Lovas, J. R., and Yuste, R. (2022). Dissociation and reaggregation of *Hydra vulgaris* for studies of self-organization. *STAR Protocols* 3, 101504. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101504.

Lozano, C., Matallana-Surget, S., Givens, J., Nouet, S., Arbuckle, L., Lambert, Z., et al. (2020). Toxicity of UV filters on marine bacteria: Combined effects with damaging solar radiation. *Science of The Total Environment* 722, 137803. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137803.

Lozano-Bilbao, E., Espinosa, J. M., Lozano, G., Hardisson, A., Rubio, C., González-Weller, D., et al. (2020). Determination of metals in *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777) as a pollution bioindicator. *Environ Sci Pollut Res* 27, 21621–21627. doi: 10.1007/s11356-020-08684-6.

Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P., and Weinberg, R. A. (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 705–709. doi: 10.1016/S0955-0674(00)00155-1.

Mao, F., He, Y., Kushmaro, A., and Gin, K. Y.-H. (2017). Effects of benzophenone-3 on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 193, 1–8. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.09.029.

Martínez, D. E. (1998). Mortality Patterns Suggest Lack of Senescence in *Hydra*. *Experimental Gerontology* 33, 217–225. doi: 10.1016/S0531-5565(97)00113-7.

Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S. L., Péan, C., Berger, S., et al. eds. (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press doi: 10.1017/9781009157896.

McCoshum, S. M., Schlarb, A. M., and Baum, K. A. (2016). Direct and indirect effects of sunscreen exposure for reef biota. *Hydrobiologia* 776, 139–146. doi: 10.1007/s10750-016-2746-2.

McDowell, R. E., Amsler, C. D., McClintock, J. B., and Baker, B. J. (2014). Reactive oxygen species as a marine grazing defense: H₂O₂ and wounded *Ascoseira mirabilis* both inhibit feeding by an amphipod grazer. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 458, 34–38. doi: 10.1016/j.jembe.2014.04.012.

Mearns-Spragg, A., Tilman, J., Tams, D., and Barnes, A. (2020). The Biological Evaluation of Jellyfish Collagen as a New Research Tool for the Growth and Culture of iPSC Derived Microglia. *Frontiers in Marine Science* 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.00689> [Accessed September 7, 2022].

Merle, P.-L., Sabourault, C., Richier, S., Allemand, D., and Furla, P. (2007). Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine* 42, 236–246. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.038.

Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 27, 405–412. doi: 10.1051/medsci/2011274017.

Miller, I. B., Moeller, M., Kellermann, M. Y., Nietzer, S., Di Mauro, V., Kamyab, E., et al. (2022). Towards the Development of Standardized Bioassays for Corals: Acute Toxicity of the UV Filter Benzophenone-3 to Scleractinian Coral Larvae. *Toxics* 10, 244. doi: 10.3390/toxics10050244.

Miller, R. J., Lenihan, H. S., Muller, E. B., Tseng, N., Hanna, S. K., and Keller, A. A. (2010). Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ Sci Technol* 44, 7329–7334. doi: 10.1021/es100247x.

Mitchelmore, C. L., and Hyatt, S. (2004). Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Marine Environmental Research* 58, 707–711. doi: 10.1016/j.marenvres.2004.03.019.

Monsinjon, T., and Knigge, T. (2007). Proteomic applications in ecotoxicology. *PROTEOMICS* 7, 2997–3009. doi: 10.1002/pmic.200700101.

Morris, J. J., Rose, A. L., and Lu, Z. (2022). Reactive oxygen species in the world ocean and their impacts on marine ecosystems. *Redox Biology* 52, 102285. doi: 10.1016/j.redox.2022.102285.

Morse, D. E., and Morse, A. N. C. (1991). Enzymatic Characterization of the Morphogen Recognized by *Agaricia humilis* (Scleractinian Coral) Larvae. *The Biological Bulletin* 181, 104–122. doi: 10.2307/1542493.

Moya, A., Ganot, P., Furla, P., and 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.

Mrosovsky, N., Ryan, G. D., and James, M. C. (2009). Leatherback turtles: The menace of plastic. *Marine Pollution Bulletin* 58, 287–289. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.10.018.

Muralikrishna, I. V., and Manickam, V. (2017). “Chapter Eighteen - Analytical Methods for Monitoring Environmental Pollution,” in *Environmental Management*, eds. I. V. Muralikrishna and V. Manickam (Butterworth-Heinemann), 495–570. doi: 10.1016/B978-0-12-811989-1.00018-X.

Muscatine, L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Ecosyst. world* 25, 75–87.

Muscatine, L., Ferrier-Pagès, C., Blackburn, A., Gates, R. D., Baghdasarian, G., and Allemand, D. (1998). Cell-specific density of symbiotic dinoflagellates in tropical anthozoans. *Coral Reefs* 17, 329–337. doi: 10.1007/s003380050133.

Neumann, B., Vafeidis, A. T., Zimmermann, J., and Nicholls, R. J. (2015). Future Coastal Population Growth and Exposure to Sea-Level Rise and Coastal Flooding - A Global Assessment. *PLOS ONE* 10, e0118571. doi: 10.1371/journal.pone.0118571.

Nienhuis, S., Palmer, A. R., and Harley, C. D. G. (2010). Elevated CO₂ affects shell dissolution rate but not calcification rate in a marine snail. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277, 2553–2558. doi: 10.1098/rspb.2010.0206.

Nørgaard, K. B., and Cedergreen, N. (2010). Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environ Sci Pollut Res* 17, 957–967. doi: 10.1007/s11356-009-0284-4.

Nowotny, J. D., Connelly, M. T., and Traylor-Knowles, N. (2021). Novel methods to establish whole-body primary cell cultures for the cnidarians *Nematostella vectensis* and *Pocillopora damicornis*. *Sci Rep* 11, 4086. doi: 10.1038/s41598-021-83549-7.

Noyes, P. D., and Lema, S. C. (2015). Forecasting the impacts of chemical pollution and climate change interactions on the health of wildlife. *Current Zoology* 61, 669–689. doi: 10.1093/czoolo/61.4.669.

OCDE (1992). *Essai n° 306: Biodégradabilité dans l'eau de mer*. OECD doi: 10.1787/9789264070493-fr.

O'Connor, M. I., Bruno, J. F., Gaines, S. D., Halpern, B. S., Lester, S. E., Kinlan, B. P., et al. (2007). Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 1266–1271. doi: 10.1073/pnas.0603422104.

Odintsova, N. A., Ermak, A. V., and Tsal, L. G. (1994). Substrate selection for long-term cultivation of marine invertebrate cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 107, 613–619. doi: 10.1016/0300-9629(94)90360-3.

Odintsova, N. A., and Khomenko, A. V. (1991). Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia). *Cytotechnology* 6, 49–54. doi: 10.1007/BF00353702.

O'Keefe, S. J., Feltis, B. N., Piva, T. J., Turney, T. W., and Wright, P. F. A. (2016). ZnO nanoparticles and organic chemical UV-filters are equally well tolerated by human immune cells. *Nanotoxicology* 10, 1287–1296. doi: 10.1080/17435390.2016.1206148.

Ouédraogo, D.-Y., Delaunay, M., Sordello, R., Hédouin, L., Castelin, M., Perceval, O., et al. (2021). Evidence on the impacts of chemicals arising from human activity on tropical reef-building corals; a systematic map. *Environmental Evidence* 10, 22. doi: 10.1186/s13750-021-00237-9.

Ousley, S., de Beer, D., Bejarano, S., and Chennu, A. (2022). High-Resolution Dynamics of Hydrogen Peroxide on the Surface of Scleractinian Corals in Relation to Photosynthesis and Feeding. *Frontiers in Marine Science* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.812839> [Accessed December 11, 2022].

Palmer, C. V., Modi, C. K., and Mydlarz, L. D. (2009). Coral Fluorescent Proteins as Antioxidants. *PLOS ONE* 4, e7298. doi: 10.1371/journal.pone.0007298.

Panganiban, R. A. M., Mungunsukh, O., and Day, R. M. (2013). X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *International Journal of Radiation Biology* 89, 656–667. doi: 10.3109/09553002.2012.711502.

Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J. B., and Beiras, R. (2014). Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere* 104, 44–50. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.053.

Park, C.-B., Jang, J., Kim, S., and Kim, Y. J. (2017). Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 57–63. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.11.017.

Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Pörtner, H. O., Scanes, E., and Wright, J. M. (2013). Predicting the Response of Molluscs to the Impact of Ocean Acidification. *Biology* 2, 651–692. doi: 10.3390/biology2020651.

Pascual-Torner, M., Carrero, D., Pérez-Silva, J. G., Álvarez-Puente, D., Roiz-Valle, D., Bretones, G., et al. (2022). Comparative genomics of mortal and immortal cnidarians unveils novel keys behind rejuvenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2118763119. doi: 10.1073/pnas.2118763119.

Patel, N., Khan, M. Z. A., Shahane, S., Rai, D., Chauhan, D., Kant, C., et al. (2020). Emerging Pollutants in Aquatic Environment: Source, Effect, and Challenges in Biomonitoring and Bioremediation- A Review. *Pollution* 6, 99–113. doi: 10.22059/poll.2019.285116.646.

Patz, J., Olson, S., and Gray, A. L. (2006). Climate Change, Oceans, and Human Health. *Oceanography* 19, 52–59. doi: 10.5670/oceanog.2006.64.

Peeken, I., Primpke, S., Beyer, B., Gütermann, J., Katlein, C., Krumpfen, T., et al. (2018). Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nat Commun* 9, 1505. doi: 10.1038/s41467-018-03825-5.

Pense-Lheritier, A.-M. (2013). Innovation et éco-conception pour les produits de l'industrie cosmétique: *Marché et organisations* N° 17, 137–147. doi: 10.3917/maorg.017.0137.

Petralia, R. S., Mattson, M. P., and Yao, P. J. (2014). Aging and longevity in the simplest animals and the quest for immortality. *Ageing Research Reviews* 16, 66–82. doi: 10.1016/j.arr.2014.05.003.

Pey, A., Zamoum, T., Christen, R., Merle, P.-L., and Furla, P. (2017). Characterization of glutathione peroxidase diversity in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Biochimie* 132, 94–101. doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.016.

Pfannkuchen, M., and Brümmer, F. (2009). Heterologous expression of DsRed2 in young sponges (Porifera). *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1113–1117. doi: 10.1387/ijdb.072526mp.

Picot Groz, M., Martinez Bueno, M. J., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., et al. (2014). Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Science of The Total Environment* 493, 162–169. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.062.

Piraino, S., Boero, F., Aeschbach, B., and Schmid, V. (1996). Reversing the Life Cycle: Medusae Transforming into Polyps and Cell Transdifferentiation in *Turritopsis nutricula* (Cnidaria, Hydrozoa). *Biol Bull* 190, 302–312. doi: 10.2307/1543022.

Plantivaux, A., Furla, P., Zoccola, D., Garello, G., Forcioli, D., Richier, S., et al. (2004). Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1170–1181. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.043.

Plessier, F., Schmutz, S., Novault, S., and Marlow, H. (2022). “Single-Cell Transcriptomic Analysis in the Regenerating Cnidarian *Nematostella vectensis*,” in *Whole-Body Regeneration: Methods and Protocols* Methods in Molecular Biology., eds. S. Blanchoud and B. Galliot (New York, NY: Springer US), 565–581. doi: 10.1007/978-1-0716-2172-1_30.

Pomponi, S. A., Willoughby, R., and Kelly-Borges, M. (1998). “Sponge Cell Culture,” in *Molecular Approaches to the Study of the Ocean*, ed. K. E. Cooksey (Dordrecht: Springer Netherlands), 423–433. doi: 10.1007/978-94-011-4928-0_22.

Rahbar, E., and Abdul Wahid, N. (2011). Investigation of green marketing tools’ effect on consumers’ purchase behavior. *Business Strategy Series* 12, 73–83. doi: 10.1108/17515631111114877.

Reddy, P. C., Gungi, A., and Unni, M. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms of Hydra Regeneration. *Results Probl Cell Differ* 68, 259–290. doi: 10.1007/978-3-030-23459-1_12.

Regoli, F., and Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research* 93, 106–117. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006.

Revel, J., Massi, L., Mehiri, M., Boutoute, M., Mayzaud, P., Capron, L., et al. (2016). Differential distribution of lipids in epidermis, gastrodermis and hosted Symbiodinium in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 191, 140–151. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.10.017.

Reverter, M., Rohde, S., Parchemin, C., Tapissier-Bontemps, N., and Schupp, P. J. (2020). Metabolomics and Marine Biotechnology: Coupling Metabolite Profiling and Organism Biology for the Discovery of New Compounds. *Frontiers in Marine Science* 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.613471> [Accessed December 12, 2022].

Richardson, A. J., Bakun, A., Hays, G. C., and Gibbons, M. J. (2009). The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends Ecol Evol* 24, 312–322. doi: 10.1016/j.tree.2009.01.010.

Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P.-L., and Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 208, 277–285. doi: 10.1242/jeb.01368.

Richier, S., Merle, P.-L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F., and Allemand, D. (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1621, 84–91. doi: 10.1016/S0304-4165(03)00049-7.

Richier, S., Rodriguez-Lanetty, M., Schnitzler, C. E., and Weis, V. M. (2008). Response of the symbiotic cnidarian *Anthopleura elegantissima* transcriptome to temperature and UV increase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 3, 283–289. doi: 10.1016/j.cbd.2008.08.001.

Richier, S., Sabourault, C., Courtiade, J., Zucchini, N., Allemand, D., and Furla, P. (2006). Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *The FEBS Journal* 273, 4186–4198. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05414.x.

Rigano, L. (2014). ‘Very’ Water-resistant Sunscreens. *COSMETICS & TOILETRIES*. Available at: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulas-products/sun-care/article/21836290/very-water-resistant-sunscreens>.

Rinkevich, B. (1999). Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *Journal of Biotechnology* 70, 133–153. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00067-X.

Rinkevich, B. (2005). Marine Invertebrate Cell Cultures: New Millennium Trends. *Mar Biotechnol* 7, 429–439. doi: 10.1007/s10126-004-0108-y.

Rinkevich, B. (2011). Cell Cultures from Marine Invertebrates: New Insights for Capturing Endless Stemness. *Mar Biotechnol* 13, 345–354. doi: 10.1007/s10126-010-9354-3.

Roark, E. B., Guilderson, T. P., Dunbar, R. B., Fallon, S. J., and Mucciarone, D. A. (2009). Extreme longevity in proteinaceous deep-sea corals. *PNAS* 106, 5204–5208. doi: 10.1073/pnas.0810875106.

Roberty, S., Fransolet, D., Cardol, P., Plumier, J.-C., and Franck, F. (2015). Imbalance between oxygen photoreduction and antioxidant capacities in Symbiodinium cells exposed to combined heat and high light stress. *Coral Reefs* 34, 1063–1073. doi: 10.1007/s00338-015-1328-5.

Roberty, S., Furla, P., and Plumier, J.-C. (2016). Differential antioxidant response between two Symbiodinium species from contrasting environments. *Plant, Cell & Environment* 39, 2713–2724. doi: 10.1111/pce.12825.

Rodriguez Hernandez, J. A. (2020). Holothurian Primary Muscle Cell Culture Enhancement: Cell Adhesion, Sorting and Application.

Rosental, B., Kozhekbaeva, Z., Fernhoff, N., Tsai, J. M., and Traylor-Knowles, N. (2017). Coral cell separation and isolation by fluorescence-activated cell sorting (FACS). *BMC Cell Biol* 18, 30. doi: 10.1186/s12860-017-0146-8.

Rosner, A., Armengaud, J., Ballarin, L., Barnay-Verdier, S., Cima, F., Coelho, A. V., et al. (2021). Stem cells of aquatic invertebrates as an advanced tool for assessing ecotoxicological impacts. *Science of The Total Environment* 771, 144565. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144565.

Ross, C., Fogarty, N. D., Ritson-Williams, R., and Paul, V. J. (2017). Interspecific Variation in Coral Settlement and Fertilization Success in Response to Hydrogen Peroxide Exposure. *The Biological Bulletin* 233, 206–218. doi: 10.1086/696215.

Röttinger, E. (2021). *Nematostella vectensis*, an Emerging Model for Deciphering the Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Whole-Body Regeneration. *Cells* 10, 2692. doi: 10.3390/cells10102692.

Rouan, A., Pousse, M., Tambutté, E., Djerbi, N., Zozaya, W., Capasso, L., et al. (2022). Telomere dysfunction is associated with dark-induced bleaching in the reef coral *Stylophora pistillata*. *Molecular Ecology* 31, 6087–6099. doi: 10.1111/mec.16199.

Roux, P.-F., and Bischof, O. (2019). La sénescence, une destinée cellulaire aux multiples visages. *Planet-Vie*. Available at: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/physiologie-cellulaire/la-senescence-une-destinee-cellulaire-aux> [Accessed November 16, 2022].

Roxy, M. K., Modi, A., Murtugudde, R., Valsala, V., Panickal, S., Prasanna Kumar, S., et al. (2016). A reduction in marine primary productivity driven by rapid warming over the tropical Indian Ocean. *Geophys. Res. Lett.* 43, 826–833. doi: 10.1002/2015GL066979.

Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., et al. (2007). Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 49–89. doi: 10.1089/ars.2007.9.49.

Saikumar, P., Dong, Z., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (1998). Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17, 3341–3349. doi: 10.1038/sj.onc.1202579.

Sander, M., Sander, M., Burbidge, T., and Beecker, J. (2021). Efficacité et innocuité des écrans solaires pour la prévention du cancer de la peau. *CMAJ* 193, E348–E354. doi: 10.1503/cmaj.201085-f.

Sanders, S. M., Ma, Z., Hughes, J. M., Riscoe, B. M., Gibson, G. A., Watson, A. M., et al. (2018). CRISPR/Cas9-mediated gene knockin in the hydroid *Hydractinia symbiolongicarpus*. *BMC Genomics* 19, 649. doi: 10.1186/s12864-018-5032-z.

Santos, A. J. M., Miranda, M. S., and Esteves da Silva, J. C. G. (2012). The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research* 46, 3167–3176. doi: 10.1016/j.watres.2012.03.057.

Sarigiannis, D. A., and Hansen, U. (2012). Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals – A challenge for policy makers. *Environ Health* 11, S18. doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S18.

Schaible, R., Sussman, M., and Kramer, B. H. (2014). Aging and Potential for Self-Renewal: Hydra Living in the Age of Aging - A Mini-Review. *GER* 60, 548–556. doi: 10.1159/000360397.

Schenkelaars, Q., Tomczyk, S., Wenger, Y., Ekundayo, K., Girard, V., Buzgariu, W., et al. (2018). “Chapter 38 - Hydra, a Model System for Deciphering the Mechanisms of Aging and Resistance to Aging,” in *Conn’s Handbook of Models for Human Aging (Second Edition)*, eds. J. L. Ram and P. M. Conn (Academic Press), 507–520. doi: 10.1016/B978-0-12-811353-0.00038-5.

Schmitt, C. A. (2007). Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1775, 5–20. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.005.

Schwarz, J., Weis, V., and Potts, D. (2002). Feeding behavior and acquisition of zooxanthellae by planula larvae of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Marine Biology* 140, 471–478. doi: 10.1007/s00227-001-0736-y.

Sebé-Pedrés, A., Saudemont, B., Chomsky, E., Plessier, F., Mailhé, M.-P., Renno, J., et al. (2018). Cnidarian Cell Type Diversity and Regulation Revealed by Whole-Organism Single-Cell RNA-Seq. *Cell* 173, 1520-1534.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.019.

Severino, J., Allen, R. G., Balin, S., Balin, A., and Cristofalo, V. J. (2000). Is β -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Experimental Cell Research* 257, 162–171. doi: 10.1006/excr.2000.4875.

Shashar, N., Cohen, Y., and Loya, Y. (1993). Extreme Diel Fluctuations of Oxygen in Diffusive Boundary Layers Surrounding Stony Corals. *Biol Bull* 185, 455–461. doi: 10.2307/1542485.

Shiomi, K., Qian, W.-H., Lin, X.-Y., Shimakura, K., Nagashima, Y., and Ishida, M. (1997). Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1335, 191–198. doi: 10.1016/S0304-4165(96)00137-7.

Shrestha, G., Traina, S. J., and Swanston, C. W. (2010). Black Carbon's Properties and Role in the Environment: A Comprehensive Review. *Sustainability* 2, 294–320. doi: 10.3390/su2010294.

Siebert, S., Farrell, J. A., Cazet, J. F., Abeykoon, Y., Primack, A. S., Schnitzler, C. E., et al. (2019). Stem cell differentiation trajectories in Hydra resolved at single-cell resolution. *Science* 365, eaav9314. doi: 10.1126/science.aav9314.

Silverstein, R. N., Cunning, R., and Baker, A. C. (2015). Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Global Change Biology* 21, 236–249. doi: 10.1111/gcb.12706.

Smii, H., Khazri, A., Ben Ali, M., Mezni, A., Hedfi, A., Albogami, B., et al. (2021). Titanium Dioxide Nanoparticles Are Toxic for the Freshwater Mussel *Unio ravoisieri*: Evidence from a Multimarker Approach. *Diversity* 13, 679. doi: 10.3390/d13120679.

Smith, D. J., Suggett, D. J., and Baker, N. R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology* 11, 1–11. doi: 10.1111/j.1529-8817.2003.00895.x.

Stahl, W., and Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24, 345–351. doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X.

Steinke, M., Brading, P., Kerrison, P., Warner, M. E., and Suggett, D. J. (2011). Concentrations of Dimethylsulfoniopropionate and Dimethyl Sulfide Are Strain-Specific in Symbiotic Dinoflagellates (symbiodinium Sp., Dinophyceae)1. *Journal of Phycology* 47, 775–783. doi: 10.1111/j.1529-8817.2011.01011.x.

Stenvinkel, P., and Shiels, P. G. (2019). Long-lived animals with negligible senescence: clues for ageing research. *Biochemical Society Transactions* 47, 1157–1164. doi: 10.1042/BST20190105.

Stien, D., Clergeaud, F., Rodrigues, A. M. S., Lebaron, K., Pillot, R., Romans, P., et al. (2018). Metabolomics Reveal That Octocrylene Accumulates in *Pocillopora damicornis* Tissues as Fatty Acid Conjugates and Triggers Coral Cell Mitochondrial Dysfunction. *Analytical Chemistry* 91, 990–995. doi: 10.1021/acs.analchem.8b04187.

Stien, D., Suzuki, M., Rodrigues, A. M. S., Yvin, M., Clergeaud, F., Thorel, E., et al. (2020). A unique approach to monitor stress in coral exposed to emerging pollutants. *Sci Rep* 10, 9601. doi: 10.1038/s41598-020-66117-3.

Stuart, J. A., and Brown, M. F. (2006). Energy, quiescence and the cellular basis of animal life spans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 143, 12–23. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.11.002.

Suggett, D. J., Warner, M. E., Smith, D. J., Davey, P., Hennige, S., and Baker, N. R. (2008). Photosynthesis and Production of Hydrogen Peroxide by Symbiodinium (Pyrrophyta) Phylotypes with Different Thermal Tolerances. *Journal of Phycology* 44, 948–956. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x.

Sullivan, J. C., Ryan, J. F., Watson, J. A., Webb, J., Mullikin, J. C., Rokhsar, D., et al. (2006). StellaBase: The *Nematostella vectensis* Genomics Database. *Nucleic Acids Research* 34, D495–D499. doi: 10.1093/nar/gkj020.

Sun, S., White, R. R., Fischer, K. E., Zhang, Z., Austad, S. N., and Vijg, J. (2020). Inducible aging in *Hydra oligactis* implicates sexual reproduction, loss of stem cells, and genome maintenance as major pathways. *GeroScience* 42, 1119–1132. doi: 10.1007/s11357-020-00214-z.

Tardent, P. (1995). The cnidarian cnidocyte, a hightech cellular weaponry. *BioEssays* 17, 351–362. doi: 10.1002/bies.950170411.

Technau, U., and Steele, R. E. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development* 138, 1447–1458. doi: 10.1242/dev.048959.

Teodori, L., Giovanetti, A., Albertini, M. C., Rocchi, M., Perniconi, B., Valente, M. G., et al. (2014). Static magnetic fields modulate X-ray-induced DNA damage in human glioblastoma primary cells. *Journal of Radiation Research* 55, 218–227. doi: 10.1093/jrr/rrt107.

Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S., and Gokula, V. (2018). Sea Anemones as Potential Source for Bioactive Metabolites. *Int J Pept Res Ther* 25, 591–604. doi: 10.1007/s10989-018-9705-x.

Thorel, E., Clergeaud, F., Jaugeon, L., Rodrigues, A. M. S., Lucas, J., Stien, D., et al. (2020). Effect of 10 UV Filters on the Brine Shrimp *Artemia salina* and the Marine Microalga *Tetraselmis* sp. *Toxics* 8, 29. doi: 10.3390/toxics8020029.

Tkachenko, K. S. (2017). Coral reefs in the face of ecological threats of the 21st century. *Biol Bull Rev* 7, 64–83. doi: 10.1134/S2079086416050091.

Tökölyi, J., Rosa, M. E., Bradács, F., and Barta, Z. (2014). Life history trade-offs and stress tolerance in green hydra (*Hydra viridissima* Pallas 1766): the importance of nutritional status and perceived population density. *Ecol Res* 29, 867–876. doi: 10.1007/s11284-014-1176-8.

Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., et al. (2013). Sunscreen Products as Emerging Pollutants to Coastal Waters. *PLOS ONE* 8, e65451. doi: 10.1371/journal.pone.0065451.

Trembley, A., Pronk, C., Schley, J. van der, and Lyonet, P. (1744). *Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes*. A Leide: Chez Jean & Herman Verbeek doi: 10.5962/bhl.title.64073.

- Vandepas, L. E., Warren, K. J., Amemiya, C. T., and Browne, W. E. (2017). Establishing and maintaining primary cell cultures derived from the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Journal of Experimental Biology* 220, 1197–1201. doi: 10.1242/jeb.152371.
- Vanfleteren, J. R. (1993). Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal* 292, 605–608. doi: 10.1042/bj2920605.
- Vavilala, S. L., Gawde, K. K., Sinha, M., and D'Souza, J. S. (2015). Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology* 50, 422–438. doi: 10.1080/09670262.2015.1070437.
- Venn, A. A., Tambutté, E., Lotto, S., Zoccola, D., Allemand, D., and Tambutté, S. (2009). Imaging intracellular pH in a reef coral and symbiotic anemone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 16574–16579. doi: 10.1073/pnas.0902894106.
- Ventura, P., Jarrold, M. D., Merle, P.-L., Barnay-Verdier, S., Zamoum, T., Rodolfo-Metalpa, R., et al. (2016). Resilience to ocean acidification: decreased carbonic anhydrase activity in sea anemones under high pCO₂ conditions. *Marine Ecology Progress Series* 559, 257–263. doi: 10.3354/meps11916.
- Ventura, P. N. M. (2016). Phenotypic plasticity in the symbiotic cnidarian *Anemonia viridis*: stress response at multiple levels of structural complexity. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01674220> [Accessed January 22, 2020].
- Ventura, P., Toullec, G., Fricano, C., Chapron, L., Meunier, V., Röttinger, E., et al. (2018). Cnidarian Primary Cell Culture as a Tool to Investigate the Effect of Thermal Stress at Cellular Level. *Mar Biotechnol* 20, 144–154. doi: 10.1007/s10126-017-9791-3.
- Walker, C. H. (2008). Ecotoxicity testing: science, politics and ethics. *Altern Lab Anim* 36, 103–112. doi: 10.1177/026119290803600111.
- Walton, A., and Smith, V. J. (1999). Primary culture of the hyaline haemocytes from marine decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 181–194. doi: 10.1006/fsim.1998.0184.
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology* 211, 3059–3066. doi: 10.1242/jeb.009597.
- Wijgerde, T., van Ballegooijen, M., Nijland, R., van der Loos, L., Kwadijk, C., Osinga, R., et al. (2020). Adding insult to injury: Effects of chronic oxybenzone exposure and elevated temperature on two reef-building corals. *Science of The Total Environment* 733, 139030. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139030.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution* 178, 483–492. doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- Xiang, J., Wan, C., Guo, R., and Guo, D. (2016). Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *Biomed Res Int* 2016, 7343965. doi: 10.1155/2016/7343965.
- Yang, C., Lim, W., Bazer, F. W., and Song, G. (2018). Avobenzone suppresses proliferative activity of human trophoblast cells and induces apoptosis mediated by mitochondrial disruption. *Reproductive Toxicology* 81, 50–57. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.07.003.

Yellowlees, D., Rees, T. A. V., and Leggat, W. (2008). Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell & Environment* 31, 679–694. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x.

Ying, H., Hayward, D. C., Cooke, I., Wang, W., Moya, A., Siemering, K. R., et al. (2019). The Whole-Genome Sequence of the Coral *Acropora millepora*. *Genome Biology and Evolution* 11, 1374–1379. doi: 10.1093/gbe/evz077.

Zamoum, T., and Furla, P. (2012). Symbiodinium isolation by NaOH treatment. *Journal of Experimental Biology*, jeb.074955. doi: 10.1242/jeb.074955.

Ziarrusta, H., Mijangos, L., Picart-Armada, S., Irazola, M., Perera-Lluna, A., Usobiaga, A., et al. (2018). Non-targeted metabolomics reveals alterations in liver and plasma of gilt-head bream exposed to oxybenzone. *Chemosphere* 211, 624–631. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.013.