

THESE DE DOCTORAT D'AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Ecole Doctorale Sciences de La Vie et de la Santé

Présentée par

Ludovic SAWELEW

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

Spécialité : biologie végétale

La palytoxine chez les Zoantharia (Cnidaria) : biodiversité des organismes producteurs et activité anticancéreuse de la toxine

Soutenue à huis clos le 2 octobre 2017 devant le jury composé de :

Mme Patricia BONIN, Directrice de Recherche, CNRS

M. Denis ALLEMAND, Professeur, Centre Scientifique de Monaco

M. Mohamed MEHIRI, Maître de Conférence, Univ. Nice Sophia Antipolis

M. Jean LORQUIN, Ingénieur de Recherche, IRD

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO)

Laboratoire de Biochimie Structurale & Bio-Procédés
Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
UMR235-IRD/7294-CNRS/AMU/Univ de Toulon
Aix-Marseille Université, Polytech, Case 925,
163 Av de Luminy, 13288 Marseille cedex 9

Coral Biome

Grand Luminy Technopôle
Zone Entreprises Biotech,
Case 922, 163 Av de Luminy,
13288 Marseille cedex 9



Remerciements

Premièrement je tiens à exprimer ma gratitude à M. Yvan PEREZ sans qui je n'aurais jamais eu l'occasion de réaliser cette thèse. Lorsque j'ai décroché une bourse de mobilité européenne en 2013 pour effectuer un stage professionnalisant post master, tu m'as accueilli pendant 6 mois à l'IMBE et tu as su me transmettre une partie de ton immense passion pour l'étude et la culture des coraux. Après m'avoir présenté l'équipe de Coral Biome, nous avons envisagé la réalisation d'un travail à plus long terme et c'est ainsi, qu'un an et demi, et beaucoup de démarches administratives plus tard, j'ai enfin pu commencer ma thèse dont je n'osais même plus rêver. Encore merci à toi !

Je tiens à remercier M. Denis ALLEMAND et M. Mohamed MEHIRI pour me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Mme Patricia BONIN pour avoir accepté de juger mon travail.

J'exprime toute ma gratitude à M. Jean LORQUIN, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré durant la plus grande partie de cette aventure. Merci pour tes encouragements et ton soutien sans faille, tes corrections de rédaction qui ont ajouté une plus-value à ce manuscrit et pour tout ce que tu as pu m'apprendre en chimie (HPLC, spectrométrie de masse, réactions multiples et variées, etc.)

Merci également à Coral Biome, le partenaire industriel de cette thèse et plus particulièrement à M. Frédéric GAULT pour m'avoir accueilli dans son entreprise durant 3 années. Je remercie également Mme Sandrine COURTES et Mme Carole VALENTI pour la relecture du manuscrit, leurs conseils et leur aide sur les expérimentations, notamment la spectrométrie de masse et l'imagerie, et pour m'avoir formé aux bases et à la rigueur du travail en entreprise. Merci aussi à M. Mathieu FERRY et Mme Andréa MERIOT pour la relecture des parties de ce manuscrit portant sur les coraux, pour toutes les connaissances et l'aide qu'ils m'ont apporté sur la culture des coraux ainsi que pour leur bonne humeur au quotidien.

Au cours des travaux réalisés pendant cette thèse, j'ai eu l'occasion de collaborer avec plusieurs équipes de recherche qui m'ont fait découvrir différents domaines passionnants :

Je tiens d'abord à remercier M. Daniel LAFITTE et M. Claude VILLARD pour m'avoir ouvert les locaux de la Plateforme Protéomique et Innovation Technologique Timone (PIT2) où j'ai passé de très bons moments à faire de l'imagerie et de la spectrométrie de masse MALDI-ToF. Un merci tout particulier à M. Christopher NUCCIO pour son aide précieuse, ses explications et ses conseils au cours de ces manip ainsi que pour m'avoir tenu au courant de tout ce qui se passait à l'OM.

Merci à M. Christos PANAGIOTOPOULOS et M. Vincent FAUVELLE de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO) pour leur accueil chaleureux, leur aide et la mise à disposition du matériel LC-QToF nécessaire aux analyses par spectrométrie de masse et à la fragmentation.

Merci à Mme Elsa CASTELLANI et M. Cédric MATTHEWS de l'Institut du Biologie de Développement de Marseille pour m'avoir formé et conseillé lors de diverses expérimentations d'imagerie par microscope.

Je remercie également M. Olivier ZELPHATI pour m'avoir autorisé à entrer régulièrement dans les locaux d'OZ Bioscience pour interagir avec son équipe. Un merci tout particulier à Mme Flavie SICARD et Mme Elodie BERTOSIO pour leurs échanges riches et variés notamment sur les cultures cellulaires ainsi que pour leur aide et leurs conseils sur la microscopie à épifluorescence et les dosages Bradford.

Enfin je remercie Mme Christine FERRIER-PAGES du Centre Scientifique de Monaco de m'avoir envoyé une souche de *Symbiodinium* spp. ainsi que du milieu de culture ASP-8A et pour ses conseils sur la culture des *Symbiodinium* spp.

Je remercie également M. Craig FAULDS pour la relecture des résumés anglais de cette thèse.

Sommaire

Remerciements	I
Abréviations	VII
Résumé confidentiel	IX
<u>Introduction, objectifs et contexte du travail de thèse</u>	<u>1</u>
1. La palytoxine	1
1.1. Une origine légendaire	1
1.2. La découverte de la palytoxine	2
1.3. Structures et propriétés physico-chimiques	3
1.3.1. Solubilité, pouvoir rotatoire et stabilité	3
1.3.2. Stratégies d'identification	3
1.3.3. Structure chimique	5
1.3.4. Spectroscopie UV	6
1.3.5. Identification de la palytoxine et de ses analogues par spectrométrie de masse	7
1.4. Sources de palytoxine et d'analogues	9
1.4.1. Organismes producteurs	9
1.4.2. Effet des facteurs environnementaux sur la production de palytoxine	13
1.5. Aspects toxicologiques de la palytoxine	13
1.5.1. Toxicité et symptômes chez les mammifères	13
1.6. Mécanisme d'action de la palytoxine : la pompe sodium-potassium (NaK)	18
1.6.1. Rôle physiologique de la NaK	18
1.6.2. Structure de la NaK	20
1.6.3. Mécanisme de fixation de la palytoxine sur la NaK	21
1.7. Méthodes de détection biologiques de la palytoxine et de ses analogues	22
1.7.1. Tests biologiques sur des rongeurs	23
1.7.2. Tests de cytotoxicité	23
1.7.3. Tests hémolytiques	24
1.7.4. Tests immunologiques	25
2. Les genres <i>Palythoa</i> et <i>Zoanthus</i>	26
2.1. Position taxinomique	26
2.1.1. L'embranchement Cnidaria	26
2.2. L'ordre Zoantharia	26
2.2.1. Répartition géographique et cycle de vie	26
2.2.2. Anatomie du polype	27
2.2.3. Structure des colonies	29
2.2.4. Etude des espèces de Zoantharia	30

2.2.5. Classification des espèces de <i>Palythoa</i> et de <i>Zoanthus</i>	32
3. Les relations symbiotiques chez les Zoantharia	35
3.1. Le concept d'holobionte	35
3.1.1. La symbiose Zoantharia – <i>Symbiodinium</i>	35
3.2. Les <i>Symbiodinium</i> spp.	35
3.2.1. Diversité génétique	35
3.2.2. La symbiose.....	36
4. Hypothèses sur la production de palytoxine chez les espèces du genre <i>Palythoa</i>	39
4.1. Hypothèse de la biosynthèse par les <i>Symbiodinium</i> spp.....	39
4.2. Hypothèse de la biosynthèse par des procaryotes symbiotiques	39
5. Objectifs et contexte du travail de thèse	41
5.1. Justification et contexte	41
5.2. Objectifs scientifiques.....	41
5.3. Partenaires du projet	42
<u>Chapitre 1: publication du travail de thèse (en anglais)</u>	43
1. Publication.....	43
1. Résultats complémentaires	63
<u>Chapitre 2: Analyse phylogénétique des genres <i>Zoanthus</i>, <i>Palythoa</i> (Zoantharia) et <i>Symbiodinium</i> et production toxinique</u>	65
1. Introduction	65
2. Matériel et méthodes	65
2.1. Matériel biologique.....	65
2.2. Extraction d'ADN.....	66
2.3. Amplification par PCR et séquençage	66
2.4. Reconstruction phylogénétique.....	69
2.5. Extraction et purification de la palytoxine	70
2.6. Chromatographie en phase liquide haute performance	70
2.7. Spectrométrie de masse	71
3. Résultats	72
3.1. Diagnose moléculaire et barcode ADN.....	72
3.2. Analyse des séquences de Zoantharia	74
3.3. Analyse phylogénétique des séquences de <i>Symbiodinium</i> spp.....	79
3.4. Analyse comparative de la toxicité des Zoantharia	82
3.5. Structure et qualité de la palytoxine standard (Wako).....	83
3.5.1. Flux ionique total (TIC) et chromatogramme UV	83
3.5.2. Spectre de masse	84
3.6. Structure et pureté de la palytoxine extraite des <i>Palythoa</i> producteurs (confidentiel).....	85

4. Discussion	85
4.1. Plasticité morphologique et diagnoses problématiques des espèces de Zoantharia	85
4.2. Identification moléculaire des Zoantharia et validité des marqueurs génétiques	89
4.3. Existence d'un allèle 'B' ITS-rDNA chez <i>Zoanthus sansibaricus</i>	91
4.4. Clades de <i>Symbiodinium</i> et caractéristiques environnementales	94
4.5. Etude et dosage de la palytoxine	96
4.5.1. Dosage par HPLC	96
4.5.2. Spectrométrie de masse	96
4.5.3. Toxicité comparative chez les Zoantharia	96
<u>Chapitre 3: Les <i>Symbiodinium in et ex hospite</i> ont-ils un rôle dans la biosynthèse de la palytoxine ?</u>	99
1. Introduction.....	100
2. Matériel et méthodes	100
2.1. Isolement de <i>Symbiodinium</i> spp. et obtention d'homogénat de l'hôte.....	100
2.1.1. Méthode d'isolement simple par homogénéisation et centrifugation	101
2.1.2. Méthode d'isolement par traitement à la soude.....	101
2.1.3. Méthode d'isolement par blanchissement des polypes	102
2.2. Autres clades de <i>Symbiodinium</i> cultivés	103
3. Culture <i>ex hospite</i> de <i>Symbiodinium</i> spp.....	103
3.1. Inoculation et culture sur un milieu F/2	103
3.2. Culture sur un milieu ASP-8A.....	105
3.3. Comment éviter la prolifération d'organismes indésirables et maintenir des <i>Symbiodinium</i> purs.....	105
3.3.1. Par ajout d'agents antimicrobiens	105
3.3.2. Par tri manuel.....	107
3.3.3. Par traitement acide.....	107
3.3.4. Par sélection des colonies sur boîte de Petri.....	107
3.4. Suivi de la croissance cellulaire	107
3.5.1. Par renouvellement du milieu F/2	108
3.5.2. Effet de la présence d'homogénat de l'hôte (extrait corallien) sur la croissance	108
4. Analyse de la palytoxine à partir des cellules ou des cultures de <i>Symbiodinium</i>	110
4.1. Préparation des échantillons.....	110
4.2. Analyse par HPLC	110
4.3. Détection par spectrométrie de masse MALDI-ToF	110
5. Résultats	111
5.1. Choix de la technique d'extraction des <i>Symbiodinium</i> spp. à partir de leur hôte.....	111
5.2. Culture des <i>Symbiodinium</i> et maintien d'une culture pure	113
5.3. Optimisation des cultures et croissance	114
5.3.1. Première culture	114

5.3.2. L'Adaptation des cultures par plusieurs repiquages successifs est nécessaire	114
5.3.3. Cultures par renouvellement de milieu F/2	115
5.3.4. Culture dans un milieu ASP-8A.....	116
5.3.5. Tentative d'optimisation de la croissance en présence de l'homogénat de l'hôte.....	116
5.4. La palytoxine est-elle présente dans les <i>Symbiodinium</i> isolés, et est-elle synthétisée par culture ?.....	117
6. Discussion	118
6.1. Extraction et culture des <i>Symbiodinium</i> spp.....	118
6.2. L'augmentation de la biomasse est limitée par l'appauvrissement du milieu de culture	119
6.3. La biosynthèse de palytoxine est-elle régie par les <i>Symbiodinium</i> spp.	120
7. Perspectives	122
<u>Conclusions générales et perspectives</u>	123
<u>Références bibliographiques</u>	129
<u>Annexe: Classification supra-spécifique des Zoantharia.....</u>	143

Liste des abréviations

Note : Dans le cas où une abréviation anglaise est employée en français, c'est cette abréviation anglaise qui sera conservée dans tout le manuscrit. La colonne de gauche ci-dessous reprend l'abréviation anglaise, et la colonne de droite sa signification française ainsi que la terminologie anglaise dont elle dérive.

24h-DL50	: Doses létales médianes sur 24 h
ABS	: Analyse biologique sur souris par injections intrapéritonéales
Aff.	: 'Affinis'. Désigne une espèce indéterminée ayant une forte ressemblance avec une espèce déjà décrite.
ADP	: Adénosine diphosphate
ATP	: Adénosine triphosphate
Cf.	: 'Confer'. Désigne une espèce indéterminée dont les caractéristiques (anatomiques et/ou génétiques) sont similaires à une espèce déjà décrite.
DMSO	: Diméthylsulfoxyde (C ₂ H ₆ OS)
EI	: Ionisation par bombardement électronique (Electron bombardment Ionization)
ELISA	: Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ESI	: Ionisation par électrospray (Electrospray Ionisation)
EMAA 0,45	: Eau de mer artificielle autoclavée et filtrée à 0,45 µm
GC	: Chromatographie en phase gazeuse (de l'anglais, Gas-liquid Chromatography)
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance (High-Performance Liquid Chromatography)
HRMS	: Spectrométrie de masse à haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
i.p.	: Intrapéritonéale
i.v.	: Intraveineuse
LD	: Limite de détection
MALDI	: Désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation)
MAPKs	: Protéines kinases activées par des agents mitogènes (Mitogen Activated Protein Kinases)
McTX	: Mascarénotoxine
MRM	: Contrôle par réaction multiple (Multiple Reaction Monitoring)
MS	: Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
NaK	: Pompe sodium/potassium
Ost	: Ostréocine
OvTXs	: Ovatoxines
PITX	: Palytoxine. Historiquement, la palytoxine a d'abord été abrégée en 'PTX' mais cette abréviation a été revue en 1985 lors de la découverte de la pecténotoxine (Yasumoto <i>et al.</i> , 1985), une toxine diarrhéique produite par des dinoflagellés, qui a été abrégée en 'PTX'. Actuellement la palytoxine est abrégée en 'PITX' ou 'PLTX' dans les publications. Dans ce manuscrit, c'est la première abréviation qui sera utilisée, simplement pour la différencier de la pecténotoxine.
Q	: Quadrupôle
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
SIM	: Détection d'ions sélectionnés (de l'anglais, Selected Ion Monitoring)
Sp.	: 'Species' (espèce). Espèce nouvelle qui ne possède pas encore de nom
Spp.	: 'Species' (espèces), pluriel de 'sp.'
ToF	: Temps de vol (Time of Flight)
Tr	: Temps de rétention
UV	: Ultraviolet

RESUME CONFIDENTIEL

La palytoxine (PITX) est un métabolite secondaire complexe, principalement produit chez des espèces de Cnidaria du genre *Palythoa*, qui figure parmi les toxines d'origine marine les plus puissantes. A l'heure actuelle, sa voie de biosynthèse et son origine biologique demeurent méconnues. Des études récentes ont mis en évidence une cytotoxicité puissante de la PITX envers différentes lignées de cellules cancéreuses. La cible cellulaire préférentielle de la PITX est la pompe sodium/potassium qui, dans ce contexte, constitue également un récepteur. Le travail présenté dans ce manuscrit est en amont du développement pharmaceutique de la PITX et porte sur l'étude des sources biologiques de la toxine. Leur identification est nécessaire afin de développer un protocole industriel standardisé permettant d'obtenir des quantités suffisantes de toxines pour effectuer sa caractérisation chimique ainsi que les tests précliniques portant sur son activité anticancéreuse.

Dans une première partie, l'activité anticancéreuse *in vitro* de la PITX a été évaluée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines. La cytotoxicité de la PITX était effective sur les lignées murines et humaines et 10^6 fois plus importante sur les lignées cancéreuses par rapport aux lignées non cancéreuses témoins. La PITX utilisée dans ce travail a été purifiée à partir d'une espèce non décrite de *Palythoa*, nommée *Palythoa* sp. Pc001, qui a pu être caractérisée sur la base d'une analyse phylogénétique et morphologique. La PITX a été localisée dans les tissus du *Palythoa* en imagerie par spectrométrie de masse MALDI. La PITX se concentre dans l'épiderme et le pharynx des polypes de *Palythoa*, des tissus ne renfermant que peu ou pas de cellules des *Symbiodinium* suspectés de la synthétiser d'après la littérature. Il en résulte que l'origine biologique de la molécule ne peut être clairement identifiée bien que le *Palythoa* sp. Pc001 constitue le Zoantharia dans lequel les quantités de PITX purifiée sont les plus élevées jamais enregistrées ($2,8 \pm 0,45$ mg/g).

La deuxième partie de ce manuscrit présente une étude phylogénétique et une quantification de la PITX par HPLC chez 29 échantillons de Zoantharia. Cette partie contient également une étude en spectrométrie de masse qui a permis de caractériser la structure chimique du type de PITX purifiée à partir de ces échantillons. Les analyses ont identifié deux espèces supplémentaires de *Palythoa* contenant de fortes concentrations en PITX : *Palythoa heliodiscus*, déjà connue pour contenir de la PITX et *Palythoa* aff. *clavata* chez qui la présence de PITX n'a jamais été rapportée.

La dernière partie est une étude préliminaire sur la culture *ex hospite* des endosymbiotes unicellulaires appartenant au genre *Symbiodinium*. Les cellules des endosymbiotes ont été isolées à partir d'espèces de *Palythoa* contenant de hautes concentrations de PITX afin de tester leur implication dans la biosynthèse de PITX. Bien que la présence de PITX n'ait pu être détectée par ces analyses complémentaires, que ce soit par HPLC ou par MALDI, ce chapitre présente des perspectives pour améliorer notre connaissance des éventuelles conditions de culture favorables à la production de PITX par des *Symbiodinium* spp.

Introduction

1. La palytoxine

1.1. Une origine légendaire

La palytoxine a été découverte en 1971 lors d'une campagne de recherche de l'université d'Hawaii, alors que l'objectif de la mission était d'identifier l'origine de la ciguatéra qui provoquait des intoxications alimentaires chez les personnes ayant consommé du poisson de récifs. Les poissons herbivores étant contaminés avant les poissons carnivores, les chercheurs ont émis l'hypothèse que la toxine entrait dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire d'une algue. En consultant divers ouvrages hawaïens, ils ont alors été intrigués par la mention de '*limu-make-o-hana*' signifiant littéralement 'la mousse (ou algue) mortelle de Hana'. Ce terme hawaïen désigne un organisme toxique auquel M. David Malo (1903), historien hawaïen, fait allusion dans son livre *Hawaiian Antiquities*. A la page 266, le texte principal est enrichi de la note suivante :

« Kapule m'a dit qu'à Mu'olea (Hawaii), dans le district de Hana, dans une certaine cuvette d'eau de mer, poussait une mousse empoisonnée. Elle était utilisée (autrefois) pour enduire les pointes de lances et les rendre mortelles. Les hommes qui faisaient ce travail étaient appelés hamohamo, les enduiseurs. On dit que cette mousse est de couleur rougeâtre et qu'on peut encore la trouver (aujourd'hui). Elle ne pousse nulle part ailleurs que dans cette cuvette. Kapule a vu cette mousse lorsqu'il était à Hana, il pense que c'était en 1857. C'était un vieil homme appelé Peelua (...) qui la lui avait montrée. Ceci fut une révélation et une grande surprise pour moi. Je n'avais jamais entendu une telle chose auparavant ».

Cette description fut confirmée par les notes manuscrites de Katherine Livermore (enregistrées au B. P. Bishop Museum d'Honolulu, cité par Moore et Scheuer (1971) : *« A Mu'olea (...) à la base d'une colline de 700 pieds, dans une petite cuvette d'eau de mer (...), ce limu mortel pousse sur des pierres. Lorsqu'on le touche, ses bords se contractent, et il passe d'une couleur gris foncé naturelle à une teinte violacée en expulsant un fluide jaunâtre qui empoisonne l'eau ».*

L'origine légendaire de cet organisme toxique a été rapportée par Katherine Livermore dans la légende du « *limu-make-o-hana* » :

« Dans le district de Hana, à Hawaii se trouvait autrefois un village de pêcheurs frappé par une malédiction. Lorsque les villageois allaient à la pêche, il arrivait fréquemment que l'un d'entre eux disparaisse mystérieusement et ne rentre jamais au village. Après plusieurs disparitions inquiétantes, les pêcheurs, en colère et désespérés, se mirent à chercher activement les causes de ces disparitions. Or, non loin de leur village, vivait un homme solitaire avec une allure un peu étrange, il était très bossu, ce qui le déformait et le courbait vers le sol, comme s'il scrutait continuellement la terre ou ses cultures. Emportés par leur colère, les villageois commencèrent à suspecter cet ermite. Un jour, ils l'encerclèrent pour le questionner sur les disparitions et, sous l'emprise de la colère, l'interrogatoire dégénéra et les villageois s'en prirent physiquement et violemment à cet homme. En lui arrachant ses vêtements, ils s'aperçurent qu'il portait dans son dos une immense gueule de requin constituée de dents pointues supportées par d'immenses mâchoires.

Ils venaient de découvrir un Dieu requin qui, au moyen des dents acérées de son dos, dévorait les pêcheurs qui entraient sur son territoire marin. Par vengeance, les pêcheurs décidèrent de tuer le Dieu Requin, de brûler son corps et de jeter ses cendres à la mer, dans une petite cuvette entre des rochers. Ils pensèrent avoir triomphé du mal mais le désir de mort du Dieu n'en était pas anéanti pour autant. Son esprit se transmet par ses cendres et, dans la cuvette, une mousse (limu) extrêmement toxique apparut. Cette mousse était la gardienne du territoire du Dieu Requin et elle continuait de tuer les hommes qui s'en approchaient. »

1.2. La découverte de la palytoxine

C'est donc en croyant étudier l'origine de la ciguatéra, que le Professeur Scheuer (Moore et Scheuer, 1971) qui avait entendu parlé de la légende du *Limu-make-o-Hana*, s'appuya sur l'aide du Professeur Banner et du Dr. Helfrich de l'Institut d'Océanologie d'Hawaii, pour localiser la cuvette légendaire. Or, les Hawaïens ne révélèrent pas l'emplacement de cette cuvette qui était tenu secret depuis que les prêtres hawaïens avaient déclaré cet endroit tabou en certifiant qu'un malheur s'abattraît sur quiconque troublerait le *limu*. Comme le rapporte Katherine Livermore :

« Au temps des rois, (la cuvette) fut déclarée tabou (kapu) et son emplacement tenu secret car on avait peur que les gens qui connaissaient son emplacement puissent s'en servir à des fins maléfiques. »

Cependant, en 1961, après de longues recherches au moyen d'un solide réseau d'informateurs autochtones, et surtout en utilisant plusieurs casiers de bières Okole maluna qui parvinrent à délier les langues les plus apeurées, l'emplacement de la cuvette fut finalement révélé aux scientifiques (Walsh et Bowers, 1971).

Cette petite cuvette contenant le fameux *limu* fut localisée au bout d'une coulée de lave à Mu'olea (Kanewai), au sud de Hana, à Maui. Le premier échantillon de *limu* toxique, qui ne fut trouvé nulle part ailleurs qu'autour de la cuvette, fut prélevé le 31 décembre 1961. Pendant le prélèvement, les résidents locaux rappelèrent constamment à l'équipe de chercheurs que l'endroit était *kapu* et que le malheur serait imminent. Or, l'après-midi-même, un incendie d'origine inconnue, peut-être criminel, ravagea le bâtiment principal du Laboratoire Marin d'Hawaii sur l'île de Coconut, Oahu, l'établissement où travaillaient Banner et Helfrich.

Une étude taxinomique de l'échantillon de *limu* détermina qu'il n'appartenait pas au règne végétal mais au règne animal, et qu'il s'agissait probablement d'une nouvelle espèce de *Palythoa* (Cnidaria : Zoantharia : Sphenopidae) (Moore et Scheuer, 1971). Une évaluation de la toxicité de l'échantillon par injection intrapéritonéale chez des souris conclut qu'il s'agissait de l'une des substances les plus toxiques connues. Le *limu* fut nommé *Palythoa toxica*, et la substance toxique fut nommée palytoxine (PITX). Les méthodes de à l'époque ne permirent pas d'identifier la structure chimique de la PITX avec précision, mais une analyse élémentaire détermina qu'elle était composée d'atomes de carbone (C), d'hydrogène (H), d'azote (N) et d'oxygène (O) (Moore et Scheuer, 1971).

1.3. Structures et propriétés physico-chimiques

1.3.1. Solubilité, pouvoir rotatoire et stabilité

Dès sa découverte et son isolement en 1971 (Moore et Scheuer, 1971), la PITX fut décrite comme un solide blanc, amorphe et hygroscopique ; elle est insoluble dans les solvants non polaires comme le chloroforme, l'éther et l'acétone, partiellement soluble dans le méthanol et l'éthanol, soluble dans la pyridine, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'eau. Il s'agit d'un composé optiquement actif dont la rotation est de $+26^\circ$ et $+2^\circ$ dans l'eau (Moore et Scheuer, 1971; Tan et Lau, 2000). La température de fusion de la PITX n'a pas été déterminée à ce jour. Dans les solutions aqueuses, la PITX mousse lorsqu'elle est agitée en raison de sa nature amphiphile (Moore et Scheuer, 1971).

Peu d'études ont été menées sur la stabilité de la PITX. Cependant quelques observations montrent qu'elle est sensible à la lumière, aux rayons UV et aux solutions basiques et acides (Hewetson *et al.*, 1990). Ainsi, l'exposition de la toxine à la lumière visible et aux UV provoque des changements de structure à la fois dans le chromophore 263 nm et dans les chromophores 233 nm (cf. 1.3.4. Spectroscopie UV) réduisant sa toxicité d'un facteur 20 après une exposition de seulement 5 min aux UV et 30 min à la lumière visible (Hewetson *et al.*, 1990).

Le chromophore 263 nm est sensible à la fois aux solutions méthanoliques acides (0,05 M HCl) et aqueuses basiques (0,05 M NaOH), et se dégrade avec une demi-vie de 85 et 55 min respectivement. Toutefois, une neutralisation dans les 2 min permet de régénérer la PITX sans perte apparente de toxicité (Moore et Scheuer, 1971).

1.3.2. Stratégies d'identification

Suite à sa première description (Moore et Scheuer, 1971), une étude monumentale de presque 11 ans a été nécessaire pour définir l'architecture chimique de la PITX. Ce travail fut laborieux car la molécule est complexe, comme la plupart des molécules toxiques, et elle est instable, soluble dans l'eau et non-cristalline (Uemura *et al.*, 1981a), ce qui a rendu l'identification difficile.

En 1981, deux groupes de chercheurs indépendants, le premier à l'université de Nagoya au Japon, mené par le Professeur Hirata, et le deuxième à l'université d'Hawaii aux USA, mené par le Professeur Moore, ont mis à jour presque simultanément deux structures planaires très proches de la PITX. Le Professeur Hirata qui avait travaillé sur une toxine extraite de *Palythoa tuberculosa* provenant d'Okinawa au Japon, localisa un groupe hydroxyle sur la position C44 et une fonction hémiacétale sur C47 (Uemura *et al.*, 1981a et b), alors que le Professeur Moore qui avait étudié une toxine extraite de *Palythoa* sp. provenant de Tahiti, localisa une liaison cétale entre les C44 et C47 (Moore et Bartolini, 1981). **La figure 1** reprend la structure de la PITX avec la numérotation des carbones importants pour la compréhension du texte.

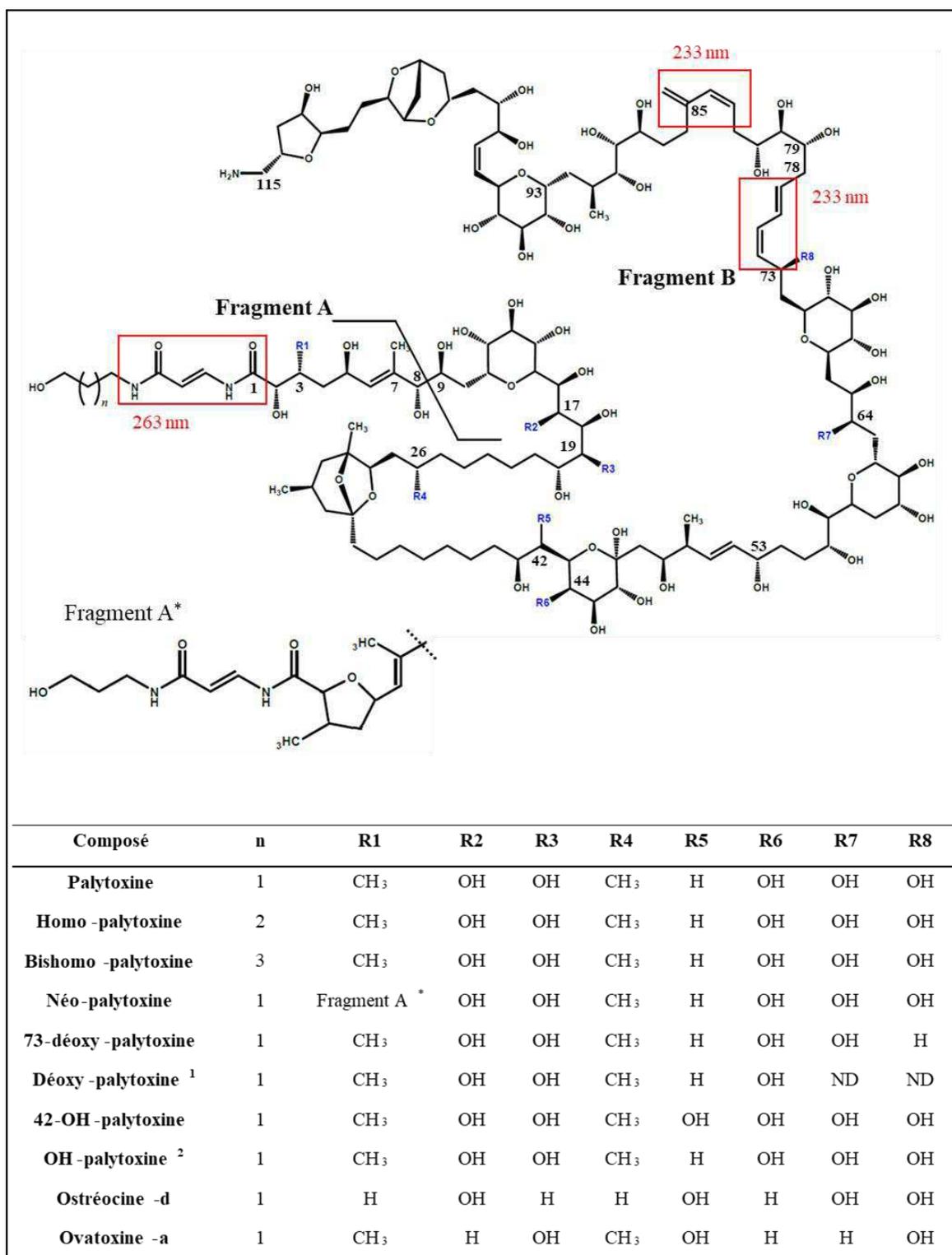


Figure 1. Structure chimique de la palytoxine et de ses analogues connus. Adapté de Pelin (2011). ¹ la position précise de la déoxygénation n'est pas connue, elle est située entre C53 et C78. ² la position précise de l'oxygénation n'est pas connue, elle se situe entre C79 et C93. Sur la molécule, les chiffres représentent le numéro des carbones de la chaîne principale. Les structures entourées d'un rectangle rouge sont responsables de l'absorption de la palytoxine dans l'UV.

Les techniques utilisées étaient principalement basées sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du ^1H et du ^{13}C . Ces techniques demandent plusieurs milligrammes de composés et furent rendues possibles par les chimistes qui purifièrent de grandes quantités de PITX à partir de *Palythoa tuberculosa* et *Palythoa* sp. (Moore et Bartolini, 1981; Uemura *et al.*, 1981a et b). Ces études ont consisté à reconstituer des fragments obtenus après oxydation au périodate de sodium (NaIO_4) ou par ozonolyse (O_3) de la molécule de PITX naturelle (Moore et Bartolini, 1981; Uemura *et al.*, 1981a et b). La RMN étudie les positions structurales des atomes ou groupes d'atomes d'une molécule. Dans ces études, la PITX de structure chimique inconnue à cette époque, a été placée dans un champ magnétique puissant selon lequel les noyaux de ses atomes tendaient à s'aligner (spin). Les signaux détectés par le spectromètre RMN (en ppm), ont permis d'établir les arrangements structuraux au sein de la molécule qui demandent différentes énergies de résonance selon leur position (Moore *et al.*, 1982). Ce travail considérable a finalement abouti en 1981.

1.3.3. Structure chimique

C'est grâce à la RMN qu'en 1981 la PITX a pu être définie comme étant une molécule amphiphile longue et complexe de 2679 Daltons et de formule chimique $\text{C}_{129}\text{H}_{223}\text{N}_3\text{O}_{54}$. Sa base moléculaire est constituée d'une longue chaîne partiellement insaturée de 115 atomes de carbone et comporte six doubles liaisons, des éthers cycliques, 64 centres chiraux, et 40 à 42 groupements hydroxyles (**Figure 1**) (Katikou, 2007).

La molécule étant relativement instable, il est fréquent qu'elle se clive entre les carbones 8 et 9, ce qui engendre deux fragments A et B (**Figure 1**) et la perte d'une molécule d'eau. Le fragment A est composé d'une chaîne principale constituée de 14 C, de 2 amines secondaires et de 2 doubles liaisons. C3 et C7 portent chacun un méthyle, et six atomes d'O sont fixés sur le fragment A. Le fragment B est beaucoup plus grand et est composé du reste de la molécule, de C9 à C115. Il contient une amine primaire en bout de chaîne sur le C115 terminal qui est responsable du caractère basique de la PITX (Moore *et al.*, 1980). Enfin, le C85 est relié par une double liaison à un méthyle.

Structurellement, la PITX est une molécule remarquable, à la fois parce qu'elle comporte la plus longue chaîne carbonée parmi les composés naturels, et parce qu'elle présente un total de 64 centres chiraux et de huit doubles liaisons, pouvant ainsi donner plus de 10^{21} stéréo-isomères (Patockaa et Stredab, 2002). La détermination de l'isomérisation de la molécule s'est donc avérée indispensable pour caractériser la PITX. En 1982, soit un an après l'identification chimique, plusieurs scientifiques sont parvenus à déterminer sa stéréochimie à partir d'une toxine isolée de *Palythoa tuberculosa* provenant d'Okinawa au Japon (Cha *et al.*, 1982; Fujioka *et al.*, 1982; Klein *et al.*, 1982; Ko *et al.*, 1982). La stéréochimie de la PITX a été alors révélée en utilisant la synthèse chimique et la RMN. D'abord la structure chimique de tous les fragments obtenus par dégradation a été établie par RMN. Ensuite, tous les stéréo-isomères possibles ont été synthétisés chimiquement pour chaque fragment. Le profil RMN de chaque isomère synthétisé a été établi et l'identification de l'isomérisation de la PITX naturelle a été faite en comparant les spectres RMN des isomères synthétisés avec le spectre RMN de la molécule naturelle.

En 1989, malgré tous les stéréo-isomères possibles, un groupe de chercheurs de l'université d'Harvard dirigé par le Professeur Kishi est parvenu à synthétiser chimiquement et complètement une molécule de PITX sous sa forme acide. Son activité biologique, son comportement chromatographique et ses données spectrales étaient identiques à la molécule naturelle (Armstrong *et al.*, 1989; Kishi, 1989). Quelques années plus tard, la synthèse de la PITX à l'identique de sa forme naturelle fut rendue possible (Suh et Kishi, 1994), mais ce fut un travail long et fastidieux, et qui comprend 65 étapes, donc beaucoup moins rentable que l'extraction et la purification à partir de *Palythoa* spp.

1.3.4. Spectroscopie UV

Dans l'UV, la PITX montre un spectre constitué de deux bandes d'absorption à λ_{\max} 233 nm (ϵ 47000) et 263 nm (ϵ 28000) (Hirata *et al.*, 1979) (**Figure 2**). Ces absorbances caractéristiques sont associées d'une part à la présence de deux diènes conjugués (deux doubles liaisons séparées par une liaison simple, **Figure 1**) sur le fragment B et donnant la bande à 233 nm, et d'autre part par la conjugaison (délocalisation électronique) présente sur le fragment A (succession amide – double liaison – amide, **Figure 1**) et visualisée par la bande à 263 nm (Moore *et al.*, 1978). Le ratio d'absorbance entre 233 nm et 263 nm est de 1,71 (Moore et Scheuer, 1971). Malgré le fait que différents analogues de PITX existent, le spectre d'absorption UV reste identique dans chaque cas et il permet de détecter rapidement et simplement la présence de PITX dans les extraits (Tan et Lau, 2000), car les différences structurelles entre les analogues se situent en dehors des chromophores (**Figure 1**). C'est sur cette base que nous quantifierons la PITX dans ce travail (Chapitre 2) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à 263 nm.

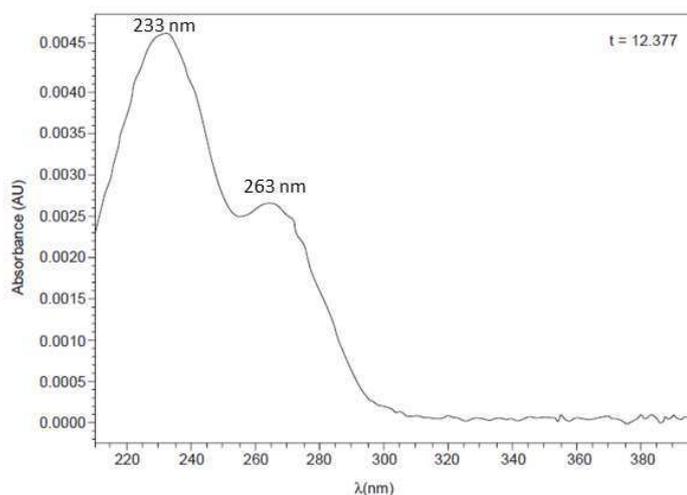


Figure 2. Spectre UV de la palytoxine isolée de *Palythoa tuberculosa* et analysée à une concentration de 25 µg/ml dans l'eau. D'après Katikou (2007).

1.3.5. Identification de la palytoxine et de ses analogues par spectrométrie de masse

L'identification par spectrométrie de masse est la technique de choix pour la détermination structurale de la PITX et de ses analogues (Katikou, 2007). Elle n'est possible qu'à partir du moment où les molécules à analyser sont ionisables, et trouver le mode et les meilleures conditions d'ionisation constitue le premier travail à effectuer. En général, un spectromètre de masse est couplé à un système chromatographique de séparation (placé en amont), c'est soit une HPLC si l'on travaille en mode liquide, soit une GC (chromatographie en phase gazeuse, de l'anglais Gas-liquid Chromatography) si l'on travaille sur des molécules de petite taille et volatilisables. Tout réside dans (1) le mode d'ionisation (action qui s'effectue dans la source ou chambre d'ionisation du spectromètre de masse), en mode positif ou en mode négatif selon les molécules (les ions positifs ou négatifs sont formés préférentiellement), et dans (2) la méthode de séparation des ions fragmentés ou non (action qui s'effectue dans l'analyseur).

La PITX étant une molécule de taille moyenne (2679 Da), son ionisation est possible, (i) soit avec un système Electrospray en mode liquide (en anglais, Electrospray Ionisation-Mass spectrometry, ESI-MS), et en mode positif car elle possède des amides et une amine terminale (entre autres) qui s'ionisent positivement en milieu légèrement protoné, (ii) soit par désorption-ionisation laser assistée par matrice (en anglais, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI) ; lors de cette technique, l'ionisation au laser s'effectue sur le solide (molécule séchée) qui est inclus dans une matrice, l'ensemble est désigné par 'la cible'. A ce jour, la seule publication relative à l'analyse en MALDI-ToF (temps de vol, de l'anglais, Time of Flight) de la PITX est celle de Paz *et al.* (2011). La GC-MS (couplage d'une CPG avec un spectromètre de masse), utilise une ionisation par bombardement électronique (de l'anglais, Electron bombardment Ionization, EI) et à très fortes températures ; elle est réservée aux molécules de petite taille, donc en aucun cas à l'analyse de la PITX qui est fragile.

En Electrospray (ESI), le mode d'ionisation s'effectue généralement à pression atmosphérique. L'échantillon en solution est introduit dans la source d'ionisation du spectromètre au travers d'un capillaire métallique. Sous l'effet d'un champ électrique, le liquide est vaporisé en un fin brouillard de gouttelettes mono- ou poly-chargées. Le solvant entourant ces gouttelettes est progressivement évaporé par l'azote chauffé qui circule à contre-courant. Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte de façon que les répulsions électrostatiques entre charges de même signe à leur surface soient telles qu'il y a explosion coulombienne de ces gouttelettes. Enfin, une série de lentilles placées sous vide permet de focaliser le faisceau d'ions à l'entrée de l'analyseur ce qui permet leur détection à l'état gazeux.

En MALDI et par le faisceau laser (à l'azote), l'ionisation et la vaporisation s'effectuent préférentiellement sur des biomolécules de taille importante (polymères, protéines, peptides, polysaccharides ou encore dendrimères). Elle est relativement similaire à l'ESI en douceur relative et en ions produits, bien qu'elle crée cependant beaucoup moins d'ions multichargés. La matrice qui

entoure la molécule séchée (dans la cupule d'une plaque), sert à la protéger de la destruction par le faisceau et à faciliter la vaporisation et l'ionisation.

Séparation des ions et comptage. Les analyseurs trient les ions formés dans la source ; les plus couramment utilisés sont le quadropôle (Q) et le ToF. Le vide est effectué par des pompes à palettes (vide de l'ordre de quelques mTorr), afin d'éviter la collision des ions entre eux au moment de leur séparation. Les ions sont comptés par un détecteur, l'unité de fragment est le rapport m/z (masse divisée par la charge), et il est important de déterminer si les ions sont mono-, bi- ou tri-chargés pour déterminer la masse totale de la molécule à identifier et sa structure.

Le cas de la PITX. La méthode de choix est le couplage LC-QToF, c'est-à-dire une séparation chromatographique en mode liquide en amont (LC pour HPLC), une ionisation ESI, et deux analyseurs positionnés en tandem, un Q et un ToF. La sensibilité dans ce cas est optimale (jusqu'à la femtomole) et cette configuration est particulièrement adaptée à des extraits biologiques susceptibles de contenir des traces dans les mélanges non séparables. C'est le cas de la PITX et de ses analogues qui ne sont pas séparables par HPLC, mais peuvent être aisément identifiés par spectrométrie de masse. On peut, en fonction des appareillages et notamment ceux à haute résolution utilisé en HRMS (de l'anglais, High Resolution Mass Spectrometry), travailler en mode SIM (pour 'Selected Ion Monitoring') en sélectionnant un ion et en analysant les fragments qu'il génère.

En une simple expérience d'analyse en LC-MS (ESI), on peut identifier pour la PITX les fragments (en Daltons) à m/z 1340,7 $[M+2H]^{2+}$, 1331,7 $[M+2H-H_2O]^{2+}$, et 906,1 $[M+2H+K]^{3+}$. Un ion caractéristique est celui qui correspond au fragment A et qui résulte du clivage entre les C8 et C9 accompagné de la perte additionnelle d'une molécule d'eau, et identifié à m/z 327. Cet ion est généralement présent en forte abondance en mode positif, bien que son absence ne signifie pas forcément l'absence de PITX (Rossi *et al.*, 2010). Cet ion (identifié par son m/z) varie selon les différents analogues de PITX (**Tableau 1**).

Palytoxine (PITX) et analogue	Fragment A (m/z)
PITX	327
73-deoxy-PITX	327
42-OH-PITX	327
Homo-PITX	341
Bishomo-PITX	355

Tableau 1. Ions générés par le fragment A de la palytoxine et de ses quelques analogues. Ces ions correspondent au clivage entre les C8 et C9, et qui s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau.

On peut également étudier les transitions et la correspondance (provenance) des ions en réalisant, par les analyseurs en tandem, des expériences de contrôle de réactions multiples (MRM, en anglais, Multiple Reaction Monitoring). Après collision, la sélection des ions à étudier se fait en

paramétrant la machine, et ils sont spécifiquement analysés grâce au tandem. Les transitions pour la PITX sont $1340,7 \rightarrow 327,1$, $1331,7 \rightarrow 327,1$, et $906,1 \rightarrow 327,1$ avec les paramètres suivants (réglages du spectromètre de masse, en anglais) : température turbogas 0°C, voltage du spray d'ion 5500 V, 'declustering potential' 1 V, potentiel de focus 390 V, potentiel d'entrée 11 V (pour m/z $1331,7 \rightarrow 327,1$), 5 V (pour m/z $1340,7 \rightarrow 327,1$), énergie de collision 50 eV, potentiel de la cellule de sortie 10 V, 'dwell time' 1 s (Ciminiello *et al.*, 2011). Cette technique de masse permet de donner avec précision la structure de la PITX et de ses analogues souvent présents en mélange.

Diverses analyses de PITX et d'analogues, comme l'ostréocine-d et d'autres toxines de dinoflagellés benthiques, ont été décrites ; et les données peuvent servir de base pour l'analyse des fragments, ainsi que les paramètres (conditions) de source et d'analyseur (Ciminiello *et al.*, 2008, 2009; Rossi *et al.*, 2010; Ciminiello *et al.*, 2011, 2012; Tartaglione *et al.*, 2016).

1.4. Sources de palytoxine et d'analogues

Au fil du temps et après la première identification de la PITX (Moore et Bartolini, 1981; Uemura *et al.*, 1981 a et b), plusieurs analogues ont été découverts chez différents groupes d'organismes producteurs. La concentration de la PITX et/ou de ses analogues présents varient en fonction des espèces et/ou des individus. Un récapitulatif est donné dans le **Tableau 2**.

1.4.1. Organismes producteurs

1.4.1.1. Zoantharia

Depuis l'isolement et l'identification de la PITX en 1971 chez l'espèce hawaïenne *Palythoa toxica* (Moore et Scheuer, 1971), plusieurs autres espèces de *Palythoa* productrices de PITX ont été identifiées dans diverses régions du monde :

Palythoa tuberculosa (Kimura et Hashimoto, 1973) et *Palythoa* aff. *margaritae* (Oku *et al.*, 2004) au Japon, *Palythoa caribaeorum* (Attaway et Ciereszko, 1974; Béress *et al.*, 1983) et *Palythoa mammilosa* à Puerto Rico et à la Jamaïque (Attaway et Ciereszko, 1974), *Palythoa* sp. à Tahiti (Quinn *et al.*, 1974; Moore *et al.*, 1975) et *Palythoa heliodiscus* (Deeds *et al.*, 2011) en Indo-Pacifique et trouvés en magasins d'aquariophilie. La PITX aurait également été identifiée chez quelques espèces du genre *Zoanthus*, le groupe frère des *Palythoa* du point de vue phylogénétique, et plus précisément chez *Zoanthus solanderi* et *Zoanthus sociatus* (Gleibs *et al.*, 1995) provenant des côtes colombiennes. Il faut toutefois noter que la présence de PITX dans ces deux espèces n'a pas été confirmée par spectrométrie de masse mais par l'effet hémolytiques et le profil HPLC des extraits de ces coraux, comparativement à de la PITX standard. Il n'y a donc pas eu d'identification précise de la structure chimique des toxines. D'ailleurs, aucune autre étude n'a confirmé la présence de PITX chez les *Zoanthus* spp.

Composé	Organisme	PM	Concentration	Référence
Palytoxine	<i>Palythoa. toxica</i>	2680,15	275 µg/g z sec	Moore et Scheuer, 1971
Palytoxine	<i>P. tuberculosa</i>	2680,15	13,6 µg/g z sec	Kimura et Hashimoto, 1973
Palytoxine	<i>P. caribaeorum</i>	2680,15	30 µg/g z sec	Béress <i>et al.</i> , 1983
Palytoxine	<i>P. heliodiscus</i>	2680,15	613 µg/g z sec	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxine	<i>P. heliodiscus</i>	2680,15	515 µg/g z sec	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxine	<i>P. heliodiscus</i>	2680,15	1164 µg/g z sec	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxine	<i>P. heliodiscus</i>	2680,15	1037 µg/g z sec	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxine ¹	<i>P. vestitus</i>	ND	ND	Quinn <i>et al.</i> , 1974
Palytoxine	<i>P. aff. margaritae</i>	2680,15	ND	Oku <i>et al.</i> , 2004
Palytoxine ²	<i>Zoanthus solanderi</i>	ND	ND	Gleibs <i>et al.</i> , 1995
Palytoxine ²	<i>Z. sociatus</i>	ND	ND	Gleibs <i>et al.</i> , 1995
Palytoxine-b	<i>P. tuberculosa</i>	2721,51	mineure	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Homo-palytoxine	<i>P. tuberculosa</i>	2694,18	mineure	Uemura <i>et al.</i> , 1985
Bishomo-palytoxine	<i>P. tuberculosa</i>	2708,20	mineure	Uemura <i>et al.</i> , 1985
Néo-palytoxine	<i>P. tuberculosa</i>	2662,13	mineure	Uemura <i>et al.</i> , 1985
73-déoxy-palytoxine	<i>P. tuberculosa</i>	2665,16	mineure	Uemura <i>et al.</i> , 1985
Déoxy-palytoxine ³	<i>P. heliodiscus</i>	2665,16	3515 µg/g z sec	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Déoxy-palytoxine ³	<i>P. cf. toxica</i>	2664,15	ND	Tartaglione <i>et al.</i> , 2016
42-OH-palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2696,15	mineure	Ciminiello <i>et al.</i> , 2009
42-OH-palytoxin	<i>P. toxica</i>	2696,15	mineure	Ciminiello <i>et al.</i> , 2009
OH-palytoxine ⁴	<i>P. cf. toxica</i>	2696,15	ND	Tartaglione <i>et al.</i> , 2016
42-OH-palytoxin	<i>Trichodesmium</i> spp.	2696,15	mineure	Kerbrat <i>et al.</i> , 2011
CA-I ⁵	<i>Chondria armata</i>	ND	ND	Yasumoto et Murata, 1990
CA-II ⁵	<i>C. armata</i>	ND	ND	Yasumoto et Murata, 1990
Mascarenotoxine-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2588	mineure	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Mascarenotoxine-a	<i>O. mascarenensis</i>	2588	mineure	Lenoir <i>et al.</i> , 2004
Mascarenotoxine-b	<i>O. mascarenensis</i>	2606	mineure	Lenoir <i>et al.</i> , 2004
Mascarenotoxine-c	<i>O. ovata</i>	2628	mineure	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Ostrécocine-d	<i>O. siamensis</i>	2634	ND	Ukena <i>et al.</i> , 2001
Ovatoxine-a	<i>O. ovata</i>	2646	mineure	Ciminiello <i>et al.</i> , 2008
Ovatoxine-b	<i>O. ovata</i>	2662	mineure	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Ovatoxine-c	<i>O. ovata</i>	2690	mineure	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Ovatoxine-d	<i>O. ovata</i>	2706	mineure	Rossi <i>et al.</i> , 2010

Tableau 2. Palytoxines et analogues identifiés chez les Zoantharia, Cyanobacteria, algues et dinoflagellés. PM, poids moléculaire ; ND, non déterminé ; z, Zoantharia. ¹ la toxine trouvée chez *Palythoa vestitus* a été définie comme étant de la palytoxine par comparaison du spectre UV et de la cytotoxicité (cellules cancéreuses) avec ceux de la palytoxine de *Palythoa tuberculosa*, mais la toxine n'a pas été caractérisée par spectrométrie de masse. ² la présence de palytoxine chez *Zoanthus solanderi* et *Zoanthus sociatus* a été montrée par HPLC, par comparaison avec la palytoxine standard isolée de *Palythoa caribaeorum*, mais elle n'a pas été caractérisée par spectrométrie de masse. ³ la position de la déoxygénation n'a pas été déterminée. ⁴ la position de l'oxygénation n'a pas été déterminée. ⁵ CA-I et CA-II sont deux analogues de palytoxine trouvés chez l'algue rouge *Chondria armata* qui produit surtout de l'acide domoïque.

Parallèlement à la présence de PITX, d'autres molécules de structure très proche ont été identifiées chez plusieurs *Palythoa* spp. Dans la suite de ce manuscrit et par commodité, ces

molécules apparentées à la PITX seront nommées par le terme ‘analogues de PITX’. Rossi *et al.* (2010) ont identifié de la PITX en concentration majoritaire ainsi que des traces de palytoxine-b (PITX-b) dans un échantillon de toxines provenant de la société Wako (Japon) et extrait de *Palythoa tuberculosa* (**Tableau 2**). Chimiquement, la PITX-b possède 2 carbones, 2 hydrogènes et 1 oxygène de plus que la PITX classique, probablement au niveau du fragment B. Des traces d’homo- (homo-PITX), de bishomo- (bishomo-PITX), de néo- (néo-PITX) ainsi que de 73-déoxy-palytoxine (73-déoxy-PITX) ont également été identifiées chez *Palythoa tuberculosa* par Uemura *et al.* (1985). L’homo- et la bishomo-PITX possèdent, respectivement, 1 et 2 atomes de carbone supplémentaires sur le fragment A par rapport à la PITX classique (**Figure 1**), la néo-PITX possède un fragment A différent et la 73-déoxy-PITX est déoxygénée au niveau du C73. La déoxy-PITX a également été identifiée et quantifiée chez *Palythoa heliodiscus* à raison de 3,515 mg par gramme de *Palythoa* frais (Deeds *et al.*, 2011), ce qui constitue la plus grande concentration en analogue de PITX connue chez une espèce de *Palythoa*. Il pourrait s’agir de la 73-déoxy-palytoxine ; toutefois le site de déoxygénation n’a pas été identifié. La déoxy-PITX a également été identifiée chez *Palythoa* cf. *toxica* mais son site de déoxygénation n’a pas été positionné, il se situerait entre les C53 et C78 (Tartaglione *et al.*, 2016). Enfin, l’hydroxy-palytoxine (ou OH-PITX) possède un atome d’oxygène supplémentaire par rapport à la PITX. Des traces de 42-OH-PITX, dont l’oxygénation se situe sur le C42, ont été trouvées chez *Palythoa tuberculosa* et *Palythoa toxica* (Ciminiello *et al.*, 2009). De l’OH-PITX a été identifiée chez *Palythoa* cf. *toxica* mais le site de l’oxygénation n’a pas été déterminé, il se situerait entre C79 et C93 (Tartaglione *et al.*, 2016).

1.4.1.2. Dinoflagellés appartenant au genre *Ostreopsis*

Plusieurs études ont décrit des composés ressemblant aux analogues de PITX, chez des dinoflagellés libres du genre *Ostreopsis* (Dinophyceae) (Usami *et al.*, 1995; Lenoir *et al.*, 2004; García-Altare *et al.*, 2015). Ces molécules portent des noms différents selon qu’elles ont été nommées en fonction du genre *Ostreopsis* ou en fonction de l’espèce à partir desquelles elles ont été isolées.

La distribution géographique des espèces d’*Ostreopsis* est très importante et le genre comprend majoritairement des dinoflagellés benthiques (vivant à proximité du fond marin) et épiphytes (vivant sur d’autres organismes). Bien qu’ils soient plutôt répandus dans les environnements marins tropicaux et subtropicaux, ces dinoflagellés sont détectés principalement en périodes estivales et de plus en plus régulièrement dans les régions tempérées du globe, probablement à cause du réchauffement climatique (Katikou, 2007). Récemment, la présence d’*Ostreopsis* spp. potentiellement toxiques a été reportée dans plusieurs pays méditerranéens, s’ensuivit une augmentation significative de la toxicité des fruits de mer et des syndromes respiratoires chez les personnes exposées aux aérosols marins (Ciminiello *et al.*, 2015).

Ostreopsis siamensis. Les premières molécules ressemblant à la PITX et isolées chez un organisme n’appartenant pas au genre *Palythoa*, sont les ostréocines (Ost). Usami *et al.* (1995) ont isolé l’Ost-d, présente en majorité chez *Ostreopsis siamensis* provenant du Japon. Structuellement,

l'Ost-d peut être comparée à une molécule de PITX mais où les groupements méthyle sur C3 et C26 et les groupements hydroxyles sur C19 et C44 sont absents, et où un groupement hydroxyle est présent sur C42. Chimiquement, l'Ost-d a été identifiée comme étant la 42-hydroxy-3,26-dideméthyl-19,44-didéoxypalytoxine (**Figure 1**). Bien que des efflorescence d'*Ostreopsis siamensis* se produisent régulièrement en Méditerranée, l'Ost-d n'y a jamais été détectée jusqu'à présent (Paz *et al.*, 2011; Ciminiello *et al.*, 2013). A côté de l'Ost-d, des traces d'autres ostréocines ont été identifiées chez *Ostreopsis siamensis* du Japon mais en quantités trop faibles pour permettre l'identification précise de leur formule ou structure chimique par spectrométrie de masse et RMN. Toutefois, une structure potentielle a été proposée pour l'Ost-b qui présenterait une oxygénation supplémentaire sur C44 par rapport à l'Ost-d, et serait donc de la 42-hydroxy-3,26-dideméthyl-19-déoxypalytoxine (Ukena *et al.*, 2001).

Ostreopsis mascarenensis est la plus grande espèce du genre avec un diamètre dorso-ventral de 113 à 195 μm (Quod, 1994). En 2004, Lenoir *et al.* (2004) ont purifié et caractérisé par spectrométrie de masse, deux composés ayant des effets semblables à ceux de la PITX à partir d'*Ostreopsis mascarenensis* de l'archipel des Mascareignes (Océan Indien), et ils les ont nommés mascarénotoxines (McTX) -a et -b. La structure chimique de ces analogues de PITX n'a pas été identifiée mais ils auraient des poids moléculaires compris entre 2500 et 2535 Da.

Ostreopsis ovata est la plus petite espèce du genre, elle présente un diamètre dorso-ventral de 50 – 56 μm (Fukuyo, 1981). Plusieurs ovatoxines (OvTXs) ont été identifiées dans cette espèce et sept ont été décrites, OvTXs -a à -h (Ciminiello *et al.*, 2010, 2012; Brissard *et al.*, 2015; García-Altare *et al.*, 2015). L'OvTX-a, la plus étudiée et la majoritaire, possède trois atomes d'oxygène de moins par rapport à la PITX, sur C17, C44 et C64 (**Figure 1**), et un de plus sur C42. *O. ovata* produit également une molécule dont la structure n'a pas été complètement identifiée et qui est supposée être de la PITX. Cette molécule a été nommée palytoxine isobarique (García-Altare *et al.*, 2015).

1.4.1.3. Procaryotes

La production de PITX ainsi que de 42-OH-PITX, a été démontrée chez une cyanobactérie marine du genre *Trichodesmium* par spectrométrie de masse (Kerbrat *et al.*, 2011). Par ailleurs, Frolova *et al.* (2000) ont produit des anticorps anti-PITX par injection de PITX couplée à de la BSA et de l'adjuvant de Freund chez des lapins, et avec lesquels ils ont détecté des composés ayant des propriétés antigéniques semblables à celles de la PITX, chez des bactéries Gram négatives appartenant aux genres *Aeromonas* et *Vibrio* et extraites à partir de *Palythoa* sp. Mais une fois cultivées en milieu artificiel, hors du *Palythoa* sp., la PITX n'a plus été détectée chez ces mêmes bactéries après plusieurs inoculations (cultures) successives. Similairement, Seemann *et al.* (2009) ont identifié une toxine chez des bactéries isolées à partir de *Palythoa caribaeorum* et présentant une activité hémolytique semblable à celle de la PITX. Cependant, l'absence d'étude par spectrométrie de masse dans ces deux dernières études n'a pas permis d'identifier avec certitude la présence de PITX chez ces bactéries isolées de *Palythoa* spp.

1.4.2. Effet des facteurs environnementaux sur la production de palytoxine

Les résultats présentés dans la littérature et concernant l'identification et la quantification de PITX chez les *Palythoa* spp. (**Tableau 1**), indiquent que des individus d'une même espèce peuvent présenter un profil toxinique différent, c'est-à-dire que, soit ils ne produisent pas les mêmes molécules (PITX ou analogues), soit les quantités produites sont très variables.

Des observations similaires ont été faites chez différentes souches d'une même espèce d'*Ostreopsis*. Ainsi, une souche *Ostreopsis* cf. *ovata* provenant des côtes méditerranéennes françaises produit les ovatoxines de -a à -e (Brissard *et al.*, 2014), alors qu'une souche d'Italie de la même espèce produit les ovatoxines de -a à -f (Ciminiello *et al.*, 2012), et qu'une autre du Japon produit les ovatoxines -a, -d et -e (Uchida *et al.*, 2013). De plus, les quantités de toxines dans les cellules varient.

Les paramètres environnementaux pourraient influencer la production des toxines, ce qui expliquerait les variations de profils toxiniques chez des individus d'une même espèce (de genre *Ostreopsis* ou *Palythoa*) vivant dans des milieux ou des conditions différentes.

Toutefois les résultats portant sur *Ostreopsis* cf. *ovata* sont à prendre avec précaution car, même si la région génomique ITS (ITS1 – 5,8S – ITS2) utilisée pour identifier les échantillons d'*Ostreopsis* dans ces trois études est efficace pour identifier les espèces d'*Ostreopsis* (Penna *et al.*, 2006), rien ne dit qu'elle permet de distinguer des sous-populations au sein de cette espèce. Il pourrait ainsi y avoir des sous-populations différentes d'*Ostreopsis* cf. *ovata* en France, en Italie et au Japon, et qui produisent des ovatoxines différentes en raison de variations génétiques intraspécifiques qui ne peuvent être mises en évidence par le marqueur génétique utilisé.

1.5. Aspects toxicologiques de la palytoxine

1.5.1. Toxicité et symptômes chez les mammifères

La PITX est le composé naturel non-protéique le plus toxique connu. Sa toxicité est extrême chez les mammifères. La première étude majeure chez différentes espèces de mammifères date des années 1970s (Wiles *et al.*, 1974). Elle montre que le degré de toxicité de la PITX extraite de *Palythoa vestitus* est principalement lié à la fois à son mode d'administration et à l'espèce animale, ces résultats seront détaillés dans les paragraphes suivants. Les toxicités sont généralement exprimés sous forme de doses létales médianes sur 24 h (24h-DL50), c'est-à-dire qu'elles expriment les doses de PITX létales pour la moitié des sujets (ici, mammifères) utilisés dans l'expérience après une durée de 24 h. Depuis les années 1970s, d'autres études ont porté sur la toxicité de la PITX chez les mammifères par différentes voies d'administration, les principaux résultats sont répertoriés dans le **Tableau 3** suivant.

Espèce	Voie d'administration	Origine/type de palytoxine	Temps (h)	DL50 (ng/kg)	Référence
Lapin (46)	i.v.	<i>Palythoa vestitus</i>	24	25	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Lapins (1)	p.c.	<i>P. vestitus</i>	24	250 ^{1,2}	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Lapins (2)	i.o.	<i>P. vestitus</i>	24	400 ¹	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Lapins (2)	i.d.	<i>P. vestitus</i>	24	550 ^{1,2}	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Chiens (32)	i.v.	<i>P. vestitus</i>	24	33	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Chiens (NS)	i.v.	<i>P. tuberculosa</i>	24	50	Ito <i>et al.</i> , 1982
Chiens (17)	i.m.	<i>P. vestitus</i>	24	80	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Singes rhésus (24)	i.v.	<i>P. vestitus</i>	24	78	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (50)	i.v.	<i>P. vestitus</i>	24	89	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (30)	i.m.	<i>P. vestitus</i>	24	240	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (21)	i.t.	<i>P. vestitus</i>	24	360	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (30)	s.c.	<i>P. vestitus</i>	24	400	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (34)	i.p.	<i>P. vestitus</i>	24	710	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (12)	i.r.	<i>P. vestitus</i>	24	>10 000	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (42)	i.g.	<i>P. vestitus</i>	24	>40 000	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Rats (2)	i.d.	<i>P. vestitus</i>	24	550 ^{1,2}	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Cochons d'Inde (38)	i.v.	<i>P. vestitus</i>	24	110	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Cochons d'Inde (2)	i.d.	<i>P. vestitus</i>	24	550 ^{1,2}	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Souris (NS)	i.v.	<i>P. toxica</i>	NS	150	Moore et Scheuer, 1971
Souris (96)	i.v.	<i>P. vestitus</i>	24	450	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Souris (102)	i.p.	Wako	24	295	Riobó <i>et al.</i> , 2008a
Souris (NS)	i.p.	<i>P. toxica</i>	NS	400	Moore et Scheuer, 1971
Souris (NS)	i.p.	<i>P. tuberculosa</i>	24	500	Levine <i>et al.</i> , 1987
Souris femelles CD-1 (35)	i.g.	42-OH-PITX	24	651	Tubaro <i>et al.</i> , 2011
Souris femelles Swiss (NS)	i.p.	HBG	48	720	Rhodes <i>et al.</i> , 2002
Souris femelles CD-1 (30)	i.g.	Wako	24	767	Sosa <i>et al.</i> , 2009
Souris (32)	s.c.	<i>P. vestitus</i>	24	1 390	Wiles <i>et al.</i> , 1974
Souris (42)	i.g. répétées	Wako	7 d	>30 000/d ³	Del Favero <i>et al.</i> , 2013
Souris Swiss albino (NS)	i.g.	<i>P. sp.</i>	24	>2,5×10 ⁶ ¹	Munday et Reeve, 2013

Tableau 3. Toxicité de la palytoxine via différentes voies d'administration chez des espèces de mammifères. ¹ non létal aux doses testées ; ² dose administrée par animal et non par kg ; ³ injections réalisées une fois par jour pendant 7 jours ; ⁴ palytoxine mixée à la nourriture. Le nombre d'animaux utilisés pour les tests est mentionné entre parenthèses. Abréviations : i.d., intradermale ; i.g, intragastrique ; i.m., intramusculaire ; i.o., intra-oculaire ; i.p., intra-péritonéale ; i.r., intra-rectale ; i.t., intra-trachéale ; i.v., intraveineuse ; p.c., percutanée ; s.c., sous-cutanée ; ND, non-déterminé ; NS, non spécifié ; HBG, palytoxine obtenue auprès de Hawaii Biotechnology Group, l'espèce de *Palythoa* utilisée n'est pas mentionnée ; Wako, lot de palytoxine acheté auprès de l'entreprise Wako (Japon) qui réalise ses extractions à partir de *Palythoa tuberculosa*.

1.5.1.1. Injections en intraveineuse

La PITX montre le plus haut degré de toxicité lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse (i.v.), et elle est la plus toxique chez les lapins (24h-LD50, 25 ng/kg), suivi par les chiens bâtards (33 – 50 ng/kg), les singes rhésus (78 ng/kg), les rats (89 ng/kg), les cochons d'Inde (110 ng/kg) et les souris (150-450 ng/kg) (Moore et Scheuer, 1971; Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975; Ito *et al.*, 1982).

La mort survient généralement rapidement après l'injection mais le temps entre l'injection et la mort est dépendant de la dose injectée (Wiles *et al.*, 1974). Les principaux symptômes incluent des états d'ataxie, de somnolence et d'épuisement avant la mort (Wiles *et al.*, 1974). Quelques symptômes supplémentaires apparaissent en fonction des espèces, comme la dyspnée et les convulsions chez les rats, les souris et les cochons d'Inde, la perte de poils chez les souris, des crises cardiaques chez les singes et les chiens, la défécation, des vomissements et des saignements importants dans le tractus gastro-intestinal chez les chiens (Wiles *et al.*, 1974). Les études histologiques ont mis en évidence des dommages dans de nombreux organes comme le foie, le tractus gastro-intestinal, les poumons, les reins et le cerveau (Moore et Scheuer, 1971; Wiles *et al.*, 1974, Vick et Wiles, 1975; Ito *et al.*, 1982).

1.5.1.2. Injections intrapéritonéales

Plusieurs études se sont concentrées sur l'injection intrapéritonéale (i.p.) de PITX chez des mammifères. D'ailleurs l'injection i.p. d'extraits de fruits de mer ou de microalgues chez la souris est devenu un test courant pour évaluer la contamination de ces échantillons par la PITX ou d'autres substances toxiques (Fukui *et al.*, 1987; Taniyama *et al.*, 2003; Ito et Yasumoto, 2009).

L'étude de Wiles *et al.* (1974) indique que la toxicité de la PITX chez le rat est moins importante par voie i.p. (24h-LD50 : 710 ng/kg) que par i.v. (24h-LD50 : 89 ng/kg). La même observation a été faite chez la souris où les valeurs des 24h-DL50 par i.p. varient de 295 à 720 ng/kg (Moore et Scheuer, 1971; Levine *et al.*, 1987; Rhodes *et al.*, 2002; Riobó *et al.*, 2008a), et les valeurs des 24h-DL50 par i.v. de 150 à 450 ng/kg.

Les symptômes présentés par les animaux ayant reçu de la PITX par voie i.p. sont comparables à ceux ayant reçu des injections en i.v., avec en plus des irritations de la peau et des gonflements locaux à l'endroit des injections, ainsi qu'un délai plus long entre l'injection de PITX et l'apparition des symptômes et de la mort (Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975).

1.5.1.3. Injections par voie intragastrique

Parmi toutes les voies d'administration de la PITX testées chez le rat, l'injection par voie orale s'est révélée être la moins létale (24h-DL50, >40 µg/kg) (Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975). Cette diminution de toxicité est probablement due à la faible absorption de la toxine à travers le tube gastro-intestinal, conséquence de son caractère hydrophile (Patocka *et al.*, 2015). De plus, elle pourrait être dégradée par les enzymes gastriques ainsi que par l'acidité de l'estomac. Ajouté à

cela, des injections intra-rectales, sans passer par l'estomac, montrent des 24h-DL50 de l'ordre de 10 µg/kg, ce qui correspond à une toxicité quatre fois plus élevée que les injections par voie orale (Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975). D'autres études portant sur des injections intragastriques de PITX chez la souris ont montré des valeurs de 24h-DL50 comprises entre 651 et 767 ng/kg (Sosa *et al.*, 2009; Aligizaki *et al.*, 2011). En exposant des souris à des doses journalières répétées de PITX pendant une semaine, Del Favero *et al.* (2013) ont défini une dose maximale sans effet nocif observé (en anglais, No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) de 30 µg/kg/d.

1.5.1.4. Autres voies d'injection

Les 24h-DL50 des injections de PITX chez le rat par voie intramusculaire (240 ng/kg), intratrachéale (360 ng/kg) et sous-cutanée (400 ng/kg) sont comparables à celles par i.p. Les symptômes engendrés par ces quatre voies d'administration sont également comparables, les injections intratrachéales induisant cependant des problèmes respiratoires plus importants que les trois autres (Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975).

La PITX instillée dans les yeux de lapins, à raison de 0,1 – 0,4 µg/kg, n'a pas provoqué la mort des animaux mais a induit, après 24 h, la fermeture de l'œil ainsi que l'apparition d'exsudats de pus et de sang, de conjonctivites, d'œdèmes, d'ulcérations et d'opacités de la cornée (Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975).

Les injections de PITX par voies intradermale (0,55 µg) et percutanée (0,5 µg) à faibles concentrations non létales ont provoqué une inflammation et une nécrose locales de la peau ainsi que des dommages aux organes internes chez des lapins (Wiles *et al.*, 1974; Vick et Wiles, 1975).

1.5.1.5. Toxicité, intoxications et symptômes chez l'homme

De toute évidence, la dose létale de PITX chez l'homme n'a pas été déterminée expérimentalement. Cependant, l'extrapolation à partir des 24h-DL50 mesurées pour des injections de PITX en i.v. chez plusieurs espèces de mammifères (**Tableau 3**) ont permis d'évaluer la dose létale chez l'homme entre 25 et 450 ng/kg, soit entre 2,3 et 31,5 µg pour un homme adulte de poids moyen (Riobó *et al.*, 2006).

Actuellement, les empoisonnements humains par la PITX et ses analogues sont fréquents et représentent un réel danger. Il existe trois principaux modes d'intoxication :

Par le milieu marin. Lorsque les conditions sont favorables, les microalgues du genre *Ostreopsis* produisent régulièrement des efflorescences marines (proliférations rapides, en anglais 'blooms') qui aboutissent à une concentration très importantes de ces organismes en milieu marin, principalement en surface et près des côtes. Lorsque ces efflorescences sont formées par des espèces toxiques contenant de la PITX ou des analogues et que des embruns marins contenant ces molécules sont transportés par le vent, il arrive qu'ils aillent intoxiquer des personnes présentes à proximité par inhalation ou par contact dermique. Ce type d'intoxication est reporté en Méditerranée depuis le début des années 2000. L'évènement le plus marquant concerne l'été 2005

pendant lequel des centaines de personnes ont été intoxiquées à Gênes, en Italie, et ont eu besoin de soins médicaux suite à l'inhalation d'aérosols contenant des fragments d'*Ostreopsis* spp. toxiques (Brescianini *et al.*, 2006). Les symptômes présentés par les personnes intoxiquées incluaient de fortes fièvres associées à des problèmes respiratoires sévères telles que des rhinorrhées aqueuses (écoulements nasaux), des toux sèches ou légèrement grasses, des bronchoconstrictions avec une légère dyspnée (difficultés respiratoires) et des sifflements. Quelques cas de conjonctivites ont également été observés.

Par l'alimentation. La PITX et ses analogues ont été détectées chez divers animaux marins comme des crabes (Yasumoto *et al.*, 1986; Alcalá *et al.*, 1988; Lau *et al.*, 1995), divers poissons (Hashimoto *et al.*, 1969; Fukui *et al.*, 1987 et 1988; Kodama *et al.*, 1989), des mollusques incluant des moules, des coques, des huîtres et des pétoncles (Ramos et Vasconcelos, 2010; Paredes *et al.*, 2011). Cette bioaccumulation de PITX dans des animaux marins de consommation humaine (Gleibs et Mebs, 1999; Ramos et Vasconcelos, 2010) a entraîné plusieurs cas d'empoisonnement, parfois mortels chez l'homme (Gonzales et Alcalá, 1977; Alcalá, 1983; Alcalá *et al.*, 1988; Noguchi *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999; Deeds et Schwartz, 2010; Paredes *et al.*, 2011). Dès lors, l'autorité européenne de sécurité des aliments (en anglais, European Food Safety Authority, EFSA) a recommandé l'établissement d'une limite maximale de 30 µg de PITX et d'ostreocine-d par kg de fruits de mer afin de mieux protéger les consommateurs (EFSA, 2009). Ce seuil correspond à la valeur létale maximale estimée chez un homme de poids moyen et pourrait être trop élevé. Les principaux symptômes présentés par les personnes ayant ingéré des aliments contaminés par de la PITX sont principalement des douleurs thoraciques, des troubles gastro-intestinaux, des nausées, des vomissements, des problèmes respiratoires, une augmentation et des troubles du rythme cardiaque, une fluctuation de la pression sanguine, une hémolyse (destruction des globules rouges), des ataxies (manque de coordination des mouvements volontaires), des spasmes musculaires, des convulsions, des engourdissements des extrémités et des vertiges.

Par l'aquariophilie. Il a été récemment constaté que plusieurs *Palythoa* spp. toxiques, et contenant par gramme de polype, jusqu'à 3,5 mg de déoxy-PITX et 1 mg de PITX, sont couramment vendues en magasins d'aquariophilie (Deeds *et al.*, 2011). Ces coraux se retrouvent alors régulièrement dans les aquariums des particuliers et peuvent causer des intoxications domestiques. Les accidents les plus souvent rapportés se sont produits lorsque des particuliers ont voulu se débarrasser de *Palythoa* spp. contenant de la PITX devenues trop envahissantes en les ébouillantant, ce qui a formé des vapeurs d'eau toxiques qui, après inhalation, ont provoqué des problèmes respiratoires importants, des fièvres, des douleurs musculaires, des troubles de la tension artérielle et des maux de tête (Snoeks et Veenstra, 2012; Hall *et al.*, 2015). Des irritations cutanées ont également été répertoriées suite à des contacts avec des *Palythoa* spp. toxiques (Nordt *et al.*, 2011). Dans d'autres cas, ce sont des projections de gouttelettes d'eau contenant de la PITX dans les yeux qui ont provoqué des conjonctivites et des inflammations de la cornée (Moshirfar, 2010; Ruiz *et al.*, 2015).

1.6. Mécanisme d'action de la palytoxine : la pompe sodium-potassium (NaK)

1.6.1. Rôle physiologique de la NaK

L'intérieur de chaque cellule vivante est chargé négativement par rapport à son environnement. Ce gradient électrochimique est entretenu par l'activité des pompes sodium-potassium (NaK) (Habermann, 1989) qui sont des enzymes insérées dans la membrane plasmique d'un grand nombre de cellules animales et qui transportent des ions sodium (Na^+) et potassium (K^+) de part et d'autre de cette membrane à travers le cycle de Post-Albers (**Figure 3**). En accumulant les ions Na^+ à l'extérieur de la cellule et les ions K^+ à l'intérieur, les NaK maintiennent le potentiel membranaire de la cellule qui fournit la base de la communication neuronale et contribue à réguler la pression osmotique ainsi que le volume cellulaire. De plus, le gradient de Na^+ sert de force motrice à des transporteurs actifs secondaires comme les cotransporteurs glucose/sodium (Wright, 2001; Turk et Wright, 2004) et l'échangeur calcium/sodium (Yu et Choi, 1997).

1.6.1.1. Le cycle de Post-Albers

La NaK est une ATPase qualifiée de 'type P' car elle catalyse la transformation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) en libérant un ion phosphate. Cette réaction de déphosphorylation libère de l'énergie qui est utilisée par la NaK pour transporter des ions contre leur gradient de concentration. Lors de chaque cycle de Post-Albers, la NaK hydrolyse une molécule d'ATP et échange trois ions Na^+ du milieu intracellulaire contre deux ions potassium (K^+) du milieu extracellulaire (Post *et al.*, 1972; Beaugé et Glynn, 1979). La NaK possède deux états conformationnels, E1 et E2, qui se distinguent par différentes affinités pour l'ATP et les ions Na^+ et K^+ . Ces deux états diffèrent également par l'ouverture de la NaK qui est soit ouverte sur le milieu intracellulaire (E1) soit ouverte sur le milieu extracellulaire (E2). En début de cycle de Post-Albers, la NaK est dans l'état conformationnel E1, elle est donc ouverte du côté cytoplasmique et fermée du côté extracellulaire et elle a une forte affinité pour l'ATP ($K_d = 0,1 - 0,2 \text{ mM}$) et les ions Na^+ ($K_d = 0,19 - 0,26 \text{ }\mu\text{M}$) (**Figure 3, étape 1**). La NaK transforme alors une molécule d'ATP en ADP et se phosphoryle avec le phosphate libéré lors de cette transformation. L'énergie libérée par la phosphorylation change l'état conformationnel de la NaK qui passe à l'état P-E2 ('P' pour phosphorylé) en emprisonnant trois ions Na^+ (**Figure 3, étape 2**) (Skou, 1988; Glynn, 1993) dans sa structure. En passant à l'état P-E2, l'extrémité cytoplasmique de la NaK se ferme et son extrémité extracellulaire s'ouvre. De plus, la pompe perd son affinité pour l'ATP et les ions Na^+ ($K_d = 14 \text{ mM}$) alors que son affinité pour K^+ augmente ($K_d = 0,1 \text{ mM}$). Les trois ions Na^+ sont relargués dans le milieu extracellulaire et deux ions K^+ se lient à la NaK (**Figure 3, étape 3**). La liaison de 2 ions K^+ à la NaK provoque une déphosphorylation spontanée de la pompe qui entraîne l'emprisonnement des 2 ions K^+ dans la structure de la NaK (**Figure 3, étape 4**). Cette

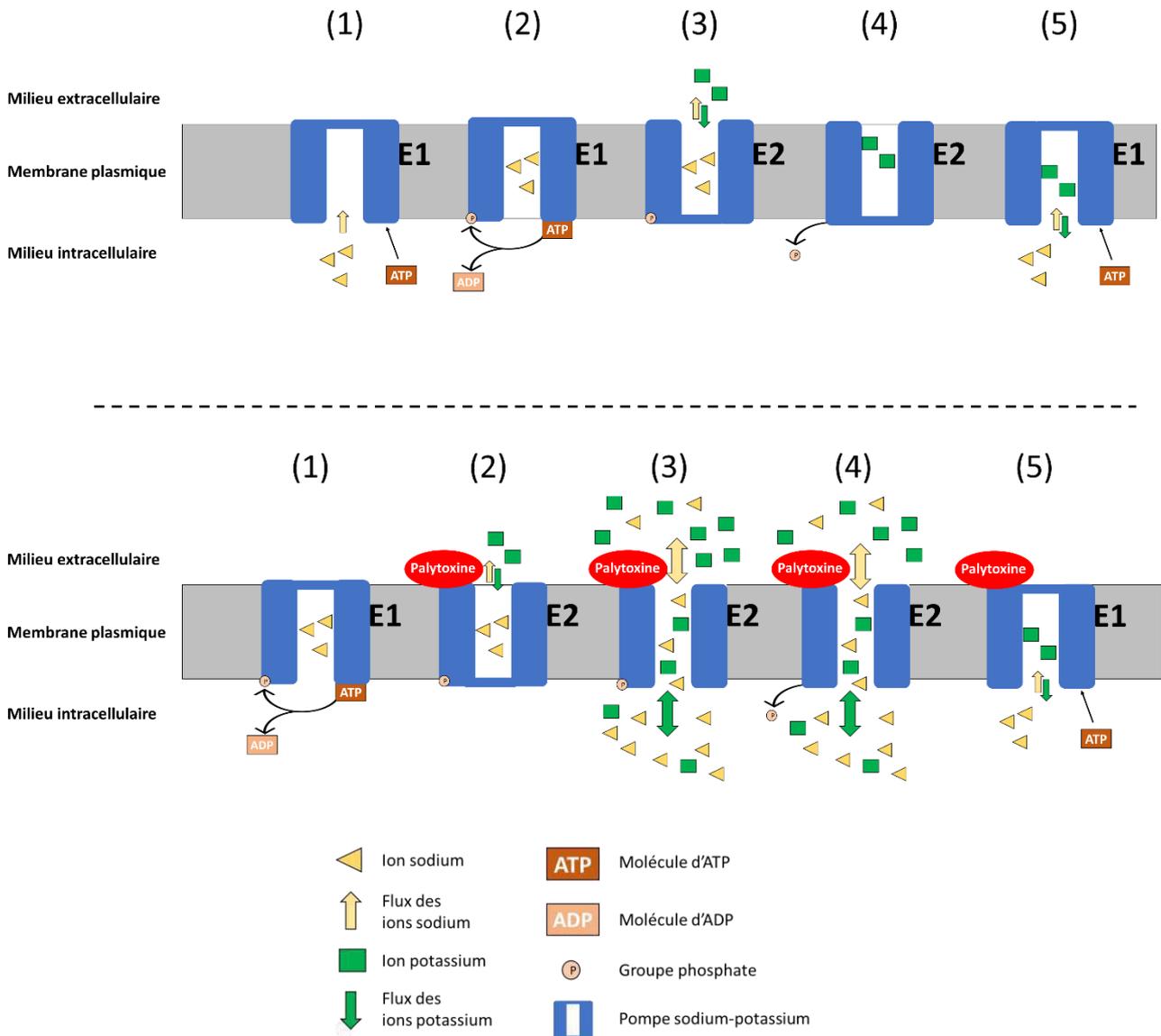


Figure 3. Représentation schématique du cycle de Post-Albers de la pompe sodium-potassium.
Cycle normal (haut) : la pompe sodium-potassium (NaK), dans l'état conformationnel E1, a une forte affinité pour les ions sodium (Na^+) et pour l'ATP, elle fixe trois Na^+ et une molécule d'ATP du milieu intracellulaire (1). La NaK transforme l'ATP en ADP et se phosphoryle avec le groupe phosphate relargué (2), ce qui fait passer la NaK dans l'état conformationnel E2, et ferme son extrémité intracellulaire et ouvre son extrémité extracellulaire, l'affinité pour Na^+ diminue et celle pour les ions potassium (K^+) augmente. La NaK relargue les 3 Na^+ et capte deux ions K^+ (3). La NaK se déphosphoryle (4), ce qui permet le retour à l'état E1, l'affinité pour Na^+ et l'ATP redevient forte tandis que celle pour K^+ redevient faible. La NaK relargue les deux ions K^+ et capte trois ions Na^+ (5). **En présence de palytoxine (bas) :** (2) la palytoxine (PITX) se fixe préférentiellement sur une NaK dans l'état conformationnel E2, dont l'extrémité cytoplasmique est fermée et l'extrémité extracellulaire ouverte. (3) La fixation de la PITX ouvre l'extrémité cytoplasmique de la NaK, ce qui transforme la NaK en un canal cationique non-spécifique et entraîne un flux d'ions selon leur gradient de concentration. La NaK se déphosphoryle (4), ce qui permet le passage à l'état E1 et ferme son extrémité extracellulaire (5).

déphosphorylation entraîne le retour de la NaK à l'état E1, la fermeture de l'extrémité extracellulaire et l'ouverture de l'extrémité intracellulaire. L'affinité de la pompe redevient faible pour K^+ alors qu'elle redevient forte pour Na^+ et pour l'ATP. Les ions K^+ sont relargués dans le milieu intracellulaire et le cycle peut recommencer (**Figure 3, étape 5**) (Glynn, 1993; Skou, 1988).

1.6.2. Structure de la NaK

La NaK est constituée par deux sous-unités, α et β , voire une troisième sous-unité, γ , dans le cas de certains tissus (**Figure 4**). Plusieurs isoformes de chaque sous-unité ont été mises à jour.

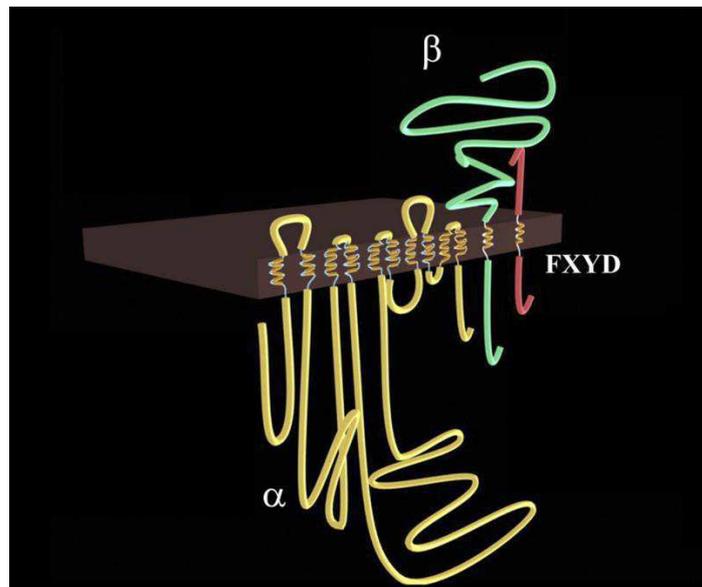


Figure 4. Représentation schématique de la pompe sodium-potassium (D'après Mijatovic *et al.*, 2007). La NaK est composée de la sous-unité α catalytique qui forme 10 domaines transmembranaires (représentée en jaune) et de la sous-unité β régulatrice qui comprend plusieurs sites de glycosylation (représentée en vert). Une troisième sous-unité supplémentaire (représentée en rouge) peut être associée à la NaK ; elle a une fonction régulatrice et appartient à la famille des protéines FXYD. En marron, la membrane plasmique ; haut, milieu extracellulaire ; bas, milieu intracellulaire.

La sous-unité α constitue la sous-unité catalytique car elle se lie à l'ATP et emprisonne les ions Na^+ et K^+ dans sa structure lors de leur transport. Chez l'homme, son poids moléculaire est de 100 – 113 kDa selon les isoformes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (Tokhtaeva *et al.*, 2012). Elle a une structure en lacet qui traverse dix fois la membrane plasmique, formant les domaines transmembranaires M1 à M10. Les terminaisons Nter et Cter sont situées du côté intracellulaire (Antolovic *et al.*, 1991).

La sous-unité β est hautement glycosylée, elle a une masse moléculaire d'environ 60 kDa. Chez l'homme, la fraction protéique de cette sous-unité est de 36 – 38 kDa selon les isoformes $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Tokhtaeva *et al.*, 2012). Elle traverse la membrane plasmique une seule fois, son extrémité Nter se trouve du côté intracellulaire et son extrémité Cter du côté extracellulaire. Les rôles joués par la sous-unité β ne sont pas tous clairement identifiés à ce jour mais les différentes isoformes β

peuvent favoriser l'équilibre de la NaK soit vers l'état E1 soit vers l'état E2 (Hilbers *et al.*, 2016). De plus, par sa relation avec la sous-unité α , elle modulerait l'activité de transport de la NaK en influençant l'affinité de cette dernière pour les ions Na^+ et K^+ (Jaunin *et al.*, 1993).

La troisième sous-unité pouvant être associée à la NaK est la sous-unité γ , appelée aussi FXYD. Il existe sept isoformes de FXYD chez l'homme, allant de 7 à 11 kDa (Tokhtaeva *et al.*, 2012). Il s'agit d'une petite protéine membranaire spécifiquement associée à la NaK (Béguin *et al.*, 1997), probablement par des interactions avec le domaine Cter de la sous-unité α (Donnet *et al.*, 2001). Bien que la présence de la sous-unité γ ne soit pas essentielle pour obtenir une activité NaK (Scheiner-Bobis et Farley, 1994), sa présence modifie l'affinité de la NaK pour l'ATP et les ions Na^+ et K^+ (Arystarkhova *et al.*, 1999; Therien *et al.*, 1999), régulant ainsi son activité de manière tissu et isoforme spécifique.

1.6.3. Mécanisme de fixation de la palytoxine sur la NaK

Le site de liaison de la PITX sur la NaK est couplé à d'autres cardénolides tels que l'ouabaïne qui est connue pour se lier à la sous-unité α de la NaK (Habermann et Chhatwal, 1982). L'ouabaïne présente une action antagoniste à la PITX, car une fois liée, elle provoque la fermeture totale de la NaK et empêche la diffusion des ions (Habermann et Chhatwal, 1982; Schilling *et al.*, 2006; Vale-Gonzalez *et al.*, 2007; Pelin *et al.*, 2012). Des résultats de cinétiques récents ont révélé que la dissociation de la PITX liée à la NaK par la compétition de l'ouabaïne était incomplète, ce qui laisse suggérer que les sites de fixation de la PITX et de l'ouabaïne sur les pompes NaK ne sont pas exactement identiques bien que ces deux toxines partagent des déterminants structurels (Artigas et Gadsby, 2003, 2006; Pelin *et al.*, 2013).

D'autres études ont montré que la NaK n'est pas l'unique seule cible de la PITX, cette dernière pouvant également interférer avec le fonctionnement d'autres ATPases de type P comme la pompe Ca^{++} du réticulum sarcoplasmique (Coca *et al.*, 2008) et la pompe H^+/K^+ du colon (Scheiner-Bobis *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont mis en avant le fait que la PITX pouvait agir comme un promoteur tumoral en modifiant la composition de la protéine activatrice AP-1 via l'activation de protéines kinases activées par des agents mitogènes (en anglais, Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs) suite à sa liaison à la NaK, cette dernière étant un récepteur (Wattenberg, 2011) (**Figure 5**). AP-1 est un hétérodimère composé de protéines de types c-Fos et c-Jun. Elle est reconnue pour jouer un rôle important dans la promotion tumorale (Young *et al.*, 1999). La PITX influe sur la nature de AP-1 de plusieurs manières. Premièrement, le stress osmotique engendré par l'afflux important d'ions dans la cellule suite à la liaison de la PITX sur la NaK déclenche des voies de signalisation qui stimulent l'activité de c-Jun, p38 et ERK5. Ensuite, la PITX augmente l'activité de ERK2 en diminuant l'activité de sa phosphatase MKP-3. ERK2 et ERK5 contrôlent l'expression du gène c-Fos. Ainsi, la composition de AP-1 est modulée par la PITX soit par l'augmentation de l'activité de ERK2 et ERK5 qui augmentent l'expression du gène c-Fos, soit par l'activation de l'expression de

c-Jun suite au stress osmotique, ce qui entraîne une modification de AP-1 et peut conduire à la promotion de tumeurs (Wattenberg, 2011).

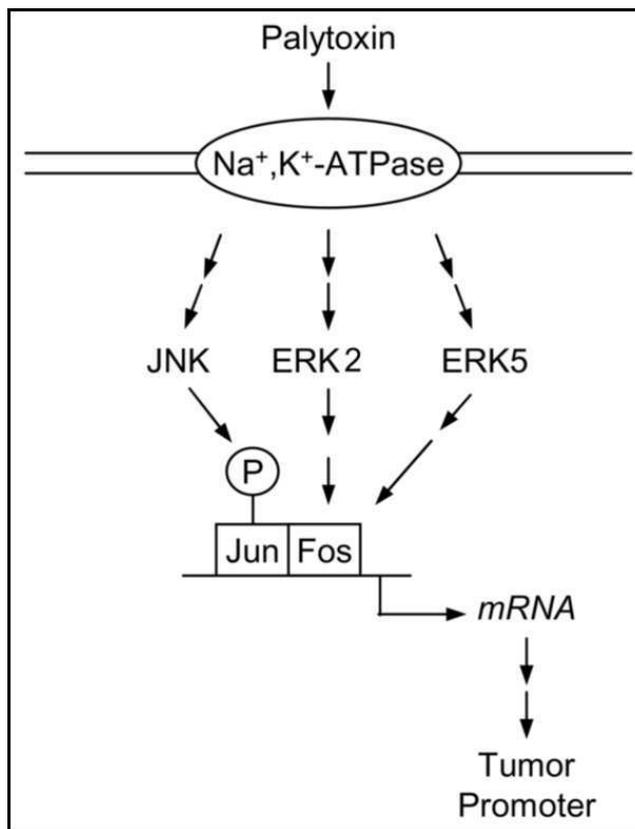


Figure 5. Activation des MAPKs suite à la liaison de la palytoxine sur la pompe sodium/potassium. En se liant à la pompe NaK, la palytoxine module l'activité de la protéine AP-1 un promoteur tumoral dont la structure est un hétérodimère composé de protéines c-Fos et c-Jun. La protéine influence AP-1 en modifiant sa composition à la fois en augmentant l'activité de ERK2 et ERK5 et ainsi l'augmentation de l'expression du gène c-Fos, et en augmentant l'activité de c-Jun suite au stress osmotique engendré par l'entrée de cations dans la cellule lors de la transformation des pompes en canaux. Cette modification de la composition de AP-1 peut conduire à la promotion de tumeurs.

1.7. Méthodes de détection biologiques de la palytoxine et de ses analogues

Les méthodes de détection et de quantification de la PITX et de ses analogues ont principalement été développées pour des raisons sanitaires. En effet, en raison du nombre croissant d'intoxications alimentaires par ces toxines, il devenait urgent de pouvoir les déceler dans les aliments. Actuellement et bien que l'EFSA recommande une limite maximale de 30 µg de PITX par kg de fruits de mer (EFSA, 2009). Il n'existe pas de méthode standard pour détecter et doser ces composés dans les échantillons. Toutefois, plusieurs types de méthodes de détection ont été développées (pour revue Carmen Louzao *et al.*, 2015).

1.7.1. Tests biologiques sur des rongeurs

La première méthode développée pour détecter la PITX et ses analogues consiste à injecter par voie i.p. des extraits de fruits de mer chez des rongeurs. Cette méthode est largement répandue pour tout ce qui concerne l'analyse de la toxicité des toxines marines. Dès la découverte de la PITX et de ses analogues, cette méthode a été développée pour déterminer la présence ou non de composés toxiques dans des échantillons, et cela avant de les identifier par des méthodes chimiques. L'inconvénient de ce test biologique est qu'il ne donne aucune indication sur la provenance des toxines présentes, mais il permet de caractériser globalement la toxicité d'un extrait, et d'autre part d'en étudier les symptômes qui eux dépendent de la dose et de la voie d'administration (cf. 1.5.1. 'Toxicité et symptômes chez les mammifères'). La limite de détection (LD) de ce test peut difficilement être estimée étant donné que la sensibilité du test dépend des animaux utilisés (âge, sexe, souche, etc.) et que les extraits injectés ne sont pas purs.

1.7.2. Tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité consistent à mesurer les effets de toxines sur des cultures de différentes lignées cellulaires. Ils présentent une alternative aux tests sur des animaux. Ils reposent sur la mesure des dommages cellulaires qui se traduisent par des changements morphologiques des cellules, la biosynthèse de différents métabolites en présence des toxines ou la mort des cellules. Ces tests sont généralement très sensibles et permettent de détecter la présence de PITX jusqu'à des concentrations de l'ordre de la picomole. La limite de détection de ces tests dépend des lignées cellulaires utilisées. Elle est de l'ordre du picomolaire sur les cellules humaines Hela (lignée cancéreuse) (Habermann *et al.*, 1989; Lau *et al.*, 1995) et les cellules de rat 3Y1 (lignée fibroblastique) (Oku *et al.*, 2004) et de 0,5 et 26,8 ng sur les cellules MCF-7 (cancer du sein) (Bellocci *et al.*, 2008; Sala *et al.*, 2009).

1.7.2.1. Tests cytotoxiques sur des cellules de neuroblastome

Différentes lignées de neuroblastomes ont été utilisées, avec ou non un prétraitement à l'ouabaine pour la détection des PITXs et de leurs analogues. La viabilité des cellules, qui peut être mesurée par l'activité oxydo-reductase mitochondriale catalysée par la succinate déshydrogénase, est inversement corrélée à la concentration en toxines. Cette activité mitochondriale peut être mesurée *via* des tests colorimétriques au MTT, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (Ledreux *et al.*, 2009), ou grâce aux tests colorimétriques à la resazurine (Espiña *et al.*, 2009). L'utilisation de microplaques comportant généralement 96 puits, permet de faire des analyses multiples avec une bonne statistique. Ce type de tests a l'avantage d'être sensible jusqu'à 0,2 ng/ml et est relativement simple d'utilisation. La limite de détection de ces tests est comprise entre 26,8 et 268 ng sur des cellules neuro-2a (neuroblastomes) et NG108-15 (lignée hybride neuroblastome x gliome) (Cañete et Diogène, 2008).

1.7.2.2. Autres tests cytotoxiques et différence de sensibilité

Plusieurs types de cellules ont été utilisés pour identifier la présence de PITX ou d'analogues : les cellules Hela (cellules cancéreuses humaines) (Lau *et al.*, 1995), les cellules de rats 3Y1 (cellules fibroblastiques) (Oku *et al.*, 2004) et les cellules MCF-7 (cancer du sein) (Bellocci *et al.*, 2008a et b). La quantification de la toxicité sur ces lignées est déterminée par l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) cytosolique dans le surnageant des cultures cellulaires. Les cellules exposées à la PITX et à ses analogues engendrent une lyse cellulaire proportionnelle à la dose de toxine et qui est mesurée par l'augmentation de LDH dans le milieu. La lyse cellulaire pouvant être inhibée par l'ouabaïne (Habermann et Chhatwal, 1982), elle constitue aussi une réponse spécifique à l'action de la PITX et de ses analogues.

Les hépatocytes de rats ont montré une plus grande sensibilité à la PITX que les cellules de neuroblastomes humains (Espiña *et al.*, 2009). L'explication tiendrait au fait que les cellules de rongeurs possèdent un isoforme de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe NaK qui est 100 fois moins sensible à l'ouabaïne (Habermann *et al.*, 1981; Espiña *et al.*, 2009).

La prolifération des cellules Caco-2 (lignée cellulaire intestinale humaine) est très sensible aux effets de la PITX (Pelín *et al.*, 2012). Cependant, des cellules Caco-2 se sont montrées suffisamment résistantes pour réaliser des études d'absorption *in vitro*. Une étude portant sur des monocouches de Caco-2 différenciées a montré en effet que ces cellules ne laissaient pas passer la PITX de façon significative (Fernández *et al.*, 2013).

L'effet cytotoxique de la PITX semble être plus prononcé sur les cellules cancéreuses de peau HaCaT que sur la peau de personnes ayant été exposées à des efflorescences d'*Ostreopsis* spp. (Pelín *et al.*, 2011). De plus, la présence de deux sites de liaison pour la PITX a été proposée, une sensible et une insensible à l'ouabaïne (Pelín *et al.*, 2013).

1.7.3. Tests hémolytiques

Lorsque la PITX ou ses analogues se fixent sur les pompes NaK, ces dernières se transforment en canaux non-spécifiques ouverts qui permettent aux cations de diffuser librement entre le milieu intra- et extracellulaire. Cette diffusion libre annule l'équilibre ionique et provoque à terme la lyse des cellules à cause de la pression osmotique. Dans le cas des érythrocytes, la PITX provoque un effet hémolytique différé, c'est-à-dire qu'après un certain laps de temps après l'injection de la molécule, les cellules lysent et leur contenu, principalement constitué d'hémoglobine, est déversé dans le milieu extracellulaire. Dans les tests hémolytiques, la mesure de la quantité d'hémoglobine relarguée est déterminée par spectrophotométrie UV-visible et la mesure du délai de l'effet hémolytique est également enregistrée. Ces deux données permettent d'évaluer la concentration de PITX contenue dans l'échantillon analysé. La sensibilité de ces tests dépend de l'origine spécifique des érythrocytes et des caractéristiques physiologiques de l'animal ainsi que du temps et de la température d'incubation (Habermann *et al.*, 1981; Bignami, 1993; Riobó *et al.*, 2008a). Les tests hémolytiques sont largement utilisés pour étudier la toxicité d'extraits de fruits de

mer même si plusieurs paramètres comme les matrices ou d'autres composés hémolytiques présents dans l'extrait peuvent causer des interférences.

1.7.4. Tests immunologiques

Des anticorps mono- et polyclonaux ont été utilisés pour développer différentes techniques d'immunodétection. Levine *et al.* (1988) ont été les premiers à synthétiser un anticorps anti-PITX à partir du lapin grâce à de la PITX marquée par l'agent radioactif ^{125}I de Bolton-Hunter. Par la suite, des tests de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée 'en sandwich' (en anglais, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) ont été développés (Bignami, 1993) et ont permis la quantification de la PITX. Après différentes mises au point, notamment pour éviter les interférences avec les matrices de fruits de mer contenant de la PITX, les tests ELISA en sandwich ont permis de détecter la PITX jusqu'à des concentrations de 1,1 ng/ml (Boscolo *et al.*, 2013).

Les anticorps monoclonaux anti-PITX ont également permis de développer une méthode de détection de PITX basée sur des capteurs électrochimoluminescents avec une limite de détection de 0,07 ng/ml. Ce test n'a pas montré d'interférences avec la matrice de moules ou de microalgues lorsque les extraits étaient dilués à un dixième (Zamolo *et al.*, 2012).

2. Les genres *Palythoa* et *Zoanthus*

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les animaux de l'embranchement Cnidaria (Metazoa), et plus particulièrement au genre *Palythoa* (famille Sphenopidae) qui comprend des espèces productrices de PITX, ainsi qu'au genre *Zoanthus* (famille Zoanthidae) qui est phylogénétiquement et morphologiquement très proche du genre *Palythoa* alors qu'il ne comprend pas d'espèces productrices de PITX.

2.1. Position taxinomique

Les genres *Palythoa* et *Zoanthus* appartiennent à l'embranchement Cnidaria, à la sous-classe et à l'ordre Zoantharia.

2.1.1. L'embranchement Cnidaria

Les Cnidaria sont des organismes diploblastiques, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de deux feuilletts embryonnaires, l'ectoderme et l'endoderme, séparés par une matrice acellulaire, la mésoglée. Ils possèdent un orifice unique servant à la fois de bouche et d'anus, une symétrie généralement radiaire et un seul axe principal de polarité, l'axe oral-aboral (Herberts, 1987; Martindale *et al.*, 2002). Ils se caractérisent également par l'absence d'organes différenciés et par la présence de cellules particulières dans leurs tissus, les cnidocytes, principalement localisés au niveau des tentacules. Ces cellules urticantes contiennent, pour la plupart, un mini-harpon muni d'un filament creux et d'une vacuole à venin qui leur sert principalement à capturer et paralyser des proies. Les Cnidaria présentent généralement un cycle de vie comprenant deux formes, une forme polype benthique (fixe) et une forme méduse pélagique (mobile). Les méduses sont plutôt solitaires alors que les polypes sont majoritairement coloniaux bien que des formes solitaires existent également.

2.2. L'ordre Zoantharia

2.2.1. Répartition géographique et cycle de vie

Les genres *Palythoa* et *Zoanthus* appartiennent à l'ordre Zoantharia (Cnidaria : Hexacorallia) qui regroupe des Cnidaria benthiques et généralement coloniaux. Ils sont étroitement apparentés aux Actiniaria (anémones de mer, Cnidaria : Hexacorallia) et peuvent se rencontrer dans le monde entier, dans des environnements marins variés allant des eaux de surface à la mer profonde. Le cycle de développement des Zoantharia se différencie de celui des autres Cnidaria par l'absence de forme méduse. Ils vivent sous la forme de polypes sexués généralement gonochoriques (**Figure 6**) et se reproduisent soit par reproduction sexuée (production d'une larve planctonique qui peut parcourir de longues distances en mer avant de se fixer et de donner un polype), soit par bourgeonnement (un polype formant un autre polype immédiatement à côté de lui).

2.2.2. Anatomie du polype

L'ordre Zoantharia appartient à la sous-classe Hexacorallia caractérisée par des polypes qui présentent une symétrie d'ordre six ou d'un multiple de six (6.n) en plus d'une symétrie bilatérale.

Corps. Le corps du polype est cylindrique, sa partie distale comporte des bractées dont l'une peut-être plus développée et marquer la symétrie bilatérale. La paroi du corps des polypes de Zoantharia est recouverte d'une couche mucopolysaccharidique (mucus) d'épaisseur variable. Elle est sécrétée par les cellules de l'ectoderme et serait fabriquée à partir de produits de photosynthèse issus des dinoflagellés endosymbiotes du genre *Symbiodinium* (Trench, 1970) (cf. 3. 'Les relations symbiotiques chez les Zoantharia'). L'ectoderme est mince soit continu soit discontinu et séparé en îlots par des lames de mésoglée. Il contient des cnidocytes dont la structure et la densité varient selon l'organe et le niveau considéré (Herberts, 1987). Le corps des Zoantharia se caractérise par l'incrustation de particules exogènes dans les tissus de la plupart des espèces (Herberts, 1972) (**Figure 6**), en général il s'agit d'éléments minéraux comme des grains de sable ou des débris de coquille, mais ils peuvent aussi être d'origine animale ou végétale (Herberts, 1972, Reimer *et al.*, 2010b). Ces particules servent à solidifier la structure de ces organismes qui ne possèdent pas de squelette calcaire. Les Zoantharia sélectionnent les particules qu'ils incorporent dans leurs tissus en fonction de leur taille et de leur densité et non en fonction de leur nature (Haywick et Mueller, 1997). Ces incrustations adhèrent à la cuticule et sont incorporés par les cellules amiboïdes à différents niveaux de profondeur et pouvant aller de l'ectoderme jusqu'à la mésoglée, selon les espèces (Low *et al.*, 2016). La mésoglée, dont la structure présente une grande variabilité, est toujours épaisse (Herberts, 1987; Ryland et Lancaster, 2003; Reimer *et al.*, 2010b;). Elle est constituée d'une substance homogène de composition semblable au collagène des Vertébrés (Herberts, 1987). Elle peut être sillonnée de lacunes formant un système canalaire qui peut s'organiser en sinus annulaire encerclant le corps du polype dans sa partie distale (Swain et Swain, 2014). L'endoderme comporte des cellules à grosses inclusions mucopolysaccharidiques qui font saillie dans la cavité gastrique et de nombreuses cellules à granules qui peuvent être des particules en voie de résorption (Herberts, 1987).

Tentacules. Les tentacules sont simples, creux et disposés en deux cercles alternes autour du disque buccal, à l'extérieur des bractées. Ils contiennent beaucoup de nématocystes et de cellules glandulaires. Ils contiennent de nombreux *Symbiodinium* spp. A la base de l'ectoderme, une couche de fibres musculaires longitudinales développée précède la mésoglée peu différenciée. La couche musculaire qui limite la mésoglée du côté interne est généralement moins importante et composée de fibres circulaires.

Le disque buccal est situé entre les tentacules, généralement plat ou en forme de dôme, il comporte une bouche ovale ou en forme de fente en son centre (Herberts, 1987).

Pharynx. Le pharynx forme généralement des plis qui sont supportés par des épaississements de la mésoglée. Le pharynx possède un siphonoglyphe ventral (gouttière ciliée, repli), bordé par une mésoglée généralement très épaisse, qui se prolonge par un appendice, appelé hyposulcus (Herberts, 1987; Ryland et Lancaster, 2003; Sinniger *et al.*, 2005). L'ectoderme du

pharynx contient des cnidocytes et diverses cellules sécrétrices. L'endoderme du pharynx est épais et contient fréquemment des *Symbiodinium* spp. (Herberts, 1987; Sinniger *et al.*, 2005; Reimer *et al.*, 2010b)

Mésentères. La cavité générale du polype est séparée en loges par 6.n couples de mésentères. Les mésentères sont composés d'une mince couche de mésoglée légèrement élargie au niveau de son insertion sur la colonne et recouverte de part et d'autre d'endoderme (Herberts *et al.*, 1987; Sinniger *et al.*, 2005). Chaque couple de mésentères détermine un espace appelé endocoèle. Lorsqu'un mésentère atteint le pharynx il est appelé 'macrosepte', et s'il ne l'atteint pas il est appelé 'microsepte'. Les macroseptes sont fertiles alors que les microseptes sont stériles. Il existe deux paires de mésentères dites directrices, l'une dorsale composée de microseptes, l'autre ventrale composée de macroseptes. Les Zoantharia sont séparés en deux sous-ordres selon l'arrangement des mésentères qui peut être macrocnémique (sous-ordre Macrocnemina) ou microcnémique (sous-ordre Brachycnemina) selon que le 5^e mésentère à partir du directif dorsal est respectivement un macrosepte ou un microsepte (**Figure 7**) (Haddon et Schackelton, 1891).

Le sphincter, muscle qui contrôle l'ouverture de la colonne du polype, est simple ou double, endodermique ou mésogléen selon les espèces (Sinniger et Häussermann, 2009).

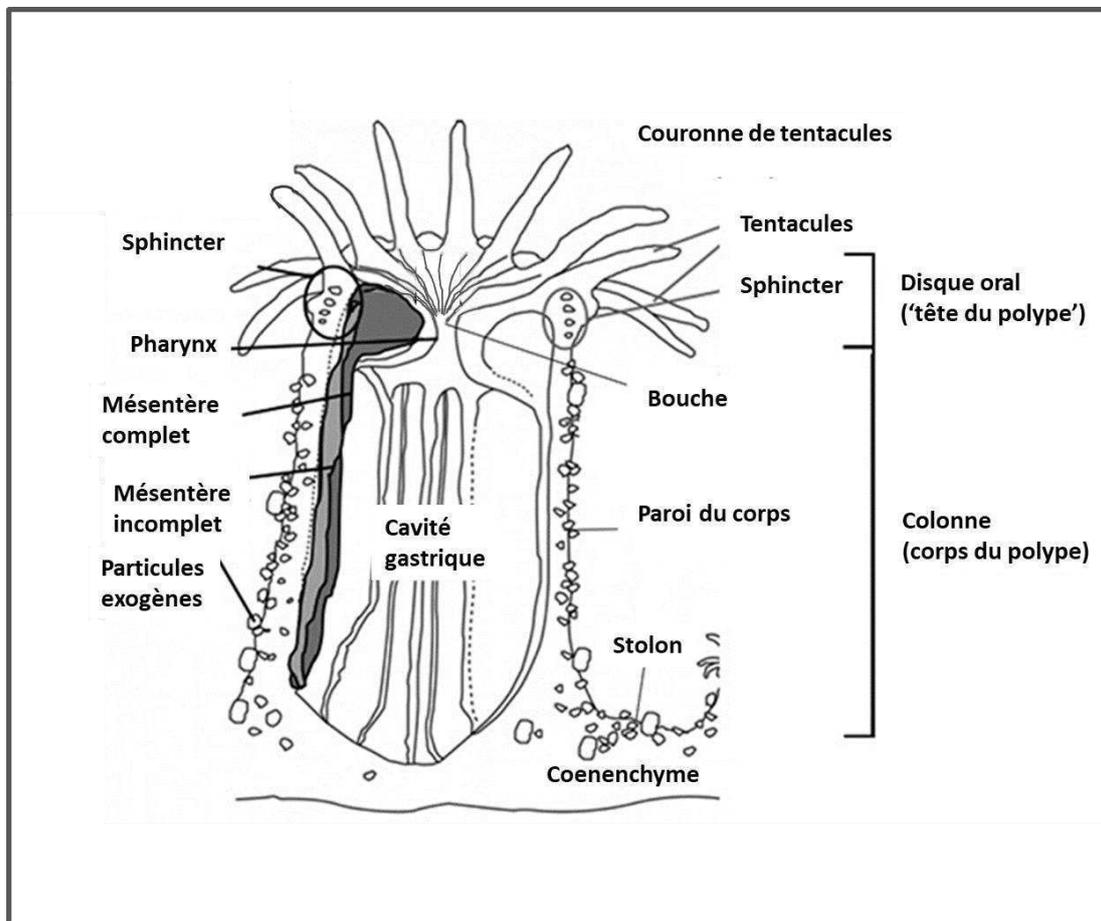


Figure 6. Représentation schématique et simplifiée de la morphologie des polypes de Zoantharia. Adapté d'une figure fournie par le Dr James Reimer.

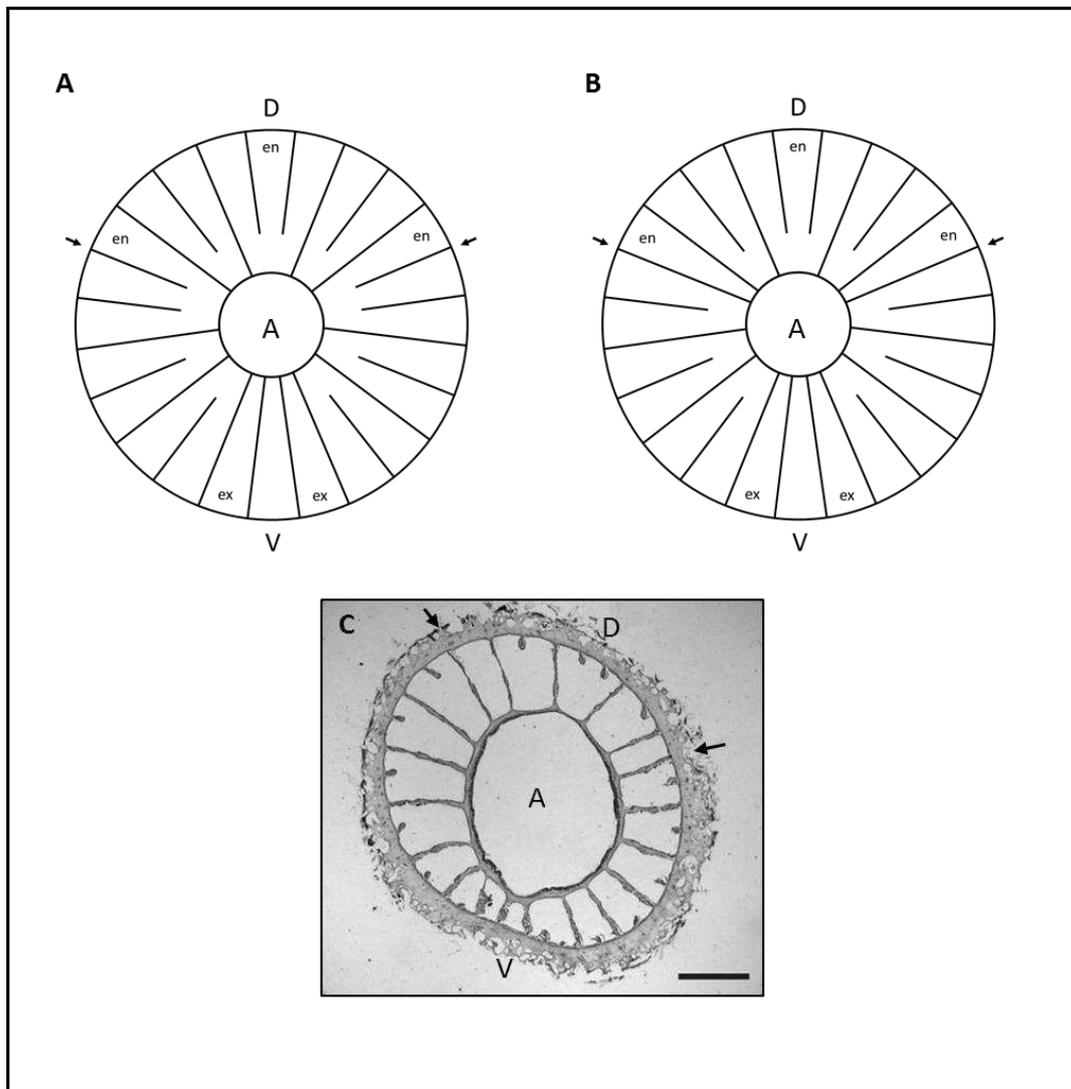


Figure 7. Représentation schématique d’une coupe transversale d’un Zoantharia au niveau du pharynx. Disposition microcnémic (A) et macrocnémic (B) des mésentères (d’après Herberts, 1987) ; photographie d’une coupe histologique au niveau de l’actinopharynx chez *Parazoanthus* sp., disposition macrocnémic (C, adapté de Reimer *et al.*, 2010b). Légende : A, actinopharynx ; D, couple de mésentères directs dorsal ; en, endocoel ; ex, exocoel ; V, couple de mésentères directs ventral. Les flèches indiquent les 5^e mésentères dorsaux. Barre = 500 µm.

2.2.3. Structure des colonies

Les polypes vivent majoritairement fixés à un substrat, de manière solitaire ou sous forme de colonies plus ou moins grandes. Les polypes d’une colonie sont reliés entre eux au niveau de leur base par des stolons parcourus de solenia (canaux) qui relient les cavités gastriques des différents polypes (Pax, 1910; Herberts, 1987; Fossa et Nilsen 1998). Les stolons peuvent être minces, laissant les polypes presque totalement libres (forme ‘liberae’), ou épaissis en coenenchyme plus ou moins épais dans lequel les polypes peuvent être légèrement (forme ‘intermediae’) ou presque totalement enchâssés (forme ‘immersae’), ne laissant dépasser du coenenchyme que leur partie orale (**FIGURE 8**).

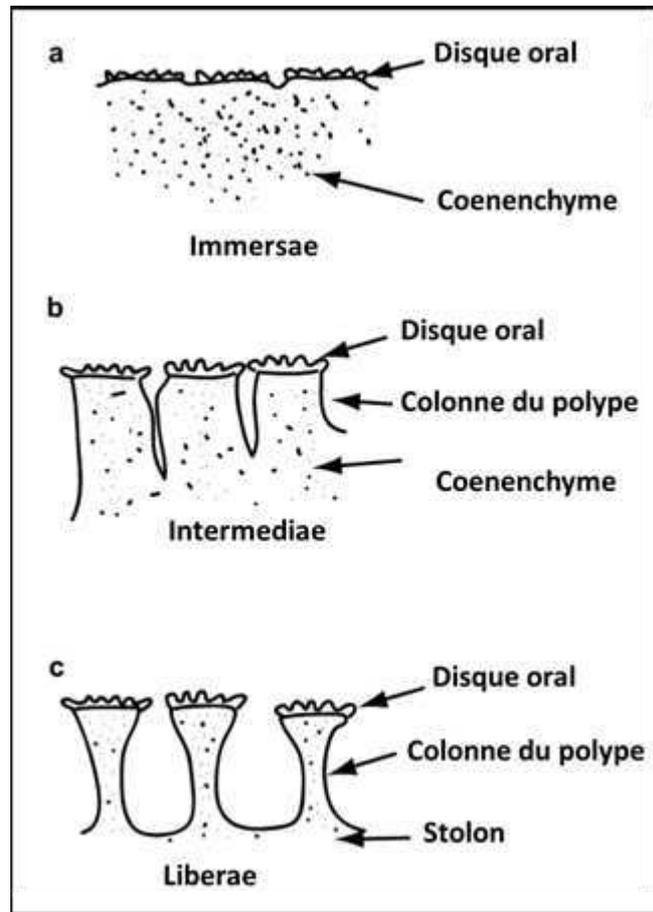


Figure 8. Représentation schématique des différentes structures des polypes et des colonies chez les Zoantharia. A, forme ‘immersae’, les polypes sont profondément enchâssés dans un coenenchyme bien développé ; B, forme ‘intermediae’, forme intermédiaire avec généralement des polypes épais bien développés et modérément enchâssés dans un coenenchyme ; C, forme ‘liberae’, les polypes sont dégagés et s’étendent bien au-dessus d’un mince coenenchyme (stolon). Adapté de Reimer *et al.*, 2006.

2.2.4. Etude des espèces de Zoantharia

Malgré leur grande distribution géographique et leur abondance relative par rapport à certains autres groupes de Cnidaria, peu d’études ont porté sur les organismes de cet ordre jusqu’à présent. Ceci est principalement dû au haut degré de variations morphologiques intraspécifiques (Burnett *et al.*, 1994, 1997; Reimer *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2013), et à la présence de particules minérales incrustées dans la paroi du corps qui compliquent les analyses histologiques internes et demandent des processus de décalcification et de désilification (Reimer *et al.*, 2010b).

2.2.4.1. Plasticité morphologique et nécessité d’identifier les espèces au moyen de la génétique

Les genres *Palythoa* et *Zoanthus* sont considérés comme les représentants de l’ordre Zoantharia car ils font partie des premiers genres décrits, ils sont abondants sur le terrain et ils contiennent un nombre important d’espèces, bien que ce nombre soit actuellement remis en question. En effet, jusqu’aux années 2000, les caractères diagnostiques spécifiques étaient

principalement basés sur l'anatomie externe et interne des individus tels que la couleur et le diamètre du disque oral, le nombre de tentacules, la structure externe du polype, de la colonie (Fosså et Nilsen, 1998) ou des cnidocytes (Ryland et Lancaster, 2003 et 2004), et enfin le nombre de mésentères et de septa (Herberts, 1987; Walsh et Bowers, 1971). C'est ainsi que de nombreuses prétendues nouvelles espèces ont été décrites au sein des genres *Palythoa* et *Zoanthus* jusqu'aux années 1990 – 2000. La base de données de Fautin comprenait d'ailleurs jusqu'à 120 *Zoanthus* spp. en juillet 2003 (cité par Reimer *et al.*, 2004). Cependant, les caractères anatomiques spécifiques internes et externes utilisés pour classer les Zoantharia se sont montrés peu satisfaisants et ont conduit à une taxonomie chaotique de cet ordre (Burnett *et al.*, 1995 et 1997). C'est sur base de cette constatation que plusieurs études ont expérimenté la génétique pour tenter d'identifier plus précisément les espèces de Zoantharia. Ainsi, si quelques études ont utilisé l'analyse électrophorétique des allozymes sur des loci polymorphiques pour identifier des espèces (Burnett *et al.*, 1994 et 1995), les techniques actuelles les plus courantes reposent sur l'amplification d'ADN en chaîne par polymérase (en anglais, Polymerase Chain Reaction, PCR) de différents marqueurs génétiques et combinée à la reconstruction d'arbres phylogénétiques (par exemple, voir Reimer *et al.*, 2004, 2006a, 2006b et 2007). Les résultats ont montré de façon frappante, que des individus d'une même espèce ou d'un même groupe, et phylogénétiquement identiques ou très proches, peuvent présenter un haut degré de plasticité morphologique, principalement au niveau de la couleur et du diamètre du disque oral ainsi qu'au niveau de la taille et de la structure des polypes et de la colonie. Suite à ces études, le nombre d'espèces de Zoantharia existantes a été revu à la baisse, beaucoup se révélant être des synonymes. La base de Fautin (2013) ne compte d'ailleurs plus que 12 *Zoanthus* spp. (dernière mise à jour le 2 janvier 2013). Actuellement, des études portent toujours sur la taxinomie des Zoantharia, et le remaniement de l'ordre dans son intégralité est constant. Les marqueurs génétiques les plus couramment utilisés pour identifier spécifiquement les Zoantharia sont, au niveau mitochondrial, l'ADN ribosomal 16S (mt-16S) ainsi que la première sous-unité du cytochrome oxydase (CO1), et au niveau nucléaire, les régions du spaceur ribosomique interne transcrit (ITS-rDNA).

2.2.4.2. Classification supra-spécifique des Zoantharia

L'ordre Zoantharia regroupe actuellement 27 genres répartis en 9 familles. Parmi ces genres, seuls 5 comptent plus de 5 espèces (*Epizoanthus* Gray, 1867, *Isozoanthus* Carlgren, in Chun, 1903, *Palythoa*, *Parazoanthus* Haddon et Shackelton, 1891, *Zoanthus*), alors que les autres genres n'en comptent pas plus de 5 et que 10 sont monospécifiques. Beaucoup de genres (13/27) et de familles (4/9) ont été créés ces deux dernières décennies suite à un remaniement profond de cet ordre après l'utilisation de la génétique. À l'heure actuelle, bien que la taxonomie des Zoantharia soit plus claire, le remaniement de cet ordre n'est pas terminé, il va se poursuivre et s'affiner au fil des études à venir. D'ailleurs, les données actuelles ne permettent toujours pas de placer deux groupes de Zoantharia de façon définitive, la famille Abysoanthidae et le genre *Stephanidium* occupent actuellement une place incertaine au sein de l'ordre Zoantharia. L'annexe (p. 142) comprend la

classification supra-spécifique actuelle et complète des Zoantharia avec les autorités taxinomiques ainsi qu'une brève diagnose pour chaque groupe, d'après Low *et al.* (2016).

2.2.5. Classification des espèces de *Palythoa* et de *Zoanthus*

2.2.5.1. Notion de complexes d'espèces

De nombreuses espèces de Zoantharia récoltées dans les Caraïbes, ou plus généralement dans l'océan Atlantique, sont génétiquement identiques ou très proches d'espèces trouvées dans l'océan Indo-Pacifique (Reimer *et al.*, 2012). Cette observation s'explique par le fait qu'avant la fermeture de l'isthme de Panama il y a environ 3 millions d'années (ODEa *et al.*, 2016), les eaux tropicales des Caraïbes communiquaient avec celles de l'océan Pacifique et les échanges génétiques entre les populations de Zoantharia des deux bassins océaniques étaient facilités car **(i)** la plupart des Zoantharia sont capables de vivre dans une large gamme de milieux tropicaux et subtropicaux et présentent une forte tolérance écologique (Reimer *et al.*, 2008; Polak *et al.*, 2011) et **(ii)** ces organismes présentent une phase larvaire relativement longue, jusqu'à 170 jours (Ryland *et al.*, 2000; Polak *et al.*, 2011), ce qui procure à ces espèces des capacités de propagation importantes. Avant la fermeture de l'isthme de Panama les larves pouvaient passer de l'océan Atlantique à l'océan Indo-Pacifique et inversement. Depuis la fermeture de l'isthme, il n'y a plus d'échanges génétiques entre les populations de l'Atlantique et de l'Indo-Pacifique car elles sont devenues allopatriques. Ces populations ne pouvant s'hybrider entre elles, on parle actuellement d'espèces sœurs et non d'espèces synonymes.

2.2.5.2. Classification actuelle

Dans la classification actuelle, les espèces sœurs Caraïbes-Atlantique/Indo-Pacifique sont groupées dans un complexe et portent des noms d'espèce différents en fonction du bassin océanique dont elles sont issues.

Le genre *Palythoa* comprend quatre groupes dont une espèce endémique et trois complexes d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique:

- *Palythoa grandis*, espèce endémique des Caraïbes n'ayant pas d'espèce sœur en Indo-Pacifique.
- *Palythoa caribaeorum* / *Palythoa tuberculosa*
- *Palythoa variabilis* / *Palythoa heliodiscus*
- *Palythoa* aff. *clavata* / *Palythoa* sp. 'sakurajimensis'

Palythoa sp. 'sakurajimensis' est une espèce de *Palythoa* non décrite à laquelle un qualificatif a été ajouté par Reimer *et al.* (2007a) qui ont identifié cette espèce au large de Sakurajima, au Japon.

Le genre *Zoanthus* comprend quatre complexes contenant des espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique, très proche génétiquement :

- *Zoanthus pulchellus* / *Zoanthus kuroshio*
- *Zoanthus sociatus* / *Zoanthus sansibaricus*
- *Zoanthus solanderi* / *Zoanthus gigantus*

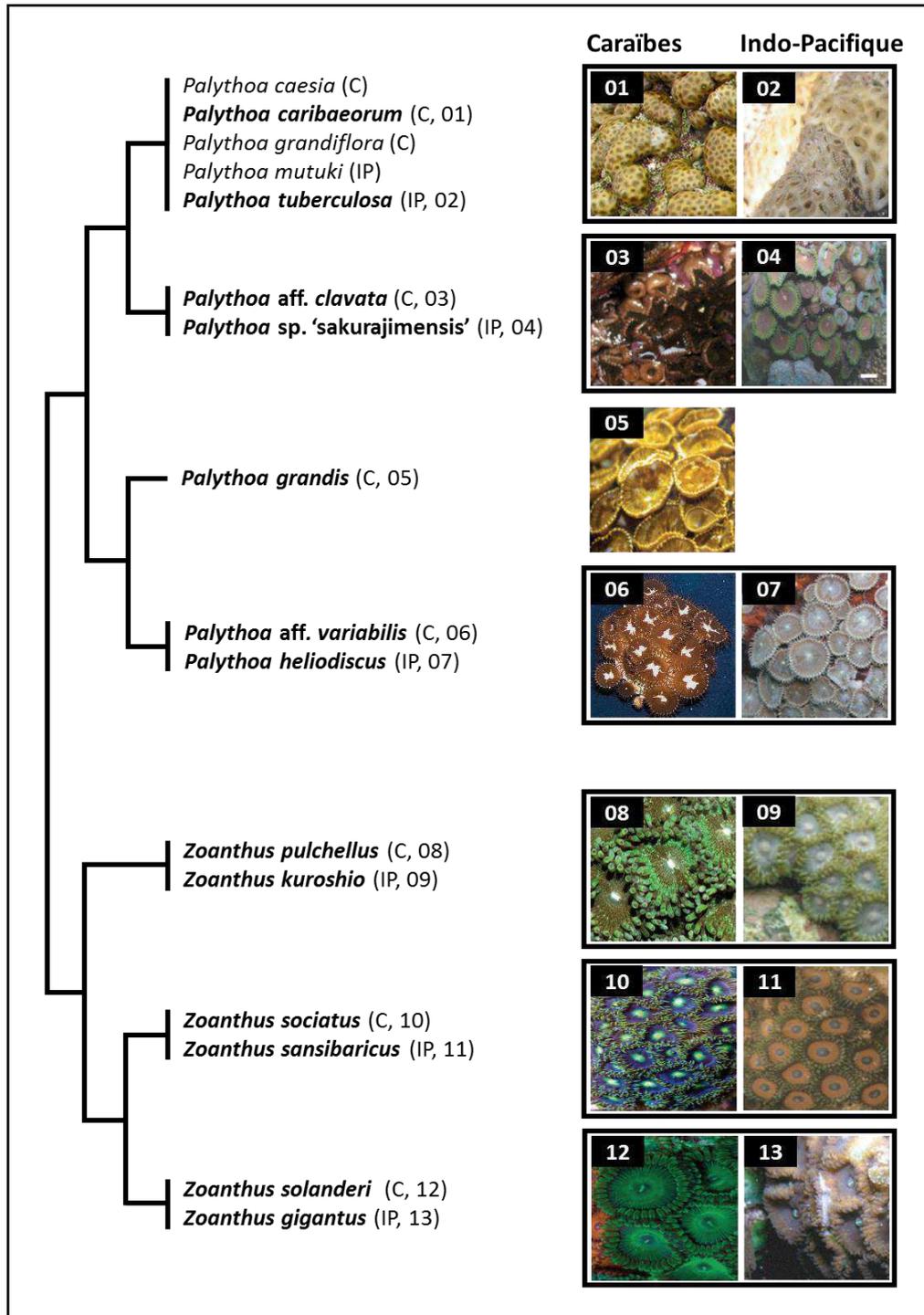


Figure 9. Représentation schématique de la classification phylogénétique actuelle des complexes d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique chez les genres *Palythoa* et *Zoanthus*. Schéma établi d'après Reimer *et al.*, 2012. En gras, les noms d'espèce utilisés pour désigner les différents complexes d'espèces sœurs Caraïbes (C)/Indo-Pacifique (IP). Photographies : colonne de gauche, espèces des Caraïbes ; à droite, espèces d'Indo-Pacifique. Encadrés : complexes. *Palythoa grandis* est une espèce endémique des Caraïbes n'ayant pas d'espèce sœur en Indo-Pacifique. Origine des photographies, 01 et 03, fournies par James Reimer et Maria Santos de l'unité 'Molecular Invertebrate Systematics and Ecology Lab', University of the Ryukyus, Japon ; 02, 04, Reimer *et al.*, 2007 ; 05, 06, 08, 10, 12, Reimer *et al.*, 2012 ; 07, Reimer *et al.*, 2006a ; 09, 11, 13, Reimer *et al.*, 2006b.

2.2.5.3. Notes sur le complexe *Palythoa caribaeorum/tuberculosa*

Dans la représentation schématique précédente (**Figure 9**), plus de deux noms d'espèces de *Palythoa* sont indiquées dans le complexe *caribaeorum/tuberculosa*, Ceci pour indiquer qu'il y a vraisemblablement plus de deux espèces sœurs dans ce groupe. En effet, bien que les *Palythoa* spp. montrent une grande plasticité morphologique, la comparaison de la structure des polypes et des colonies (**Figure 10**) indique que *Palythoa caribaeorum* (Caraïbes) et *Palythoa tuberculosa* (Indo-Pacifique) constitueraient un premier complexe d'espèces sœurs et que *Palythoa grandiflora* (Caraïbes) et *Palythoa mutuki* (Indo-Pacifique) en constitueraient un deuxième. *Palythoa caesia* (Indo-Pacifique) pourrait être une espèce synonyme de *Palythoa tuberculosa* (**Figure 10**).

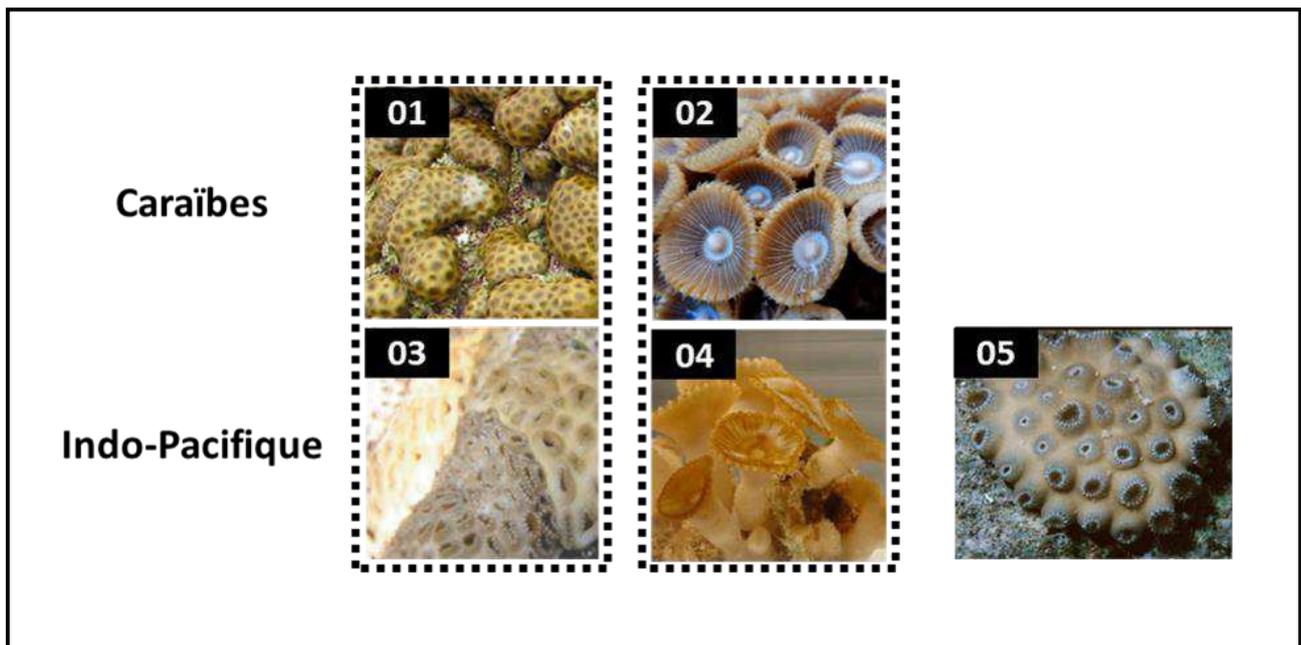


Figure 10. Espèces présentes dans le complexe *Palythoa caribaeorum/tuberculosa*. En encadré, 2 complexes Caraïbes/Indo-Pacifique potentiels : *Palythoa caribaeorum* (01)/*tuberculosa* (03) et *Palythoa grandiflora* (02)/*mutuki* (04). *Palythoa caesia* (05) pourrait être une espèce synonyme de *Palythoa tuberculosa*. Origine des photographies : 01 et 02, fournies par James Reimer et Maria Santos de l'unité 'Molecular Invertebrate Systematics and Ecology Lab', University of the Ryukyus, Japon ; 03, Reimer *et al.*, 2007 ; 04, Deeds *et al.*, 2011 ; 05, muséum de Floride (www.floridamuseum.ufl.edu).

3. Les relations symbiotiques chez les *Zoantharia*

3.1. Le concept d'holobionte

Les *Zoantharia*, comme tous les Cnidaria et pratiquement tous les organismes, contiennent de nombreux et divers microorganismes procaryotes ou eucaryotes dans leur mucus ou leurs tissus qui peuvent ou non vivre en symbiose avec l'hôte *Zoantharia*. L'hôte et les divers organismes qu'il contient forment une unité écologique désignée par le terme d'holobionte (Rosenberg et Rosenberg, 2008).

Peu d'études ont porté à ce jour sur les microorganismes vivant dans les *Zoantharia* mais les résultats actuels indiquent une très grande biodiversité d'organismes. Diverses études ont identifié des populations bactériennes chez des *Palythoa* spp. (Frolova *et al.*, 2000; Seemann *et al.*, 2009; Carlos *et al.*, 2013;) mais l'étude la plus exhaustive a été réalisée par Sun *et al.* (2014) qui ont étudié la communauté de microorganismes associée à *Palythoa australiae* provenant du sud de la Chine par pyroséquençage. Ces auteurs ont identifié une large communauté bactérienne comprenant 22 embranchements de bactéries (dont 16 déjà décrits et 6 non décrits) ainsi que des archées (Archaea), des champignons (Fungi) et des microorganismes photosynthétiques.

3.1.1. La symbiose *Zoantharia* – *Symbiodinium*

La symbiose la plus connue et la plus étudiée chez les Cnidaria est le mutualisme avec des organismes eucaryotes photosynthétiques et unicellulaires du genre *Symbiodinium* (Eukaryota : Dinoflagellata : Dinophyceae : Suessiales), couramment appelés zooxanthelles. Ce mutualisme est fréquent chez les Cnidaria et chez la plupart des espèces des genres *Palythoa* et *Zoanthus*.

3.2. Les *Symbiodinium* spp.

3.2.1. Diversité génétique

Les *Symbiodinium* spp. ne présentent pas de caractères diagnostiques externes pour les différencier entre eux, l'utilisation de la génétique est indispensable pour identifier les groupes au sein de ces organismes. La région génomique ITS [ARNr 18S, séquence partielle – ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), séquence complète – ARNr 5,8S, séquence complète – ITS2, séquence complète – ARNr 28S, séquence partielle] (LaJeunesse, 2001; Hunter *et al.*, 2007;), ou la région ITS2 seule (Reimer *et al.*, 2006d; Stat *et al.*, 2011; Reimer *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2017) constituent de bons marqueurs génétiques pour identifier les clades de *Symbiodinium* spp.

Les études génétiques de ces dernières décennies ont permis d'identifier neuf clades de *Symbiodinium*, de A à I (Pettay *et al.*, 2011; Pochon *et al.*, 2012) (**Figure 11**). Chaque clade comprend une multitude de sous-clades (Santos *et al.*, 2003), et de nouveaux sous-clades sont sans cesse identifiés. A l'heure actuelle, nul ne sait si le niveau spécifique se situe au niveau des clades ou des sous-clades. De plus, alors que les clades sont bien supportés dans les études phylogénétiques, les sous-clades le sont plus ou moins selon les études, ce qui ne permet pas de

conclure avec assurance à leur existence. C’est la raison pour laquelle nous avons choisi de ne pas nous intéresser à l’identification et à la discussion des sous-clades dans ce travail.

L’identification génétique *Symbiodinium* spp. vivant en symbiose avec les Cnidaria est également utile pour identifier des espèces ou certaines populations de *Palythoa* spp. et de *Zoanthus* spp. Certains clades et sous-clades (parfois soutenus statistiquement) de *Symbiodinium* sont en effet connus pour établir des symbioses très spécifiques avec certains Zoantharia. Ainsi, Reimer *et al.* (2013) ont identifié deux sous-clades de *Symbiodinium* au sein du clade C (sous-clades *Palythoa tuberculosa*/Penghu et *Zoanthus vietnamensis*/Keelung) uniquement présents respectivement chez des échantillons de *Palythoa tuberculosa* récoltés sur les côtes de l’île de Penghu au Japon, et chez des échantillons de *Zoanthus vietnamensis* récoltés dans la région de Keelung au Japon. Dans l’étude ces deux sous-clades sont soutenus statistiquement (ML/NJ, 98/100) et (90/86) alors que les autres groupes au sein de clade C ont des valeurs statistiques aux alentours de 50-60. L’analyse phylogénétique est basée sur ITS2.

3.2.2. La symbiose

3.2.2.1. Diversité des hôtes

Les *Symbiodinium* spp. peuvent vivre librement en mer ou en symbiose, non seulement avec des Cnidaria, mais aussi avec des Foraminifera (Eukaryota : Chromalveolata : Rhizaria), des Mollusca (Eukaryota : Animalia : Protostomia : Lophozoa), des Plathelminthes (Eukaryota : Animalia : Protostomia : Platyzoa), et des Porifera (Eukaryota : Animalia) (**Figure 11**). Dans la suite de ce manuscrit, nous ne nous intéresserons qu’aux symbioses établies avec les Cnidaria.

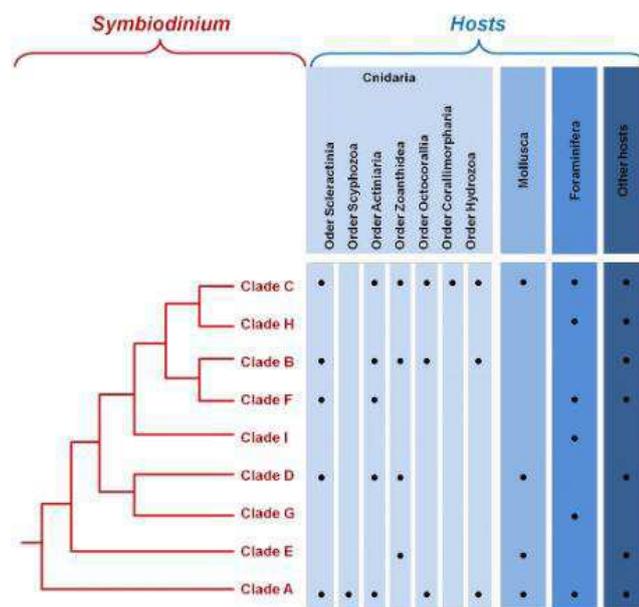


Figure 11. Clades de *Symbiodinium* et hôtes connus. Les relations phylogénétiques entre les principaux clades de *Symbiodinium* (gauche) sont mises en relation avec les différents groupes d’hôtes connus (droite). (Crédit, Alice Fournier).

3.2.2.2. Etablissement de la symbiose

Chez les Cnidaria et les Zoantharia, les *Symbiodinium* spp. sont soit transmis directement par les parents à leur descendance par transmission verticale (Davy et Turner, 2003), soit acquis par chaque génération à partir de l'environnement par transmission horizontale (Babcock *et al.*, 1986; Gómez-Cabrera *et al.*, 2008; Byler *et al.*, 2013). La transmission horizontale implique d'abord un premier contact au cours duquel il y a reconnaissance des partenaires grâce à une signalisation moléculaire entre le symbiote et son hôte. Ensuite, le symbiote est phagocyté par l'hôte et sa présence empêche la maturation du phagosome qui se transforme en un symbiosome (**Figure 12**). Cela permet au symbiote de ne pas être détruit, mais au contraire, de s'établir durablement dans son hôte. Un symbiosome est une vacuole acide, dont le pH est aux alentours de 4 (Barott *et al.*, 2015), et qui est délimitée par un complexe de membranes dont plusieurs proviennent du *Symbiodinium* sp., elles-mêmes entourées par une membrane dérivant de l'hôte (Wakefield *et al.*, 2000; Trautmann *et al.*, 2001; Kazandjian *et al.*, 2008). Bien que tous les mécanismes impliquant la reconnaissance hôte-symbiote ainsi que l'entrée et l'établissement du symbiote dans son hôte ne soient pas élucidés, de nombreux détails peuvent être trouvés dans les revues de Davy *et al.* (2012) et de Fransolet *et al.*, (2012).

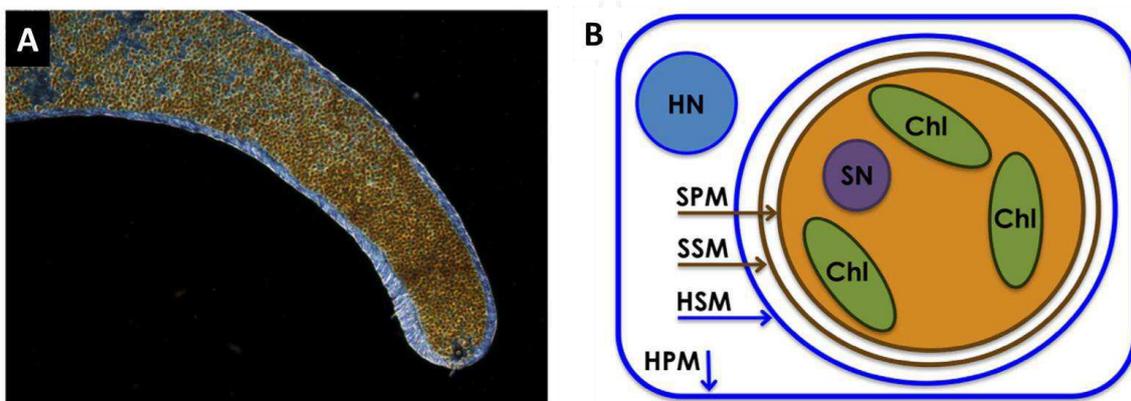


Figure 12. Répartition des *Symbiodinium* spp. à l'intérieur des hôtes Cnidaria, et structure du symbiosome. D'après Garrett *et al.*, (2013). **A**, photographie d'un tentacule d'*Eixaptasia pallida* transparent dans lequel on voit les cellules de *Symbiodinium* spp. (sphères brunes). **B**, représentation schématique d'une cellule de *Symbiodinium* sp. (cercle avec fond orange) à l'intérieur d'une cellule de Cnidaria (rectangle bleu). Chl, chlorophylle du *Symbiodinium* sp. ; HN, noyau de l'hôte ; HPM, membrane plasmique de l'hôte ; SN, noyau du *Symbiodinium* sp. ; SPM, membrane plasmique du *Symbiodinium* sp. Le symbiosome est constitué d'une membrane provenant de l'hôte (HSM) et de plusieurs membranes provenant du symbiote (SSM).

3.2.2.3. Echanges métaboliques

Les échanges métaboliques sont cruciaux pour le bon fonctionnement de la symbiose Cnidaria – *Symbiodinium*. **La Figure 13** reprend les principaux échanges entre les *Symbiodinium* spp. et leur hôte Cnidaria dans la symbiose. Bien que certaines de ces associations symbiotiques puissent être trouvées en eaux riches, la plupart s'est initialement formée dans les eaux marines

tropicales de surface pauvres en nutriments, et se révèlent indispensables pour la survie des hôtes Cnidaria. En effet, les *Symbiodinium* spp. leur fournissent des éléments indispensables pour survivre tels que l'oxygène, des acides gras, des acides aminés et divers produits de la photosynthèse (Delbeek *et al.*, 1998). En échange, les *Symbiodinium* reçoivent une protection physique et des déchets métaboliques de l'hôte comme du dioxyde de carbone et de l'ammoniaque. Toutefois, le processus le plus connu et caractéristique des symbioses Cnidaria – *Symbiodinium* et qui fait intervenir de nombreux échanges à la fois vers l'hôte et le symbiote, est la photosynthèse.

3.2.2.4. Photosynthèse

Le carbone inorganique utilisé par les *Symbiodinium* spp. et nécessaire pour la photosynthèse peut provenir soit de la respiration de l'hôte et du symbiote sous forme de CO₂ (Harland et Davies, 1995), soit de la squelettogenèse chez les coraux dits durs (ce n'est pas le cas chez les Zoantharia qui n'ont pas de squelette calcaire) chez qui le CO₂ est produit en tant que sous-produit de la calcification (Ware *et al.*, 1992) soit de l'eau de mer extérieure (Furla *et al.*, 2000a et b). Le *Symbiodinium*, n'étant pas en contact avec le milieu extérieur lorsqu'il est dans l'hôte, il doit recevoir le carbone inorganique au niveau du symbiosome, ce qui est réalisé par l'hôte grâce à un mécanisme de concentration et un transport actif du carbone. De plus, le *Symbiodinium* se trouve dans un symbiosome qui est rendu acide par l'hôte grâce à des pompes à proton H⁺-ATPases de type V, ce qui augmente l'activité photosynthétique du symbiote (Barott *et al.*, 2015). Les produits de la photosynthèse sont ensuite transférés du *Symbiodinium* vers l'hôte Cnidaria (Davy *et al.*, 1996).

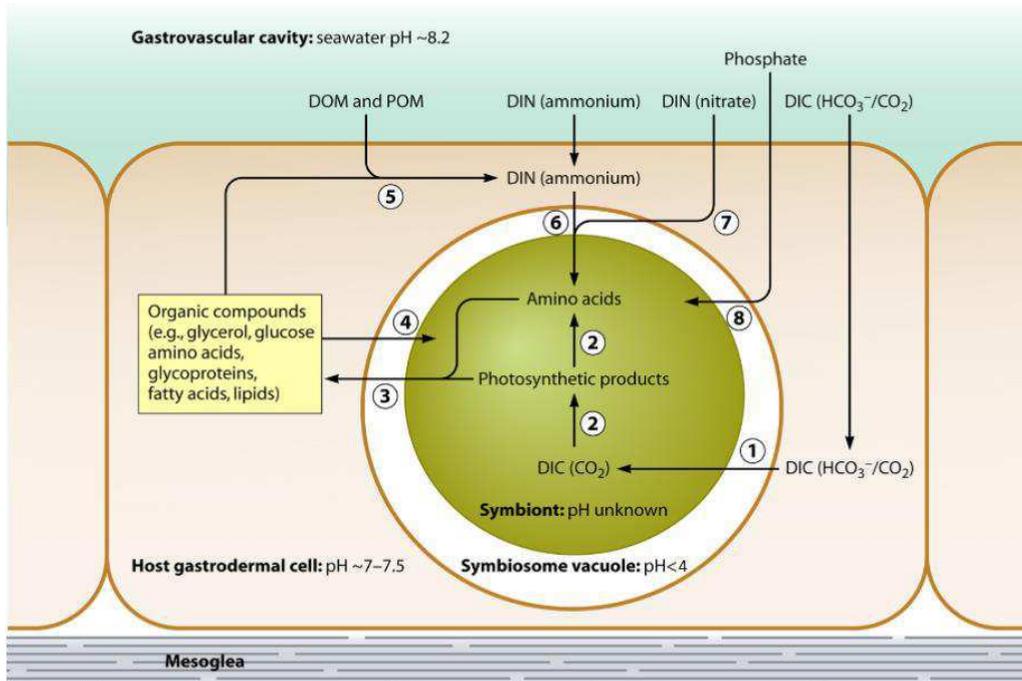


Figure 13. Principales interactions nutritionnelles mises en place dans la symbiose Cnidaria – *Symbiodinium*. (D'après Davy *et al.* 2012).

4. Hypothèses sur la production de palytoxine chez les espèces du genre *Palythoa*

Actuellement, l'origine biogénétique de la PITX chez les *Palythoa* spp. reste incertaine. Bien que le genre *Palythoa* soit connu depuis longtemps pour contenir une des substances naturelles les plus toxiques au monde, la PITX, la biogenèse de cette molécule reste très controversée. Alors que certains organismes producteurs libres de PITX ont été identifiés (**Tableau 2**), il est beaucoup plus difficile de déterminer le rôle respectif de l'hôte et de ses symbiotes dans la voie de biosynthèse de la PITX au sein d'un holobionte. Etant donné que tous les Zoantharia dans lesquels de la PITX a été détectée jusqu'à présent vivent en symbiose avec des zooxanthelles, l'hypothèse la plus répandue est que la PITX serait synthétisée par les dinoflagellés endosymbiotiques du genre *Symbiodinium* (Nakamura *et al.*, 1993; Onodera *et al.*, 2004) et/ou par des bactéries symbiotiques (Frolova *et al.*, 2000; Seemann *et al.*, 2009).

4.1. Hypothèse de la biosynthèse par les *Symbiodinium* spp.

Cette hypothèse est basée sur le fait que d'autres dinoflagellés, des *Ostreopsis* spp. sont connus pour produire de la PITX et des ovatoxines analogues (Honsell *et al.*, 2011). Par ailleurs, des structures polykétidiques et vasoconstrictives ont été isolées et identifiées dans des *Symbiodinium* spp., les zooxanthellatoxines A et B (**Figure 14**) (Nakamura *et al.*, 1993; Drainville-Higgins, 2004; Onodera *et al.*, 2004). Bien que ces molécules toxiques n'aient aucun lien structural avec la PITX, on peut cependant supposer que la biosynthèse de PITX par les *Symbiodinium* est possible ou en partie possible, par analogie avec celle des zooxanthellatoxines parce qu'il pourrait exister d'autres polyketide-synthases (PKSs) qui interviendraient dans la biosynthèse de la PITX.

4.2. Hypothèse de la biosynthèse par des procaryotes symbiotiques

Frolova *et al.* (2000) ont utilisé la méthode ELISA pour isoler, à partir d'une espèce de *Palythoa* toxique, des bactéries Gram-négatives appartenant aux genres *Aeromonas* et *Vibrio* et produisant des composés antigéniquement liés à la PITX. Cependant, une fois isolées et cultivées sur un milieu artificiel, les bactéries ont perdu la faculté de produire de la PITX après plusieurs inoculations. De plus, Seemann *et al.* (2009) ont isolé des bactéries ayant une activité hémolytique semblable à celle de la PITX à partir de *Palythoa caribaeorum*. Cette hypothèse est aussi supportée par une étude qui montre que la PITX peut être synthétisée par d'autres procaryotes. Kerbrat *et al.* (2011) ont en effet identifié de la PITX et de la 42-OH-PITX chez des cyanobactéries marines du genre *Trichodesmium*.

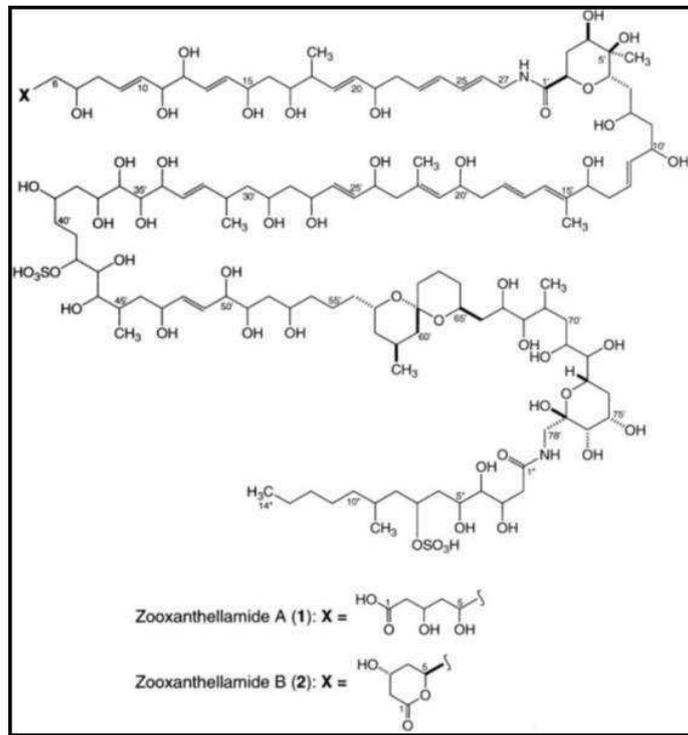


Figure 14. Structure des zooxanthellatoxines A et B identifiées chez des *Symbiodinium* spp. (D'après Nakamura *et al.* (1993)).

5. Objectifs et contexte du travail de thèse

5.1. Justification et contexte

La palytoxine (PITX) est une molécule marine très toxique principalement identifiée dans des Cnidaria du genre *Palythoa*, à des concentrations pouvant atteindre plus d'1 mg / g de *Palythoa* sp. frais (Deeds et al., 2011). Cependant, les concentrations et la structure (PITX et analogues) peuvent varier d'un échantillon à l'autre (Deeds et al., 2011). Le ou les organisme(s) responsable(s) est (sont) à ce jour totalement inconnu(s). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence le potentiel anticancéreux de la PITX lorsqu'elle est utilisée à faible concentration. Ainsi, elle détruit des tumeurs xénogreffées chez la souris avec des LD50 comprises entre 68 et 83 ng/kg (Görögh et al., 2013).

Dans le cadre d'un développement appliqué et qui vise dans un proche avenir à démarrer des essais précliniques contre le cancer, un procédé de production doit être mis en œuvre afin de disposer de grandes quantités de toxine. Des recherches à la fois académiques et appliquées doivent donc y être développées conjointement, tout en ayant bien pris conscience, notamment dans ce type de programme de recherche, qu'il faut faire constamment « la navette » entre 'appliquée' et 'académique' pour réussir. C'est dans ce cadre qu'une interaction public/privé s'est mise en place, le public apportant son aide dans les aspects mécanistiques, procédés et d'identification (chimique, par imagerie, phylogénétique/morphologique). L'organisme privé assure la multiplication des coraux en aquarium, la mesure de l'activité anticancéreuse (prestation), définit la stratégie de développement et finance le salaire de l'étudiant (Bourse CIFRE/ANRT, Conventions Industrielles de Formation par la Recherche/Association Nationale de la Recherche et de la Technologie).

5.2. Objectifs scientifiques

Il s'agit :

- **D'identifier de nouvelles sources biologiques de PITX.** Pour ce faire, le travail porte (i) sur l'identification phylogénétique de *Palythoa* spp., l'identification sur des critères morphologiques étant très insuffisante, et (ii) sur l'évaluation de la teneur en PITX contenue dans les espèces productrices, et (iii) tenter d'établir une corrélation.
- **D'étudier l'activité anticancéreuse *in vitro*** de la PITX isolée des coraux de l'entreprise.
- **De déterminer la structure chimique** de la ou des toxines extraite(s) des *Palythoa* spp. productrices, de la localiser chez l'animal par imagerie parallèlement aux *Symbiodinium*.
- **D'apporter des éléments sur l'implication des *Symbiodinium* spp. dans la biosynthèse de la toxine.** Ils seront isolés et cultivés pour tenter de répondre à la question. Il serait en effet plus rentable de cultiver des *Symbiodinium* pour produire la toxine, et ainsi s'affranchir de la culture et de l'extraction de *Palythoa*, et simplifier le procédé. Une méthode de culture standardisée de *Symbiodinium* sera un des thèmes exploratoires, des éléments mécanistiques manquent, une reproductibilité plus contrôlée pour des études de physiologie sont également nécessaires.

5.3. Partenaires du projet

Le travail s'est effectué dans le cadre d'un partenariat entre :

(i) la société privée de biotechnologie marine, CORAL BIOME (CB) possède une salle d'aquariums contrôlés pour la culture d'invertébrés marins, des connaissances approfondies sur les holobiontes de cnidaires, et une expertise en développement pharmaceutique de composés issus de coraux, notamment contre le cancer. Deux autres fermes d'élevage de cnidaires, une aux Caraïbes et une autre en Indonésie sont associées à CB pour s'approvisionner en *Palythoa* spp. (cultures en mer). La société a organisé les tests d'activité anticancéreuse et les a financés pour cette thèse.

(ii) Une unité de l'Université d'Aix-Marseille,

- **Le MIO** (Institut Méditerranéen d'Océanologie, Aix-Marseille Université/CNRS/IRD/Université de Toulon), par son Laboratoire de Biochimie structurale et Bio-Procédés (UMR-235IRD, équipe Microbiologie Environnementale et Biotechnologies (responsable Jean Lorquin, PhD). Ce laboratoire est spécialisé dans l'identification des métabolites, les cultures microbiologiques et les Biotechnologies (Procédés industriels).

Chapitre 1 : publication du travail de thèse (en anglais)

Characterisation of palytoxin from an undescribed *Palythoa* (Anthozoa: Zoantharia: Sphenopidae) with significant in vitro cytotoxic effects on cancer cells at picomolar doses

(Accepté avec révisions mineures, Plos One)

Ludovic Sawelew, Frédéric Gault, Christopher Nuccio, Yvan Perez, Jean Lorquin

Keywords: palytoxin, *Palythoa*, *Symbiodinium*, cytotoxicity, antitumor activity, MALDI-imaging mass spectrometry.

Abstract

Palytoxin (PITX), a large polyhydroxylated compound, is among the most potent non-peptide toxin in marine organisms known so far. The literature emphasizes the sodium/potassium pump (NaK) as the privileged target for PITX when exerting its toxic effects. In this study, we focused on an undescribed species (*Palythoa* sp. Pc001), a coral species belonging to the genus *Palythoa* routinely cultivated in aquariums. We demonstrated that this species contains one of the highest yields of pure PITX production ever found, 2.22 ± 0.41 mg PITX per gram of wet *Palythoa*. Using molecular data combined with external morphology, we identified *Palythoa* sp. Pc001 as the sister species to *Palythoa* aff. *clavata*. Further, the clade of a symbiotic *Symbiodinium* sp. was characterised by DNA barcoding and pigment content. Molecular data showed that *Palythoa* sp. Pc001 contains ‘generalist’ *Symbiodinium* belonging to clade C. This paper also describes for the first time the localisation of PITX and *Symbiodinium* cells in tissues of a highly toxic *Palythoa* species. PITX toxicity was assayed on 72 h-cultured murine and human cancer cells versus human normal cells. Using MTT colorimetric assay and quantitative videomicroscopy, our results showed much higher in vitro cytotoxic activity on cancer cells ($IC_{50} 0.54 \pm 0.05 \times 10^{-12}$ M) than on normal ones ($IC_{50} > 1 \times 10^{-6}$ M). Such a strong differential effect has never been reported with respect to the most potent NaK ligands (cardiac glycosides) described so far. Moreover, PITX displayed similar in vitro growth inhibitory activity in rodent and human cancer cells, although the NaK in rodents displays a double mutation in the $\alpha 1$ -subunit that usually decreases the sensitivity to others cardiac glycosides like ouabain, when compared to human cells. This work demonstrates, first, that picomolar concentrations of PITX specifically kill cancer cells, and secondly, that this in vitro antitumor effect would not be entirely relied to its canonical targeting to the NaK α -subunit. Thus, PITX ranks amongst highly potent anti-cancer drugs as it targets cancers while minimizing the drug’s exposure effects to the normal cells.

Introduction

Many organisms such as animals, plants and bacteria are known to secrete poisonous substances in their environment to protect themselves from aggressors. These toxins may also be very useful in cancer therapy due to their high cell-killing potency (Wiles *et al.*, 1974; Görögh *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2013;). PITX, one of the most toxic natural compounds known to date, is a nonprotein marine toxin which consists of a long, partially unsaturated (with eight double bonds) aliphatic backbone with spaced cyclic ethers and 64 chiral centers (Uemura *et al.*, 1985). Initially isolated from a *Palythoa* species (Anthozoa: Zoantharia: Sphenopidae) (Moore and Scheuer, 1971), it can also be found in numerous other marine organisms from the same ecological region (Aratake *et al.*, 2016). Moreover, several analogues of PITX were discovered in various organisms (Table 1). Currently, the biogenetic origin of PITX in *Palythoa* remains unclear. The leading hypothesis is that the toxin is synthesised by symbiotic dinoflagellates (Nakamura *et al.*, 1993; Onodera *et al.*, 2004) and/or by bacteria (Frolova *et al.*, 2000; Seemann *et al.*, 2009). To date, *Palythoa heliodiscus* is the largest PITX producer known among zoanthids, providing high yield of PITX (1 mg/g wet *Palythoa*) and deoxy-PITX (3.51 mg/g wet *Palythoa*) (Deeds *et al.*, 2011). However, in most cases the toxin yield is very low. As a consequence, and because of sanitary problems due to toxic *Ostreopsis* spp. outbreaks (Del Favero *et al.*, 2012a), there is a need for high-yield sources of PITX so as to facilitate its functional characterisation. Sales from aquarium trade of zoanthids containing PITX have also caused domestic intoxications after inhalation of steam (Snoeks et Veenstra, 2012; Hall *et al.*, 2015), dermal contact (Nordt *et al.*, 2011) or water spray in the eyes (Moshirfar, 2010; Ruiz *et al.*, 2015).

PITX and its analogues bind and transform the Na⁺/K⁺-ATPase pump (NaK) into an open channel. The PITX binding site is coupled to other cardiac glycosides (CGs), such as ouabain which is known to bind the α -subunit of NaK (Habermann et Chhatwal, 1982). NaK α -subunit isoforms have a similar affinity for all CGs (Wang *et al.*, 2001). However, recent kinetic experiments revealed that PITX binding dissociation resulting from ouabain competition was incomplete, suggesting an additional, ouabain-insensitive, PITX binding site (Pelin *et al.*, 2013). The ensuing ionic passive transport through NaK leads to the depolarization of the plasma membrane (Kudo and Shibata, 1980; Rossini and Bigiani, 2011) and affects the mechanisms controlling intracellular calcium (Ca²⁺) concentration (Satoh *et al.*, 2003). The intracellular Ca²⁺ increase is related to a long-lasting and gadolinium-sensitive Ca²⁺ influx suggesting a possible involvement of stretch-activated channels in PITX-induced cytotoxicity (Del Favero *et al.*, 2012b). Furthermore, PITX mediates disruption of the actin cytoskeleton and cytomorphological changes (Louzao *et al.*, 2008, 2011). The massive increase of Ca²⁺ in the cytosol triggers the activation of cellular signalling pathways. As is the case with various CGs (Haas *et al.*, 2002), mitogen activated protein kinases (MAPKs) mediate PITX-stimulated signalling and relay a variety of signals to the cellular machinery that regulates cell fate and function (Wattenberg, 2011).

Compound	Organism	MW	Concentration	Reference
Palytoxin	<i>Palythoa</i> aff. <i>clavata</i>	2679	1810-2630 µg/g wet z	This study
Palytoxin	<i>P. toxica</i>	2679	275 µg/g wet z	Moore and Scheuer, 1971
Palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2679	13.6 µg/g wet z	Kimura and Hashimoto, 1973
Palytoxin	<i>P. caribaeorum</i>	2679	30 µg/g wet z	Béress <i>et al.</i> , 1983
Palytoxin	<i>P. heliodiscus</i>	2679	613 µg/g wet z	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxin	<i>P. heliodiscus</i>	2679	515 µg/g wet z	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxin	<i>P. heliodiscus</i>	2679	1164 µg/g wet z	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxin	<i>P. heliodiscus</i>	2679	1037 µg/g wet z	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Palytoxin ¹	<i>P. vestitus</i>	ND	ND	Quinn <i>et al.</i> , 1974
Palytoxin	<i>P. aff. margaritae</i>	2679	ND	Oku <i>et al.</i> , 2004
Palytoxin ²	<i>Zoanthus solanderi</i>	ND	ND	Gleibs <i>et al.</i> , 1995
Palytoxin ²	<i>Z. sociatus</i>	ND	ND	Gleibs <i>et al.</i> , 1995
Palytoxin-b	<i>P. tuberculosa</i>	2720	minor	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Homo-palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2692	minor	Uemura <i>et al.</i> , 1985
Bishomo-palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2706	minor	Uemura <i>et al.</i> , 1985
Neo-palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2661	minor	Uemura <i>et al.</i> , 1985
73-deoxy-palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2663	minor	Uemura <i>et al.</i> , 1985
Deoxy-palytoxin ³	<i>P. heliodiscus</i>	2663	3515 µg/g wet z	Deeds <i>et al.</i> , 2011
Deoxy-palytoxin ³	<i>P. cf. toxica</i>	2662	ND	Tartaglione <i>et al.</i> , 2016
42-OH-palytoxin	<i>P. tuberculosa</i>	2695	minor	Ciminiello <i>et al.</i> , 2009
42-OH-palytoxin	<i>P. toxica</i>	2695	minor	Ciminiello <i>et al.</i> , 2009
OH-palytoxin ⁴	<i>P. cf. toxica</i>	2695	ND	Tartaglione <i>et al.</i> , 2016
42-OH-palytoxin ⁵	<i>Trichodesmium</i> sp.	2695	minor	Kerbrat <i>et al.</i> , 2011
CA-I ⁶	<i>Chondria armata</i>	ND	ND	Yasumoto and Murata, 1990
CA-II ⁶	<i>C. armata</i>	ND	ND	Yasumoto and Murata, 1990
Mascarenotoxin-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2588	minor	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Mascarenotoxin-a	<i>O. mascarenensis</i>	2588	minor	Lenoir <i>et al.</i> , 2004
Mascarenotoxin-b	<i>O. mascarenensis</i>	2606	minor	Lenoir <i>et al.</i> , 2004
Mascarenotoxin-c	<i>O. ovata</i>	2628	minor	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Ostreocin-d	<i>O. siamensis</i>	2634	ND	Ukena <i>et al.</i> , 2001
Ovatoxin-a	<i>O. ovata</i>	2646	minor	Ciminiello <i>et al.</i> , 2008
Ovatoxin-b	<i>O. ovata</i>	2662	minor	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Ovatoxin-c	<i>O. ovata</i>	2690	minor	Rossi <i>et al.</i> , 2010
Ovatoxin-d	<i>O. ovata</i>	2706	minor	Rossi <i>et al.</i> , 2010

Table 1. Summary of the known molecules in the palytoxin family in Zoantharia, Cyanobacteria, algae and dinoflagellates. MW, molecular weight. ND, not determined. z, zoanthid. ¹ In absence of mass spectrometry data, the toxin found in *Palythoa vestitus* showed equivalent UV spectrum and toxicity against mice Ehrlich ascites tumor than *P. tuberculosa* toxin, and has been supposed to synthesize a similar palytoxin. ² For *Zoanthus solanderi* and *Z. sociatus*, presence of palytoxin in the extracts was only shown by HPLC comparatively to the palytoxin standard isolated from *P. caribaeorum*, but has never been characterised by mass spectrometry. ³ Position of the deoxygenation was not determined for this analogue. ⁴ Position of the oxygenation was not determined for this analogue. ⁵ In this case, 42-hydroxy-palytoxin was the main toxin, palytoxin was present at only 10-20% of the total toxin amount. ⁶ CA-I and CA-II are two palytoxin analogues in the red alga *Chondria armata* which mainly produces domoic acid.

In this study, we have shown that aquacultured zoanthids from an undescribed species belonging to the *Palythoa* aff. *clavata/sakurajimensis* complex represent a new PITX source with the highest yield ever found. While PITX has been primarily identified as a tumour promoter when combined to carcinogenic compounds (Wattenberg, 2007; Fujiki *et al.*, 1986), the PITX isolated from *Palythoa* sp. Pc001 exhibited high *in vitro* cytotoxic effects on cancer cells at picomolar doses. The IC₅₀ concentrations calculated from MTT colorimetric assay associated with quantitative videomicroscopy showed that *in vitro* cytotoxicity is over 1,000 times higher toward cancer cells than normal cells. Moreover, comparative MTT colorimetric assay for *in vitro* growth inhibitory effects on murine *versus* human cancer cell lines suggested that the targeting of the NaK α -subunit is not the sole mechanism underlying the cytotoxic effects of PITX. Based on these results PITX may be a very promising anti-cancer agent.

Materials and methods

***Palythoa* sp. Pc001 origin.** *Palythoa* sp. Pc001 specimens used in this study were provided from the aquarium trade industry (Indonesia) and bred at Coral Biome's facility (Marseille). Specimens were maintained in a closed system aquaculture connected to a biological filter fed by artificial seawater (Instant Ocean salts, from Seachem, Madison, USA). Specimens were maintained at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and exposed to a daytime photoperiod of 12 h with an irradiance of $70 \text{ mol. quanta m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and fed daily with fish food pellets (Formula One, from Ocean Nutrition, Essen, Belgium) to maximize growth rate.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing. To amplify both *Palythoa* and *Symbiodinium* genes, tissue sample consisting of five tentacles joined by a small piece of polyp oral disc was placed in 80% alcohol. Total genomic DNA was extracted using the DNAeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA). Two commonly used DNA barcode markers were amplified to identify the *Palythoa* sp. Pc001 specimens: the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) and the nuclear internal transcribed spacer region of ribosomal DNA (ITS-rDNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2). An ITS-rDNA sequence of approximately 750-850 base pairs was amplified using the primers Zoanf-ITS (5' - CTT GAT CAT TTA GAG GGA GT - 3') and Zoanr-ITS (5' - CGG AGA TTT CAA ATT TGA GCT - 3'). The PCR program was carried out as follow: an initial denaturing step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 1 min denaturation at 94°C , 1 min annealing at 50°C , 2 min extension at 72°C followed by 10 min at 72°C . The portion of the mitochondrial COI gene of approximately 650 base pairs was amplified with the following primers: HCO2198 (5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3') and LCO1490 (5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'). PCR amplification was performed as follow: an initial denaturing step at 94°C for 2 min followed by 5 cycles of 15 s denaturation at 92°C , then 45 s annealing at 48°C followed by an incremental increase until 72°C in 1 min, then 1 min 30 extension at 72°C , followed by 30 cycles of 15 s denaturation at 92°C , 45 s annealing at 52°C , 45 s extension at 72°C , followed by 7 min at 72°C .

To identify the *Symbiodinium* clade associated to *Palythoa* sp. Pc001, an ITS2-rDNA sequence (5.8S ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene, partial sequence) of approximately 250-300 base pairs was amplified using the specific primers ITS2-F1 (5' - GAA TTG CAG AAC TCC GTG - 3') and ITS2-R2 (5' - ATA TGC TTA AAT TCA GCG GGT - 3'). PCR amplification was performed under stringent conditions to specifically target the *Symbiodinium* genes instead of coral ones: an initial denaturing step at 94°C for 3 min followed by 12 cycles of 45 s denaturation at 94°C, 45 s annealing at 58°C and an incremental decrease of 0.5°C every cycle, 1 min extension at 72°C, followed by 20 cycles of 45 s denaturation at 94°C, 45 s annealing at 52°C and 1 min extension at 72°C followed by 7 min at 72°C.

After amplification, all PCR fragments were visualised by denaturing gradient gel electrophoresis and were sequenced in both directions using the amplicon primers with an ABI 96-capillary 3730XL sequencer at Eurofins genomics (Ebersberg, Germany).

Phylogenetic analyses. Two data sets were used for molecular analyses: dataset 1 for *Palythoa* species with ITS-rDNA and COI concatenated sequences and dataset 2 for *Symbiodinium* with ITS2-rDNA sequences. All sequences obtained in this study were first checked using NCBI BLAST, then aligned with orthologous sequences available in public databases using CLUSTALW implemented in BioEdit v7.1.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). The program MUSCLE (Edgar, 2004) was also used to carry out a multiple alignment based on the *Symbiodinium* ITS2-rDNA sequences. The MODELTEST v3.0b4 program (Posada and Crandall, 1998) was used to identify the best model of DNA evolution using Bayesian information criterion (BIC). Molecular analyses were conducted through neighbour-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) methods, using MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013) and Bayesian inference (BI) employing MrBayes v3.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Topological robustness was determined using 100 non-parametric bootstrap replicates for NJ and ML analyses. For BI, Markov Chain Monte Carlo searches were done with four chains for 1,000,000 generations, with a random starting tree, default priors and Markov chains (with default heating values) sampled every 1,000 generations.

MALDI-IMS analyses and localisation of *Symbiodinium* cells in *Palythoa* Pc001 tissues. Polyps were collected from cultured colonies in aquariums, harvested with care, and then quickly frozen in a container of isopentane plunged in liquid nitrogen. After 5 min, dry polyps were stored at -80°C overnight. Tissue sections were cut using a Leica CM 1900 UV Microsystems cryostat (Leica Microsystems SAS) with a microtome chamber and a specimen holder chilled at -20°C. Sections of 18 µm were made in crosswise directions at three levels of the polyp body. Lengthwise sections were also made in some specimens. Sections were thaw mounted onto Indium Tin Oxide coated microscopic slides (Bruker Daltonics) adapted for matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry (MALDI-IMS), and onto superfrost plus slides (Thermo Scientific) for epifluorescence imaging. Both types of target slides were dried in a desiccator for 45 min. Polyps sections were scanned before matrix deposition with a histology slide scanner (Opticlab H850

scanner, Plustek). Then, 2,5-dihydroxybenzoic (DHB) acid (Bruker, Daltonics), 30 mg/mL in 50/50 methanol (MeOH)/H₂O 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) was used as a matrix and applied on tissue sections using an automatic matrix sprayer (TM-Sprayer, HTX Technologies). MALDI calibration was carried out manually with a Peptide Calibration Standard 2 (Bruker Daltonics). MALDI-IMS analyses were performed using an Ultraflextreme mass spectrometer controlled by the FlexControl 3.3 software (Bruker Daltonics) in positive reflectron mode. MALDI-IMS sequences were created with FlexImaging 3.0 and the measurement region were manually defined with the previous histological images. The spatial resolution was set at 50 µm with a laser diameter of 20 µm, and 300 laser shots were accumulated for each spot. The laser power was optimised at the start directly on tissue and then fixed for the overall MALDI-IMS experiment. The images were opened with SCILS Lab v2.5 in RAW data with a baseline subtraction to maintain resolution of the average mass spectrum. Due to the high intensity of the PLTX signal, root mean square normalisation was chosen for a better visualization of the distribution. Endogenous auto fluorescence of chlorophyll and peridinin pigments of the *Symbiodinium* cell was revealed under an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-U) using a filter cube B-2E/C corresponding to a medium band blue excitation. Images were acquired with NIS-Elements BR v2.30 imaging software.

PITX purification. About one gram of fresh *Palythoa* sp. Pc001 was gently detached from the substrate with a scalpel, chopped into several pieces and placed in 20 mL of 80% (v/v) MeOH in milliQ H₂O. After agitation for 12 h at 4°C, the extract was centrifuged (8,000 g, 20 min), the pellet rinsed with 5 mL milliQ H₂O, centrifuged (8,000 g, 20 min) and the supernatants were pooled. MeOH was evaporated using a rotavapor and the aqueous phase extracted several times with dichloromethane to remove carotenoid and chlorophyll pigments. The red-color (RC) organic phases were pooled, evaporated to dryness and kept at 4°C in darkness for further pigment identification. The remaining aqueous phase that contained PITX was evaporated and deposited onto a two-centimeter diameter glass column filled with 10 cm³ of C₁₈ reversed phase powder (Lichroprep RP₁₈, from MERCK, France). The column was washed with acidified H₂O (0.2% (v/v) formic acid), then with 50% (v/v) MeOH in acidified H₂O. PITX was finally eluted with 75% (v/v) MeOH in acidified H₂O, and a dried pale-yellow solid of pure PITX was obtained by N₂ flow evaporation. The toxin was solubilised in dimethylsulfoxide (DMSO) and quantified by using high performance liquid chromatography (HPLC, see below). Routinely, preparations containing 100 µg PITX in 100 µL DMSO were stored at 4°C for up to 6 months. From the last purification step, a yellow carotenoid (YC) fraction retained on the Lichroprep-RP column was eluted by pure MeOH, evaporated to dryness and stored at 4°C in darkness for further identification.

HPLC analyses. Solvents were of HPLC grade and obtained from Biosolve (Dieuze, France). To control the purity of the PITX fraction and quantify the toxin, 2-5 µg of the sample in milliQ H₂O were injected and analysed by reverse-phase (RP) HPLC with a Waters equipment composed of a 1525 binary pump, a 2996 diode array detector, a 7725i Rheodyne injector fitted with a 20-µL loop, and a temperature control system. Files were acquired by the Empower software. Separations were carried out on a Waters Symmetry C₁₈ column (4.6 × 100 mm, ODS2, 5

µm) protected with a guard cartridge. The elution was performed at 30°C at a flow rate of 0.8 mL/min and using a linear gradient of MeOH (eluent A) in acidified H₂O with 0.2 % (v/v) acetic acid (eluent B), from 5 to 100 % A during 20 min. PITX was visualised at 263 nm and total spectra were analysed from 200 to 700 nm by the software to control the purity. Commercial PITX (from WAKO Pure Chemical Industries, Japan) was redissolved in DMSO and used for calibration. Data were averaged from three injections. The yield of PITX in *Palythoa* sp. Pc001 (expressed as mg/g of wet *Palythoa*) was determined by averaging the yields calculated from 12 animal extractions. Pigments from *Symbiodinium* and *Palythoa* sp. Pc001 (RC and YC) extracts were also analysed by the same HPLC device but using an Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C₈ column (4.6 × 150 mm) eluted with the gradient method of Zapata *et al.* (2000).

Mass spectrometry. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-ToF) analyses were performed on a Microflex II mass spectrometer (Bruker, Germany). A 10 mg/mL solution of 2,5-DHB in 70/30 acetonitrile/H₂O 0.1 % TFA was used as matrix (Paz *et al.*, 2011). From a solution of 1 mg/mL of purified toxin in milliQ H₂O, 0.8 µL were mixed with 0.8 µL of the matrix solution, deposited and allowed to dry at room temperature. Data were acquired in a positive reflectron mode, the range was set from 600 to 5000 Da, and pulsed ion extraction was fixed at 150 ns. Ions formed upon irradiation by a smartbeam laser using a frequency of 200 Hz. The laser irradiance was set to 45-50% (relative scale 0-100) arbitrary units according to the corresponding threshold required for the applied matrix system. Mass spectra were treated with the Flex Analysis software (Bruker, Germany) and no smoothing or baseline subtraction was performed. Purified PITX was also analysed by ESI-MS/MS on a Q-ToF Synapt G1 High Definition mass spectrometer (Waters, UK) mounted with a nanospray ionization source and a V-mono-reflectron, in the positive mode. The following source settings were used: capillary voltage 3.2 kV, sampling cone 40 V, extraction cone 4 V, source temperature 120°C, desolvation gas flow 200 L/h (N₂) at a temperature of 150°C, and trap collision energy 38 eV. The calibration was performed with a solution of CsI 1 mg/mL and used in the 100-3200 mass range with a precision of +/- 3 ppm. A solution of purified PITX (1 mg/mL) in MeOH/H₂O (1:1) was diluted 25 times (15 µM final concentration) and injected via a syringe pump in the nano-source at a flow rate of 3 µL/min.

Carotenoids and chlorophylls identification. RC and YC fractions obtained previously as dried matter (see PITX purification) were each dissolved in 1 mL of MeOH and 10-20 µL were directly analysed by HPLC on a C₈ reverse-phase column. For comparison, photosynthetic pigments were also extracted from a pellet containing fresh *Symbiodinium* cells with 5 mL of a MeOH-H₂O (4:1) mixture under agitation with a magnetic barrel for 2 h at 4°C in darkness. After centrifugation (10,000 g, 5 min), the coloured supernatant was slightly evaporated and 20 µL were directly analysed by HPLC. *Symbiodinium* cells were isolated according to a protocol adapted from Perez and Weis (2006). This involved cutting in half three polyps and homogenizing each half in a glass tissue grinder with 1 mL of filtered artificial seawater. After decantation and leaving pieces of

Palythoa sp. Pc001 in the bottom grinder, the six solutions were pooled and centrifuged at 450 g for 5 min to pellet the algae which were then washed in three changes of seawater.

Cell lines and culture media. All medium components were purchased from Lonza (Westburg, Germany). The cell lines were purchased from the following bank collections: the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA); the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK); the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany); the Cell Line Services (CLS, Eppelheim, Germany); PromoCell (PC, Europe). The normal cell line used was the human dermal fibroblast (NHDF; PC C12300). The cancer cell lines sensitive to pro-apoptotic stimuli used here included the human Hs683 oligodendroglioma (ATCC HTB-138) and the mouse B16F10 melanoma (ATCC CRL6475) cell lines (Branle *et al.*, 2002; Ingrassia *et al.*, 2009; Van Goietsenoven *et al.*, 2010). The cancer cell lines displaying various levels of resistance to pro-apoptotic stimuli included the human A549 non-small-cell lung cancer (NSCLC; DSMZ ACC-107), the human U373 glioblastoma cells (ECACC08061901) (Branle *et al.*, 2002; Mijatovic *et al.*, 2006), and the rodent 9L gliosarcoma cells. The human HBL-100 (CLS 330178) epithelial cell line was also included as a non-cancerous but transformed model. All cell lines except NHDF were cultured in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and a mixture of glutamine 0.6 mg/mL, penicillin 200 IU/mL, streptomycin 200 IU/mL and gentamycin 0.1 mg/mL (all at final concentration). The NHDF cell line was cultured in an MEM culture medium with 5% heat-inactivated FBS and antibiotics as described above.

MTT colorimetric assay and quantitative videomicroscopy. Cell lines were plated according to their growth rate and left to adhere and grow for 24 h before treatment. Cells were then treated for 72 h with different concentrations of purified PITX in DMSO ranging from 1 pM to 1 μ M, with a semi-log concentration increase. After the treatment period, cells were incubated with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) solution to enable mitochondrial reduction. Blue formazan was solubilised with DMSO, and optical density was measured at 570 nm (reference wavelength 610 nm). The IC₅₀ concentrations were calculated from 96-well plates in which each experimental condition was carried out in six replicates except for the control, which was carried out in 12 replicates. Direct visualization of the PITX-induced effects on the cell proliferation and morphology of human Hs683 and U373n glioma cells was performed by means of time-lapse computer-assisted phase contrast microscopy, *i.e.* quantitative videomicroscopy as previously described (Debeir *et al.*, 2008). A picture of the same field was acquired every 4 min over a period of several hours. Movies were generated from these digitised images to enable a rapid viewing of the cell behaviour for the duration of the experiments in control versus treated experimental conditions. Experiments were carried out in tetraplicates in human Hs683 and U373 glioma cell lines in the absence (control) or the presence of PITX at 0.01 and 1 nM.

Results

Morphological description and molecular typing of *Palythoa* sp. Pc001. The sand-encrusted button-like body, the oral disk and tentacles (approximately 60) are brown and punctuated with white dots (Fig 1). The oral disc, with a diameter of 10-15 mm, has green overtones with a whitish centre and a white strip that forms a radius crossing the centre of the oral disc. The sequences of ITS-rRNA and COI genes from 17 specimens of *Palythoa* (representing 10 species) and 4 specimens of *Zoanthus* (representing 4 species) were concatenated to increase the accuracy of the phylogenetic reconstructions. The total length of the concatenation based on the two genes was 1221 bp (770 and 451 pb ITS-rRNA and COI respectively). The best-fitting model K2+ Γ was used for all methods. BI was performed with the following settings: the model employed two substitution types (nst = 2) with stationary state frequencies fixed to equal in order to get the K2 model (prset statefreqpr = fixed(equal)). Rate variation across sites was modelled using a gamma distribution (rates = gamma). Sequences from *Zoanthus kuroshio*, *Z. gigantus*, *Z. sansibaricus* and *Z. sociatus* were used as outgroups (Fig 1). The monophyly of *Palythoa* genus was highly supported whatever the method considered (100 bootstrap value (bv) for NJ /100 bv for ML /1 posterior probability (pp) for BI). Monophyletic lineages within the *Palythoa* genus were identified with good support values. The first clade (100/100/1) contained *Palythoa grandis* as the sister group to the *P. variabilis*/*P. heliodiscus* complex (100/97/1). The second clade consisted of *P. caribaeorum*, *P. tuberculosa* and *P. Mutuki*, although this group was moderately supported (76/73/1). *P. grandiflora* appeared as the sister species to this assemblage but with low bv values (66/69/1). The new sequences obtained from *Palythoa* sp. Pc001 grouped within a well-supported clade containing *P. sp. sakurajimensis* (Japan) and *P. aff. clavata* (Florida) (99/91/1). However, the sister group relationship between *Palythoa* sp. Pc001 and *P. sp. clavata* was supported by BI only (pp = 0.96).

Molecular typing of the *Symbiodinium* clade and pigment characterisation. After the sequencing step, the ITS2-rDNA sequence displayed clear chromatograms in both forward and reverse directions with no ‘double-peaks’, and therefore no cloning step was performed to investigate the intragenomic variability. The best fit model for data set 2 was K2+I. Phylogenetic analysis of ITS2-rDNA sequences, which were rooted on midpoint, yielded well-resolved trees in which the main clades previously described in cnidarians received high support values whatever the method considered (Fig 2). *Symbiodinium* ITS2-rDNA sequence isolated from the *Palythoa* sp. Pc001 grouped within the ‘generalist’ clade C (93/100/0.94). To check the origin of the chlorophylls and carotenoids, total pigments were extracted from purified *Symbiodinium* cells and analysed by RP-HPLC-DAD on a C₈ column. The eluted pigments were identified as peridinin (major pigment, retention time 13.4 min, λ_{max} 474 nm) and its *cis*-isomer (minor, 13.8 min, 459 nm), fucoxanthin (major, 18.2 min, 468 nm) and its isomer (minor, 17.9 min, 461 nm), diadinoxanthine (major, 23.0 min, [422,446,477] nm) and dinoxanthin (minor, 24.0 min, [416,441,469] nm), chlorophyll *a* (major, 34.0 min, [429,616,662] nm) and its epimer (major, 34.4 min, [430,618,662] nm), and the very weak compounds chlorophyll *c*₂ (9.1 min, 450 nm) and

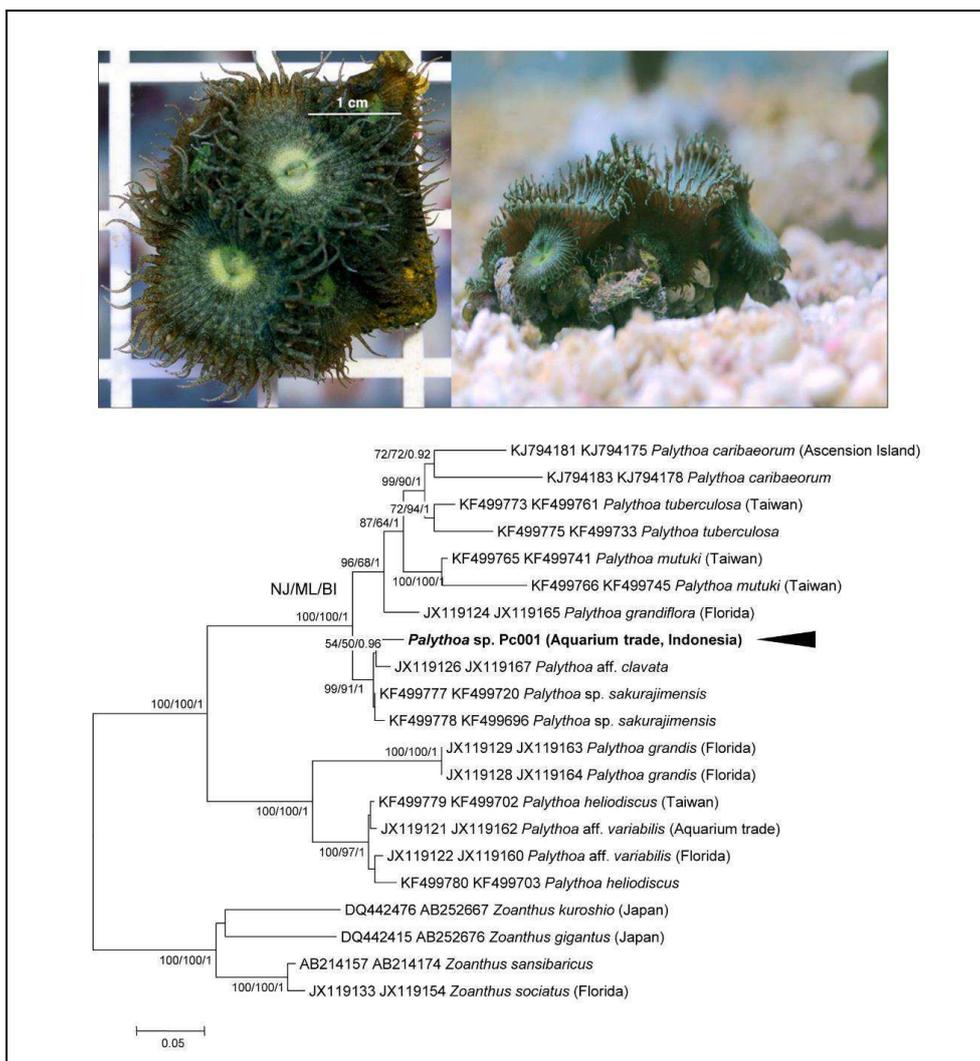


Figure 1. Morphotype and phylogenetical identification of *Palythoa* sp. Pc001 used in this study. Top: two colonies of *Palythoa* sp. Pc001 collected in Indonesia and routinely cultivated in aquariums at Coral Biome. Bottom: maximum likelihood tree calculated from a supermatrix including ITS-rRNA and COI sequences (1221 nucleotide positions) under the K2 + Γ model. The lnL value of this optimal tree is -5683.49. Support values obtained using different reconstruction approaches are indicated at nodes in the following order: neighbor joining (NJ), maximum likelihood (ML), and bayesian inference (BI). Support values are displayed when bootstrap values ≥ 70 or posterior probabilities $p \geq 0.90$. Tree was rooted on the monophyletic assemblage consisting of 4 *Zoanthus* species. Black arrowhead indicates the sequence belonging to *Palythoa* sp. Pc001 used for palytoxin extraction. Sequences/species names from previous studies in regular font with GenBank Accession Numbers.

phaeophytin *a* (hypothetic, 36.0 min, [409,607,660] nm) (profile not shown). No β -carotene was detected. In parallel, the dichloromethane (RC) and the C₁₈ (YC) fractions obtained during the PITX purification process were also analysed for their pigment content. Identical pigments comprising carotenoids and chlorophylls were found in the RC fraction, since carotenoids only were present at lower doses in the YC fraction (data not shown), indicating that the liquid-liquid extraction using dichloromethane removed the totality of the chlorophylls and a major part of the carotenoids which facilitated the subsequent purification steps.

Purification, quantification and characterisation of PITX. PITX was eluted as a pure compound at 75% MeOH by HPLC and DAD acquisitions in the 200-700 nm range. The purified fraction was eluted as a symmetrical peak at about 80% MeOH on the C₁₈-HPLC column (Fig 3A) by using a 0.2% acetic acid in the aqueous solvent (eluent B), the retention time was 14.8 min instead of 15.8 min in a 1% acid concentration. The purified fraction displayed two UV bands characteristic of PITX at 233 and 263 nm. The purity was controlled by C₁₈-HPLC-DAD in the entire UV-visible range, and then by C₈-HPLC-DAD to verify the presence of residual carotenoid/chlorophyll pigments. No pigment or other compound was detected. Specimens of *Palythoa* sp. Pc001 were found to produce 2.22 ± 0.41 mg of PITX/g wet *Palythoa* ($n = 11$), as evaluated by HPLC analyses (Table 1).

The mass spectra corresponded to a single molecule free of contaminants (Fig 3B). Indeed, by using the optimised matrix of Paz *et al.* (2011) composed of DHB in a 0.1% TFA/acetonitrile mixture (which gave better resolution than with a α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix), the MALDI-ToF mass spectrometry in the positive mode revealed single charged molecules containing mainly Na⁺ and few K⁺ ions. The purified toxin showed a clear ion profile with a prominent ion at m/z 2701.421 [M + Na]⁺ corresponding to a molecular mass of

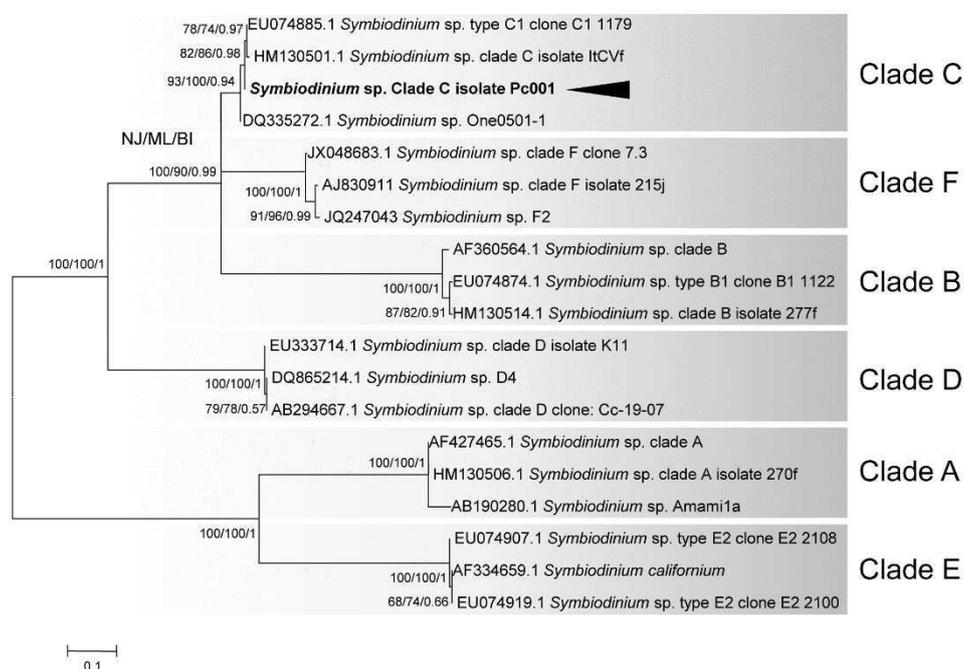


Figure 2. Phylogenetical identification of a *Symbiodinium* sp. from *Palythoa* sp. Pc001. Maximum likelihood tree calculated from ITS2-rRNA sequences (268 nucleotide positions) of *Symbiodinium* clades from various corals under the K2 + I model. The lnL value of this optimal tree is -1592.20. Support values obtained using different reconstruction approaches are indicated at nodes in the following order: neighbor joining (NJ) maximum likelihood (ML) bayesian inference (BI). Black arrowhead indicates the sequence belonging to the *Symbiodinium* clade identified in the *Palythoa* species used for palytoxin extraction. Sequences/species names from previous studies are indicated in regular font with GenBank Accession Numbers. On the right, *Symbiodinium* clades confirmed to be in symbiosis with various metazoans species (this study and previous studies) designated with shaded boxes.

2678.43 (Fig 3B). Together with this main molecular ion, minor adducts at m/z 2683.359 $[M + Na - H_2O]^+$, 2665.262 $[M + Na - 2H_2O]^+$, and 2717.396 $[M + K]^+$ were found, confirming the high degree of PITX purity. ESI-tandem mass spectrometry analyses on a Q-ToF instrument were also performed to confirm the PITX structure, and revealed a complex ion pattern with multiply charged states. The cleavage between carbon 8 and 9 of the PITX was demonstrated by the loss of the A moiety which was recovered as a single fragment ion $[M + H]^+$ m/z 327.126 in the full MS spectra and corresponded to a $C_{16}H_{27}N_2O_5$ part formula usually observed in PITX (data not shown). Other characteristic tri- and bi-charged ions were notably identified at m/z 906.495 $[M + 2H + K]^{3+}$, 1351.750 $[M + H + Na]^{2+}$, and 1359.741 $[M + H + K]^{2+}$ (data not show). Further, MS/MS assignments confirmed the presence of a single molecule in the final purified fraction. The calculation based on these tri- and bi-charged ions, together with the MALDI-ToF data, attributed to the PITX of *Palythoa* sp. Pc001 a molecular weight of 2678.48, similar to that of PITX of *P. tuberculosa*, *P. toxica*, *P. caribaeorum* and *P. heliodiscus* (Table 1).

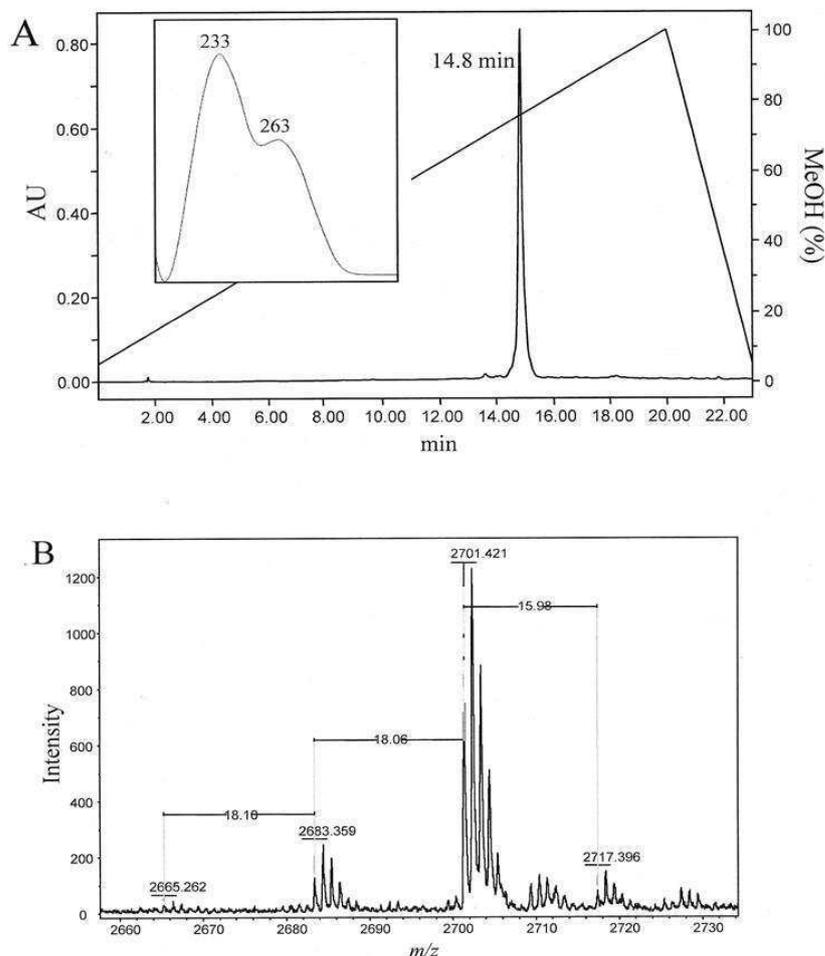


Figure 3. Analysis of palytoxin purified from *Palythoa* sp. Pc001. A. HPLC profile at 263 nm of the palytoxin isolated from *Palythoa* sp. Pc001. The insert graph shows the UV spectrum of the toxin eluted at 14.8 min in the gradient conditions used (see Methods). B. MALDI-ToF mass spectrum of the palytoxin isolated from *Palythoa* sp. Pc001.

Localisation of PITX and *Symbiodinium* cells. Cross-sections were analysed by MALDI-IMS to localise the PITX in *Palythoa* sp. Pc001 tissues. At the same time, chlorophyll and peridinin pigments were analysed by epifluorescence microscopy to localise *Symbiodinium* cells (Fig 4). PITX was easily identified by MALDI-IMS and displayed a non-homogeneous distribution in polyp tissues. The ectodermal tissues, *e.g.* the epidermis of the body wall and the pharynx, showed the highest concentrations of PITX (Fig 4A, B). PITX was also found in some tissues of endodermal origin but with concentrations usually lower than in the ectodermal ones (Fig 4A-F). Amongst the endodermal tissues, the outer side of the endodermal fold close to the epidermis and the inner layer around the pharynx contained the highest PITX concentrations (Fig 4A, B). Very few PITX was detected in the gastrodermis of the enteron and septa (Fig 4C-F). High concentrations of PITX were also detected in the mucus-like secretion surrounding the polyps, especially well visible in the sagittal sections executed along the apico basal axis of the body (data not shown). No PITX was observed in the tentacles whatever the tissue considered (Fig 4A, B). Sections were also analysed by epifluorescence microscopy to localise the endogenous auto fluorescence due to chlorophyll and peridinin pigments of the *Symbiodinium* cells (Fig 4G-I). A strong signal was detected in the epidermis of both the body wall and the tentacles, the endodermal fold (outer layer of the gastrodermis below the epidermis) at the level of the mouth opening and the inner layer of the gastrodermis constituting the enteron wall. The gastrodermis constituting the septa walls located in the median part of the body also contained numerous *Symbiodinium* cells (Fig 4H), the number of which significantly decreased towards the apex (Fig 4G) and the base (Fig 4I).

***In vitro* growth inhibitory effect on cancer cells lines and IC₅₀.** The MTT colorimetric assay-related data are detailed in Table 2. Our results revealed that PITX-mediated sensitivity of the normal non-cancerous and non-transformed NHDF cell line was $\sim 10^6$ orders of magnitude lower than that of the cancerous or HBL-100 transformed cell lines. The HBL-100 cell line transformed for immortalisation behaved as a cancer, not as a normal cell line regarding the PITX cytotoxicity. The incomplete competition between PITX and ouabain over the binding of the NaK $\alpha 1$ -subunit suggests that this subunit is the main target of PITX (Pelín *et al.*, 2013). To test this hypothesis, two rodent models were included in our assay, *i.e.* the B16F10 mouse melanoma and the 9L rat gliosarcoma cell lines. Indeed, rodents display a double mutation in the NaK $\alpha 1$ -subunit, they are therefore 100-1,000 times less sensitive to NaK α -subunit inhibitors like the CG UNBS1450, when compared to human cells (Mijatovic *et al.*, 2007 a et b; Lefranc *et al.*, 2008). Interestingly, the rodent cell lines displayed similar sensitivity to PITX-mediated *in vitro* growth inhibition when compared to human cells (Table 2). The mean IC₅₀ calculated for cancer cell lines including the IC₅₀ obtained for transformed HBL-100 cells was 0.53 ± 0.05 pM PITX. Videomicroscopy data illustrate the morphological pictures obtained with 0.01 and 1 nM PITX on human Hs683 and U373 glioma apoptosis-resistant cells (Fig 5). The concentration of 0.01 nM (*i.e.* 10 pM) represents ~ 20 times the IC₅₀ *in vitro* growth inhibitory concentration associated with PITX (Table 2), while 1 nM represents $\sim 2,000$ times this IC₅₀ concentration. Both Hs683 and U373 cell lines began to die about 3 h and 5 h respectively after having been treated with 0.01 nM PITX. Both cells died after 3 h post-

treatment with 1 nM of PITX. The morphological appearance of dying Hs683 and U373 cells treated with 1 nM PITX (Fig 5) is typical of cell swelling and bubbling occurring after the impairment of various ion channels and pumps, not only NaK.

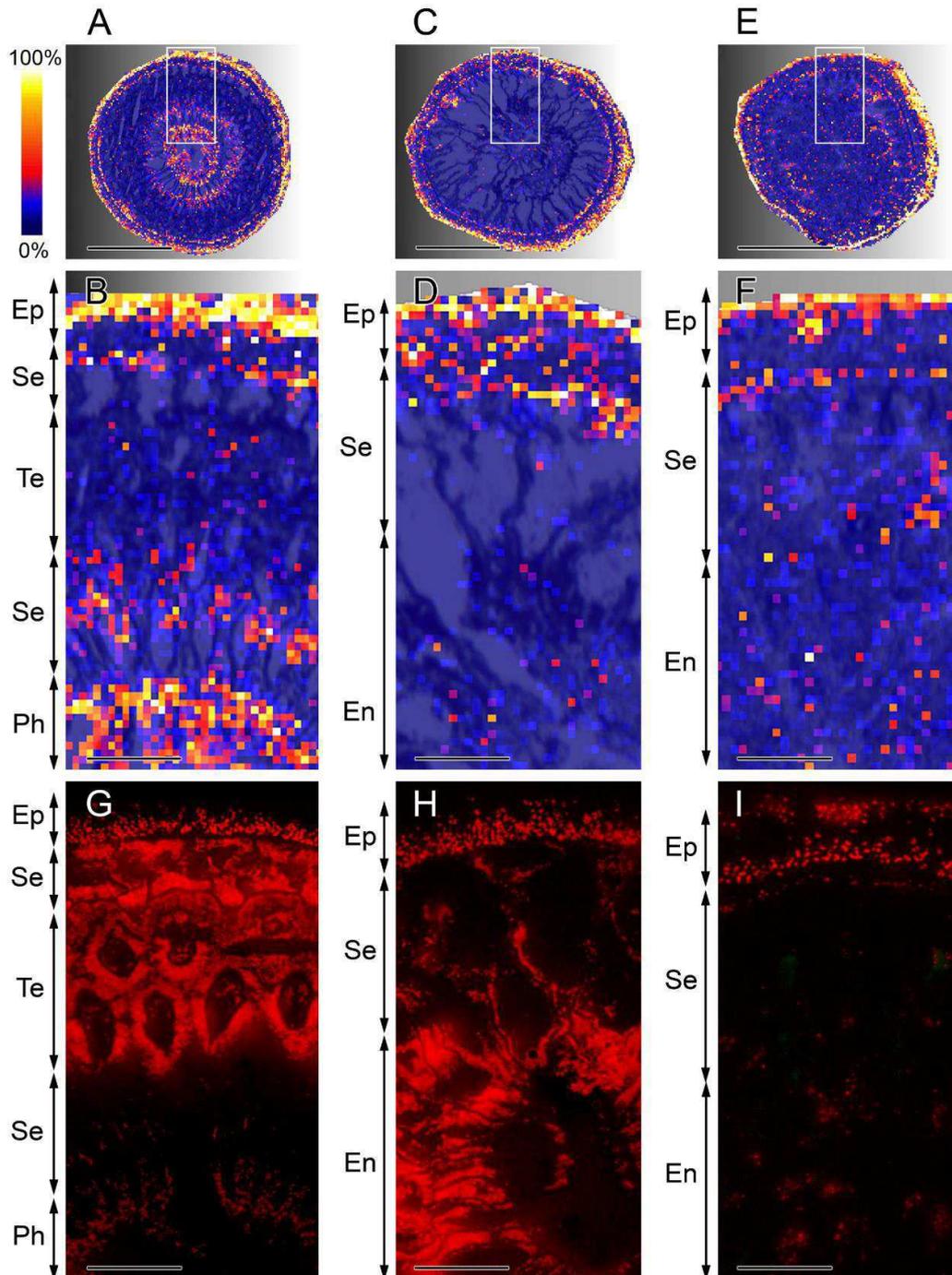


Figure 4. Cross sections of *Palythoa* sp. Pc001. Sections at the mouth and tentacles (A), actinopharynx (C) and basal (E) levels demonstrating the location and relative concentrations of palytoxin (PITX) by MALDI-imaging mass spectrometry. Areas delimited by white rectangles are enlarged (B, D, F) and compared with images of the same histological regions showing endogenous autofluorescence due to photosynthetic pigments of *Symbiodinium* cells (G-I). Abbreviations: En, enteron; Ep, epidermis; Ph, pharynx; Se, septa; Te, tentacles. Color scale, highest PITX concentrations (100%) - no PITX (0%). Scale bars = 3 mm (A, C, E), 0.5 mm (B, D, F, G-I).

Cell line	Normal/cancer	Origin	IC ₅₀ (pM)
NHDF (dermal fibroblast)	Normal	Human	> 1 × 10 ⁶
HBL-100 (mammary epithelial)	Immortalised cells	Human	0.65
A549 (lung carcinoma)	Cancer	Human	0.67
Hs683 (glioma)	Cancer	Human	0.58
U373n (glioma)	Cancer	Human	0.56
9L (gliosarcoma)	Cancer	Rat	0.39
B16F10 (melanoma)	Cancer	Mouse	0.44
Mean ± SEM	Cancer	Human and murine	0.53 ± 0.05

Table 2. IC₅₀ *in vitro* growth inhibitory concentration by 50% after having cultivated the cells in presence of the *Palythoa* sp. Pc001 palytoxin for 72 h. For calculation of the average, the IC₅₀ value for HBL-100 transformed cell line was included.

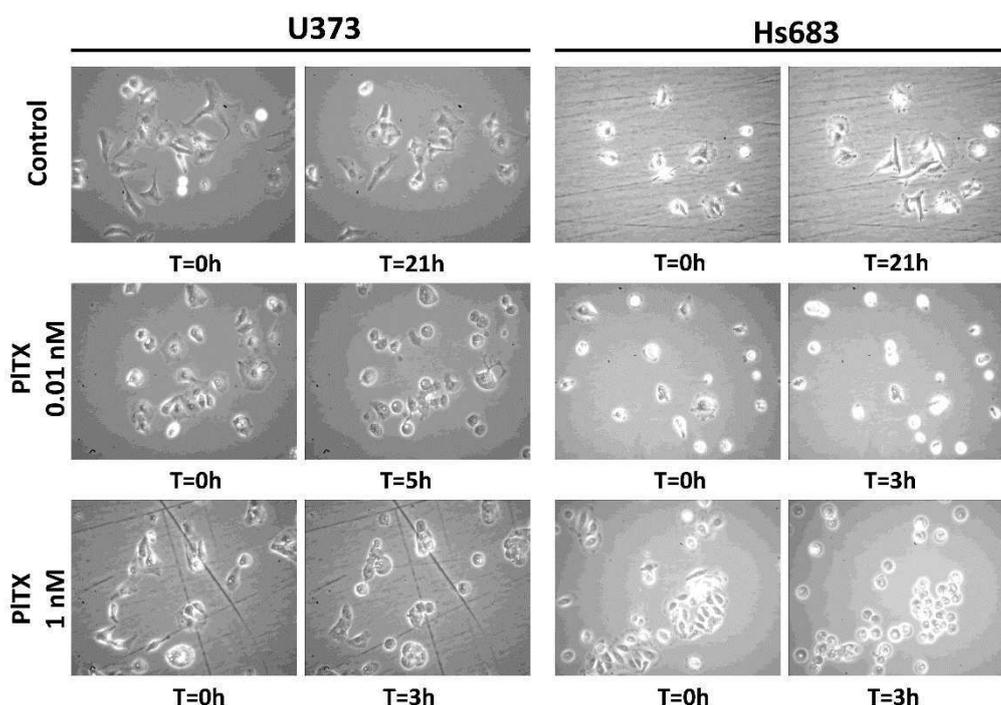


Figure 5. Effect of palytoxin on human cell lines monitored by videomicroscopy. Human U373 (left panel) and Hs683 cell lines (right panel) treated with 0.01 or 1 nM palytoxin. As marked morphological changes of U373 and Hs683 cell lines were observed after 3 to 5 h of treatment with palytoxin, these timepoints were chosen for their illustrations while growth of the control has been followed and is presented at 21 h.

Discussion

Taxonomic remarks on *Palythoa* sp. Pc001 and its *Symbiodinium* clade. The identification of the specimens used in this study is a crucial step given that (i) different *Palythoa* species might produce different types or stereo-isomers of PITX, (ii) the IC₅₀ found here are remarkably lower than previous published data, a result that can be explained by differential pharmacological effects related to different isomers of PITX (Ciminiello *et al.*, 2014). The identification of a zoanthid species is not a trivial task, even for a taxonomist, mainly due to the lack of reliable diagnostic characters combined with high levels of intraspecific morphological variation (Burnett *et al.*, 1997; Fosså and Nilsen, 1998; Reimer *et al.*, 2004). Recent molecular studies suggested that several previously described species were simply redundant (Reimer *et al.*, 2004, 2012). Moreover, many of the remaining species exist in sibling pairs between the Atlantic and Indo-Pacific basins. Without collection location or genetic data, it is therefore simply impossible to tell species pairs apart. Our molecular analyses showed that the closest relative to *Palythoa* sp. Pc001 is *Palythoa* aff. *clavata*, an undescribed species found in Florida waters (Reimer *et al.*, 2012). More recently, Reimer *et al.* (2014) identified new specimens from Ascension Island belonging to the *clavata* complex. The morphology of *Palythoa* sp. Pc001 does not match with any Indo-Pacific *Palythoa* species but fits very well with a specimen from the Cape Verde Islands named *Palythoa* sp. 265 (Reimer *et al.*, 2010a) which is also genetically very close to *P.* aff. *clavata* (Reimer *et al.*, 2012). Unfortunately, we could not include *Palythoa* sp. 265 in our concatenated analysis since ITS-rRNA sequences are not available in public databases. Nevertheless, Reimer *et al.* (2010a) provided its COI sequence, the phylogenetic analysis of which confirmed a close relationship between *Palythoa* sp. 265 from the Cape Verde Islands and *Palythoa* sp. Pc001 (not shown). Molecular analyses have also shown that the undescribed Indo-Pacific species *P.* aff. *sakurajimensis* is genetically close to *Palythoa* sp. Pc001. However, this molecular result is not congruent with morphological data, emphasizing once more that, in zoanthids, genetic similarities do not necessarily reflect morphological ones. Species boundaries are based primarily on morphology and it is generally assumed that morphological variations reflect reproductive isolation with genetic differentiation. However, genetic studies and fertilization trials producing viable larvae suggest that morphologic and genetic distinctions are not always closely linked in corals (for review, Miller and Benzie, 1997). So far, even if it is reasonable to consider *Palythoa* sp. Pc001 as an undescribed species on the basis of its morphology and collection location, it is not possible to assess to which extent hybridization with *P.* aff. *sakurajimensis* occurs naturally on the reef. As found in *P.* aff. *clavata* (Reimer *et al.*, 2014) and *Palythoa* sp. 265 (Reimer *et al.*, 2010a), *Palythoa* sp. Pc001 contains a ‘generalist’ *Symbiodinium* belonging to clade C. A comparison of published results with the range of pigments synthesised by the *Symbiodinium* sp. found in *Palythoa* sp. Pc001 suggests that these pigments are synthesised only by the *Symbiodinium* cells (see Zapata *et al.*, 2000; Venn *et al.*, 2006; Daigo *et al.*, 2008). This, in turns, supports that *Palythoa* sp. Pc001 seem not to be associated with epizoic or endolithic Cyanobacteria, green algae and diatoms, in contrast to other corals (Daigo *et al.*, 2008).

Storage of PITX in *Palythoa* sp. Pc001. *Palythoa* sp. Pc001 contains the highest amount of PITX ever found in a zoanthid (2.22 ± 0.41 mg/g wet zoanthid). The mean recorded value of 0.22% (w/w) PITX is high compared to the values found in the literature (see Table 1), and corresponds to eight times more than the first value of 0.027% (w/w) recorded by Moore and Sheuer (1971) from *P. toxica*. In *P. heliodiscus*, Deeds *et al.* (2011) found a maximum of 1164 $\mu\text{g/g}$ wet zoanthid for PITX corresponding to 0.12% (w/w). The PITX synthetic pathway and the putative symbiotic organism(s) involved are entirely unknown (Aratake *et al.*, 2016). Based on structure similarities between PITX and zooxanthellatoxins, these last being secreted by *Symbiodinium* spp. (Nakamura *et al.*, 1993; Drainville-Higgins, 2004; Onodera *et al.*, 2004), it has been hypothesised that the symbiotic dinoflagellates in *Palythoa* are responsible for PITX synthesis. Moreover, several species of free dinoflagellates are able to produce PITX and analogues (Ukena *et al.*, 2001; Lenoir *et al.*, 2004; Ciminiello *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2010). MALDI-IMS carried out on *Palythoa* sp. Pc001 tissues did not highlight an exclusive colocalisation of *Symbiodinium* cells and high levels of PITX. Strikingly, high levels of PITX could be detected in histological regions where few or no *Symbiodinium* cells could be observed, notably in the epidermis forming the pharynx. This raises interesting questions about the storage process in toxic *Palythoa* species. PITX is unlikely to be able to diffuse through cellular membranes due to its large molecular mass. Hence the hypothesis of a central role of the *Symbiodinium* cells in PITX synthesis suggests that (i) PITX migrates through the symbiosome membranes and the cytoplasmic membrane of the host cell thanks to a non-diffusive active transport and (ii) a storage pathway must exist in some cells of toxic *Palythoa* species. It is noteworthy that the PITX and its analogues are not only produced by dinoflagellates. PITX and one of its analogues, 42-hydroxy-PITX, have been shown to be produced by a marine cyanobacteria belonging to the genus *Trichodesmium* (Kerbrat *et al.*, 2011). Frolova *et al.* (2000) detected PITX-like compounds in Gram-negative *Aeromonas* sp. and *Vibrio* sp. bacteria using anti-PITX antibodies. Similarly, bacteria isolated from *Palythoa caribaeorum* were found to display a PITX-like haemolytic activity (Seemann *et al.*, 2009) confirming that several prokaryotic organisms can produce at least one PITX type. It is therefore possible to assume that the *Symbiodinium* spp. and symbiotic prokaryotes collaborate with the cnidarian host to produce and store PITX. Accordingly, the holobiont itself has a decisive role and provides a favourable environment where crucial organisms for the synthesis and storage of PITX are united. This could also explain the differences of toxicity between several genetically close species of zoanthids (Gleibs *et al.*, 1995; Deeds *et al.*, 2011; Aratake *et al.*, 2016) containing *Symbiodinium* spp. belonging to the same clade. In any event, identifying the organisms involved in the PITX synthesis would necessitate both confocal laser scan microscopy and immunolabelling methods associated with metabolomics.

PITX from *Palythoa* sp. Pc001 is the most powerful anti-cancer CGs ever reported. Ouabain-related *in vitro* IC₅₀ growth inhibitory effects are in the 10-100 nM ranges of concentration (Mijatovic *et al.*, 2007 a et b), thus 10^4 to 10^5 orders of magnitude higher than the $0.54 \pm 0.05 \times 10^{-12}$ M (picomolar) IC₅₀ evaluated in this work against various cancer cell lines. UNBS1450 inhibits $\alpha 3\beta 1$ NaK at 3.2 nM and demonstrates a much higher inhibition of NaK than classic CGs, with

potency > 200 times greater than ouabain and ~6 times greater than digoxin (Mijatovic *et al.*, 2007b). However, the use of UNBS1450 at antiproliferative concentrations does not induce apoptosis or intracellular Ca²⁺ increases that are typically involved in CG-mediated cardiotoxicity (Mijatovic *et al.*, 2006). Videomicroscopy experiments showed that in presence of 10 pM of PITX isolated from *Palythoa* sp. Pc001, Hs683 oligodendroglioma and U373n glioblastoma cell lines died but with a delay for the pro-apoptotic resistant U373n cells. Both cell lines displayed swelling and bubbling behaviours characteristic to NaK impairment as well as other ion channels. It is known that changes in ion fluxes are the immediate effects of PITX on the cells. In particular, the increase of the Na⁺ permeability leads to the membrane depolarization and to a secondary Ca²⁺ influx that may lead to multiple events regulated by Ca²⁺-dependent pathways (Louzao *et al.*, 2008, 2011). However, it has been shown at low concentrations (10–100 nM) that other CGs do not affect the ionic imbalance of the cell and bind nonpumping NaK localised in caveolae leading to activation of the Src tyrosine kinase and MAPKs (Haas *et al.*, 2002; Wattenberg, 2007). Several works previously described the effects of PITX on proliferation and survival of cancer cells in similar experimental conditions, *i.e* without a pre-treatment with ouabain. Valverde *et al.* (Valverde *et al.*, 2008) described the cytotoxic effect triggered by the *P. caribaeorum* PITX on neuroblastoma cells (ATCC CRL-2267). A 24h treatment with 1 nM of PITX inhibited up to over 50% cell proliferation. Significant toxic effects of the *P. caribaeorum* PITX were also observed in head and neck squamous cell carcinoma cell lines with a LD₅₀ of 1.5-3.5 ng PITX/mL (0.56-1.30 nM), in contrast to healthy epithelial cells (Görögh *et al.*, 2013). Furthermore, Kerbrat *et al.* (2011) reported an IC₅₀ of 170 pM with neuroblastoma cells (ATCC CCL-131) incubated for 22h with a PITX mixture mainly composed of the 42-hydroxy isomer from the cyanobacteria *Trichodesmium* sp. Finally, Ledreux *et al.* (2009) reported an IC₅₀ value of 42.9 ± 3.8 pM in experiments carried out on Neuro2a cell line with a PITX incubation time of 19 h.

What could explain the higher cytotoxicity of the PITX isolated from *Palythoa* sp. Pc001? The molecular weight of 2679 Da and the fragmentation recorded by mass spectrometry show that the *Palythoa* sp. Pc001 toxin is a ‘classic’ PITX similar to that isolated from *P. toxica*, *P. tuberculosa* and *P. caribaeorum* (Moore et Scheuer, 1971; Kimura et Hashimoto, 1973; Béress *et al.*, 1983). However, different stereo-isomers may be isolated from different *Palythoa* species. For instance, successive NMR-based stereostructural studies revealed that the two 42-hydroxy-PITXs isolated from *P. toxica* and *P. tuberculosa* were diastereo-isomers with inverted configurations at C50 (Ciminiello *et al.*, 2014). Interestingly, the cytotoxicity of 42-hydroxy-50R-PITX from *P. tuberculosa* toward skin HaCaT keratinocytes appeared approximately two orders of magnitude lower than that of PITX and one order of magnitude lower than that of 42-hydroxy-PITX isolated from *P. toxica* (Ciminiello *et al.*, 2014). The configurational inversion at C50 likely causes the 42-hydroxy-50R-PITX to undergo conformational changes that ultimately reduce its toxicity (Tosteson *et al.*, 1995; Pelin *et al.*, 2013; Ciminiello *et al.*, 2014).

PITX from *Palythoa* sp. Pc001 acts through unknown NaK binding sites. Ouabain, a potent blocker of the NaK used to inhibit some PITX effects *in vitro*, can displace PITX binding on

purified NaK (Habermann et Chhatwal, 1982; Tosteson *et al.*, 1995). The binding site for ouabain is restricted to the N-terminal 200 amino acids of the NaK α -subunit (Ishii and Takeyasu, 1993). Data obtained here suggest that the PITX binding abilities are not only restricted to binding site for ouabain on the NaK α -subunit. Indeed, we showed similar *in vitro* growth inhibitory activity in rodent and human cancer cells although the NaK in rodents displays double mutation in the α 1-subunit which decreases the sensitivity to NaK inhibitors like UNBS1450 from 100 up to 1,000 times, when compared to human cells (Mijatovic *et al.*, 2007 a et b; Lefranc *et al.*, 2008). Furthermore, it has been demonstrated that PITX and ouabain could simultaneously bind to NaK (Artigas and Gadsby, 2004) and a study on immortal human skin keratinocytes (HaCaT) supports the existence of both ouabain-sensitive and -insensitive PITX binding sites (Pelin *et al.*, 2013). Together with our results, all of the above strengthens the hypothesis that PITX-induced cytotoxic effects via NaK might be mediated by binding sites that are distinct and/or partially overlapping with the α -subunit traditionally identified for other CGs.

PITX from *Palythoa* sp. Pc001 showed a specific cytotoxicity towards cancer cells. PITX from *Palythoa* sp. Pc001 shows an exceptionally *in vitro* growth inhibitory activity on cancer cells which is $\sim 10^6$ orders of magnitude higher than on normal cells. This is the broadest differential cytotoxicity of potent NaK ligands ever reported (Mijatovic *et al.*, 2007 a et b; Lefranc *et al.*, 2008). Moreover, the *in vitro* growth inhibitory activity induced by PITX on cancer cells, associated with sensitivity to pro-apoptotic stimuli, was similar to the activity observed in those associated with various levels of resistance to pro-apoptotic stimuli. CGs are preferentially toxic to melanomas *via* the inhibition of NaK (Eskiocak *et al.*, 2016). The CG UNBS1450 is significantly less active (in terms of *in vitro* growth inhibition) in normal fibroblasts (WI-38) than in NSCLC (A549 and Cal-12T; Mijatovic *et al.*, 2007b) and glioblastoma cells (T98G and U373; Lefranc *et al.*, 2008). Considering the high cytotoxicity at very low doses towards cancer cells demonstrated here, PITX from *Palythoa* sp. Pc001 represents a very promising anti-cancer agent. However, due to the lack of knowledge concerning the mechanisms of action of PITX *via* NaK, it is difficult to explain this puzzling differential cytotoxicity. Several physiological explanations related to different cancer phenotypes can nevertheless be suggested. First, the number of NaK might be different in various cancer cells. While the α 1 subunit of NaK is highly expressed in glioblastomas compared with normal tissues (Lefranc *et al.*, 2008), Rajasekaran *et al.* (1999) showed a down regulation of the β 1-subunit in renal cell carcinoma accompanied by a significant reduction in the NaK activity. A low NaK activity may consequently increase the PITX toxicity in some cancer cells. Second, one can also suggest that the heterodimers constituting the NaK in cancer cells are different and able to increase the death consecutive to the binding of PITX on particular isoforms. However, several publications emphasised the altered expression of NaK subunits in cancer cells when compared to corresponding normal ones. Different cancer types are characterised by over-expression of different α - and β -subunits and the presence of specific additional regulatory polypeptides, like FXYD proteins or transporters modifying the NaK kinetic properties (Mijatovic *et al.*, 2007a). Targeting the metabolic differences between tumour and normal cells holds promise as a novel anti-cancer

strategy (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017). Cancer cells usually use high level of ATP for their enhanced glycolytic metabolism (Warburg effect, Tran *et al.*, 2016). Distinct UNBS1450-mediated *in vitro* growth inhibitory effects between normal and cancer cells seemed to be correlated with a lower ATP level in cancer than in normal cells (Lefranc *et al.*, 2008). Therefore, cancer cells might compensate less efficiently the ionic imbalance after a PITX treatment than healthy cells because of a lower ATP level.

Given that, the above observations raise two questions. Does the treatment with PITX interfere with the glucose metabolism and preferentially reduce ATP level in cancer cells? Is the ATP level in cancer cells sufficient to maintain a healthy metabolism after incubation with picomolar doses of PITX? To explore that, further experiments are needed. In particular, it will be useful to study intracellular signalling pathways and modification of the ATP level triggered by the PITX both in cancer and normal cells, in addition to transcriptome analysis using next-generation sequencing in regard to cancer metabolism and PITX cytotoxicity.

Résultats complémentaires

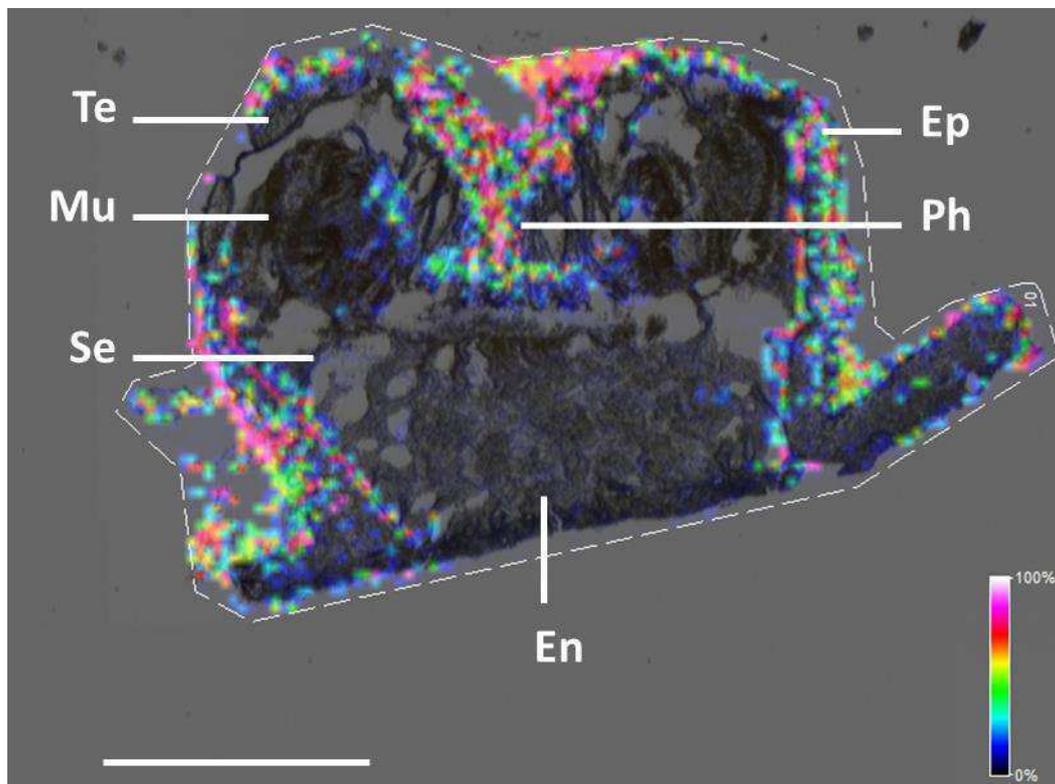


Figure 6. Coupe longitudinale de *Palythoa* sp. Pc001 passant par le centre du pharynx. Abréviations : En, entéron ; Ep, épiderme ; Mu, muscle sphincter ; Ph, pharynx ; Se, septa ; Te, tentacules. L'échelle de couleur représente les quantités relatives de palytoxine, de la plus haute (100%) à l'absence de palytoxine (0%). Barre = 3 mm.

Chapitre 2 :

Analyse phylogénétique des genres *Zoanthus*, *Palythoa* (*Zoantharia*) et *Symbiodinium* et production toxinique

(à soumettre dans ‘Organism Diversity and Evolution’)

1. Introduction

Une première étude (cf. ‘Chapitre 1’) a mis en évidence qu’une espèce de *Palythoa* non décrite, *Palythoa* sp. Pc001 est capable de fournir des concentrations élevées en PITX. Cette étude a notamment mis en avant l’activité anticancéreuse de cette toxine à de très faibles doses. Il était dès lors nécessaire de rechercher d’autres sources biologiques de PITX, et ce pour tenter de répondre à différentes hypothèses : des PITX extraites de différentes espèces de *Zoantharia* ont-elles les mêmes propriétés pharmacologiques ? Ou encore, quelle est la structure des produits purifiés suivant leur origine ? Ces produits contiennent-ils des analogues de la PITX et si oui, en quelle proportion ? D’après la littérature, les seuls Cnidaria accumulant des quantités significatives de PITX appartiennent à l’ordre des *Zoantharia*, plus spécialement au genre *Palythoa*. Les travaux présentés dans ce chapitre ont donc été axés sur l’identification moléculaire des *Zoantharia* ainsi que la mesure des concentrations en PITX qu’ils renferment

Les échantillons biologiques ont été récoltés parmi les *Zoantharia* présents dans les systèmes de culture (Coral Biome). Des techniques moléculaires ont été utilisées pour identifier chaque spécimen car la diagnose des espèces de *Zoantharia* sur la base des caractères morphologiques externes est délicate, même pour un systématicien spécialiste du groupe, en raison d’une très grande plasticité phénotypique. Les variations phénotypiques portent principalement sur la forme des colonies et des polypes, la couleur et le diamètre du disque oral et le nombre de tentacules (Burnett *et al.*, 1994, 1995, 1997; Reimer *et al.*, 2004, 2006a, 2006c, 2006b). Or l’identification formelle d’une colonie est cruciale pour garantir à Coral Biome une source fiable et standardisée en PITX.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Vingt-huit colonies de *Zoantharia* appartenant aux genres *Palythoa* et *Zoanthus* ainsi qu’une colonie morphologiquement apparentée à ces deux genres (Z20) constituent le jeu de données taxinomique de cette étude (**Tableau 1**). Les morphotypes de ces différentes colonies sont présentés dans la **Figure 1**. Dès leur réception dans les locaux de Coral Biome, les spécimens sont placés dans des conteneurs de 70 l alimentés par un circuit fermé d’eau de mer artificielle (Instant Ocean salts de Seachem, Madison, USA). Les paramètres physico-chimiques des conditions de cultures sont les suivants : température 25 – 26°C, masse volumique 1023 – 1025 kg.m⁻³, KH 7 – 8°, pH 8,2 – 8,4, Ca 400 – 450 mg.l⁻¹, Mg 1200 – 1300 mg.l⁻¹, nitrates < 5 mg.l⁻¹, phosphates < 0,1 mg.l⁻¹. Les

spécimens sont soumis à une photopériode de 12 : 12 (lumière : obscurité) avec une intensité lumineuse de $70 \text{ mol.quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (deux tubes fluo T5 actinic⁺ de 80 W et une ampoule HQI Megachrome Coral de 400 W de la marque Giesemann, Nettetal, Allemagne) et sont nourris deux à trois fois par semaine avec des copépodes (*Calanus finmarchicus*) lyophilisés et broyés (Dupla, Gelsdorf, Allemagne) distribués à raison de 700 – 900 $\mu\text{g/l}$.

2.2. Extraction d'ADN

Après 2-3 semaines d'adaptations en circuit fermé, des échantillons biologiques constitués soit d'un disque oral complet pour les espèces de petite taille, soit de plusieurs tentacules reliés entre eux par une portion de disque oral pour les plus gros polypes, sont prélevés. Les cellules de *Symbiodinium* étant fortement représentées au niveau des tentacules, ces prélèvements de tissu permettent d'obtenir à la fois des cellules de Zoantharia et des cellules de *Symbiodinium* en nombre suffisant pour l'extraction et la purification de l'ADN de chacun de ces représentants. Une fois récoltés, les échantillons sont immédiatement placés dans de l'éthanol 80%. L'ADN génomique total est extrait à l'aide du kit DNAeasy (Qiagen, Valencia, USA). La concentration en ADN des extraits ainsi obtenus est mesurée à l'aide d'un appareil Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Les extraits d'ADN sont ensuite conservés à -20°C dans des aliquotes à une concentration comprise entre 30 et 60 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2.3. Amplification par PCR et séquençage

Deux marqueurs génétiques couramment utilisés pour l'identification des espèces de Zoantharia (Reimer *et al.*, 2007b) sont amplifiés par une réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais, Polymerase Chain Reaction, PCR) : le gène mitochondrial codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI) et un fragment de l'ARN ribosomique 45S, précurseur des ARN ribosomiques constituant la petite et la grande sous-unité du ribosome, respectivement l'ARNr 18S et 28S. L'ARNr 45S est organisé de la façon suivante : 5'ETS (External Transcribed Sequence) – ARNr 18S – ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) – ARNr 5,8S – ITS2 – ARNr 28S – 3'ETS. Le fragment du gène de Zoantharia amplifié pour cette étude comprend la région codant pour ITS1 – ARNr 5,8S – ITS2 (annoté dans le manuscrit ITS-rDNA). Les PCR sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, USA) dans un volume de 40 μl contenant 1,6 μl d'ADN extrait, 28,95 μl d'eau ultra-pure, 2 μl de chaque amorce (10 μM), 1 μl de Taq polymérase, 0,45 μl de nucléoside triphosphate et 4 μl de tampon contenant du MgCl_2 (1,5 mM).

Des fragments ITS-rDNA d'environ 750-850 paires de bases (pb) sont amplifiés avec le couple d'amorces publié dans le travail de Reimer *et al.* (2007b) Zoanf-ITS (5' - CTT GAT CAT TTA GAG GGA GT - 3') et Zoanr-ITS (5' - CGG AGA TTT CAA ATT TGA GCT - 3') selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min suivie par 35 cycles comprenant 1 min de dénaturation à 94°C , 1 min d'hybridation à 50°C et 2 min d'élongation à 72°C et une étape d'élongation finale de 10 min à 72°C . Les fragments du gène mitochondrial COI d'environ 650 pb sont amplifiées par PCR avec les amorces HCO2198 (5' - TAA ACT TCA

Code	Origine
Z01	Mer des Caraïbes
Z02	Mer des Caraïbes
Z03	Inconnue
Z04	Inconnue
Z05	Indo-Pacifique
Z06	Indo-Pacifique
Z07	Indo-Pacifique
Z08	Mer des Caraïbes
Z09	Mer des Caraïbes
Z10	Mer des Caraïbes
Z11	Mer des Caraïbes
Z12	Indo-Pacifique
Z13	Mer des Caraïbes
Z14	Indo-Pacifique
Z15	Indo-Pacifique
Z16	Mer des Caraïbes
Z17	Indo-Pacifique
Z18	Mer des Caraïbes
Z19	Mer des Caraïbes
Z20	Inconnue
Z21	Ile de la Réunion
Z22	Ile de la Réunion
Z23	Ile de la Réunion
Z24	Ile de la Réunion
Z25	Ile de la Réunion
Z26	Mer des Caraïbes
Z27	Mer des Caraïbes
Z28	Mer des Caraïbes
Z29	Indo-Pacifique

Tableau 1. Origine des Zoantharia obtenus du commerce aquariophile et utilisés dans cette étude. Les codes ont été donnés aléatoirement aux spécimens, de Z01 à Z29.

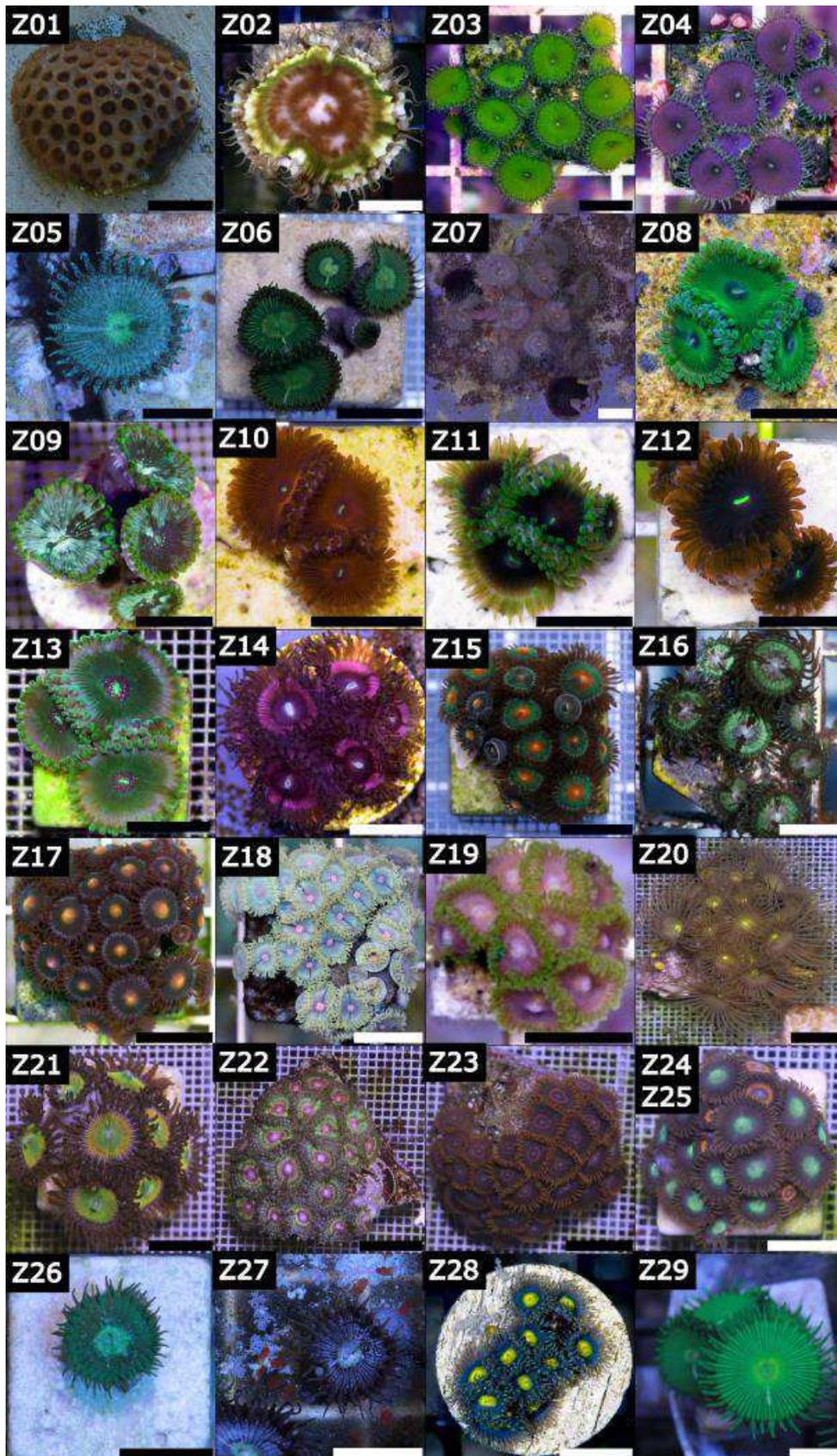


Figure 1. Morphotypes des colonies de Zoantharia utilisées. Sur la même photographie, Z24 code pour les polypes verts, et Z25 pour les polypes orange. Les barres d'échelle représentent 1 cm.

GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3') et LCO1490 (5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3') selon les conditions suivantes : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min suivie par 5 cycles comprenant 15 s de dénaturation à 92°C, 45 s d'hybridation à 48°C, une augmentation graduelle de la température jusqu'à 72°C en 1 min et 1 min 30 d'élongation à 72°C, le tout suivi par 30 cycles comprenant 15 s de dénaturation à 92 C, 45 s d'hybridation à 52°C et 45 s d'élongation à 72°C et une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C.

Dans le cas des *Symbiodinium* spp. présents dans les tissus des Zoantharia, l'amplification des séquences ITS2-rDNA d'environ 250-300 pb (le gène ribosomique 5,8S, séquence partielle ; le spaceur interne transcrit 2, séquence complète ; le gène ribosomique 28S, séquence partielle) est effectuée à l'aide des amorces spécifiques ITS2-F1 (5' - GAA TTG CAG AAC TCC GTG - 3') et ITS2-R2 (5' - ATA TGC TTA AAT TCA GCG GGT - 3'). La séquence ITS2-rDNA est choisie car sa vitesse d'évolution permet une identification robuste des clades de *Symbiodinium* spp. connus (Stat *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2017). De plus, c'est un marqueur génétique largement utilisé dans des études de barcode ADN publiées et il existe un grand nombre de séquences disponibles dans les bases de données publiques correspondant à cette région génomique. Un programme PCR spécifique permettant d'amplifier prioritairement les gènes de *Symbiodinium* spp. est utilisé : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min suivie par 12 cycles comprenant 45 s de dénaturation à 94°C, 45 s d'hybridation à 58°C avec une diminution progressive de 0,5°C à chaque cycle, et 1 min d'élongation à 72°C, ensuite 20 cycles comprenant 45 s de dénaturation à 94°C, 45 s d'hybridation à 52°C et 1 min d'élongation à 72°C et une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C.

Après amplification, tous les produits PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose et séquencés dans les deux directions en utilisant les amorces PCR avec un séquenceur ABI 96-capillary 3730XL (Eurofins genomics, Ebersberg, Allemagne). Les séquences 'sens' et 'anti-sens' de chaque marqueur moléculaire sont alignées et contrôlées avec les chromatogrammes pour les positions ambiguës.

2.4. Reconstruction phylogénétique

Après validation, les séquences sont alignées avec des séquences orthologues disponibles dans les bases de données publiques du NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant le programme CLUSTALW implémenté dans le logiciel BioEdit v7.1.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Trois jeux de données sont générés pour les analyses moléculaires : les deux premiers étant composés soit des séquences COI soit des séquences ITS-rDNA de Zoantharia, le troisième étant constitué exclusivement des séquences ITS2-rDNA des *Symbiodinium* spp.

Pour chaque jeu de données, le modèle d'évolution est déterminé à l'aide du programme MODELTEST v3.0b4 (Posada et Crandall, 1998) implémenté dans MEGA. Les reconstructions phylogénétiques sont réalisées avec la méthode de 'neighbor-joining'(NJ) et de maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood, ML) dans MEGA v6.0 et grâce à l'inférence bayésienne (BI) dans MrBayes v3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). La robustesse topologique des arbres phylogénétiques est évalué en utilisant 100 répliques de bootstrap non-paramétriques pour les

analyses NJ et ML. Pour les analyses BI, 1 000 000 de générations sont exécutées avec 4 chaînes MC et les arbres sont échantillonnés toutes les 100 générations.

2.5. Extraction et purification de la palytoxine

Les méthodes d'extraction décrites ici sont utilisées en routine pour tout polype quel que soit l'espèce. Tous les solvants utilisés sont de qualité 'grade HPLC' (Biosolve, Dieuze, France).

Quatre à six polypes de *Zoantharia* sont prélevés des bassins, séparés de leur support, séchés délicatement sur du papier absorbant, pesés et découpés au moyen d'un scalpel en plusieurs fragments qui sont placés dans un tube Falcon fermé hermétiquement. Ils sont extraits par 20 ml d'un mélange méthanol : H₂O mQ (80 : 20, v/v) pendant 4 h à 4°C, à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique. Après décantation, le solvant contenant les métabolites est retiré délicatement à la pipette, centrifugé 20 min à 4500 g afin d'éliminer les débris résiduels. Les débris contenus dans le tube d'extraction sont rincés par le mélange MeOH : H₂O, centrifugés, et les surnageants de couleur rouge-orange rassemblés. Ces derniers contiennent la PITX associée à des pigments (caroténoïdes, chlorophylles) provenant majoritairement des cellules de *Symbiodinium* ; la couleur et donc la teneur en pigments est variable selon les espèces.

Plusieurs étapes sont ensuite nécessaires pour purifier et concentrer la PITX à partir du surnageant obtenu. Le MeOH est évaporé (rotavapeur BUCHI), la phase aqueuse résultante est extraite 3 fois au dichlorométhane (CH₂Cl₂) pour éliminer la majorité des pigments, et la phase aqueuse finale est évaporée pour éliminer toute trace de CH₂Cl₂. Cette dernière phase est déposée sur une colonne en verre de 2 cm de diamètre munie d'un embout Luer et reliée à une pompe à membrane par l'intermédiaire d'une fiole à vide. Remplie par 10-12 cm³ de phase C₁₈ (Lichroprep RP18, de Merck, Lyon, France) et préalablement conditionnée, la colonne est d'abord lavée par 2-3 volumes d'H₂O acidifiée (acide formique, 0,2 %, v/v), puis par 2-3 volumes de MeOH : H₂O acidifiée (1 : 1, v/v). La PITX est finalement éluée par 2 volumes de MeOH : H₂O acidifiée (3 : 1). Après évaporation du MeOH, la phase aqueuse résultante est volumée, et une faible partie (5 à 10 µL) est prélevée pour effectuer un contrôle par analyse HPLC. La PITX dans la phase aqueuse est finalement évaporée à sec sous flux d'azote dans un tube Chromacol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La PITX séchée ainsi obtenue et de couleur translucide à jaune pâle est reprise par du diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservée dans des microtubes à raison de 25, 50 ou 100 µg/µl à 4°C et à l'obscurité pendant plusieurs mois.

2.6. Chromatographie en phase liquide haute performance

La PITX présente dans la dernière étape de purification (en milieu aqueux) ou dans le DMSO (étape finale) est contrôlée et quantifiée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, en anglais 'High Pressure Liquid Chromatography'). L'appareillage est constitué d'une pompe binaire Waters 1525, d'un injecteur manuel Rheodyne 7725i (La Jolla, Californie, USA), d'un four et d'un détecteur à barrettes de diode Waters 2996 (DAD, pour 'Diode Array Detector') et d'une colonne RP-C₁₈ Cortecs (4,6 x 75 mm, porosité 2,7 µm, de chez Waters).

Le système est piloté par le logiciel Empower v2002, et le gradient d'élution est détaillé dans le **Tableau 2** suivant.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	5	95
10	100	0
12	5	95

Tableau 2. Gradient HPLC utilisé pour quantifier la palytoxine. A, acétonitrile ; B, H₂O mQ + 0,1% AcOH. Débit 0,8 ml/min ; température de la colonne 30°C ; Volume injecté 5 – 20 µl ; Durée du programme 12 min. Détection à 263 nm et utilisation du DAD pour vérifier la pureté (traces éventuelles de pigments ou de lipides).

Une droite étalon est établie après injection de quantités croissantes de PITX standard (de chez WAKO, représenté en France par Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin). Le conditionnement de la toxine WAKO est la suivante : à la réception, 100 µg de PITX (1 flacon) sont dissous dans 100 µl de DMSO, et des volumes de 5, 10 et 15 µl de cette solution sont injectés en HPLC (n = 2). La teneur en PITX dans les échantillons est évaluée en reportant l'aire des pics (en µV.seconde) sur la droite étalon et est donnée en mg/g de polype frais. Trois injections sont systématiquement effectuées pour quantifier la PITX en HPLC dans les échantillons purifiés.

2.7. Spectrométrie de masse

La structure de la toxine purifiée à partir des trois *Palythoa* spp. présentant les plus hautes concentrations est déterminée par HPLC couplée à la spectrométrie de masse ElectroSpray munie de 2 analyseurs en tandem, un quadropôle (Q) et un ToF (Time of Flight). L'appareil est un 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), l'HPLC est un système UPLC équipé d'un détecteur à barrettes de diode (DAD). La séparation est effectuée par une colonne RP-C₁₈ Cortecs (4,6 x 75 mm, porosité 2,7 µm, de chez Waters) à un débit de 0,4 ml/min. Le gradient d'élution employé et les paramètres principaux de masse sont donnés dans le **Tableau 3**. Des tests de fragmentation des ions moléculaires ont montré que la dissociation active de collision (en anglais, Collision-Induced Dissociation, CID) donnait les meilleurs résultats en utilisant des énergies de 45 eV pour l'ion moléculaire bi- et tri-chargé, et de 100 eV pour l'ion moléculaire mono-chargé.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	20	80
35	60	40
40	100	0
45	20	80

Tableau 3. Gradient HPLC utilisé sur le système LC-QToF pour la détermination structurale de la palytoxine purifiée des *Zoantharia*. A : acétonitrile (HPLC-S*, Biosolve) + 0,1 % AcOH ; B : H₂O mQ + 0,1 % AcOH (Carlo Erba). Débit : 0,4 ml/min ; température de colonne : 30 °C ; volume injecté : 2 – 5 µl ; polarité : positive ; réflectron : activé ; source : Electrospray (Dual AJS ESI) ; fragmenteur à 45-100 eV. * grade spectrométrie de masse.

3. Résultats

3.1. Diagnose moléculaire et barcode ADN

Le **Tableau 4** liste les échantillons pour lesquels deux ou trois marqueurs phylogénétiques ont pu être amplifiés avec succès. Les séquences partielles du gène COI et de la région génomique ITS-rDNA de *Zoantharia* (jeux de données 1 et 2) ont une longueur finale respective de 402 pb et 760 pb. Après alignement, les séquences de la région génomique ITS2-rDNA du jeu de données 3 utilisées pour l'identification des clades de *Symbiodinium* ont une longueur finale de 277 pb. Le modèle d'évolution Kimura 2 (Kimura, 1980) avec l'application d'une loi de correction gamma (K2+ Γ) est sélectionné pour les reconstructions phylogénétiques basées sur le jeu de données 1, K2+ Γ avec une proportion invariable de sites constants (+I) pour le jeu de données 2 et K2+I pour le jeu de données 3. Pour les analyses BI, le programme utilisé (Mr Bayes) ne propose pas l'utilisation du modèle d'évolution K2. Ainsi, le modèle d'évolution HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) est choisi. Afin d'obtenir le modèle K2 à partir du modèle HKY, les fréquences d'état stationnaire sont fixées pour être égales en utilisant la ligne de commande 'prset statefreqpr = fixed (equal)'.

Pour chacun des trois jeux de données, les topologies présentées sont celles obtenues à l'aide de la méthode de vraisemblance sur lesquelles sont indiquées les valeurs de bootstrap (bv) obtenues en NJ et les probabilités postérieures (pp) calculées avec la méthode BI. Ces valeurs sont détaillées uniquement pour les nœuds présentant des $bv \geq 80$ en ML, des $bv \geq 85$ en NJ et/ou des $pp \geq 0,85$ en BI.

Code	ITS-rDNA	COI	ITS2-rNDA	Identification des Zoantharia	Clade de <i>Symbiodinium</i>
Z06	+	+	+	<i>Palythoa mutuki</i>	C
Z29	+	+	+	<i>P. mutuki</i>	C
Z01	-	+	+	<i>P. caribaeorum</i>	C
Z05	+	+	+	<i>P. sp. Pc001</i>	C
Z26	+	+	+	<i>P. aff. clavata</i>	C
Z27	+	+	+	<i>P. aff. clavata</i>	C
Z02	+	+	+	<i>P. grandis</i>	C
Z04	+	+	+	<i>P. heliodiscus</i>	C
Z03	+	+	+	<i>P. heliodiscus</i>	C
Z07	+	+	+	<i>P. heliodiscus</i>	C
Z14	+	+	+	<i>Zoanthus kuroshio</i>	C
Z21	+	+	+	<i>Z. kuroshio</i>	C
Z22	-	+	+	<i>Z. kuroshio</i>	C
Z16	+	+	+	<i>Z. aff. pulchellus</i>	C
Z18	-	+	+	<i>Z. aff. pulchellus</i>	A
Z19	-	+	+	<i>Z. aff. pulchellus</i>	A
Z28	+	+	+	<i>Z. sociatus</i>	A
Z15	+	+	+	<i>Z. sansibaricus</i>	C
Z17	+	+	+	<i>Z. sansibaricus</i>	C
Z23	+	+	+	<i>Z. sansibaricus</i>	A
Z24	+	+	+	<i>Z. sansibaricus</i>	C
Z25	+	+	+	<i>Z. sansibaricus</i>	C
Z08	+	+	+	<i>Z. solanderi</i>	A
Z09	+	+	+	<i>Z. solanderi</i>	A
Z10	+	+	+	<i>Z. solanderi</i>	A
Z11	+	+	+	<i>Z. solanderi</i>	A
Z12	+	+	+	<i>Z. gigantus</i>	D
Z13	+	+	+	<i>Z. solanderi</i>	A
Z20	+	+	+	<i>Terrazoanthus sp.</i>	C

Tableau 4. Séquences amplifiées et identifications spécifiques des espèces de Zoantharia ainsi que des clades de *Symbiodinium* associés. COI, sous-unité I de la cytochrome oxydase mitochondriale ; ITS2-rDNA, spaceur interne transcrit 2 ; ITS-rDNA, spaceur interne transcrit 1, gène 5,8 S, spaceur interne transcrit 2. +, séquence amplifiée par PCR ; -, séquence non amplifiée par PCR. *P.*, *Palythoa* ; *Z.*, *Zoanthus*.

3.2. Analyse des séquences de *Zoantharia*

COI - Les séquences de la sous-unité I de la cytochrome oxydase mitochondriale (COI) ont été amplifiées avec succès pour la totalité des échantillons étudiés (n = 29, comprenant 10 spécimens de *Palythoa*, 18 spécimens de *Zoanthus* et un spécimen de *Terrazoanthus* inclus dans le groupe externe). Les trois méthodes de reconstruction phylogénétique (ML, NJ, BI) employées pour l'analyse de COI ont produit des topologies similaires. La topologie obtenue en ML racinée sur 5 séquences de *Parazoanthus* et deux séquences de *Terrazoanthus* est présentée sur la **Figure 2**. Au sein du groupe externe, le genre *Parazoanthus* est polyphylétique et comprends deux séquences de *Terrazoanthus* sp. et *Hydrozoanthus gracillis*. Le spécimen Z20 apparaît comme le groupe frère de *Terrazoanthus* sp. (JX119168, Floride) (95/94/1). La monophylie du groupe comprenant les genres *Zoanthus* et *Palythoa* est soutenue quelle que soit la méthode employée (valeurs statistiques des nœuds en ML, NJ, BI : 97/99/1). Au sein de ce groupe, seule la monophylie du genre *Zoanthus* est soutenue par toutes les analyses (98/99/1), la monophylie des *Palythoa* ne pouvant quant à elle être confirmée sur la base des séquences de COI (71/65/0,71), attestant probablement d'une vitesse d'évolution plus lente de ce gène chez les *Palythoa* spp. que chez les *Zoanthus* spp.

Au sein du genre *Palythoa*, les séquences des spécimens Z05, Z06, Z26, Z27 et Z29 présentent 100% d'homologie avec *Palythoa mutuki* (KF499742, Taiwan), *Palythoa* aff. *clavata* (KJ794177, Île de l'Ascension) et *Palythoa* sp. 'sakurajimensis' (KF499720, Taiwan). Toutes ces espèces forment une polytomie basale avec la séquence JX119166 de *Palythoa* aff. *clavata* (Floride) qui ne diffère des séquences précédentes que par une seule substitution (C→T, position 377). De même, la séquence de Z01 ne présente aucune différence nucléique avec celles de *Palythoa caribaeorum* (AB219208, Honduras ; KJ794175, Île de l'Ascension), *Palythoa tuberculosa* (GQ848278, Nouvelle Calédonie ; KF499737, Taiwan) et *Palythoa grandiflora* (JX119165, Floride). Une lignée fortement soutenue (92/97/1) se distingue plus clairement et comprend principalement deux groupes frères. Le premier groupe présente un phénotype morphologique homogène et très caractéristique. Il est relativement isolé génétiquement des autres *Palythoa* spp. mais modérément supporté (70/56/0,91) et inclut deux séquences de *Palythoa grandis* et une séquence amplifiée chez le spécimen Z02. Le deuxième groupe représente le complexe d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique *Palythoa heliodiscus/variabilis*. Les séquences des spécimens Z03 et Z07 présentent 100% d'homologie avec celles *Palythoa* aff. *variabilis* (JX119160, Floride) et *Palythoa heliodiscus* (AB219216, Madagascar). Néanmoins, l'ensemble de ces séquences forment, avec celle de Z04, un groupe modérément supporté (80/70/0,87).

Le genre *Zoanthus* diverge pour former trois lignées évolutives principales dont la monophylie est bien soutenue mais qui présentent des relations deux à deux incertaines (polytomie basale). La première lignée (98/92/1) coïncide avec le complexe d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique *Zoanthus solanderi/gigantus* et comprend les séquences des spécimens Z08 – Z13 100% homologues avec celles de *Zoanthus gigantus* (KF499713, Taiwan) et de *Zoanthus solanderi* (JX119157, Floride). La deuxième lignée (94/88/1) coïncide avec le complexe d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique *Zoanthus sociatus/sansibaricus* et comprend d'une part la séquence du spécimen Z28 et d'autre part les séquences des spécimens Z15, Z17 et Z23 – Z25 100%

homologues à celles de *Zoanthus sansibaricus* (KF499723, Taiwan) et *Zoanthus sociatus* (JX119154, Florida). Enfin, les séquences des spécimens Z14, Z16, Z18, Z19, Z21 et Z22 sont 100% homologues à celles de *Zoanthus vietnamensis* (KF499705, Taiwan), *Zoanthus pulchellus* (JX119156, Floride) et *Zoanthus kuroshio* (AB252665, Japan) et forment une troisième et dernière lignée modérément soutenue (83/75/0,66) qui coïncide avec le complexe d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique *Zoanthus pulchellus/kuroshio*.

ITS-rDNA - Des séquences d'ITS-rDNA ont été amplifiées pour 25 des 29 spécimens de Zoantharia étudiés. Aucune séquence ITS-rDNA n'a pu être amplifiée pour les spécimens Z01, Z18, Z19 et Z22 et ce en dépit de plusieurs tentatives. Comme dans le cas des analyses des séquences COI, est présentée la topologie obtenue en ML sur laquelle les valeurs statistiques obtenues lors des analyses en NJ et BI ont été ajoutées (**Figure 3**). La séquence du spécimen Z20 se positionne dans le groupe externe comme groupe frère d'une séquence de *Terrazoanthus* sp. (82/84/1), un résultat congruent avec les analyses basées sur COI. Globalement, les reconstructions phylogénétiques basées sur ITS-rDNA sont en accord avec celles basées sur COI. Néanmoins, le genre *Zoanthus* apparaît paraphylétique de par l'existence d'un allèle supplémentaire (allèle 'B') amplifié chez l'espèce *Zoanthus sansibaricus* et plusieurs spécimens apparentés (Z15, Z17, Z23-25). Au-delà de cette incongruence entre le marqueur nucléaire et le marqueur mitochondrial, la monophylie du genre *Palythoa* est quant à elle confirmée par des indices élevés (97/84/0,93). Il en est de même pour l'ensemble des lignées et espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique de *Zoanthus* et de *Palythoa* soutenues dans les analyses basées sur COI, et ce quelle que soit la méthode de reconstruction phylogénétique considérée. Les analyses de ITS-rDNA confirment donc au sein du genre *Palythoa* la validité des complexes d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique *Palythoa caribaeorum/tuberculosa* (100/100/1), *Palythoa* aff. *clavata*/sp. 'sakurajimensis' (100/100/1) et *Palythoa variabilis/heliodiscus* (99/64/1) et au sein du genre *Zoanthus* les complexes *Zoanthus pulchellus/kuroshio* (100/100/1), *Zoanthus sociatus/sansibaricus* (100/100/1) et *Zoanthus solanderi/gigantus* (100/100/1). Nous retrouvons également la relation de groupe frère entre *Palythoa grandis* et le complexe d'espèces sœurs *Palythoa variabilis/heliodiscus* (99/99/1). Les taux de GC des séquences ITS-rDNA confirment la forte similarité moléculaire des espèces composant chaque complexe Caraïbes/Indo-Pacifique pour les deux genres étudiés (**Tableau 5**). Enfin, les relations de parentés définies au sein des différents complexes d'espèces sœurs sont plus robustes sur la base des séquences ITS-rDNA, particulièrement dans le cas des espèces appartenant au genre *Zoanthus*. Les séquences de ITS-rDNA présentent en général une variation intraspécifique plus faible que la variation interspécifique (**Tableau 6**) et permettent notamment de discriminer au sein d'un complexe des espèces issues du bassin Atlantique par rapport à celles du bassin Indo-Pacifique: *Zoanthus pulchellus* et Z16 (Atlantique, 100/100/1) versus *Zoanthus kuroshio*, *Zoanthus vietnamensis*, Z14 et Z21 (Indo-Pacifique, 100/100/1), ou encore *Zoanthus sociatus* et Z28 (Atlantique 100/100/1) versus *Zoanthus sansibaricus* (Indo-Pacifique). La distance génétique entre les spécimens Z08 – Z13, assimilés à *Zoanthus solanderi* (Atlantique 86/87/0,99) et *Zoanthus gigantus* (Indo-Pacifique) est cependant moins informative (paraphylie de *Zoanthus gigantus*).

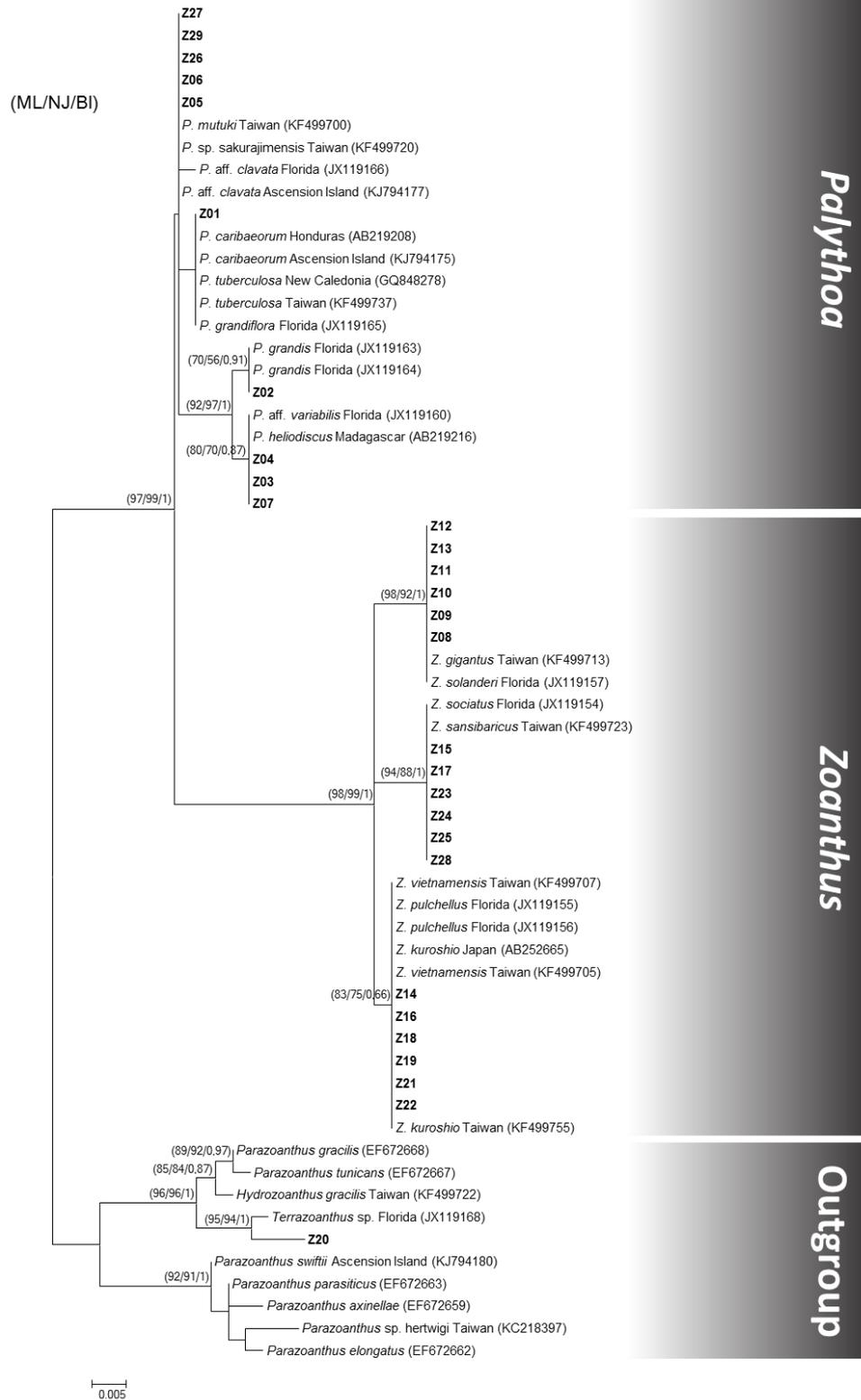


Figure 2. Analyse phylogénétique des Zoantharia basée sur les séquences COI. Les séquences originales amplifiées chez les spécimens de cette étude sont indiquées en gras. Les séquences/espèces provenant d'études précédentes sont en police régulière et comprennent le nom d'espèce, l'origine géographique (quand elle est spécifiée), et le numéro d'accèsion. Les valeurs statistiques des nœuds obtenues avec la méthode maximum de vraisemblance (ML), la méthode du plus proche voisin (NJ), et l'inférence bayésienne (BI) sont indiquées pour des valeurs supérieures à 80 pour ML, 85 pour NJ et/ou 0,85 pour BI.

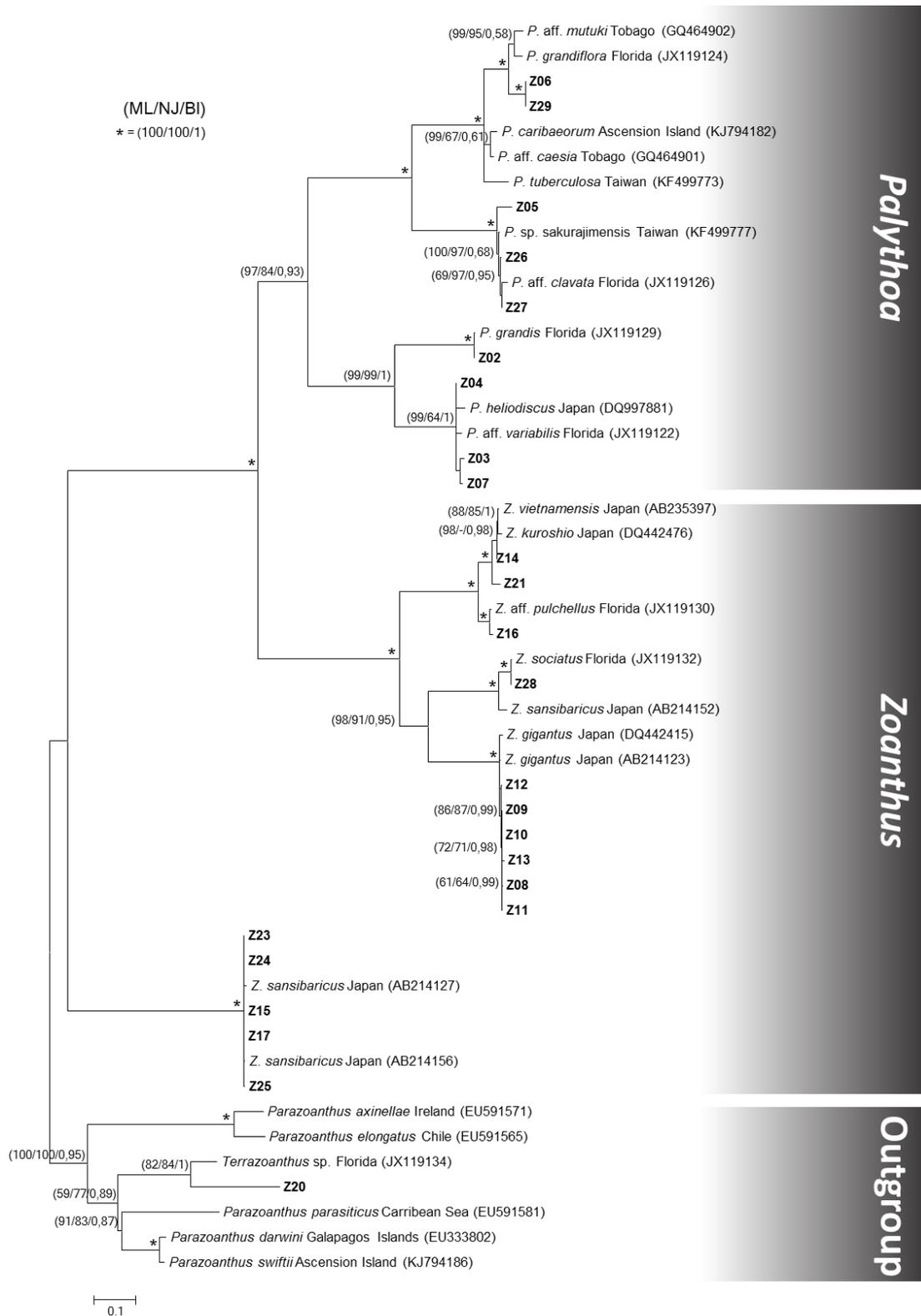


Figure 3. Analyse phylogénétique des Zoantharia basée sur les séquences de la région génomique ITS-rDNA. Les séquences originales amplifiées chez les spécimens de cette étude sont indiquées en gras. Les séquences/espèces provenant d'études précédentes sont en police régulière et comprennent le nom d'espèce, l'origine géographique et le numéro d'accèsion. Les valeurs statistiques des nœuds obtenues avec la méthode maximum de vraisemblance (ML), la méthode du plus proche voisin (NJ), et l'inférence bayésienne (BI) sont indiquées pour des valeurs supérieures à 80 pour ML, 85 pour NJ et/ou 0,85 pour BI.

Espèce	ITS1	5,8S	ITS2	% GC
<i>Z. gigantus</i>	349	157	156	53,01
<i>Z. solanderi</i>	349	157	156	52,90
<i>Z. kuroshio</i>	298	157	107	59,78
<i>Z. pulchellus</i>	294	157	109	59,39
<i>Z. sociatus</i>	349	157	101	54,16
<i>Z. sansibaricus</i>	343	157	101	53,80
<i>Z. sansibaricus</i> 'B'	327	157	145	44,95
<i>P. mutuki</i>	329	157	108	53,76
<i>P. grandiflora</i>	307	157	103	52,82
<i>P. caribaeorum</i>	251	157	110	54,29
<i>P. tuberculosa</i>	257	157	105	52,64
<i>P. aff. caesia</i>	278	157	108	54,37
<i>P. aff. clavata</i>	287	157	106	58,02
<i>P. sp. 'sakurajimensis'</i>	286	157	105	57,60
<i>P. grandis</i>	263	157	121	54,92
<i>P. aff. variabilis</i>	346	157	120	59,59
<i>P. heliodiscus</i>	212	157	120	59,75
<i>P. grandiflora</i>	307	157	103	52,82

Tableau 5. Longueur (pb) et % de GC des séquences de la région génomique ITS-rDNA des *Palythoa* spp. et *Zoanthus* spp. Moyenne de 2 séquences utilisées par espèce. Séquences provenant de cette étude, Reimer *et al.*, 2007 a et b; Swain, 2009; Reimer *et al.*, 2012, 2013, 2014; Graham *et al.*, 2015.

Complexe spécifique	Polymorphisme interspécifique (%)	Polymorphisme intraspécifique (%)		Inter/Intra (%)
		Caraïbes	Indo-Pacifique	
<i>P. caribaeorum/tuberculosa</i>	11,71	14,90	4,46	1,21
<i>P. variabilis/heliodiscus</i>	12,63	12,96	14,52	0,92
<i>P. aff. clavata/'sakurajimensis'</i>	4,19	1,65	1,06	3,09
<i>Z. sociatus/sansibaricus</i>	3,77	3,40	2,74	1,23
<i>Z. pulchellus/kuroshio</i>	36,69	3,55	0,19	19,62
<i>Z. solanderi/gigantus</i>	1,49	0,31	1,01	2,26

Tableau 6. Polymorphisme de la région génomique ITS-rDNA. Entre 3 et 5 séquences utilisées par espèce. Inter/Intra, ratio du polymorphisme interspécifique sur la moyenne du polymorphisme intraspécifique du complexe. Séquences provenant de cette étude, Reimer *et al.*, 2007 a et b; Swain, 2009; Reimer *et al.*, 2012, 2013, 2014; Graham *et al.*, 2015.

Afin de préciser l'origine de l'allèle 'B' amplifié chez *Zoanthus sansibaricus*, le degré de similarité des séquences de ce gène avec les séquences ITS-rDNA de Zoantharia disponibles dans les bases de données NCBI est établie à l'aide du programme Blast. Les séquences présentant la plus forte similarité avec l'allèle 'B' ont été amplifiées chez des spécimens appartenant au genre *Edwardsia* (pourcentage d'identité = 99% ; e-value = 5e-76). Deux de ces séquences sont utilisées pour constituer, avec le jeu de données 2, un quatrième jeu de données. Les reconstructions phylogénétiques basées sur le jeu de données 4 montrent une polyphylie du genre *Zoanthus* avec un positionnement au sein du groupe extérieur des séquences de l'allèle 'B' formant le groupe frère des deux séquences amplifiées chez *Edwardsia* sp. (**Figure 4**).

Les diagnoses moléculaires des 28 échantillons de *Zoanthus* et de *Palythoa* établi après analyses des deux marqueurs sont présentées dans le **Tableau 7**.

<i>Palythoa</i>		<i>Zoanthus</i>	
Code	Identification	Code	Identification
Z05	<i>P. aff. clavata</i> /'sakurajimensis'	Z16, Z18, Z19	<i>Z. pulchellus</i>
Z26, Z27	<i>P. aff. clavata</i>	Z14, Z21, Z22	<i>Z. kuroshio/vietnamensis</i>
Z06, Z29	<i>P. grandiflora/mutuki</i>	Z28	<i>Z. sociatus</i>
Z02	<i>P. grandis</i>	Z15, Z17, Z23, Z24, Z25	<i>Z. sansibaricus</i>
Z03, Z04, Z07	<i>P. aff. variabilis/heliodiscus</i>	Z08, Z09, Z10, Z11, Z13	<i>Z. solanderi</i>
Z01	<i>P. caribaeorum</i>	Z12	<i>Z. gigantus</i>

Tableau 7. Récapitulatif des identifications moléculaires des Zoantharia par complexe d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique.

3.3. Analyse phylogénétique des séquences de *Symbiodinium* spp.

Les séquences ITS2-rDNA des *Symbiodinium* spp. ont été amplifiées pour les 29 échantillons de Zoantharia. L'arbre phylogénétique ITS2-rDNA (**Figure 5**) montre que tous les clades (de A à F) sont fortement supportés (100/100/1). Les séquences ITS2-rDNA provenant de tous les échantillons identifiés comme appartenant au genre *Palythoa* (Z01 – Z07, Z26 et Z27) ainsi que certains échantillons de *Zoanthus* (Z14 – Z17, Z20 – Z22, Z24, Z25 et Z29) sont groupées dans le clade C (100/100/1). La séquence de *Symbiodinium* sp. amplifiée à partir des extractions d'ADN de *Zoanthus gigantus* (Z12) est classée dans le clade D et forme un groupe bien supporté avec la séquence EU333714 (90/78/0,61). Au sein du clade A, trois groupes sont soutenus par de fortes valeurs statistiques : le premier groupe (100/77/0,88) est formé par tous les échantillons de *Z. solanderi* ; le deuxième (100/99/0,93) par trois séquences amplifiées à partir des extractions d'ADN de *Zoanthus* provenant des Caraïbes (Z18, Z19 et Z28) et deux séquences existantes dans les bases de données publiques (AF427 et HM130506) ; et, le troisième (91/70/0,76) par la séquence amplifiée à partir des extractions d'ADN d'un *Zoanthus* collecté à la Réunion (Z23) et la séquence AB190280.

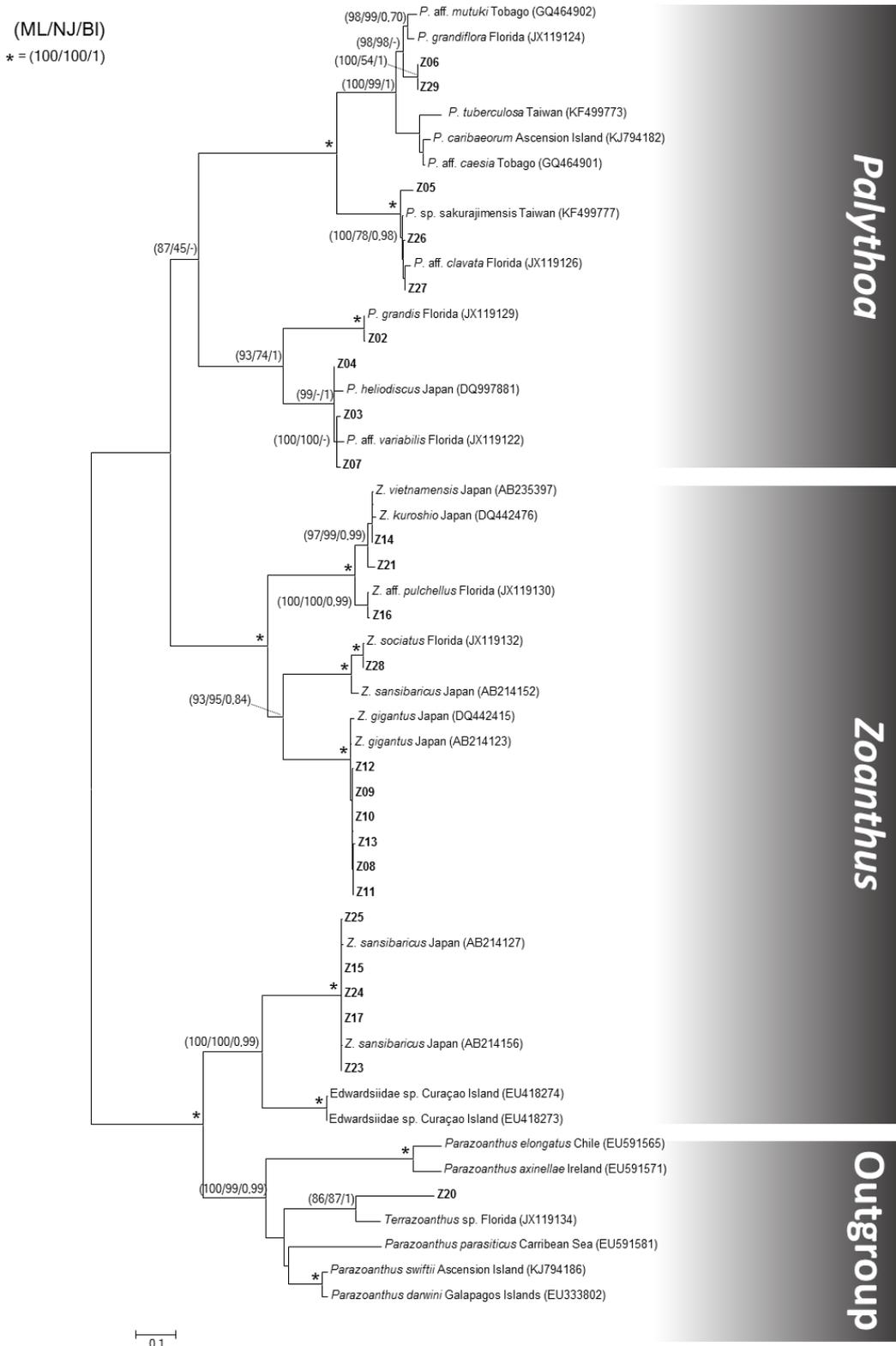


Figure 4. Analyse phylogénétique basée sur les séquences de la région génomique ITS-rDNA de Zoantharia. Les séquences originales amplifiées chez les spécimens de cette étude sont indiquées en gras. Les séquences/espèces provenant d'études précédentes sont en police régulière et comprennent le nom d'espèce, l'origine géographique et le numéro d'accèsion. Les valeurs statistiques des nœuds obtenues avec la méthode maximum de vraisemblance (ML), la méthode du plus proche voisin (NJ), et l'inférence bayésienne (BI) sont indiquées pour des valeurs supérieures à 80 pour ML, 85 pour NJ et/ou 0,85 pour BI.

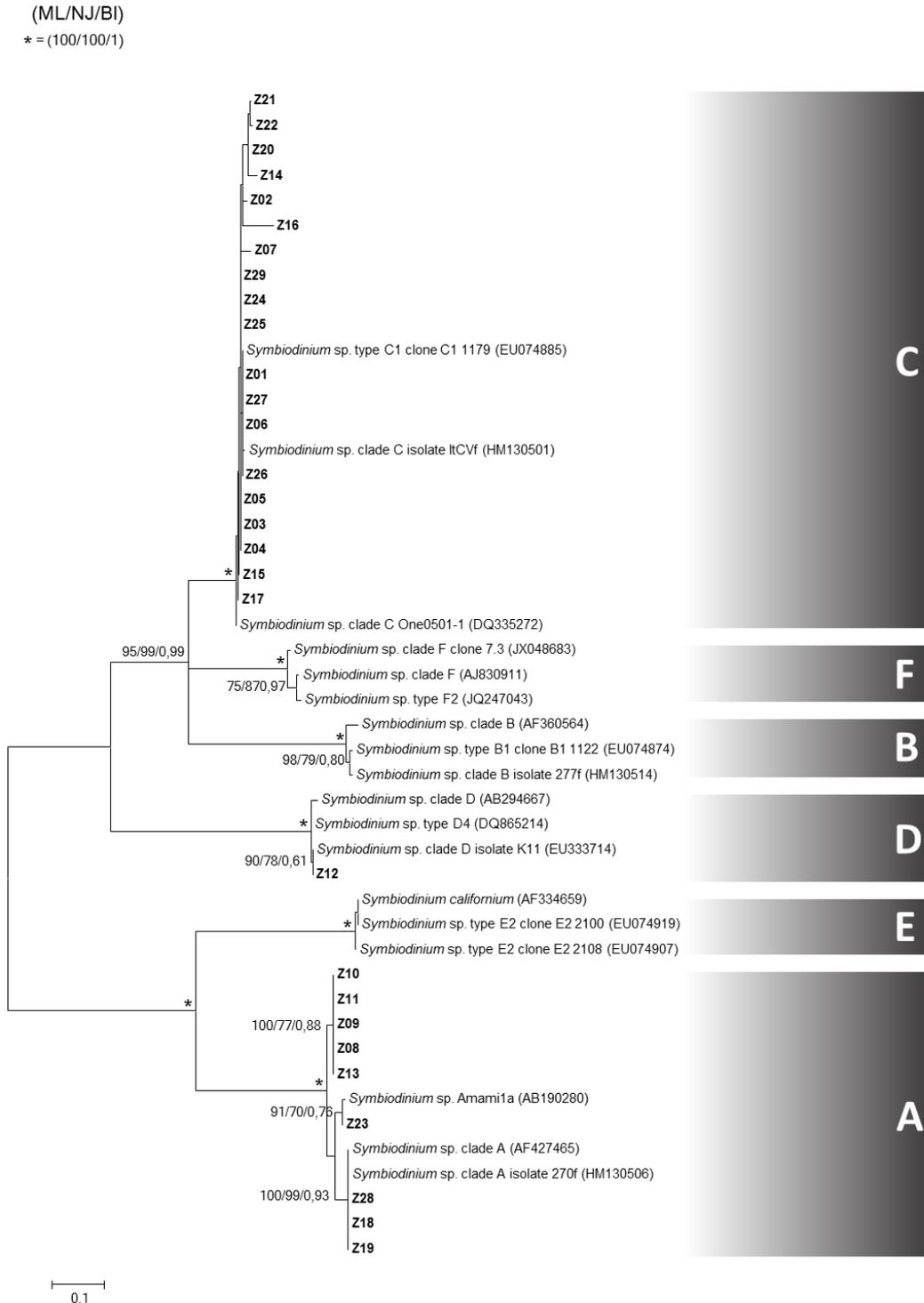


Figure 5. Analyse phylogénétique basée sur les séquences ITS2-rDNA de *Symbiodinium*. Les séquences originales amplifiées dans cette étude sont indiquées en gras. Les séquences/clades provenant d'études précédentes sont en police régulière et comprennent l'identité taxinomique, l'origine (quand spécifiée) et le numéro d'accession. Les valeurs statistiques des nœuds obtenues avec la méthode maximum de vraisemblance (ML), la méthode du plus proche voisin (NJ), et l'inférence bayésienne (BI) sont indiquées pour des valeurs supérieures à 80 pour ML, 85 pour NJ et/ou 0,85 pour BI.

3.4. Analyse comparative de la toxicité des *Zoantharia*

Points importants quant à l'amélioration des méthodes d'analyse HPLC :

(1) La majorité des auteurs travaillent à des concentrations d'acide acétique ou formique de 0,2% (Ciminiello *et al.*, 2009; Deeds *et al.*, 2011; Tartaglione *et al.*, 2016), et il a été montré au laboratoire que 0,1% d'acide dans la phase liquide donnait des résultats quasi-identiques si ce n'est un temps de rétention légèrement différent. Une teneur trop élevée en acide fragilise la molécule étant donné la présence d'une part d'une amine primaire en bout de chaîne, et d'autre part la présence du fragment A multi-azoté et présentant des fonctions amides conjuguées à l'autre bout. Une élution en absence d'acide dans l'éluant donne un pic large et moins défini. Il est donc préférable d'acidifier modérément les éluants d'HPLC avec de l'acide acétique ou de l'acide formique, ce dernier est utilisé pour les étapes de purification puisqu'il est très volatile comparativement à l'acide acétique qui ne l'est pas ou très faiblement.

(2) La PITX est visualisée la plupart du temps sous la forme d'un pic symétrique lorsqu'elle est purifiée, avant l'étape de séchage à l'azote (dernière étape de purification), alors que très souvent, elle présente en HPLC un épaulement voire un massif supplémentaire sur son côté droit. L'explication tient au fait que la PITX est un polykétide de 2679 Da et qu'elle adopte une conformation différente lors de son élution sur une phase C₁₈. L'acide de l'éluant semble responsable de ce comportement chromatographique.

(3) Enfin, une analyse HPLC en phase inverse (C₁₈) ou en phase normale ne pourra probablement jamais séparer la PITX de ses analogues de PITX s'ils sont présents dans l'extrait, et toutes les formes resteront regroupées en un seul pic. Les structures sont en effet trop proches entre elles en terme de masse (quelques Daltons) devant la masse totale de la PITX et de ses analogues. Seule la spectrométrie de masse ESI (si l'ion moléculaire est visible) et MALDI permettent d'identifier des analogues avec précision et de déterminer la masse totale respectivement.

(4) Le spectre UV de la PITX, qu'elle provienne du standard (Wako) ou de celle purifiée des *Palythoa* spp., montre deux bandes d'absorption à 233 et 263 nm qui correspondent aux deux doubles liaisons conjuguées (233 nm) et à la délocalisation électronique dans le fragment A contenant des motifs azotés (Katikou, 2007). La bande à 263 nm est plus importante et plus proche du visible, donc moins sujette aux variations. C'est la raison pour laquelle la courbe étalon et la quantification ont été établies sur cette base.

La PITX est quantifiée par HPLC dans les *Zoantharia* appartenant au genre *Palythoa* (Z01-Z07, Z26, Z27 et Z29), *Terrazoanthus* sp. (Z20), ainsi que dans deux échantillons de *Zoanthus* (Z11 et Z17) choisis de telle sorte qu'ils contiennent des *Symbionium* spp. de clade A (Z11) et de clade C (Z17).

La concentration en PITX est exprimée en mg de toxine par g de *Zoantharia* frais (**Tableau 8**). En premier constat, la PITX n'est pas présente chez les genres *Zoanthus* et *Terrazoanthus*, ainsi que dans quelques échantillons du genre *Palythoa*. Les échantillons dans lesquels la PITX est détectée et quantifiée appartiennent tous au genre *Palythoa*. Aucune détection de PITX n'est observée chez *Palythoa grandis* (Z02) et *Palythoa mutuki* (Z06 et Z29) malgré au

moins deux tentatives et après avoir concentré les extraits au maximum pour augmenter le seuil de détectabilité. Les plus fortes concentrations de PITX sont enregistrées chez *Palythoa* sp. Pc001 (Z05 1,788 ± 0,056 mg/g), *Palythoa heliodiscus* (Z07 1,618 ± 0,434 mg/g) et *Palythoa* aff. *clavata* (Z26 1,077 mg/g et Z27 1,265 mg/g). Deux autres échantillons de *Palythoa heliodiscus* contiennent des concentrations de PITX plus faibles (Z03 0,053 mg/g et Z04 0,200 mg/g).

Echantillon	Espèce	Qt PITX (mg/g)	n	Analyse SM
Z01	<i>P. caribaeorum</i>	0	2	-
Z02	<i>P. grandis</i>	0	3	-
Z03	<i>P. heliodiscus</i>	0,053	1	-
Z04	<i>P. heliodiscus</i>	0,200	1	-
Z05	<i>P. sp. Pc001</i>	1,788 ± 0,056	2	+
Z06	<i>P. mutuki</i>	0	2	-
Z07	<i>P. heliodiscus</i>	1,618 ± 0,434	3	+
Z26	<i>P. aff. clavata</i>	1,077	1	-
Z27	<i>P. aff. clavata</i>	1,265 ± 0,413	3	+
Z29	<i>P. mutuki</i>	0	2	-
Z20	<i>Terrazoanthus</i> sp.	0	2	-
Z11	<i>Z. solanderi</i>	0	2	-
Z17	<i>Z. sansibaricus</i>	0	2	-

Tableau 8. Teneurs en palytoxine dans les échantillons de Zoantharia. La quantité de palytoxine est exprimée en mg / g de Zoantharia frais (séché sur du papier absorbant). n, nombre de répétitions ; *P.*, *Palythoa* ; SM, spectrométrie de masse ; *Z.*, *Zoanthus*.

3.5. Structure et qualité de la palytoxine standard (Wako)

3.5.1. Flux ionique total (TIC) et chromatogramme UV

L'analyse s'effectue en mode positif, seule possibilité dans le cas de la PITX et de ses analogues pour engendrer des ions bien définis et une bonne ionisation, alors que l'ionisation en mode négatif ne s'effectue pas ou très mal. Une énergie fixée à 45 eV donne les meilleurs résultats de fragmentation qu'à 100 eV. En mode positif (EI+), le spectre du flux ionique total (en anglais, Total Ionic Current, TIC) de la PITX standard (Wako) montre un pic dominant de PITX dans la zone comprise entre 11,5 et 13 min, concomitant avec le pic d'absorption à 263 nm et dont le tr (temps de rétention) est de 12,3 min (**Figure 6**) ; notons le petit décalage normal entre le TIC et la trace UV puisque le détecteur DAD est placé en amont du spectromètre de masse (source d'ionisation).

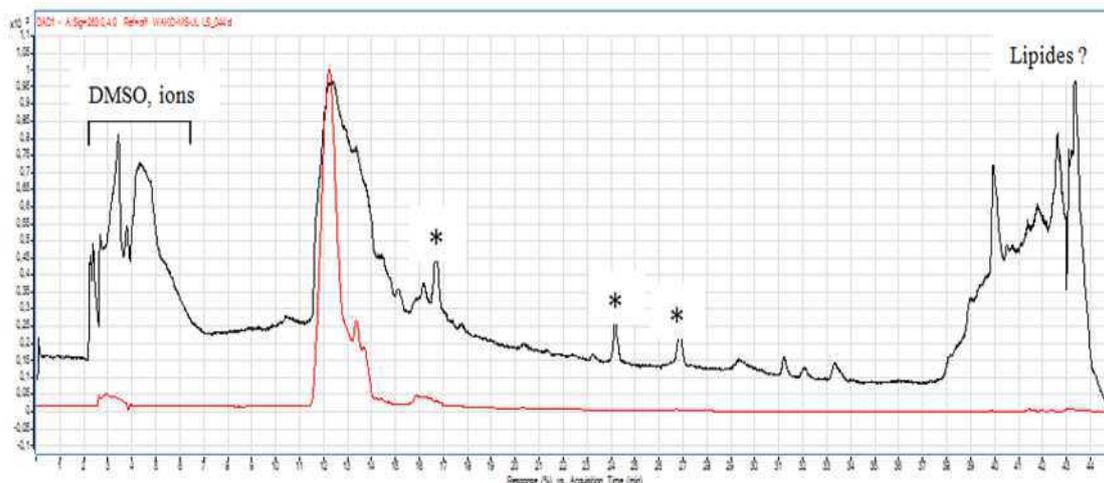


Figure 6. Flux ionique total (TIC) et absorption à 263 nm lors de l'élution de la palytoxine standard (Wako) en LC-QToF. En noir, le TIC; en rouge, le profil d'absorption à 263 nm. Les composés mineurs marqués d'un astérisque n'ont pas été déterminés.

Le TIC de la **Figure 7** montre un massif important entre 2 et 6 min provoqué par l'élution du DMSO, et faiblement visualisé par la trace à 263 nm. La PITX étant conservée à 4°C dans le DMSO l'idéal aurait été de purifier la toxine à nouveau sur une microcolonne de C₁₈ (type SePak ou OASIS, de chez Waters) pour éliminer le DMSO et permettre une analyse par ESI-MS avec probablement moins d'impuretés. Par ailleurs, le massif compris entre 38 et 45 min correspondant à des composés (ions) très retenus sur la colonne met en évidence la présence de structures lipidiques pourtant non détectables en UV, le balayage par le détecteur DAD de cette zone excluant totalement la présence de caroténoïdes (généralement à λ_{max} 400-550 nm).

3.5.2. Spectre de masse

Le spectre de masse associé au massif compris entre 11 et 15 min (TIC, **Figure 6**) est celui de la PITX. Il montre un profil ionique quasi-identique à la littérature (Ciminiello *et al.*, 2011 et 2012). Il est caractérisé par un ion moléculaire bien visible à m/z 2681 $[M + H]^+$ (**Figure 7**). Il montre également deux ions bi-chargés à m/z 1351,7420 $[M + H + Na]^{2+}$ et 1359,7301 $[M + H + K]^{2+}$, ainsi qu'un ion tri-chargé à m/z 906,8169 $[M + 2H + K]^{3+}$ qui rend compte de la présence de Na et de K. Parallèlement, de nombreux adduits caractéristiques de la PITX sont également présents à m/z 327,1927 $[M + H - \text{fragment B} - H_2O]$, 374,2911 [?], 895,8254 $[M + 3H + Na - H_2O]^{3+}$, 1322,7396 $[M + 2H - 2H_2O]^{2+}$, 1794,9848 [?] et 2016,8550 [?]. Certains de ces adduits n'ont pas été décrits dans la littérature relative à la spectrométrie de masse (Ciminiello *et al.*, 2011 et 2012; Tartaglione *et al.*, 2016).

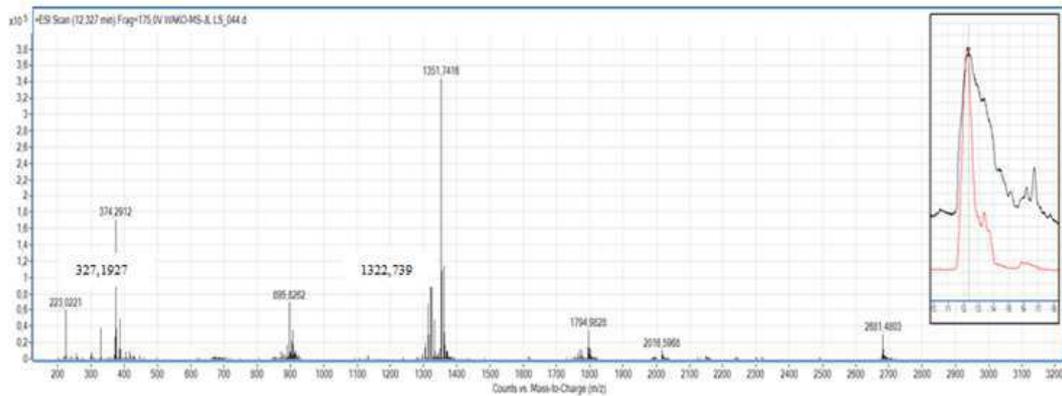


Figure 7. Spectre de masse de la palytoxine standard (Wako) et correspondant au pic à 12,3 min (encadré). Un balayage de la zone comprise entre 11 et 15 min montre un spectre de masse similaire.

3.6. Structure et pureté de la palytoxine extraite des *Palythoa* producteurs (confidentiel)

Les espèces Z03, Z04 et Z26 stockent la PITX (**Tableau 8**) à moindre concentration, et les spectres de masse sont assimilables à ceux de la PITX standard (Wako). Pour ce qui est des hauts producteurs, Z05, Z07 et Z27, une analyse fine a été effectuée, et montre pour les trois spécimens une grande similitude dans les spectres de masse. Les spectres sont très assimilables à ceux de la PITX standard (Wako) et engendrent des ions majoritaires et proéminents, typiques de la PITX comme déjà décrits auparavant (Ciminiello *et al.*, 2011 et 2012). Le fragment à m/z 327,1961 (clivage C8-C9) est cependant bien visible dans ces cas, alors que celui à m/z 374 (observé dans la PITX standard, **Figure 7**) a disparu. Une analyse détaillée des masses indique la présence d'autres fragments très mineurs à tr 13,5 min (HPLC) et à m/z 2708 (?), 1365,7544 (ion bi-chargé), 916,1618 (ion tri-chargé) et 355,1919 (ion mono-chargé). On peut aisément relever la présence d'un fragment à m/z 858 et 864 (ce dernier est plus important) et qui ont été observés par Ciminiello *et al.* (2012) sans aucune explication.

4. Discussion

4.1. Plasticité morphologique et diagnoses problématiques des espèces de *Zoantharia*

La plasticité intraspécifique des caractères morphologiques chez le genre *Palythoa* s'est illustrée, à plusieurs reprises, dans nos échantillons. Un premier cas concerne les spécimens Z26 et Z27, provenant tous deux des Caraïbes, qui possèdent des séquences COI identiques et ITS-rDNA très proches (563/567 pb, 99,29 % d'identité) correspondant dans nos analyses à *Palythoa* aff. *clavata* alors que Z26 et Z27 présentent deux phénotypes de couleur, exprimant soit des nuances de vert soit de mauve. Le deuxième cas de plasticité est illustré par les spécimens Z06 et Z29, provenant tous deux d'Indo-Pacifique et assignés à *Palythoa mutuki*, qui possèdent des séquences COI et ITS-rDNA 100% similaires et des morphotypes différents tant au niveau de leurs patrons de

couleur, exprimant des nuances de vert différentes, qu’au niveau de la taille des polypes, le diamètre des polypes de Z29 étant, généralement, supérieur à celui des polypes de Z06. Le troisième cas, plus frappant que les deux premiers, concerne les spécimens Z03 et Z04, provenant tous deux du bassin Indo-Pacifique, qui possèdent des séquences COI identiques et ITS-rDNA très proches (370/375 pb, 98,67% d’identité) alors que leurs morphotypes sont très nettement différents au niveau du patron de couleur, Z03 étant vert/jaune et Z04 violet. La démonstration que ces deux spécimens appartiennent à une seule et même espèce repose sur l’observation fréquente au laboratoire de polypes présentant une combinaison des patrons de couleurs de Z03 et Z04 (**Figure 8**). Un polype peut donc passer d’un phénotype à un autre à différent moment de son cycle de vie. Néanmoins les raisons, comme les variables environnementales, qui induisent ces changements phénotypiques demeurent mal connues. Il est également fortement soutenu par nos analyses moléculaires qu’un troisième morphotype de cette même espèce développe une couleur beige foncé/marron (Z07).



Figure 8. Illustration de la plasticité phénotypique intraspécifique des *Palythoa*. A droite et à gauche, des polypes de Z03 verts/jaunes, en bas à gauche, un polype de Z04 violet, et au centre, trois polypes présentant un mélange des deux phénotypes décrits ci-dessus.

Chez les *Palythoa* spp. Reimer *et al.* (2006a) ont décrit que la plasticité intraspécifique était très marquée principalement au niveau de l’épaisseur du cœnenchyme, ainsi les colonies de *Palythoa mutuki* peuvent être soit ‘liberae’ soit ‘intermediae’ et celles de *Palythoa tuberculosa* soit ‘intermediae’ soit ‘immersae’ (voir Figure 8 de la section ‘Introduction’). Chez les Scleractinia hermatypiques, un autre ordre d’Hexacorallia, la réduction de la lumière a été démontrée comme étant une cause de la plasticité de la structure des corallites et de la morphologie des polypes (pour revue, Ong *et al.*, 2013). De la même façon, certains changements environnementaux peuvent contribuer à la variation morphologique des Zoantharia. Cette plasticité morphologique peut faciliter la colonisation d’un large éventail d’habitats et les aider à résister aux changements de leur environnement (Burnett *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2011; Ong *et al.*, 2013). Chez *Palythoa*

caribaeorum l'augmentation de la turbidité de l'eau et de la charge en sédiment est corrélée avec une augmentation de la taille des polypes (Costa *et al.*, 2013). Les variations morphologiques en réponse à des changements de l'intensité lumineuse ont également été étudié chez *Zoanthus sansibaricus* et *Palythoa tuberculosa* (Ong *et al.* 2013). Les variations observées étaient similaires pour les deux espèces : les colonies ombragées avaient des polypes plus grands et plus étirés par rapport aux colonies témoins. Il faut cependant remarquer que l'augmentation de taille pourrait être également en lien avec une utilisation différente des ressources notamment la capacité d'occuper une plus grande surface de substrat ou de capturer des proies de plus grande taille. Par exemple, *Zoanthus sociatus* consomme des détritiques et des organismes zooplanctoniques plus petits que les espèces de *Palythoa* qui ont un plus grand diamètre de polypes (Sebens 1977). Une dernière stratégie adaptative serait l'augmentation de la fécondité par une production accrue du nombre d'œuf dans les polypes de plus grandes tailles comme cela a pu être montré chez certains Scleractinia hermatypiques (Hall et Hugues, 1996). Reimer *et al.* (2006a) ont également observé que les patrons de couleurs pouvaient varier en fonction de l'environnement. Ainsi, des échantillons de *Palythoa mutuki* et *Palythoa tuberculosa* récoltés en région volcanique arborent une couleur gris foncé en raison de l'incorporation de cendres volcaniques dans leurs tissus alors que des échantillons des mêmes espèces, prélevés ailleurs, présentent des couleurs allant du blanc au brun pâle.

Des variations intraspécifiques du patron de couleur ont également été observées parmi nos échantillons de *Zoanthus*, et ce dans plusieurs groupes. Tout d'abord, deux échantillons provenant d'Indo-Pacifique identifiés comme appartenant à *Zoanthus kuroshio*, Z14 et Z21, présentent des patrons de couleur différents (**Figure 1**). Egalement, les échantillons appartenant au complexe *Zoanthus sociatus/sansibaricus* (Z15, Z17, Z23 – Z25 et Z28) ainsi que ceux appartenant au complexe *Z. gigantus/solanderi* (Z08 – Z13) présentent aussi des patrons de couleurs très différents (**Figure 1**). Ces résultats sont en accord avec Reimer *et al.* (2004) qui montrent que les *Zoanthus* spp. possèdent une très grande plasticité intraspécifique principalement marquée au niveau de couleur des polypes et, dans une moindre mesure, au niveau de la taille du diamètre des polypes et du nombre de tentacules et de mésentères. Kamezaki *et al.* (2013) ont montré que des variations de couleur se produisent chez des spécimens de *Zoanthus sansibaricus* prélevés à différentes profondeurs. La grande variation intraspécifique du patron de couleur du disque oral chez les Zoantharia peut être liée à différents paramètres de l'environnement comme cela a été montré chez *Favia speciosa* (Todd *et al.*, 2002a, 2002b) et *Fungia fugites* (Kelmanson et Matz, 2003) qui, après plusieurs mois, changent de couleur lorsqu'ils sont placés à des profondeurs ou sous des conditions d'éclairage différentes. Un effet environnemental a également été confirmé par Kitahara *et al.* (2010). Ces auteurs ont observé que la plasticité phénotypique chez les Anthozoa est corrélée avec les variations environnementales. Leurs résultats montrent également que les Anthozoa vivant à faible profondeur, en milieu marin perturbé et impacté par les régions continentales, présentent généralement une plus grande plasticité phénotypique que les Anthozoa vivant en eaux plus profondes et stables. Les Zoantharia sont principalement des organismes d'eaux peu profondes, souvent confinés dans la zone intertidale réputée pour ses variations écologiques extrêmes et ont

probablement développé des mécanismes adaptatifs similaires aux autres Anthozoa basés sur une forte plasticité morphologique et physiologique.

L'existence de ces nombreux morphotypes pourrait s'expliquer par le fait que chez les *Zoanthus* spp., comme chez tous les Anthozoa, la couleur des tissus de l'hôte repose essentiellement sur l'expression du gène d'une protéine proche de la protéine fluorescente verte (en anglais, Green Fluorescent Protein, GFP) (Kelmanson et Matz, 2003). Kelmanson et Matz (2003) ont démontré que des échantillons de *Montastrea cavernosa* présentant des couleurs différentes expriment les mêmes protéines GFP et ont conclu qu'il pouvait exister différents loci (4 – 7) du gène de la GFP codant pour trois couleurs distinctes : cyan (± 495 nm), vert ($\pm 505 - 520$ nm) et rouge (± 580 nm). Chacune de ces couleurs est exprimée à différents degrés chez un individu, ainsi, bien qu'ils possèdent des génotypes GFP identiques, les spécimens présentent des couleurs différentes car l'expression relative des allèles de la GFP est différente. Ainsi, comme chez *M. cavernosa*, les variations intraspécifiques de la couleur du disque oral chez les *Palythoa* spp. et les *Zoanthus* spp. reposent certainement sur le même phénomène. Il serait utile d'étudier et de comparer les génotypes GFP ainsi que les profils de transcription des différentes formes associés à différents morphotypes d'une même espèce.

Il nous paraît également intéressant de soulever la question d'un lien entre la présence d'organismes photosynthétiques endosymbiotiques et la plasticité phénotypique car les Anthozoa qui vivent en eaux peu profondes et qui présentent une grande plasticité sont généralement zooxanthellés, contrairement aux Anthozoa vivant en eaux profondes. Chez les Zoantharia une part importante de la plasticité repose sur les variations morphologiques des colonies et/ou des polypes, variations susceptibles de modifier la pénétration et donc l'intensité de la lumière du jour dans les tissus du corail suivant que les colonies et les polypes soient étirés ou contractés. D'autre part, la plasticité repose également sur l'expression différentielle des fluorochromes. Comme cela a été rappelé plus haut, un large spectre de protéines fluorescentes a été décrit chez les Anthozoa, avec trois couleurs principales: cyan, vert et rouge (Kelmanson et Matz, 2003). Parce qu'elles sont capables de convertir des longueurs d'ondes plus courtes en longueurs d'ondes plus longues, la fonction principale de ces protéines fluorescentes serait liée à la symbiose photosynthétique et il a été proposé un rôle de photoprotection (Catala-Stucki, 1961; Kawaguti, 1944) et/ou d'intensification de certaines longueurs d'ondes lumineuses adaptées aux pigments photosynthétiques des *Symbiodinium* spp. (Salih *et al.*, 2000; Dove *et al.*, 2001). Une seconde fonction des protéines fluorescentes proposée plus récemment serait la protection des cellules animales contre les radicaux libres (Palmer *et al.*, 2009). Les radicaux libres sont des molécules oxydantes très réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui participent aux processus redox dans les cellules (Freeman et Crapo, 1982; Dröge, 2002;). Les radicaux libres sont largement produits par différentes voies cellulaires dont la photosynthèse des dinoflagellés symbiotiques (Dykens *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2005; Suggett *et al.*, 2008). A faible concentration, les radicaux libres exerceraient des effets positifs sur la physiologie du corail, mais des hauts niveaux d'oxydants provoquent le stress oxydatif, lui même responsable de nombreux dommages suite aux interactions avec les structures cellulaires et l'ADN. Au cours d'un stress thermique ou lumineux, le

niveau de H_2O_2 augmente, provoquant un stress oxydatif à la fois dans les zooxanthelles et les cellules du corail hôte, le bien connu ‘blanchissement’. H_2O_2 joue donc un rôle important dans les épisodes de stress oxydatifs car c’est un des oxydants les plus stables et parmi les plus représentés dans la cellule (Downs *et al.*, 2002). Bien que l’activité photosynthétique des zooxanthelles génère une grande quantité d’oxygène dissous dans des conditions physiologiques normales, le corail serait en partie protégé par les effets antioxydants des fluorochromes (Bou-Abdallah *et al.*, 2006). L’augmentation de la fluorescence dans les tissus lésés (**Figure 9**) montre l’implication des protéines fluorescentes dans la réponse du corail blanchi au cours d’un stress oxydatif. Il ressort donc de cette discussion le lien étroit entre présence d’un type de *Symbiodinium* et plasticité phénotypique chez les Zoantharia, particulièrement concernant l’expression différentielle des fluorochromes à l’origine de patrons de couleur différents. Néanmoins ces conclusions doivent être modulées car la découverte de plusieurs protéines fluorescentes chez un anthozoaire non symbiotique (Schnitzler *et al.*, 2008), *Corynactis californica*, souligne la possibilité d’une signification adaptative sans lien avec la protection contre un stress oxydatif ou la régulation de la lumière utile à la photosynthèse des *Symbiodinium* spp.

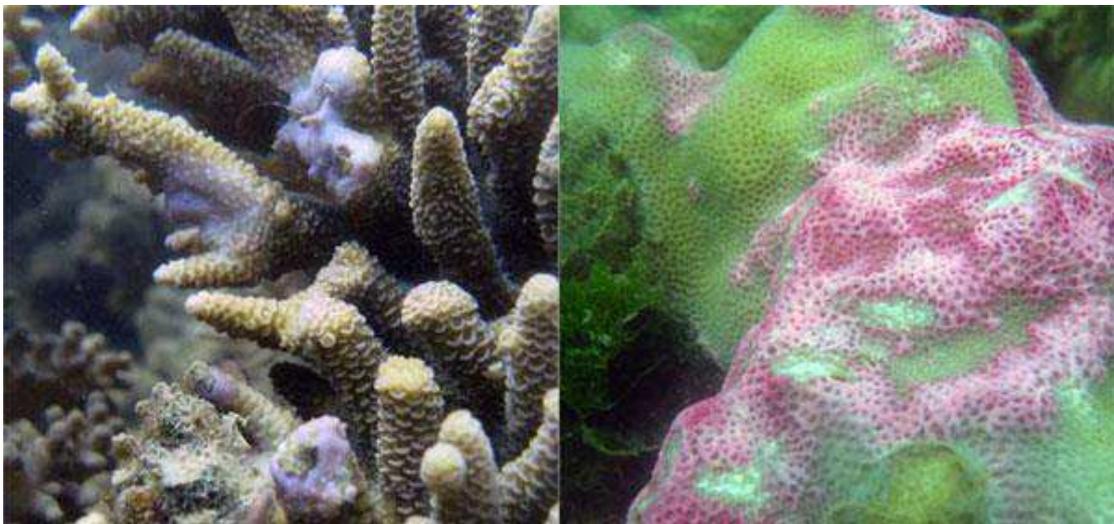


Figure 9. Variation de la fluorescence sur des colonies d’Anthozoa après lésion. Gauche : *Acropora millepora* (pigmentation bleue) sur des branches cassées. **Droite :** *Porites* sp. avec une pigmentation rouge suite à la prédation des poissons. D’après Palmer *et al.*, 2009.

4.2. Identification moléculaire des Zoantharia et validité des marqueurs génétiques

La topologie des arbres phylogénétiques basée sur l’analyse des séquences COI et ITS-rDNA confirme l’existence de complexes d’espèces sœurs, l’une présente en Caraïbes-Atlantique et l’autre en Indo-Pacifique. Les analyses distinguent chez les *Palythoa* spp. les complexes : *Palythoa caribaeorum/tuberculosa*, *Palythoa* aff. *clavata*/sp. ‘sakurajimensis’, *Palythoa variabilis/heliodiscus*. Chez les *Zoanthus* spp. : *Zoanthus pulchellus/kuroshio*, *Zoanthus sociatus/sansibaricus*, *Zoanthus solanderi/gigantus*. Ces complexes regroupent des séquences génétiques identiques ou très proches d’individus qui, par le passé, ont été nommés différemment

selon qu'ils proviennent du bassin Caraïbes-Atlantique ou du bassin Indo-Pacifique. Seul *Palythoa grandis*, une espèce connue pour son endémisme du golf du Mexique ne s'intègre dans aucun des complexes énumérés ci-dessus et ne possède apparemment pas d'espèce sœur Indo-Pacifique connue. Ces résultats sont en accord avec ceux de Reimer *et al.* (2012).

Avant la fermeture de l'isthme de Panama, les deux bassins océaniques communiquaient et les échanges génétiques entre ces populations de *Zoantharia* étaient facilités pour deux raisons : la première est que la plupart des *Zoantharia* sont capables de vivre dans une large gamme de milieux tropicaux et subtropicaux et présente une forte tolérance écologique (Reimer *et al.*, 2008; Polak *et al.*, 2011). La deuxième repose sur les caractéristiques développementales de ces organismes présentant une phase larvaire relativement longue, jusqu'à 170 jours (Ryland *et al.*, 2000; Polak *et al.*, 2011), ce qui procure à ces espèces des capacités de propagation importantes.

La fermeture de l'isthme de Panama s'est faite sur des millions d'années (Jones et Hasson, 1985; Coates et Obando, 1996), partant des eaux les plus profondes vers les eaux de surface. Bien qu'on estime que ce passage se soit complètement fermé il y a 3 M d'années (Holcombe et Moore, 1977; ODea *et al.*, 2016), des études sur les foraminifères ont montré que des échanges entre les eaux de surface des Caraïbes et du Pacifique pouvaient encore avoir lieu il y a 1,8 M d'années (Crouch et Poag, 1979; Keller *et al.*, 1989). Il est donc probable que des migrations de *Zoantharia* vers le bassin Atlantique (et vice et versa) aient pu avoir lieu jusqu'à cette période. Depuis la fermeture de l'isthme de Panama, les échanges génétiques sont impossibles car le continent américain constitue une barrière physique entre les deux bassins océaniques. De même, les grands courants océaniques qui décrivent des gyres à la fois dans l'océan Atlantique, Indien et Pacifique limitent le passage au sud des larves d'un océan à l'autre particulièrement depuis l'Indo-pacifique vers l'Atlantique. Ces phénomènes ont conduit à l'allopatrie des populations Caraïbes-Atlantique et Indo-Pacifique. Toutefois, le passage de larves planctoniques de *Zoantharia* dans les eaux du canal de Panama, du détroit de Drake (Amérique du Sud) ou dans des fuites du courant des Aiguilles au large du Cap (Afrique du Sud) n'est pas à exclure même si les paramètres physiques et chimiques de ces environnements ne leur soient pas favorables. En effet, le canal de Panama est rempli d'eau douce (McCosker et Dawson, 1975) alors que le détroit de Drake et le cap sont baignés par des eaux de mélanges froides. Le transport de larves dans les eaux de ballast des bateaux ne peut être exclu bien que cet apport de matériel génétique, relativement faible et difficilement quantifiable, soit sans doute insuffisant pour entretenir l'homogénéité génétique des populations des deux bassins (Chesher, 1968; Cariton et Geller, 1993). Ce phénomène d'allopatrie a été également décrit chez d'autres métazoaires marins benthiques présentant des stades larvaires planctoniques longs comme les Echinidae (Chesher, 1972), groupe d'échinodermes pour lequel la plupart des genres sont représentés par deux espèces sœurs de part et d'autre de l'isthme de Panama.

Les analyses phylogénétiques basées sur COI ne permettent pas de distinguer les espèces sœurs au sein d'un complexe que ce soit pour le genre *Palythoa* ou le genre *Zoanthus* en raison de la forte similarité des séquences moléculaires due à une vitesse de divergence faible de ce marqueur chez les Cnidaria en général (Shearer *et al.*, 2002; Hellberg, 2006;) et les *Zoantharia* en particulier (Reimer *et al.*, 2007a). Dans notre étude, COI évolue plus lentement pour le genre *Palythoa* que

pour genre *Zoanthus*. Les analyses phylogénétiques basées sur les séquences ITS-rDNA, marqueur connu pour avoir une vitesse d'évolution plus rapide que COI (Reimer *et al.*, 2007a), montrent comparativement une vitesse d'évolution similaire des *Palythoa* et des *Zoanthus* et une distinction des espèces de *Zoanthus* d'Atlantique et d'Indo-Pacifique au sein de chaque complexe. Cette observation ne peut cependant pas être transposée pour les espèces de *Palythoa* car l'hétérogénéité génétique intraspécifique est à l'origine d'un bruit de fond qui atténue le signal phylogénétique au sein de chaque complexe de *Palythoa*. La comparaison des séquences ITS-rDNA montre des variations intraspécifiques généralement plus importantes au sein d'un complexe d'espèces sœurs chez les *Palythoa* que chez les *Zoanthus* (**Tableau 6**). Bien que l'identification des espèces au sein des complexes d'espèces sœurs soit possible avec les séquences ITS-rDNA, le taux de substitution des séquences appartenant aux espèces sœur d'Atlantique et d'Indo-Pacifique reste faible, sauf dans le complexe *Zoanthus pulchellus/kuroshio* (**Tableau 6**). Le faible degré de variabilité des séquences ITS-rDNA entre les espèces sœurs s'explique (1) par l'allopatricité récente des populations des deux bassins océaniques (1,8 à 3 millions d'années) et (2) par le faible taux d'évolution moléculaire de cette région génomique chez les Cnidaria par rapport à la plupart des autres métazoaires (Romano et Palumbi, 1997; Knowlton, 2000).

4.3. Existence d'un allèle 'B' ITS-rDNA chez *Zoanthus sansibaricus*

Dans les arbres construits avec les séquences ITS-rDNA de Zoantharia, le genre *Palythoa* est monophylétique alors que les séquences de *Zoanthus* forment un groupe paraphylétique (voir même polyphylétique dans le jeu de données 4). Nos analyses montrent qu'en plus d'un allèle nommé 'sans' et présent chez tous les *Zoanthus*, il existe une copie de ce gène uniquement chez *Zoanthus sansibaricus*. Ce deuxième allèle, nommé 'B' a été identifiée dans une étude précédente pour la même espèce par Reimer *et al.* (2007b). A partir d'un effectif de 37 individus collectés sur différentes stations des côtes Japonaises, ces auteurs ont pu montrer par des techniques de clonage que 26 spécimens possédaient uniquement l'allèle 'sans' (70,3%), 9 spécimens possédaient les deux formes 'sans' et 'B' (25%) alors que seulement 2 spécimens possédaient uniquement l'allèle 'B'. Cette fréquence allélique est en accord avec le modèle de Hardy-Weinberg qui indique une fréquence attendue de 25 individus sans/sans, 10 individus sans/B et 1 individu B/B. Ces résultats suggèrent que cet échantillonnage a été effectué dans une population panmictique de grande taille.

Dans notre étude, tous les spécimens de *Zoanthus sansibaricus* provenant du bassin indien ont montré uniquement la présence de l'allèle 'B'. Le séquençage direct des produits de PCR est devenu une méthode commune de dépistage de la variation de l'ADN ribosomique chez les coraux selon la conjecture qu'un séquençage réussi atteste de l'absence de variation intra individuelle dans l'ADN ribosomique (Hunter *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1999; Takabayashi *et al.*, 2003). Nous n'avons pas cloné les produits PCR et tous les amplicons ont pu être séquencés directement sans double pics sur les chromatogrammes. Ceci pèse en faveur de la présence exclusive d'individus homozygotes 'BB' dans notre étude. Ces résultats diffèrent de ceux de Reimer *et al.* (2007a) bien que les protocoles d'amplification PCR soient identiques. Ces auteurs ont identifié une fréquence

allélique plus importante pour l'allèle 'sansi' (16,71% des spécimens présentaient l'allèle B). Bien que l'effectif de notre étude soit insuffisant pour une comparaison robuste avec celle de Reimer *et al.* (2007a), ces résultats préliminaires suggèrent l'absence de panmixie entre les populations japonaises de *Zoanthus sansibaricus* et celles du bassin indien, notamment celle proche de l'île de la Réunion. La question de l'existence d'une dérive génétique ou d'une sélection locale de l'allèle 'B' dans l'Océan Indien ne pourra être appréhendée qu'avec un échantillonnage des différentes populations de *Zoanthus sansibaricus* distribuées depuis les eaux japonaises jusqu'à la côte est africaine associé à une description systématique des paramètres environnementaux.

Reimer *et al.* (2007a) ont proposé plusieurs hypothèses sur l'existence de l'allèle 'B'. Un transfert horizontal direct ou indirect (implication intermédiaire d'un organisme eucaryote ou procaryote symbiote avec deux événements de transfert horizontal : *Zoanthus* sp. 1 vers symbiote puis symbiote vers *Zoanthus* sp. 2 est très peu probable chez ces eucaryotes métazoaires. Les résultats suggèrent plutôt des phénomènes d'hybridation, d'introgession (hybridation suivie de plusieurs étapes de rétrocroisement) ou de rétention de polymorphisme ancestral avec éventuellement formation de pseudogène. Néanmoins, d'après Reimer *et al.* (2007a) et nos résultats, l'existence unique de l'allèle 'B' chez certains spécimens ne plaide pas en faveur de l'hypothèse d'un pseudogène car l'allèle 'B' doit être fonctionnel chez les individus homozygotes. De même, la conservation d'un polymorphisme ancestral est peu probable en raison du phénomène d'évolution concertée qui tend à homogénéiser les milliers de copies du gène 45S et à limiter la variation intragénomique du cluster ribosomique. La conservation d'un polymorphisme ancestral ne pourrait être validée que dans le cas d'une vitesse d'évolution concertée inférieure à celle de l'évolution des espèces (Vollmer et Palumbi, 2002), hypothèse qui n'a jamais été soutenue chez les Cnidaria. De plus, à l'exclusion de *Zoanthus sansibaricus*, aucune espèce de Zoantharia ne possède cet allèle. Sur la base de ces observations ainsi que l'importante divergence entre l'allèle 'sansi' et l'allèle 'B', la présence de l'allèle 'B' peut raisonnablement s'expliquer par un phénomène d'hybridation passé. Dans nos analyses, nous remarquons une désynchronisation de l'évolution du génome nucléaire et du génome mitochondrial. Les analyses basées sur les séquences du gène mitochondrial COI sont en accord avec la morphologie ce qui n'est pas le cas des séquences nucléaires ITS-rDNA en raison de la présence de l'allèle 'B'. Cette situation est typique d'un cas d'introgession et viennent appuyer les conclusions de Reimer *et al.* (2007a) en faveur d'un croisement ayant eu lieu entre un ancêtre de *Zoanthus sansibaricus* et une autre espèce possédant l'allèle 'B'. Dans ce contexte, l'existence d'une population présentant uniquement l'allèle 'B' résulterait soit d'un phénomène de rétrocroisement des descendants hybrides avec l'espèce parente 'B' ou bien de la production d'homozygotes F2 attestant que les hybrides 'sansi/B' sont interféconds (Reimer *et al.*, 2007a).

Dans leur étude, Reimer *et al.* (2007a) ont utilisé un jeu de données taxinomique restreint, représenté par trois espèces de *Zoanthus*, *Zoanthus kuroshio*, *Zoanthus gigantus* et *Zoanthus sansibaricus* racinées sur une espèce de *Parazoanthus*. Ces auteurs ont remarqué une forte similarité entre les séquences nucléotidiques de l'allèle de *Zoanthus gigantus* et les séquences de l'allèle 'B'. Ils concluent qu'une population hybride issue d'un croisement entre l'ancêtre de

Zoanthus sansibaricus et l'espèce parente 'B' *Zoanthus gigantus* aurait eu lieu. Nos analyses basées sur un jeu de données taxinomiques beaucoup plus représentatif de la diversité des Zoantharia ne sont pas en accord avec ces conclusions. Les séquences de l'allèle 'B' de *Zoanthus sansibaricus* se positionnent dans le groupe externe et sont étroitement associées à des séquences d'une espèce non décrite appartenant au genre *Edwardsia*, proche des genres *Parazoanthus* et *Terrazoanthus*. De plus, bien que le taux de GC de l'allèle 'B' suggèrent une dérive et un isolement important en comparaison des autres séquences de *Zoanthus* et de celle d'*Edwardsia* sp., la similarité des régions génomiques ITS1, 5,8S et ITS2 (**Tableau 5**) indiquent que les séquences de l'allèle 'B' sont plus proches des séquences d'*Edwardsia* sp. que de tout autre *Zoanthus*. Ces résultats soutiennent plutôt un cas d'hybridation intergénérique entre l'ancêtre des *Zoanthus sansibaricus* et une espèce actuelle (non séquencée) ou disparue, proche ou appartenant au genre *Edwardsia*.

Les analyses moléculaires précédemment publiées indiquent que l'hybridation a joué un rôle majeur dans l'évolution des Cnidaria (Miller et Babcock, 1997; Szmant *et al.*, 1997; Willis *et al.*, 1997; Hatta *et al.*, 1999). Néanmoins un cas d'hybridation inter générique n'a jamais été décrit à notre connaissance chez les Zoantharia. L'importance de ces phénomènes d'hybridation qui ne connaît pas d'équivalent chez les autres métazoaires est directement corrélée à la synchronisation des périodes de reproduction sexuée sur un même récif qui augmente les probabilités de croisement des gamètes issues d'espèces différentes. Chez le genre *Platygyra*, les sept espèces Indo-Pacifiques présentent des taux élevés de fécondation interspécifique (Miller et Babcock, 1997) et de faibles distances génétiques (Miller et Benzie, 1997) indiquant que, dans ce cas, l'hybridation pourrait conduire à la présence d'allèles communs par introgression. L'hybridation se manifeste également chez trois espèces de *Montastrea* (Szmant *et al.*, 1997) pour lesquelles un débat persiste sur leur parenté et leur statut taxinomique (Lopez *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 1999). Des études contradictoires indiquent toutefois que malgré une fertilité croisée *in vitro*, les populations naturelles sympatrique d'*Acropora cytherea* et *Acropora hyacinthus* sont génétiquement distinctes et que l'hybridation se produit relativement rarement entre ces taxons dans la nature (Márquez *et al.*, 2002). En effet, lors des événements de reproduction de masse, les œufs sont généralement exposés à des mélanges complexes de spermatozoïdes hétérosécifiques et, dans ces situations, des facteurs tels que la concurrence des gamètes sont susceptibles de modifier les taux de fécondation.

Il résulte des phénomènes d'hybridation une forte variation intragénomique des espèces concernées. Pour exemple, chez les genres *Acropora* et *Madracis*, plusieurs espèces partagent différents types d'ADN ribosomique (Odorico et Miller, 1997; Diekmann *et al.*, 2001). Les phylogénies moléculaires basées sur les marqueurs mitochondriaux et/ou nucléaires montrent de nombreuses paraphylies et/ou polyphylies (Hatta *et al.*, 1999; Fukami *et al.*, 2000; van Oppen *et al.*, 2002) et sont souvent incongruentes non seulement entre elles mais également avec les données morphologiques.

Nos analyses intègrent des populations allopatriques appartenant à des espèces sœurs soit issues du bassin Indo-Pacifique soit issues du bassin Atlantique qui ont été isolées les unes des autres après la fermeture de l'isthme de Panama. Ainsi, les espèces de Zoantharia de notre étude possédant principalement un préférendum écologique pour les eaux peu profondes des zones

intertidale et infralittorale, l'absence de l'allèle B chez l'espèce caribéenne sœur de *Zoanthus sansibaricus*, à savoir *Zoanthus sociatus*, permet de dater l'évènement d'hybridation après la fermeture de l'isthme de Panama, entre 3 M et 1,8 M d'années (Crouch et Poag, 1979; Keller *et al.*, 1989), date à laquelle les derniers échanges d'eau superficielle entre les deux bassins se seraient taris, empêchant les flux de gène entre ces espèces. Cependant, le nombre restreint de spécimens étudiés ne permet pas une évaluation rigoureuse de la fréquence des deux allèles chez *Zoanthus sansibaricus* et éventuellement chez *Zoanthus sociatus*. Il sera nécessaire pour répondre à ces questions de mettre en place une étude appropriée de génétique des populations avec un échantillonnage adapté.

4.4. Clades de *Symbiodinium* et caractéristiques environnementales

Tous les échantillons appartenant au genre *Palythoa*, provenant d'Atlantique ou d'Indo-Pacifique, sont associés à des *Symbiodinium* de clade C. Le clade C est le clade prédominant en Indo-Pacifique et, avec le clade B, il est également le plus commun dans la région Caraïbes-Atlantique (Lajeunesse, 2005). Nos résultats reflètent ceux obtenus par Reimer *et al.* (2006d) qui ont identifié des *Symbiodinium* de clade C dans tous les échantillons de *Palythoa tuberculosa* et *Palythoa mutuki* récoltés au Japon. Leur étude basée sur le marqueur moléculaire ITS2-rDNA a montré que, parmi tous leurs échantillons, 34 étaient associés au sous-clade C1 et 1 seul au sous-clade C3. Bien que nous ayons choisi de ne pas nous prononcer dans nos analyses sur l'identification des sous-clades de *Symbiodinium* en raison de la faible valeur des marqueurs moléculaires utilisés jusqu'à présent (indices statistiques de ces sous-clades généralement inférieur à 50), d'autres études moléculaires ont caractérisé ces sous-clades (Reimer *et al.*, 2013) et ont déterminé que C1 et C3 étaient les plus ancestraux parmi les nombreux sous-clades C, qu'ils vivaient en symbiose avec un grand nombre d'espèces de Cnidaria et qu'ils avaient une large distribution géographique (Krueger et Gates, 2012). De plus, à l'exclusion de C1 et C3, tous les autres sous-clades C ne sont pas cultivables *ex hospite*, en eau de mer ou en milieu non fortement supplémenté, une caractéristique probablement consécutive à la longue évolution endosymbiotique de ces organismes, souvent spécifique de certains Cnidaria, ayant provoqué la perte totale ou partielle des métabolomes impliqués dans la biosynthèse de nutriments indispensables à leur survie à l'extérieur de leur hôte (Goulet *et al.*, 2008). Ainsi, il ressort de nos observations que les *Palythoa* intègrent préférentiellement dans leurs tissus les formes de *Symbiodinium* les moins exigeantes et les plus fréquentes dans l'environnement.

Il existe au sein des complexes d'espèces sœurs Caraïbes/Indo-Pacifique de *Zoanthus*, une corrélation entre les clades de *Symbiodinium* et l'origine géographique des échantillons. Les espèces d'Indo-Pacifique contiennent principalement des *Symbiodinium* de clade C, *Zoanthus kuroshio* (3/3, 100%) et *Zoanthus sansibaricus* (4/5, 80%) et de clade D, *Zoanthus gigantus* (1/1, 100%) alors que la majorité des échantillons provenant des Caraïbes ont subi un changement de clade de *Symbiodinium* par rapport à l'espèce parente d'Indo-Pacifique. Tous ces changements se sont produits en faveur de *Symbiodinium* de clade A (*Zoanthus solanderi* (n = 5/5), *Zoanthus* aff. *pulchellus* (n = 2/3) et *Zoanthus sociatus* (n = 1/1). Ces résultats s'accordent avec des études

précédentes qui ont identifié uniquement des *Symbiodinium* spp. de clade C dans des échantillons de *Zoanthus* spp. provenant des côtes japonaises (Reimer et Todd, 2009; Reimer *et al.*, 2013) et majoritairement des *Symbiodinium* de clade A dans des échantillons récoltés sur les côtes du Brésil et des îles du Cap-Vert (Reimer *et al.*, 2010a; Fontenele Rabelo *et al.*, 2014). Tous les *Symbiodinium* associés aux échantillons de *Zoanthus solanderi* forment un groupe bien supporté au sein du clade A alors que *Zoanthus gigantus* (Z12) est associé à un clade D. Bien que ces deux espèces soient difficilement discernables sur des bases morphologiques et moléculaires, elles sont allopatriques et occupent des bassins océaniques différents, respectivement le bassin Indo-Pacifique ou le bassin Caraïbes-Atlantique. Une étude précédente a également mis en évidence la variabilité des génotypes de *Symbiodinium* en fonction de la biogéographie chez *Palythoa caesia* (Burnett, 2002). Le polymorphisme intragénomique des *Symbiodinium* spp. provenant de spécimens de l'Est et de l'Ouest de l'océan Indien a été déterminé. La répartition géographique des génotypes de *Symbiodinium* associés à *Palythoa caesia* n'était pas homogène. Les populations de l'océan Indien occidental hébergent un clade de *Symbiodinium* différent de leurs parents orientaux. Les clades C et D étaient présents à l'Est, alors que seul le clade C se rencontrait à l'Ouest. Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, il existe un lien étroit entre plasticité phénotypique des Zoantharia, caractéristiques environnementales et clade de *Symbiodinium*. Il a été avancé que la diversité des *Symbiodinium* spp. contribue aux mécanismes d'adaptation mis en jeu face à des changements environnementaux (Buddemeier et Fautin, 1993; Rowan *et al.*, 1997). Au sein d'une seule génération, ce potentiel d'acclimatation a été illustré par des combinaisons spécifiques de clades de *Symbiodinium* résistant au stress (Marshall et Baird, 2000). Selon Kamezaki *et al.* (2013), les spécimens de *Zoanthus sansibaricus* de la zone intertidale contenaient des *Symbiodinium* du clade A, un clade reconnu comme tolérant aux forts niveaux d'ensoleillement (Banaszak *et al.*, 2000). Les spécimens des zones plus profondes ou abrités dans des surplombs et des crevasses abritaient le clade généraliste C. Les auteurs ont proposé que les changements de clade de *Symbiodinium* puissent conférer à leur hôte la possibilité d'occuper différentes profondeurs et de s'adapter à différentes intensités lumineuses. *Madracis pharensis*, une espèce de Scleractinia sciaphile, a également montré un changement de *Symbiodinium* liée à la profondeur, basculant du clade B13 depuis la surface (5 m) vers le clade B15 à plus grande profondeur (40 m) (Frade *et al.*, 2008 a et b). Les *Symbiodinium* de clade D sont eurythermes et confèrent une résistance aux températures élevées et au blanchissement de l'hôte corallien (Stat et Gates, 2011). Nos résultats suggèrent donc que suite à sa séparation de l'espèce parente *Zoanthus gigantus* consécutive à la fermeture de l'isthme de Panama, l'espèce fille *Zoanthus solanderi* aurait subi un changement de symbiote, passant du clade C au clade D, vraisemblablement consécutif à des épisodes de stress thermique afin de s'adapter à son nouvel environnement.

Bien que le lien fonctionnel entre la diversité génétique des clades de *Symbiodinium*, leur photophysologie au sein des Cnidaria et les variables environnementales telles que la température et la salinité demeure mal connues (Leal *et al.*, 2015), nos résultats associés à ceux de la littérature suggèrent que la présence d'un clade de *Symbiodinium* ne serait pas seulement basée sur une spécificité de l'hôte, mais plutôt sur les *preferendum* écologiques des *Symbiodinium*. Au final c'est

l'association avec un clade plutôt qu'un autre qui semble être un facteur important pour déterminer les limites écologiques et la distribution spatiale des Zoantharia.

4.5. Etude et dosage de la palytoxine

4.5.1. Dosage par HPLC

L'écart type des mesures enregistrées dans le **Tableau 8** est très variable et semble être lié à la teneur en eau des polypes lors de la détermination de leur masse par pesée. En effet, le séchage sur papier absorbant n'est une méthode standardisée et hautement précise. Il n'est pas possible de procéder autrement, écartant la méthode qui consiste à exprimer les teneurs par rapport au poids sec.

4.5.2. Spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse de la PITX standard Wako indique que la PITX standard du commerce est de bonne qualité et présente, en spectrométrie de masse ESI, les ions caractéristiques, conformément à la littérature (Ciminiello *et al.*, 2011 et 2012; Tartaglione *et al.*, 2016). L'analyse a permis d'obtenir un profil ionique caractéristique semblable à ceux publiés précédemment (Rossi *et al.*, 2010; Ciminiello *et al.*, 2011; Deeds *et al.*, 2011). Ceci montre que les conditions utilisées conviennent pour identifier les analogues de PITX. De plus, il n'a pas été détecté d'analogues de la PITX, d'ovatoxine ou de structures apparentées à cette dernière. Quelques pics très mineurs dans le TIC présentent néanmoins une structure non apparentée à celle de la PITX. Il sera nécessaire de préciser la nature du massif lipidique dans le TIC (zone 38-45 min) : est-il généré par l'appareil, les solvants (acide acétique ou formique, ou même l'acétonitrile), ou encore le matériel (tubulures, bouchons, etc.) ? C'est du moins la cause la plus plausible pour justifier l'existence de ce massif en fin d'élution HPLC. Par ailleurs, l'ion à m/z 864 observé par Ciminiello *et al.* (2012) ainsi que dans nos échantillons est supposé être un fragment $[M+3H-5H_2O]^{3+}$.

4.5.3. Toxicité comparative chez les Zoantharia

Les échantillons de *Zoanthus solanderi* (Z11), *Zoanthus sansibaricus* (Z17), *Terrazoanthus* sp. (Z20), *Palythoa grandis* (Z02) et *Palythoa mutuki* (Z06 et Z29) ne sont pas toxiques car aucune trace de PITX n'a pu y être décelée ni par HPLC ni par spectrométrie de masse, même après avoir concentré les échantillons, le seuil de détectabilité de la spectrométrie de masse Electrospray étant de l'ordre du picogramme. Ces résultats ne permettent cependant pas d'exclure la biosynthèse de PITX dans ces échantillons car il s'agit ici de cultures contrôlées en aquarium et que les paramètres de culture ne sont peut-être pas les plus adaptés pour permettre la biosynthèse de PITX par ces holobiontes.

Les échantillons de *Palythoa* dans lesquels la concentration de PITX était quantifiable appartiennent à deux complexes, *Palythoa* aff. *clavata*/sp. 'sakurajimensis' et *Palythoa variabilis/heliodiscus*. Ces résultats reflètent ceux de Deeds *et al.* (2011) qui ont mesuré des concentrations importantes de PITX et de déoxy-PITX chez *Palythoa heliodiscus*, de 0,515 mg/g à

1,164 mg/g et 3,515 mg/g respectivement, ainsi que des traces de PITX non quantifiables chez *Palythoa mutuki*, *Zoanthus sansibaricus* et *Zoanthus kuroshio*. Dans le cadre de ce travail en partenariat avec Coral Biome et pour des raisons de confidentialité, nous ne dévoilerons pas les résultats relatifs à l'identification des PITX dans nos échantillons, même si quelques résultats de spectrométrie de masse ont été précédemment comparés aux données sur la fragmentation de la PITX standard (Wako).

Les concentrations de PITX déterminées chez *Palythoa heliodiscus* (1,62 mg/g), *Palythoa* aff. *clavata* (1,07 – 1,26 mg/g) et une espèce non décrite, génétiquement apparentée à *Palythoa* aff. *clavata*, *Palythoa* sp. PC001 (1,79 mg/g), sont, avec celles publiées par Deeds *et al.* (2011) chez *Palythoa heliodiscus*, les plus élevées jamais enregistrées à ce jour. Elles sont bien supérieures à celles mesurées chez l'espèce réputée extrêmement toxique, *Palythoa toxica* (appelée également 'limu-make-o-Hana', l'espèce éponyme de la légende hawaïenne). *Palythoa toxica* pourrait être apparentée à *Palythoa heliodiscus* (Deeds *et al.*, 2011); cependant cette espèce n'a plus été échantillonnée en milieu naturel et il n'existe pas de données moléculaires qui permettrait de l'inclure dans une analyse phylogénétique.

Dans des travaux ultérieurs, il sera intéressant d'augmenter le nombre d'expériences d'extraction/purification (réplicas) afin d'être encore plus précis sur les valeurs des concentrations données ici. Cela permettrait notamment de mesurer la corrélation entre le morphotype et la quantité de PITX contenue dans une même espèce. En effet, nos résultats montrent une corrélation des concentrations en PITX avec des variations phénotypiques chez *Palythoa heliodiscus*: 0,053 mg/g chez Z03 (n = 1), 0,200 mg/g chez Z04 (n = 1), et $1,618 \pm 0,434$ chez Z07 (n = 3). Cependant, cette corrélation n'a pas été observée dans le cas des deux morphotypes de *Palythoa* aff. *clavata* : 1,077 mg/g chez Z26 (n = 1) et $1,265 \pm 0,413$ mg/g chez Z27 (n = 3).

L'analyse comparative des relations phylogénétiques et de la quantification de la PITX. (**Figure 10**) suggère que la capacité à produire et stocker la PITX ne repose pas sur l'appartenance à un groupe d'espèces de *Palythoa* apparentées. Les deux lignées principales de *Palythoa* (*P. caribaeorum/tuberculosa*, *P.* aff. *clavata*/sp. 'sakurajimensis' et *P. grandis*, *P. variabilis/heliodiscus*) présentent à la fois des espèces toxiques et non toxiques. Ceci suggère que la présence PITX serait un état plésiomorphe apparu et présent chez l'ancêtre commun de tous les *Palythoa* spp. (ACP) et qui aurait été perdu indépendamment chez certains descendants. Bien que Mahnir *et al.* (1992) aient identifié la présence de PITX chez l'anémone *Radianthus macrodactylus* (Cnidaria : Hexacorallia) par une analyse HPLC associée à une étude de cytotoxicité, la capacité des *Palythoa* spp. et de cette anémone à stocker des quantités importantes de PITX pèse, dans ce cas, en faveur d'un phénomène de convergence évolutive.

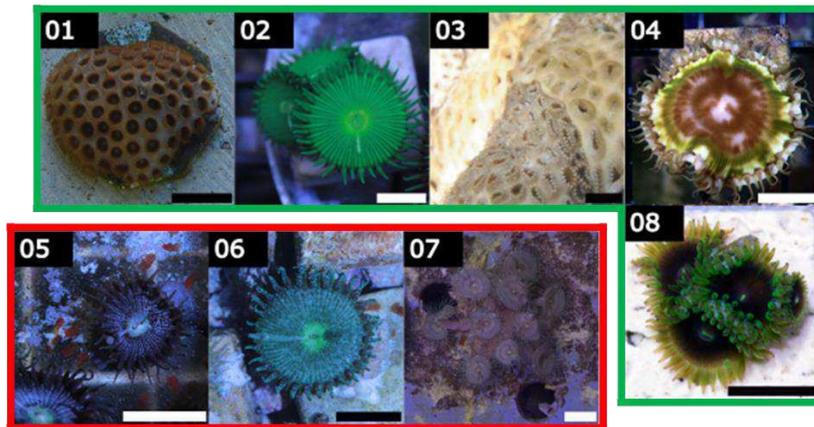
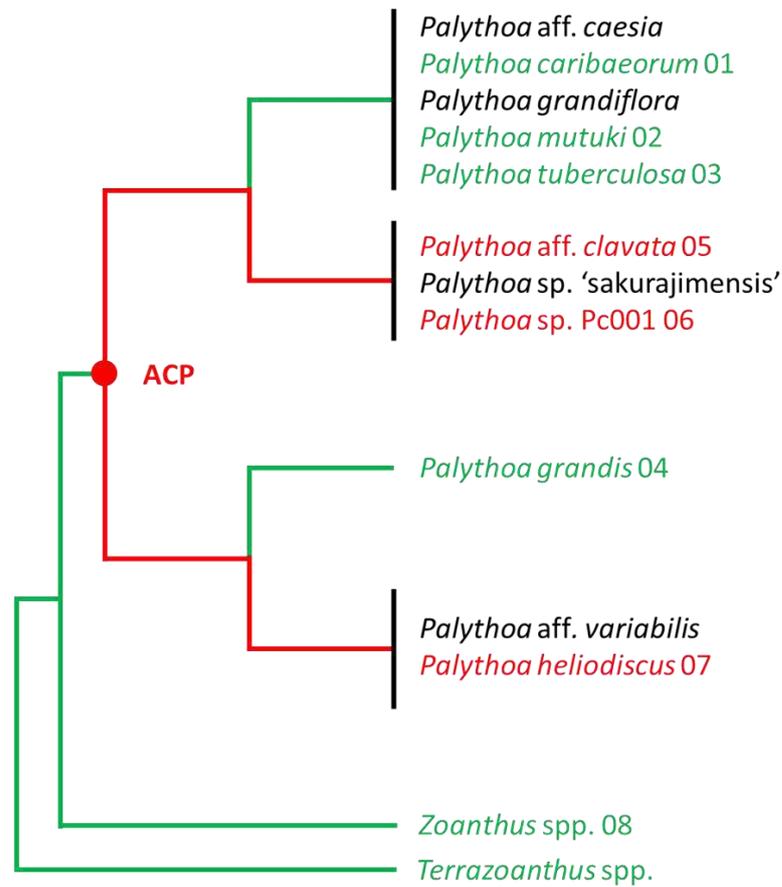


Figure. 10. Comparaison de la phylogénie et de la toxicité chez les Zoantharia. ACP : ancêtre commun des *Palythoa* spp. moyennement ou fortement toxique. En rouge : lignées ayant conservé le caractère plésiomorphe ancestral de stockage de la palytoxine. En vert : organismes faiblement ou non toxiques. En noir : *Palythoa* spp. dans lesquelles la présence de PITX n'a pas été étudiée. *Palythoa tuberculosa* n'a pas été étudié dans cette étude mais les résultats de Hirata *et al.* (1985) indiquent que cette espèce contient de faibles quantités de palytoxine (0,01 mg/g). La photographie de *Palythoa tuberculosa* (03) provient de Reimer *et al.*, 2007. Les barres d'échelle représentent 1 cm.

Chapitre 3 :

Les *Symbiodinium* spp. *in et ex hospite* ont-ils un rôle dans la biosynthèse de la palytoxine ?

1. Introduction

Les mécanismes de biosynthèse de la PITX chez les *Palythoa* spp. ainsi que le rôle des microorganismes symbiotiques (dinoflagellés du genre *Symbiodinium*, bactéries, virus) dans cette biosynthèse restent inconnus. Aucune donnée sur les gènes impliqués n'a été apportée à ce jour. Comprendre les processus de biosynthèse de la PITX permettrait de dessiner de nouvelles pistes de synthèse biotechnologiques, car la synthèse chimique ne pourra jamais faire émerger un procédé rentable pour l'industrie pharmaceutique, trop d'étapes étant nécessaires (Suh et Kishi, 1994).

La possibilité d'une biosynthèse de la PITX par les dinoflagellés symbiotiques (ou *Symbiodinium* spp.) a déjà été suggérée à plusieurs reprises dans la littérature (Nakamura *et al.*, 1993; Drainville-Higgins, 2004; Onodera *et al.*, 2004), mais jamais prouvée. Par ailleurs, des structures polycétidiques et vasoconstrictives ont été isolées et identifiées dans les *Symbiodinium* spp., les zooxanthellatoxines A et B (Nakamura *et al.*, 1993; Drainville-Higgins, 2004; Onodera *et al.*, 2004) (cf. Figure 14 dans la section 'Introduction'), mais ces molécules n'ont aucun lien structural avec la PITX. On peut, à ce stade, faire l'hypothèse que les *Symbiodinium* spp. sont impliqués, au moins en partie, dans la biosynthèse de la PITX, par analogie avec les structures des zooxanthellatoxines, et qu'il pourrait exister d'autres polycétide-synthases (PKSs) intervenant dans la biosynthèse de la PITX. Ajouté à cela, la découverte de dinoflagellés libres du genre *Ostreopsis* capables de produire de la PITX et des analogues (Ukena *et al.*, 2001; Lenoir *et al.*, 2004; Ciminiello *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2010), argumente et renforce encore l'idée que la toxine serait assemblée par des enzymes de symbiotes.

Une origine symbiotique de la biosynthèse de la PITX et de ses analogues au sein des *Palythoa* spp. a déjà été suggérée par plusieurs auteurs qui ont émis un certain nombre d'hypothèses convergentes. Tout d'abord, la toxine a été détectée dans des organismes vivant en association avec des colonies de *Palythoa* spp. (Gleibs et Mebs, 1999). Chez les organismes filtreurs (éponges, moules), la toxine peut s'accumuler à partir de l'eau de mer ou par des mécanismes encore non élucidés tandis que les prédateurs de *Palythoa* spp. toxiques (vers polychètes, *Acanthaster planci*, poissons) stockent la PITX sous sa forme active à partir de leur nourriture (Gleibs et Mebs, 1999). Deuxièmement, ces toxines ont été décrites chez des organismes marins divers, incluant même des systèmes primaires comme l'algue rouge *Chondria crispus* (Maeda *et al.*, 1985), et surtout, comme déjà dit, des dinoflagellés benthiques du genre *Ostreopsis* (Usami *et al.*, 1995). Troisièmement, des bactéries associées aux *Palythoa* spp. ont été identifiées comme étant une source possible de la biosynthèse polycétidique de la toxine. En effet, une activité hémolytique ressemblant fortement à celle de la PITX, a été mise en évidence chez des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* (Carballeira

et al., 1998), *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, ainsi qu’au sein du groupe de *Bacillus cereus* (Seeman *et al.*, 2009). Il a notamment été décrit que des composés provenant de *Vibrio* sp. et *Aeromonas* sp. possédaient une homologie antigénique apparentée à celle de la PITX (Frolova *et al.*, 2000). Ainsi, la présence de PITX et d’analogues dans cette myriade d’organismes marins oriente les chercheurs vers un mécanisme de biosynthèse d’origine unicellulaire (Piel, 2009; Seemann *et al.*, 2009). Dans le même sens, des toxines polycétidiques ont été décrites comme étant la résultante d’une cascade de réactions complexes chez les *Bacillus* spp. et faisant intervenir des NRPs (pour Non Ribosomal Proteins), conduisant à toute une série de toxines à fort potentiel pharmacologique (Stein, 2005).

Suite à ces hypothèses, ce troisième chapitre s’est efforcé d’explorer la possibilité de produire de la PITX à partir de *Symbiodinium* spp. soit fraîchement isolés de *Palythoa* spp. toxiques, soit cultivés en milieux liquides, cela malgré la faible croissance de ces cellules eucaryotes en cultures *ex hospite* et donc la faible biomasse généralement produite (Blank, 1987; Camacho *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2012).

2. Matériel et méthodes

2.1. Isolement de *Symbiodinium* spp. et obtention d’homogénat de l’hôte

Différentes techniques d’isolement de *Symbiodinium* spp. à partir de leur hôte Zoantharia sont expérimentées. L’eau de mer artificielle reconstituée à partir d’eau osmosée et de sel marin (Instant Ocean salts de Seachem, Madison, USA) est autoclavée (120°C, 20-30 min) et filtrée à 0,45 µm sur membrane en nitrate de cellulose (diamètre 47 mm) montée sur un support Millipore, une fiole à vide et une pompe. Cette eau de mer est notée ‘EMAA 0,45’ et est utilisée dans toutes les expérimentations qui suivent. Les polypes utilisés dans les expérimentations de ce chapitre sont récoltés sur des colonies cultivées en aquariums (cf. Chapitre 2, ‘Matériel et méthodes’ pour les paramètres de culture) au moyen d’un scalpel.

Des *Symbiodinium* spp. isolés de polypes d’*Exaiptasia pallida* (Cnidaria : Hexacorallia) (**Figure 1**) ont été pris comme témoins de culture, car les *Symbiodinium* spp. de cette espèce, qui sont généralement de clade B (Garrett *et al.*, 2013), sont couramment cultivés *ex hospite* (voir protocoles du Laboratoire du Dr Virginia Weis à Hawaï sur le site <http://people.oregonstate.edu/~weisv/>), alors qu’il existe très peu de données sur la culture de *Symbiodinium* spp. issus de Zoantharia (qui pourraient peut-être exiger des paramètres de culture différents des autres *Symbiodinium* spp.). Les polypes d’*Exaiptasia pallida* ne contiennent pas de PITX et n’établissent pas de coslonie, ils vivent de façon solitaire.



Figure 1. Polypes d'*Exaiptasia pallida* sur une roche de l'aquarium (société Coral Biome). Ces coraux vivent sous forme de polypes unitaires et non en colonies.

2.1.1. Méthode d'isolement simple par homogénéisation et centrifugation

Les cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées (SFI) de leur hôte sont obtenues de la manière suivante : des polypes de *Palythoa* sp. sont récoltés dans les bassins de culture, lavés 2 fois à l'EMAA 0,45 dans un bécher, puis délicatement séchés sur du papier absorbant et coupés en deux dans le sens de la hauteur. Chaque moitié de polype est reprise par 1 ml d'EMAA 0,45 et homogénéisée indépendamment à l'aide d'un homogénéisateur Potter-elvehjem. Après décantation (2 min), le surnageant provenant de chaque polype est récolté dans un microtube de 1,5 ml et centrifugé (900 g, 5 min), puis les surnageants sont rassemblés dans un tube Falcon de 25 ml et conservés à 4°C. Ce liquide constitue l'**homogénat de l'hôte** et ne contient pas de *Symbiodinium* spp. Les culots quant à eux, contiennent les cellules de *Symbiodinium*. Ils sont lavés 3 fois par 1 ml EMAA 0,45 puis centrifugés (900 g, 5 min) afin d'éliminer les tissus résiduels. Les culots sont ensuite repris dans 1 ml d'EMAA 0,45), les cellules sont comptées (microscope optique), et la solution sert d'inoculum pour la culture.

2.1.2. Méthode d'isolement par traitement à la soude

Un protocole adapté de Zamoum et Furla (2012) est utilisé pour isoler des *Symbiodinium* spp. de leur hôte en utilisant la soude. Le principe est de dégrader les tissus de l'hôte pour favoriser la libération des cellules de *Symbiodinium*. Un morceau de polype, c'est-à-dire 5 à 6 tentacules joints par un morceau de disque oral, et provenant de *Palythoa* sp. Pc001, ainsi qu'un polype entier d'*Exaiptasia pallida*, sont placés chacun dans un bécher avec 10 ml d'EMAA 0,45 contenant du NaOH 2 N. Après 4 h d'incubation à 25°C, les gros morceaux de polype sont ôtés des béchers à l'aide d'une pince, les surnageants contenant les *Symbiodinium* spp. libérés sont centrifugés (900 g, 5 min) et les culots lavés 3 fois par 1 ml d'EMAA 0,45, et centrifugés (900 g, 5 min) à nouveau afin

d'éliminer les tissus résiduels ainsi que la soude. Les cellules sont reprises dans 1 ml d'EMAA 0,45 et comptées au microscope optique ; elles sont immédiatement utilisées comme inoculum (culture liquide).

2.1.3. Méthode d'isolement par blanchissement des polypes

Lorsque des Cnidaria sont en état de stress, ils expulsent fréquemment leur *Symbiodinium* spp. dans le milieu externe; s'ensuit une décoloration des polypes, et c'est ce que l'on appelle le phénomène de blanchissement (pour revue, voir Douglas, 2003). Les stress les plus faciles à reproduire en laboratoire sont les stress thermiques chauds et froids. Des essais préliminaires de stress froid s'étant montrés peu efficaces, nos efforts se sont focalisés sur le stress thermique chaud selon un protocole adapté de celui de l'équipe du Dr V. Weis à Hawaï ('Heat shock and bleaching of *A. pallida*' ; <http://people.oregonstate.edu/~weisv/assets/heatshockandbleaching.pdf>). Pour ce faire, deux polypes de *Palythoa* sp. Pc001 sont récoltés de leur colonie (aquarium) au moyen d'un scalpel et placés dans un bécher au fond d'un aquarium pendant une semaine afin de permettre aux tissus lésés de cicatriser. Ces deux polypes cicatrisés, ainsi que deux polypes frais d'*Exaiptasia pallida* (témoins cultivés en aquarium) associés à leur support en pierre, sont chacun placés dans des microtubes de 1,5 ml en présence d'1 ml d'EMAA 0,45.

Choc thermique à 32°C. Les tubes sont ensuite incubés dans un bain-marie à 32°C pendant 24 h et près d'une source lumineuse (fenêtre du laboratoire). Les tubes ne sont pas fermés complètement afin de permettre les échanges gazeux. Après 24 h, le liquide situé au-dessus et contenant les *Symbiodinium* spp. expulsés par leur hôte Cnidaria est centrifugé (900 g, 5 min), les cellules sont comptées au microscope optique, puis immédiatement mises en culture liquide (inoculum).

Le taux de blanchissement induit par le choc thermique est le rapport entre les cellules de *Symbiodinium* expulsées lors de ce choc et celles restant dans les tissus de l'hôte. Pour le calculer, un polype d'*Exaiptasia pallida* et un polype de *Palythoa* sp. Pc001 ayant subi un choc thermique à 32°C (cf. ci-dessus), sont homogénéisés en présence d'1 ml d'EMAA 0,45 ; après centrifugation (900 g, 5 min), les *Symbiodinium* spp. sont repris dans l'EMAA 0,45 et comptés. Le calcul du taux de blanchissement induit chez les deux polypes est déterminé selon la formule (Perez *et al.*, 2011) :

$$\% \text{ de cellules expulsées} = \frac{\text{cellules expulsées}}{\text{cellules expulsées} + \text{cellules dans l'hôte}} \times 100$$

Choc thermique à d'autres températures. La question est de savoir si la température de stress de 32°C utilisée pour produire des inocula de *Symbiodinium* spp. n'est pas néfaste pour l'intégrité des symbiotes à cultiver. Pour le vérifier, un choc thermique est provoqué à différentes températures sur des SFI d'*Exaiptasia pallida* qui sont ensuite mises en culture dans du milieu F/2 à 25°C. L'expérience est la suivante : **Etape 1**, 8 polypes d'*Exaiptasia pallida* sont récoltés et leurs *Symbiodinium* spp. sont isolés par homogénéisation dans 2 ml d'EMAA 0,45, comptés, puis répartis

dans des microtubes et incubés à différentes températures : 4°C pendant 3 h ; 25°, 30°C, 32°C, et 35°C pendant 24 h (en triplicats). **Etape 2**, Les cellules sont ensuite réparties (plaque 24-puits) à $10,5 \pm 0,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans 2 ml de milieu F/2, et la croissance suivie pendant 17 jours.

2.2. Autres clades de *Symbiodinium* cultivés

Parallèlement aux *Symbiodinium* spp. isolés de *Palythoa* spp. et d'*Exaiptasia pallida*, deux autres souches de *Symbiodinium* spp. sont également utilisées dans nos expériences : l'une de clade A, isolée de *Galaxea fascicularis* (Cnidaria : Hexacorallia), fournie par le Centre Scientifique de Monaco (nommée 'souche Monaco'); et une autre de clade C1 (souche RCC4017), *Symbiodinium goreau* (Dinophyceae), provenant de la collection de Roscoff (Roscoff Culture Collection).

3. Culture *ex hospite* de *Symbiodinium* spp.

3.1. Inoculation et culture sur un milieu F/2

Le milieu de culture F/2 (Guillard et Ryther, 1962) est inoculé par les souches de *Symbiodinium* spp. préparées selon les différentes méthodes d'isolement précédentes ou provenant de collections. Ce milieu a été reconstitué dans l'EMAA 0,45 à partir d'une solution mère (50X) de F/2 sans silice (Sigma-Aldrich), à raison de 1 : 50 (v/v). La composition du milieu F/2 est indiquée dans le **Tableau 1**.

Les souches de *Symbiodinium* sont mises en culture dans 2 ml de milieu F/2 sur une plaque (24-puits) fermée hermétiquement par du Parafilm pour limiter l'évaporation, et placées dans une pièce thermostatée à $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sous 2 néons « cool white » de 36 W (OSRAM) chacun. Les souches sont exposées à une intensité lumineuse comprise entre 60 et 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{quanta}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ et à une photopériode de 12 h:12 h (jour:nuit). Les cultures ne sont pas agitées car les forces de cisaillement dues au brassage ont des impacts négatifs sur l'intégrité des cellules (Gibson et Thomas, 1995; Juhl et Latz, 2002; Camacho *et al.*, 2011). Les cellules obtenues par homogénéisation sont inoculées à 2 concentrations : 2×10^3 et 20×10^3 cellules/ml (protocoles d'Hawaï, <http://people.oregonstate.edu/~weisv/assets/algacultures.pdf>). Les cellules obtenues par blanchiment et par extraction au NaOH sont inoculées à une concentration de 10×10^3 cellules/ml.

	Composé	Concentration finale (mg/l)
Macronutriments inorganiques	Nitrate de sodium	75,0
	Phosphate de sodium monobasique	4,411
Micronutriments inorganiques	Chlorure de cobalt • 6 H ₂ O	0,01
	Sulfate de cuivre • 5 H ₂ O	0,01
	EDTA disodique • 2 H ₂ O	4,36
	Chlorure ferrique • 6 H ₂ O	3,15
	Chlorure de manganèse • 4 H ₂ O	0,18
	Molybdate de sodium • 2 H ₂ O	0,006
	Sulfate de zinc • 7 H ₂ O	0,022
Micronutriments organiques	Biotine	0,005
	Thiamine • HCl	0,1
	Vitamine B12	0,005

Tableau 1. Composition du milieu F/2 utilisé pour la culture *ex hospite* des souches de *Symbiodinium* spp.

Les milieux de culture sont contrôlés tous les jours par visualisation et les cellules sont de *Symbiodinium* comptées régulièrement au microscope optique. Ces contrôles permettent de vérifier l'absence de contaminants et l'état des cellules (couleur, mobilité). Dès que des cellules mobiles sont en nombre suffisant dans le milieu, ce dernier est aspiré stérilement et placé dans un erlenmeyer stérile et cotonné de 100 – 250 ml et contenant 50 ml de milieu F/2 (**Figure 2**). Chaque mois, les cultures en erlenmeyer sont repiquées pour permettre une reprise de la croissance et maintenir les souches viables. Pour ce faire, les erlenmeyers sont d'abord secoués énergiquement pour décoller le film de cellules des parois du récipient et homogénéiser l'ensemble ; puis 1 ml de culture est prélevé et placé dans un autre erlenmeyer identique. Chaque repiquage est systématiquement fait en deux exemplaires.

Dès leur réception, la souche Monaco et la souche RCC4017 ont été repiquées dans les mêmes conditions, en trois répliquas cette fois.



Figure 2. Cultures de *Symbiodinium* spp. en erlenmeyer. Les cultures sont placées dans des erlenmeyers stériles de 100 à 250 ml contenant 50 ml de milieu F/2. Température, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; intensité lumineuse, $60 - 90 \mu\text{mol}.\text{quanta}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$; photopériode, 12 h : 12 h (jour : nuit) ; source lumineuse, 2 néons ‘cool white’ de 36 W chacun.

3.2. Culture sur un milieu ASP-8A

Les *Symbiodinium* spp. sont cultivés en milieu liquide F/2 comme précédemment, et 1 ml sont prélevés etensemencés dans 50 ml de milieu ASP-8A (Blank, 1987), puis incubés identiquement au milieu F/2. Le **Tableau 3** indique la composition de ce milieu qui a été utilisé à maintes reprises pour la culture de *Symbiodinium* spp. (Iglesias-Prieto *et al.*, 1993; Trench et Thinh, 1995; Stochaj et Grossman, 1997; Wilcox, 1998; Warner *et al.*, 1999).

3.3. Comment éviter la prolifération d’organismes indésirables et maintenir des *Symbiodinium* purs

Des essais ont montré que de nombreux microorganismes proliféraient dans les cultures de *Symbiodinium* spp. réalisées à partir d’inocula obtenus par les trois méthodes d’extraction décrites précédemment. Pour éviter cette prolifération, plusieurs traitements sont expérimentés.

3.3.1. Par ajout d’agents antimicrobiens

Antibiotiques. Selon un protocole établi par Soffer (2009) qui consiste à inhiber la croissance des bactéries, un cocktail de trois antibiotiques est ajouté aux cultures dès l’inoculation par les *Symbiodinium* spp. fraîchement extraits : kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich), ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich) et streptomycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich).

Dioxyde de germanium (GeO_2). Celui-ci est ajouté à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (conseil du Dr Sheila Kitchen, Laboratoire de V. Weis, communication personnelle) dans le milieu de culture, dès l’inoculation par les cellules fraîches de *Symbiodinium*. Ce composé est très efficace contre la prolifération des diatomées (Azam et Volcani, 1981).

	Composé	Concentration finale (M)
Solution basique	Chlorure de sodium	$4,3 \cdot 10^{-1}$
	Sulfate de magnésium • 7 H ₂ O	$3,7 \cdot 10^{-2}$
	Chlorure de potassium	$9,4 \cdot 10^{-3}$
	Tris HMAM	$8,3 \cdot 10^{-3}$
	Chlorure de calcium • 2 H ₂ O	$7,5 \cdot 10^{-3}$
	Nitrate de sodium	$5,9 \cdot 10^{-4}$
	Na ₃ NTA	$1,6 \cdot 10^{-4}$
	Phosphate de potassium monobasique	$7,4 \cdot 10^{-5}$
	Nitrate d'ammonium	$1,5 \cdot 10^{-5}$
	Supplément I	Acide borique
Na ₂ EDTA		$3,0 \cdot 10^{-5}$
Sulfate de manganèse		$1,1 \cdot 10^{-5}$
Chlorure de fer (III) • 6 H ₂ O		$1,8 \cdot 10^{-6}$
Sulfate de zinc • 7 H ₂ O		$8,3 \cdot 10^{-7}$
Sulfate de cobalt • 7 H ₂ O		$2,6 \cdot 10^{-7}$
Supplément II	Thymine	$3,2 \cdot 10^{-6}$
	Myo-Inositol	$2,8 \cdot 10^{-6}$
	Citrate de choline	$8,5 \cdot 10^{-7}$
	Niacine	$4,1 \cdot 10^{-7}$
	Thamine (HCl)	$3,0 \cdot 10^{-7}$
	D-pantothénate de calcium	$2,1 \cdot 10^{-7}$
	Putrescine (HCl) ₂	$1,2 \cdot 10^{-7}$
	Pyridoxine (HCl)	$9,7 \cdot 10^{-8}$
	Orotate de sodium	$5,6 \cdot 10^{-8}$
	Pyridoxamine (HCl) ₂	$4,1 \cdot 10^{-8}$
	P-aminobenzoate de sodium	$3,7 \cdot 10^{-8}$
	D-Biotin	$8,0 \cdot 10^{-9}$
	Riboflavine	$5,0 \cdot 10^{-9}$
	Acide folique	$4,0 \cdot 10^{-9}$
Cyanocobalamine	$1,0 \cdot 10^{-9}$	
Folate de calcium	$3,9 \cdot 10^{-10}$	

Tableau 3. Composition du milieu ASP-8A (d'après Blank, 1987).

3.3.2. Par tri manuel

Lorsque des champignons filamenteux sont observés dans les cultures, des prélèvements de cellules de *Symbiodinium* sont effectués au moyen d'une micropipette stérile, en prenant soin de ne prendre aucun champignon. Elles sont repiquées pour ensemercer de nouvelles cultures.

3.3.3. Par traitement acide

Avant inoculation, les culots de cellules fraîches de *Symbiodinium* sont incubées pendant 1 h à température ambiante dans de l'EMAA 0,45 acidifiée à pH 4,0 par ajout d'acide orthophosphorique (H_3PO_4). Après incubation, les *Symbiodinium* spp. sont centrifugés (900 g, 5 min), le culot est lavé une fois et repris par de l'EMAA 0,45, puis les cellules sont mises en culture.

3.3.4. Par sélection des colonies sur boîte de Petri

Des cellules de *Symbiodinium* extraites par homogénéisation de polypes de *Palythoa* sp. Pc001 sont étalées sur des boîtes de Petri dont le milieu solide de culture est composé de 33 ml d'EMAA 0,45, 0,3 g de Bacto agar (Sigma), et supplémenté par le cocktail d'antibiotiques (kanamycine 50 μ g/ml, ampicilline 100 μ g/ml, streptomycine 50 μ g/ml). Les boîtes sont fermées par du Parafilm et incubées à l'envers (Soffer, 2009) pendant 2 mois à 25°C, de la même manière que les cultures liquides.

3.4. Suivi de la croissance cellulaire

Dès leur inoculation en milieu liquide, la croissance des *Symbiodinium* spp. est contrôlée tous les jours, ou du moins plusieurs fois par semaine, par comptage au moyen d'une cellule Neubauer improved (Marienfeld-superior, Lauda-Königshofen, Allemagne) et d'un microscope optique (grossissement 400 x). Avant chaque comptage, les cellules sont d'abord décrochées du récipient, soit en secouant énergiquement les erlenmeyers, soit à l'aide d'une pipette dans les puits de la plaque de culture. Dans le cas des erlenmeyers, 1 ml de culture est pipeté dans un microtube de 1,5 ml, et 20 μ l de solution d' H_3PO_4 1% sont ajoutés afin d'immobiliser les cellules et faciliter leur comptage. Dans les cas des puits de 2 ml, 20 μ l de culture sont placés directement sur la cellule de comptage. L'observation sous microscope permet de contrôler la présence de contaminants ainsi que l'aspect des cellules.

3.5. Optimisation de la croissance et de biomasse produite

La vitesse de croissance des cellules de *Symbiodinium* étant relativement lente, plusieurs paramètres sont modifiés pour accroître cette vitesse et tenter d'augmenter la biomasse. Les *Symbiodinium* spp. de *Palythoa* sp. Pc001 sont choisis pour les expériences qui suivent.

3.5.1. Par renouvellement du milieu F/2

Les cellules de *Symbiodinium* extraites sont cultivées comme précédemment (cf. 2.1, ‘Inoculation et culture sur un milieu F/2’). A la phase stationnaire et après comptage, les cellules sont centrifugées et placées dans 2 ml de milieu sur une plaque de 24 puits fermée par du Parafilm, à une densité de $6,9 \cdot 10^5$ cellules/ml. Quatre milieux sont testés (**Tableau 4**) : **condition 1**, EMAA 0,45 (témoin) ; **conditions 2 et 3**, milieu F/2 non-renouvelé dans le temps, et utilisé une fois à J0, (condition 2, une simple dose ; condition 3, triple dose) ; **condition 4**, milieu F/2 à J0 et renouvellement deux fois par l’ajout de solution mère F/2 (50X) après 14 (J0 + 14) et 29 jours (J0+ 29) de culture. Le comptage des cellules est fait régulièrement sur une période totale de 45 jours.

Condition	Ajout de solution mère 50X F/2 (µl)		
	J0	J0 + 14	J0 + 29
1	-	-	-
2	40	-	-
3	120	-	-
4	40	40	40

Tableau 4. Culture de *Symbiodinium* dans différentes conditions de culture dans le milieu F/2. Voir texte. Nombre de répliquats = 3.

3.5.2. Effet de la présence d’homogénat de l’hôte (extrait corallien) sur la croissance

L’homogénat de l’hôte est préparé en homogénéisant un polype avec un Potter comme précédemment (cf. 1.1). Après décantation rapide, le liquide surmontant est prélevé et filtré à $0,45 \mu\text{m}$ (membrane de nitrate de cellulose, Millipore). La concentration en protéines dans cet homogénat est mesurée par la microméthode de Bradford (kit Bradford acheté chez OZ Bioscience, Marseille, France). Les cellules de *Symbiodinium* sont préparées par la méthode d’homogénéisation et centrifugation (cf. 2.1.1), puis ils sont mis en culture sur une plaque 24-puits (3 répliquas) dans 2 ml de milieu F/2 contenant de l’homogénat de l’hôte à plusieurs concentrations protéiques, 0, 5, 46 et 173 ng/ml.

3.6. Etude de facteurs pouvant jouer sur la biosynthèse de palytoxine : respiration, photosynthèse et présence d’homogénat de l’hôte

Des cellules de *Symbiodinium* sont préparées à partir de *Palythoa* sp. Pc001 par la méthode d’homogénéisation (cf. 2.1.1), puis cultivées sur un milieu F/2. Arrivées en phase exponentielle ($5 \cdot 10^5$ cellules/ml), elles sont placées dans 100 ml de milieu F/2 (*i*) soit dans des erlenmeyers stériles et cotonnés de 250 ml, (*ii*) soit dans des flacons Schott stériles, fermés hermétiquement par un bouchon en caoutchouc et dans lesquels l’atmosphère est remplacé par de l’azote (N_2) pur de la manière suivante : flush pendant 10 min à l’aide de deux aiguilles (entrée/sortie du flux) traversant

les bouchons et reliées chacune par un filtre stérile de 0,45 µm (de type Swennex à embout Luer)) et installé stérilement (bec bunsen).

L'homogénat de l'holobionte est préparé selon le protocole décrit précédemment (cf. 2.1.1) et la teneur en protéines évaluée par la micro-méthode de Bradford. Deux ml d'homogénat contenant 480 ng de protéines sont incorporés dans deux cultures de cellules de *Symbiodinium* (erlenmeyer contenant 100 ml de milieu stérile F/2), la concentration protéique finale de l'homogénat dans le milieu est donc de 4,8 ng/ml. Les milieux de culture à pH 2 et 4, sont obtenus par l'ajout d'une solution d'acide orthophosphorique (H₃PO₄) à 1% (v/v) au pH-mètre. Les conditions différentes (air, azote, photopériode obscurité totale, présence ou pas d'homogénat de l'hôte, pH), sont indiquées dans le **Tableau 5**. Deux cultures témoins sont suivies en parallèle (condition 1 du Tableau).

Condition	HH	N ₂	Obscurité	pH	n	Analyse HPLC
1	-	-	-	NM	2	24 h
2	-	-	+	NM	2	24 h
3	+	-	-	NM	2	24 h
4	-	+	-	NM	2	24 h
5	+	+	-	NM	2	24 h
6	-	+	+	NM	2	24 h
7	+	-	+	NM	2	24 h
8	+	+	+	NM	2	24 h
9	-	-	-	2	1	24 h
10	-	-	-	2	1	48 h
11	+	-	-	2	2	48 h
12	-	-	-	4	1	24h
13	-	-	-	4	1	48 h
14	+	-	-	4	2	48 h

Tableau 5. Effet de la respiration, de l'éclairage et de la présence de l'homogénat de l'hôte sur la biosynthèse de la palytoxine par des *Symbiodinium* spp. HH, homogénat de l'hôte ; N₂, signifie 'sous atmosphère azotée' ; n, nombre de répliquas ; NM, non modifié.

Puis, une analyse de la PITX est réalisée par HPLC et par spectrométrie de masse, comme indiqué ci-après.

4. Analyse de la palytoxine à partir des cellules ou des cultures de *Symbiodinium*

4.1. Préparation des échantillons

La PITX est extraite des *Symbiodinium* spp. fraîchement isolés (SFI), à partir de *Palythoa heliodiscus* (Z07) par extraction dans 10 ml d'un mélange méthanol : H₂O mQ (80 : 20, v/v) pendant 2 h à 4°C, à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique. Après décantation, la solution est centrifugée (20 min, 4500 g) afin d'éliminer les débris résiduels. Le surnageant de couleur rouge-orange est extrait au dichlorométhane 1 à 2 fois, la phase aqueuse (supérieure) est prélevée, concentrée par évaporation (flux d'azote), volumée, et directement analysée en HPLC.

La PITX est également analysée dans le milieu de culture de *Symbiodinium* spp. (milieu F/2 ou ASP-8A). 1 à 2 ml de milieu sont prélevés, après centrifugation et concentration du surnageant avec un flux d'azote, une partie est analysée en HPLC et en spectrométrie de masse MALDI-ToF.

4.2. Analyse par HPLC

L'appareillage HPLC est constitué d'une pompe binaire Waters 1525, d'un injecteur manuel Rhéodyne 7725i (La Jolla, Californie, USA), d'un four, et d'un détecteur à barrettes de diode Waters 2996 (DAD, pour 'Diode Array Detector') et d'une colonne RP-C₁₈ Cortecs (4,6 x 75 mm, porosité 2,7 µm, de chez Waters). Le système est piloté par le logiciel Empower v2002 et le gradient d'éluion utilisé est détaillé dans le **Tableau 6**.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	5	95
10	100	0
12	5	95

Tableau 6. Gradient HPLC utilisé pour détecter la présence de palytoxine. A, acétonitrile ; B, H₂O mQ + 0,1% AcOH. Débit, 0,8 ml/min ; température de la colonne, 30°C ; Volume injecté, 5 – 20 µl ; Durée du programme, 12 min. Détection à 263 nm et utilisation du DAD pour vérifier la pureté (traces éventuelles de pigments ou de lipides).

4.3. Détection par spectrométrie de masse MALDI-ToF

Les cellules entières de *Symbiodinium* (SFI et cultures) et le surnageant de culture, sont directement analysés par spectrométrie de masse MALDI-ToF de la manière suivante : les échantillons (les SFI, les cellules entières cultivées sur F/2 et les surnageants de culture), sont déposés à la micropipette (1 µL) dans les cupules de la plaque d'ionisation laser. Puis 1 µl d'une solution de matrice [solution d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), 30 mg/ml, dans MeOH : H₂O + 0,1 % TFA (50/50, v/v)] est ajouté dans les cupules. Après séchage à l'air, la plaque est introduite dans le spectromètre. La calibration MALDI est réalisée avec le Peptide Calibration Standard 2, et

les analyses MALDI sont effectuées avec un spectromètre de masse Ultraflex extreme (de chez Bruker Daltonics, Billerica, USA). Le système est contrôlé par le logiciel FlexControl 3.3 software. L'ionisation est effectuée en mode positif avec réflectron. Trois cents tirs de laser d'un diamètre de 20 µm sont accumulés pour chaque point. La puissance du laser est optimisée au début de l'acquisition pour chaque échantillon.

5. Résultats

5.1. Choix de la technique d'extraction des *Symbiodinium* spp. à partir de leur hôte

L'objectif de ce chapitre a été de tenter de savoir si les *Symbiodinium* spp. ont un rôle dans la biosynthèse de la PITX. La stratégie a consisté à les isoler en parfaite intégrité et à les cultiver pour disposer d'une biomasse suffisante. La présence de la toxine a été recherchée soit à l'intérieur de cellules fraîchement isolées et intactes, soit en phase stationnaire de cultures réalisées dans un milieu le plus approprié qui soit. De nombreuses études précédentes se sont soldées par des échecs : en effet, d'une part les *Symbiodinium* spp. sont fragiles et ne supportent pas les forces de cisaillement si les cultures sont agitées ou même cultivées en présence d'un barbotage continu (Gibson et Thomas, 1995; Juhl et Latz, 2002; Camacho *et al.*, 2011), ce qui limite la respiration que l'on ne contrôle pas (aérobie ou microaérobie ?) ; d'autre part ils doivent se multiplier dans un environnement qui n'est pas le leur. La culture d'*Ostreopsis* spp., par exemple, n'a pas été améliorée à ce jour (Camacho *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2012), ni celle des *Symbiodinium* spp. (Blank, 1987; Krueger et Gates, 2012). Trouver un milieu artificiel permettant d'obtenir rapidement une augmentation importante de la biomasse des *Symbiodinium* spp. s'avère primordial afin de produire suffisamment de matériel biologique et permettre de mieux comprendre les mécanismes physiologiques d'échanges ainsi que ceux qui consistent à séquencer les gènes impliqués, mais également la possibilité de produire des métabolites spécifiques dont la PITX.

Pour ce faire et dans un premier temps, plusieurs méthodes ont été utilisées pour extraire les *Symbiodinium* spp. de leur hôte, et disposer d'inocula viables : des techniques par homogénéisation / centrifugation, par stress thermique (expulsion / blanchissement), et par extraction à la soude, ont été mises au point et considérées comme reproductibles dans notre laboratoire. Les résultats sont mitigés et discutés ci-après. Une des critiques que l'on doit souligner ici est que ce ne sont pas les mêmes espèces de *Palythoa* qui ont été utilisées lors des différentes extractions, la disponibilité des coraux dans les aquariums variant d'une espèce à l'autre.

La technique par homogénéisation a donné des résultats très satisfaisants en termes de pureté (débris de tissus de l'hôte), et a permis d'obtenir des cellules viables immédiatement et rapidement.

La technique d'isolement par blanchissement des polypes (stress thermique à 32°C) a donné des résultats satisfaisants au niveau de l'intégrité et de la pureté ; cependant, les *Symbiodinium* spp.

n'ont pas survécu plus de 3-4 jours en culture. La question est de savoir à ce stade si la température de stress à 32°C n'est pas néfaste pour les *Symbiodinium* spp. Pour ce faire, un choc thermique a été provoqué à différentes températures sur des SFI fraîchement isolés d'*Exaiptasia pallida* (4, 25, 30, 32 et 35°C ; cf. 'Matériel et méthodes'), et qui ont ensuite été mis en culture à 25°C dans du milieu F/2, la croissance a été suivie pendant 17 jours. Les résultats sont résumés à la **Figure 3** suivante.

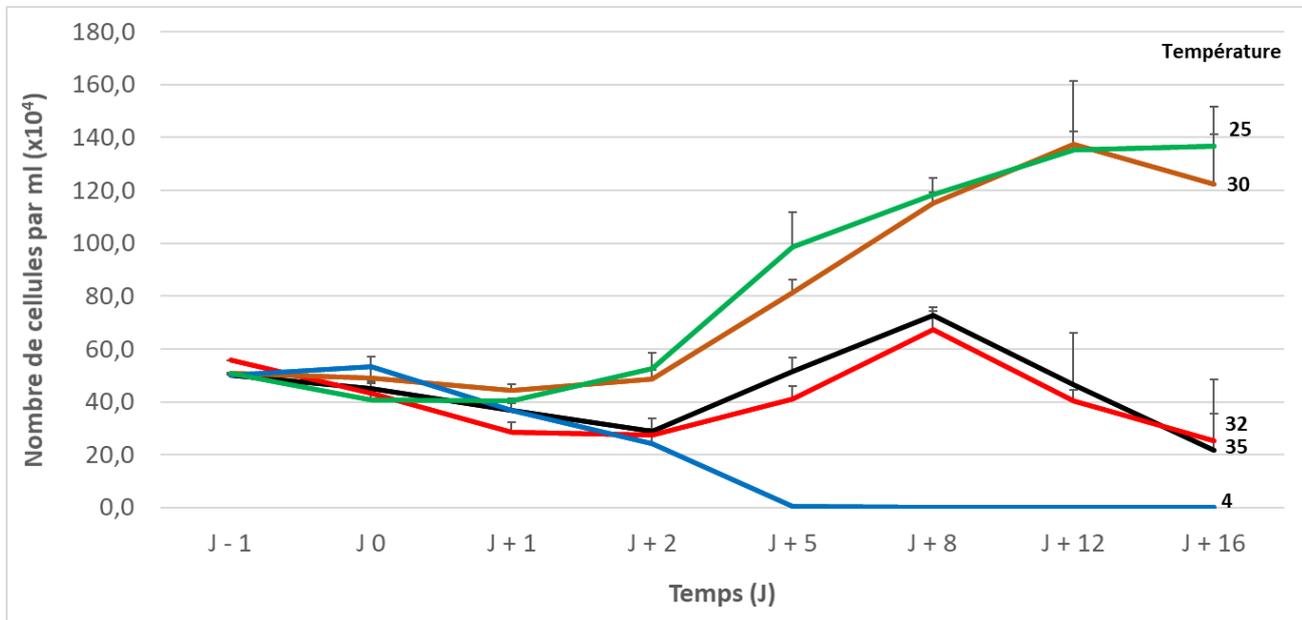


Figure 3. Effet du choc thermique à différentes températures sur la croissance de *Symbiodinium* spp. (SY) d'*Exaiptasia pallida*. Températures testées : 4°C (bleu), 25°C (vert), 30°C (brun), 32°C (rouge) et 35°C (noir). La culture s'effectue ensuite à 25°C dans un milieu F/2.

Il ressort de cette expérience que lorsque les cellules sont incubées à 4°C ou à plus de 30°C (32 et 35°C), dans nos conditions, elles ne sont pas viables ou elles ne le restent pas longtemps : le blanchissement des coraux à 32°C pendant 24 h altère la viabilité des *Symbiodinium* spp., ce qui confirme bien que les cellules expulsées à 32°C ne survivent pas.

Après un choc thermique de 24 h à 32°C, le taux de blanchissement calculé est de 5,28 % pour *Palythoa* sp. Pc001 et de 12,06 % pour *Eixaptaisia pallida*. Cette dernière valeur est en accord avec Perez *et al.* (2001) qui ont calculé des taux de blanchissement entre 10 et 20 % chez des *Eixaptaisia pallida* incubées 24 h à 32°C.

L'extraction à la soude permet une libération de nombreuses cellules de *Symbiodinium* ; cependant, la dégradation des tissus de l'hôte entraîne une grande quantité de débris qu'il est très difficile d'éliminer par centrifugation sélective. De plus, les cultures en milieu liquide F/2 et inoculées par les cellules extraites de cette manière ont très rapidement été envahies par d'autres organismes unicellulaires photosynthétiques (coloration verte intense); après quelques jours de culture seulement, les cellules de *Symbiodinium* n'étaient plus visibles. Cette technique a donc été abandonnée.

Ainsi, l'obtention de *Symbiodinium* spp. par homogénéisation est une technique simple, rapide et facile à mettre en œuvre pour l'étude des dinoflagellés symbiotiques, que ce soit pour chercher ce qu'ils contiennent, ou encore pour servir d'inoculum viable pour leur multiplication. Sur la base de ce protocole, plusieurs expériences importantes ont été faites à la suite.

5.2. Culture des *Symbiodinium* spp. et maintien d'une culture pure

Des cultures liquides en erlenmeyers stériles et aérées sans agitation permettent d'obtenir une croissance facilement quantifiable par rapport à celles réalisées en milieu solide. Le point négatif en milieu F/2 liquide est que nous avons observé que les cultures sont rapidement envahies par divers organismes unicellulaires à des temps très variables. L'ajout d'un cocktail de kanamycine (50 µg/ml), d'ampicilline (100 µg/ml) et de streptomycine (50 µg/ml) au temps zéro a permis d'inhiber totalement cette prolifération, la grande majorité de ces contaminants étant de type bactérienne (bacilles et coques), après observation au microscope optique. Cependant, des diatomées persistent en présence du cocktail d'antibiotiques ; c'est pourquoi les cultures ont été supplémentées par du GeO₂ à une dose de 10 µg/ml, ce qui a conduit à l'éradication totale des diatomées, contrairement à des cultures ne contenant pas ce composé. Ainsi, ajouter au temps zéro un cocktail d'antibiotiques et de l'oxyde de germanium est nécessaire pour se prémunir de la prolifération de bactéries et de diatomées ; il a été observé que lors des repiquages successifs, il n'est plus nécessaire d'ajouter le cocktail d'antibiotiques et l'oxyde de germanium, et que lorsque les cellules continuent de produire leurs pigments (cultures de couleur orange caractéristique), c'est une preuve directement visualisable de leur viabilité.

Parallèlement, un traitement acide a également été testé pour tenter d'inhiber la prolifération d'organismes autres que les *Symbiodinium* spp. Des cellules de *Symbiodinium* (SFI) ont été incubées en milieu acide (pH 4,0) comme indiqué dans 'Matériel et méthodes'. Aucune prolifération de bactéries ou de diatomées n'a été observée dans ce cas. La mise en culture de ces cellules a donné des résultats satisfaisants (courbes de croissance comparables aux autres cultures), avec des cultures exemptes de bactéries et de diatomées, même après les repiquages successifs.

Dans une autre expérience, des boîtes de Petri contenant de l'agar en milieu F/2 etensemencées avec des culots de *Symbiodinium* spp. fraîchement extraits (SFI), ont toutes été envahies par des diatomées, même en présence de GeO₂. Cela pourrait être dû à une répartition non homogène de l'oxyde ou à une précipitation de ce composé dans l'agar. Quoiqu'il en soit, aucune croissance des cellules de *Symbiodinium* n'a été observée dans ce cas, et la technique a été mise de côté.

Ainsi, maintenir une collection de *Symbiodinium* spp. viables consiste à les cultiver soit en présence d'antibiotiques et de dioxyde de germanium, ou à les traiter préalablement en milieu acide. Cette dernière méthode demande une étape de plus, mais coûte moins cher. Arrivé à ce stade, cultiver des *Symbiodinium* spp. s'est révélé faisable dans notre laboratoire, mais obtenir des biomasses acceptables restait le principal challenge. Voici ce qu'il en est ressorti.

5.3. Optimisation des cultures et croissance

5.3.1. Première culture

Des cultures (volume 50 ml) de *Symbiodinium* spp. réalisées à partir d'inocula fraîchement préparés d'*Exaiptasia pallida* et de *Palythoa* spp., dans un milieu liquide F/2 stérile supplémenté en antibiotiques et en oxyde de germanium, ont été réalisées, et les croissances suivies. Plusieurs phases de croissance bien distinctes ont été observées :

Phase de latence. A la première culture, les *Symbiodinium* spp. issus de *Palythoa* sp. Pc001 mettent environ 4 jours avant de commencer à se multiplier par rapport à ceux d'*Exaiptasia pallida* (2 jours) (**Figure 4**). Pendant les 2-4 premiers jours, le taux de croissance est quasi-nul.

Phase de croissance. Celle-ci est initiée dès que quelques cellules de *Symbiodinium* mobiles apparaissent et la concentration des cellules augmente régulièrement dans les cultures. Elle dure environ 2 semaines quelle que soit l'espèce étudiée, et que l'on traite préalablement les cellules à l'acide ou pas.

Phase stationnaire. Lors de cette phase, le taux de croissance redevient nul. Elle dure entre 10 et 22 jours selon les espèces (non illustré). Après cette période, la courbe de croissance décroît généralement sensiblement et fait apparaître des cellules mortes, visibles au microscope optique du fait de leur décoloration, probablement en raison de l'appauvrissement du milieu. A ce stade, les cultures de *Symbiodinium* spp. issues de *Palythoa* sp. Pc001 et d'*Exaiptasia pallida* atteignent leur optimum de manière presque équivalente, à $1,3 \cdot 10^6$ cellules/ml et $1,38 \cdot 10^6$ cellules/ml respectivement (**Figure 4**).

5.3.2. L'Adaptation des cultures par plusieurs repiquages successifs est nécessaire

Après 2 repiquages successifs, la courbe de croissance est caractérisée par une phase de latence quasiment inexistante (**Figure 5**). La phase de croissance atteint la phase stationnaire au bout de 12 jours de culture. Le comptage est effectué dans ce cas pendant 20 jours, intervalle pendant lequel les cellules sont viables (aucune décoloration observée). Il ressort que, comme dans toute étude de culture microbiologique, une adaptation physiologique du microorganisme est nécessaire et demande plusieurs pré-cultures successives. C'est d'autant plus le cas lorsque des métabolites ou des intermédiaires intervenant dans la biosynthèse doivent être identifiés.

Dans ce cas, les cellules de *Palythoa* sp. Pc001 atteignent un taux équivalent à l'expérience précédente, soit $1,37 \cdot 10^6$ cellules/ml, alors que celles d'*Exaiptasia pallida* atteignent une concentration un peu plus élevée de $1,58 \cdot 10^6$ cellules/ml. L'augmentation calculée du taux cellulaire pour les deux souches de *Symbiodinium*, est de l'ordre de 30 fois. Le fait de pré-cultiver préalablement les *Symbiodinium* spp. dans un milieu F/2 (repiquages successifs) ne fait pas augmenter sensiblement la biomasse, ni réduit le temps total de culture arrivée en phase stationnaire.

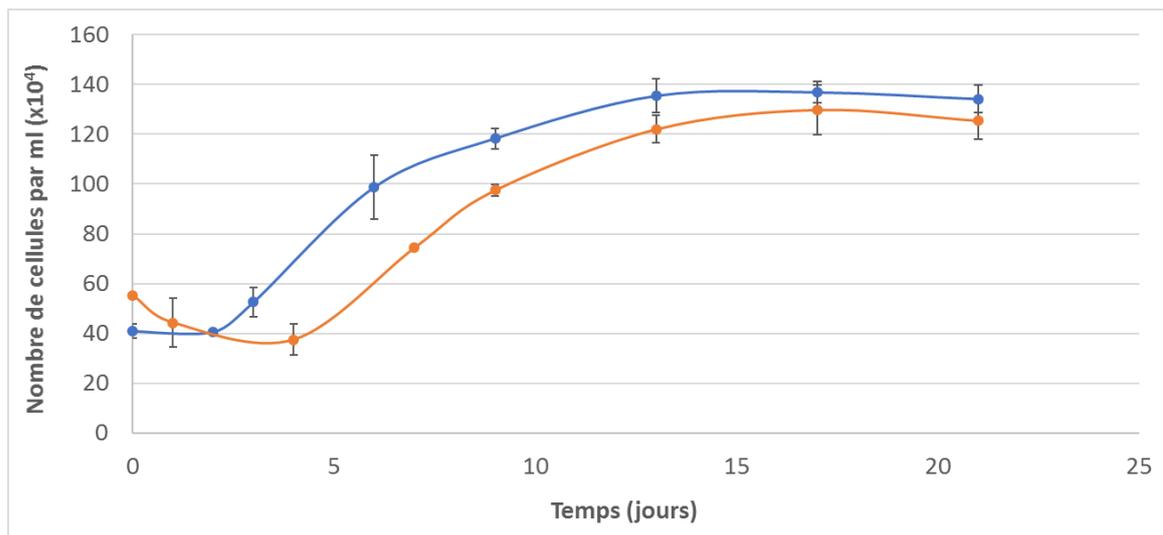


Figure 4. Courbe de croissance d'une culture primaire de *Symbiodinium* spp. fraîchement isolés (SFI). Les cellules sont isolées d'*Exaiptasia pallida* (en bleu) et de *Palythoa* sp. Pc001 (en orange) par homogénéisation, puis à J0 elles sont cultivées dans un milieu F/2. Les écart-types ont été calculés par 3 expériences (cultures, nombre de répliquats).

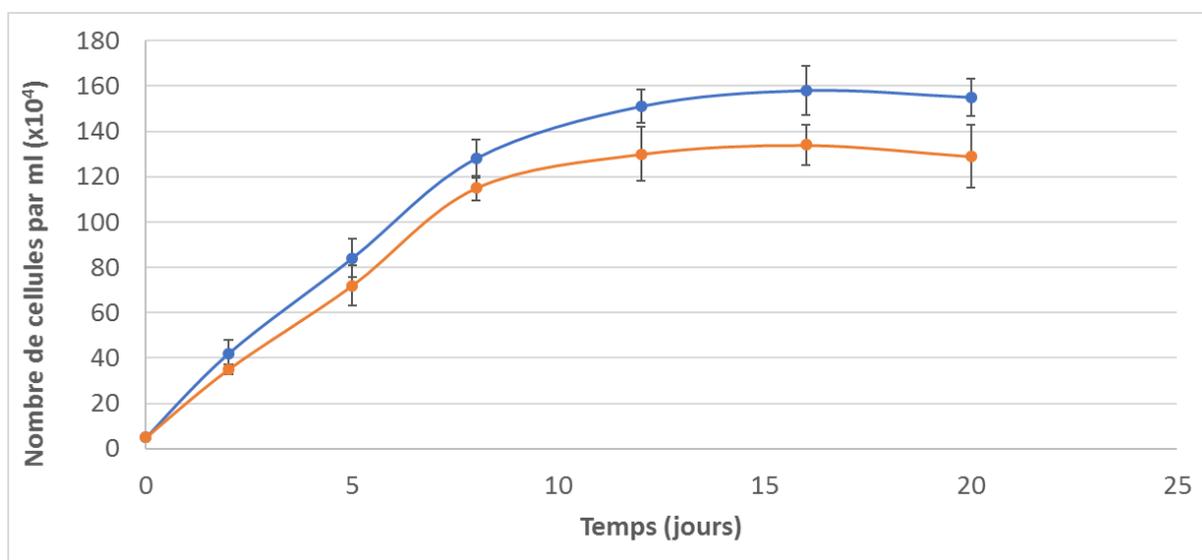


Figure 5. Courbe de croissance de *Symbiodinium* spp. en culture liquide *ex hospite* après 2 pré-cultures préalables dans le milieu F/2. Les cellules ont été isolées d'*Exaiptasia pallida* (bleu) et de *Palythoa* sp. Pc001 (orange). Les écart-types ont été calculés par 3 expériences (cultures, nombre de répliquats).

5.3.3. Cultures par renouvellement de milieu F/2

Les cultures précédentes en erlenmeyers n'étant pas satisfaisantes au niveau de la biomasse atteinte (**Figure 4 et 5**), l'important était de savoir si les éléments du milieu F/2 sont limitants ou pas pour de telles cultures. Pour répondre à la question, des essais en microplaques (cultures de 2 ml) ont été réalisées en milieu F/2 avec des *Symbiodinium* spp. isolés de *Palythoa* sp. Pc001 et repiqués 2 fois. Des ajouts de F/2 concentré, soit au départ (courbe verte), soit à divers temps de

croissance (14 et 29 jours, courbe rouge), ont été effectués comme indiqué dans ‘Matériel et méthodes’, et comme le montrent les profils exposés à la **Figure 6** suivante.

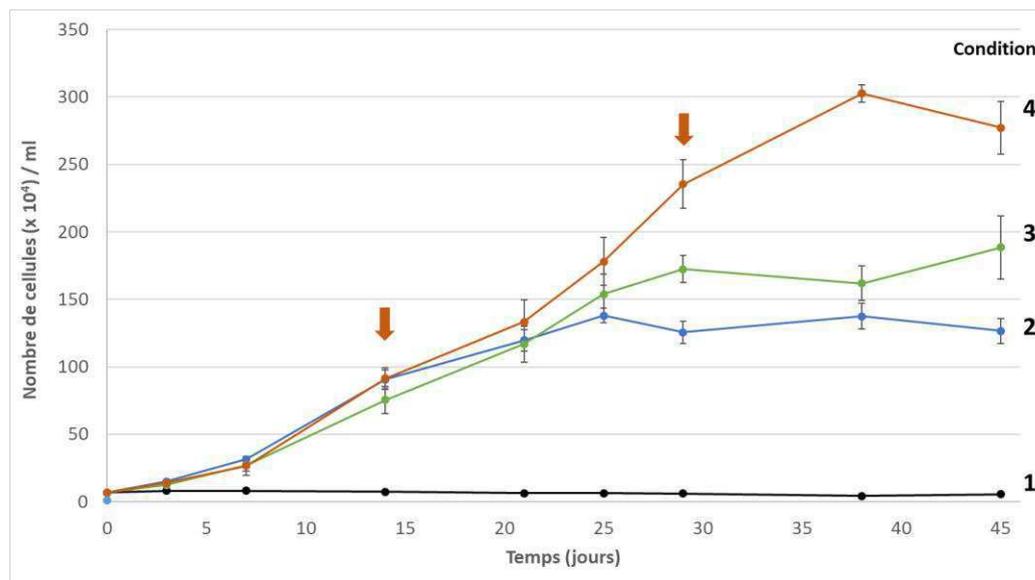


Figure 6. Effet du renouvellement du milieu sur la croissance des *Symbiodinium* spp. en culture *ex hospite* dans un milieu F/2. Des *Symbiodinium* spp. isolés de *Palythoa* sp. Pc001 et précultivés 2 fois, sont re-ensemencées dans un milieu F/2 et cultivés suivant quatre conditions : (1) eau de mer non enrichie (noir) ; (2) à J0, ajout de milieu F/2 1X (bleu) ; (3) à J0, ajout de milieu F/2 3X (vert) ; (4) ajout à J0, ajout de milieu F/2 1X et à J0+14 et à J0+29, (flèches) ajout de milieu F/2 1X (renouvellement 2 fois) (orange). Les barres d'erreur représentent les écart-types de trois cultures (triplicats).

De ces expériences, il ressort très nettement que le renouvellement du milieu à 14 et 29 jours provoque une augmentation notable de la croissance (condition 4, **Figure 6**), et ainsi une biomasse plus importante qui atteint un taux de 3.10^6 cellules/ml, soit 2,3 fois plus que si les cultures n'ont pas leur milieu renouvelé (condition 2).

5.3.4. Culture dans un milieu ASP-8A

Les courbes de croissance sont quasi-identiques à celles réalisées dans un milieu F/2 (non illustré). Le milieu ASP-8A est à la fois compliqué à faire, et il est très cher comparativement au milieu F/2. De plus, les ingrédients sont encore plus instables (oxydation, UV). Il a donc été abandonné pour la suite.

5.3.5. Tentative d'optimisation de la croissance en présence de l'homogénat de l'hôte

Par ajout de différentes quantités d'homogénat de l'hôte dans le milieu, 0, 5, 46 et 173 ng de protéines / ml, les courbes de croissance sont quasi-identiques à celles réalisées dans un milieu F/2 ne contenant pas cet homogénat (non illustré). Cet homogénat ainsi préparé n'a donc aucun effet sur la croissance, son mode de préparation ne permet pour le moment pas d'en tirer des hypothèses.

5.4. La palytoxine est-elle présente dans les *Symbiodinium* isolés, et peut-elle être produite dans les cultures ?

Sur la base de la détection de la toxine par HPLC, il ressort les constats suivants :

(1) aucune trace de PITX n'a été détectée dans les *Symbiodinium* spp. fraîchement isolés (SFI) à partir de *Palythoa* sp. Pc001 et de *Palythoa heliodiscus* (Z07), après extraction par le mélange méthanol/H₂O et concentration.

(2) aucune trace de PITX n'a été détectée dans des cellules de *Symbiodinium* isolées de *Palythoa* sp. Pc001 et cultivées sur un milieu F/2. Les cellules en phase stationnaire sont obtenues par centrifugation de la culture, puis extraites par le mélange MeOH/H₂O.

(3) aucune trace de PITX n'a été détectée dans des cultures de cellules en phase stationnaire et dont l'atmosphère supérieur est remplacé par l'azote pur, c'est-à-dire en condition de 'resting-cell'. Le but était de mimer le milieu symbiotique ou même si l'oxygène est échangé, il l'est en microaérophilie. Par analogie, les rhizobiums fixent l'azote dans leur nodule où l'atmosphère est limitée.

(4) aucune trace de PITX n'a été détectée dans les 2 conditions d'éclairage, lumière et obscurité, sur des cellules aérées à l'air, et en condition de 'resting-cell' anaérobie (sous N₂). Ce qui signifie que la biosynthèse de toxine ne dépend pas non plus du mode d'éclairage (photosynthèse).

(5) aucune trace de PITX n'a été détectée dans des cellules en condition de 'resting-cell' et à pH 4,0.

(6) aucune trace de PITX n'a été détectée dans des cellules en condition de 'resting-cell' et en présence d'homogénat de l'hôte (240 ng de protéines/ml, cf. 'Matériel et méthodes').

(7) aucune trace de PITX n'a été détectée dans des expériences liant les conditions (3), (4), (5) et (6) combinées.

Au vu de ces résultats, les *Symbiodinium* spp. isolés ou cultivés dans nos conditions ne synthétisent pas de PITX en concentration suffisante pour pouvoir être détectée par notre méthode d'analyse.

Sur la base de la détection de la toxine par spectrométrie de masse MALDI-ToF :

L'analyse de SFI par MALDI-ToF n'a pas permis de détecter la présence de PITX sur des cellules entières de *Symbiodinium* fixées avec la matrice de 2,5-DHB (**Figure 7B**). En revanche, la détection d'un ion moléculaire à m/z 2701,853 et correspondant à la PITX $[M + Na]^+$ (Paz *et al.*, 2011) est nettement visible en bombardant le laser sur la plaque et hors des cellules (**Figure 7C**).

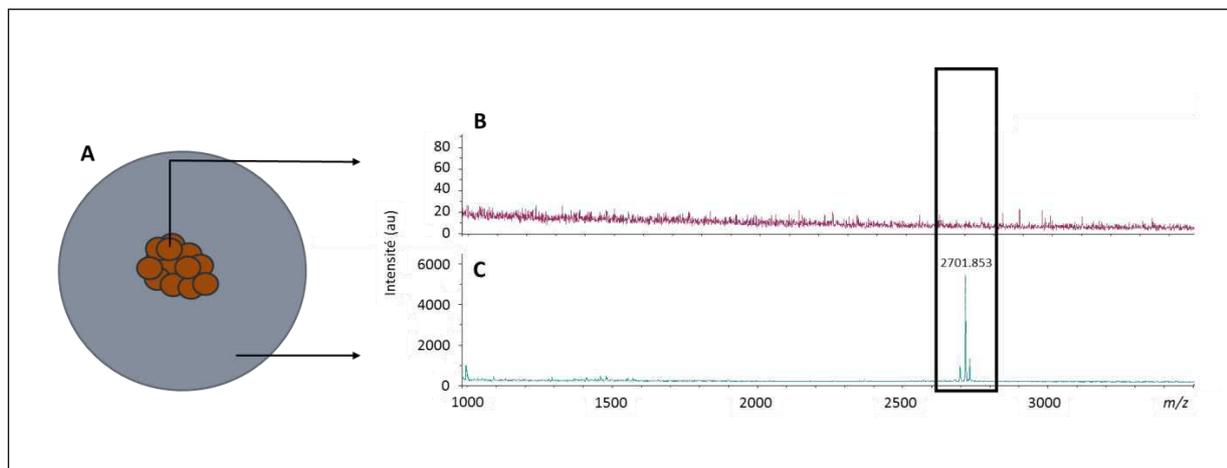


Figure 7. Détection de palytoxine dans des cellules de *Symbiodinium* isolées de *Palythoa* sp. Pc001 par spectrométrie de masse MALDI-ToF. A, représentation schématique d'un puits de plaque MALDI contenant des cellules de *Symbiodinium* en son centre (cercles bruns). Le laser est pulsé sur 2 parties de la cupule, au centre des cellules et légèrement à l'extérieur. B, spectre de masse obtenu sur les cellules entières de *Symbiodinium*. C, spectre de masse obtenu par bombardement du faisceau laser hors cellule (dans la cupule). L'encadré montre l'ion moléculaire monochargé de la palytoxine $[M + Na]^+$ où $M = 2679$ Da.

A première vue, il semble qu'une contamination de PITX provenant de l'hôte *Palythoa*, lors de l'extraction des cellules de *Symbiodinium* soit la seule explication possible, probablement du fait de lavages insuffisants de ces cellules. L'autre hypothèse serait que les *Symbiodinium* spp. synthétiseraient la PITX sans la stocker, ce qui est à mettre en relation avec la non colocalisation de la PITX et des cellules de *Symbiodinium* dans les tissus de *Palythoa* (chapitre 1 'Publication') qui pourrait, entre autre, s'expliquer par le fait que c'est l'hôte qui stocke la toxine et les *Symbiodinium* spp. qui la synthétisent.

6. Discussion

Ce chapitre décrit des recherches exploratoires et qui consistent d'une part à optimiser des cultures *ex hospite* de *Symbiodinium* spp. isolés d'espèces de *Palythoa* toxiques, et d'autre part de savoir si ces cultures sont capables de produire de la PITX et à quelles conditions. A l'heure actuelle, la culture des *Symbiodinium* spp. est possible mais les vitesses de croissance restent faibles pour convenablement aborder des études physiologiques (Blank, 1987; Krueger et Gates, 2012). Durant les expériences, il aurait fallu augmenter le nombre de répliquas, la disponibilité des coraux restant cependant limitante, plusieurs essais à répétition auraient été nécessaires. Des observations intéressantes peuvent cependant être tirées de ces travaux.

6.1. Extraction et culture des *Symbiodinium* spp.

L'obtention de *Symbiodinium* spp. frais est plus rapide et plus simple par la technique d'homogénéisation et centrifugation. Il a également été démontré que les cultures des *Symbiodinium*

spp. est réalisable et qu'elles peuvent être optimisées à conditions d'y adjoindre un cocktail d'antibiotiques et d'oxyde de germanium pour prévenir d'une contamination par des bactéries ou des diatomées respectivement. Un traitement préalable des *Symbiodinium* spp. à pH 4,0 évite les contaminations et constitue une solution efficace et peu coûteuse que celle qui consiste à ajouter des antibiotiques et l'oxyde de germanium. A notre connaissance, un tel traitement acide est utilisé pour la première fois, et a permis d'obtenir des cultures a priori axéniques après contrôle au microscope optique. Une PCR doit être cependant réalisée pour confirmer l'absence de contaminants.

6.2. L'augmentation de la biomasse est limitée par l'appauvrissement du milieu de culture

Le suivi des cultures *ex hospite* des cellules de *Symbiodinium* en milieu liquide F/2 et ASP-8A montre une augmentation du nombre de cellules d'un facteur de 30 sur deux semaines, comparable à la croissance mesurée dans d'autres études (Drainville-Higgins, 2004; Benstein *et al.*, 2014).

Les phases de croissance observées sont similaires à celles de la plupart des cultures batch de microorganismes marins photosynthétiques (Lee *et al.*, 2013). **La phase initiale de latence** montre une vitesse de croissance nulle. Comme chez de nombreux microorganismes marins photosynthétiques, la phase initiale de latence correspond à des ajustements physiologiques d'adaptation à un nouveau milieu nutritif ou à de nouvelles conditions de culture (Lee *et al.*, 2013). Chez les *Symbiodinium* spp., cette phase pourrait également correspondre à une adaptation non symbiotique (hors de l'hôte), et ce à plusieurs niveaux : **(i)** la variation la plus importante concerne le changement de pH du milieu, les *Symbiodinium* spp. passent en effet d'un milieu acide à l'intérieur du symbiosome, pH ~ 4 (Venn *et al.*, 2009; Barott *et al.*, 2015), à un milieu basique qu'est celui de l'eau de mer, généralement compris entre 7,5 et 8,4 (Chester et Jickells, 2012). **(ii)** La composition nutritive des milieux de culture est différente de la composition nutritive à l'intérieur de l'hôte, une multitude d'acides aminés et d'acides gras identifiés chez l'hôte n'entrent pas dans la composition des milieux de culture. Or, ces composés sont connus pour être échangés entre les deux partenaires, les *Symbiodinium* spp. et leur hôte lorsqu'ils vivent en symbiose (pour revue, Gordon et Leggat, 2010). **(iii)** Diverses études ont montré que lorsque les cellules de *Symbiodinium* sont isolées de leur hôte par homogénéisation, il est fréquent qu'elles restent encore enfermées dans leur symbiosome (Trautmann *et al.*, 2001; Kazandjian *et al.*, 2008). Ces symbiosomes pourraient empêcher les cellules de *Symbiodinium* d'entrer en division, et ainsi retarder le début de la croissance dans les cultures : on peut poser supposer qu'un temps est nécessaire pour la dégradation des symbiosomes, ou pour que les *Symbiodinium* spp. sortent de leur symbiosome.

Lorsque les microorganismes photosynthétiques se sont adaptés à leur milieu, ils entrent en **phase de croissance** et se multiplient tant que les éléments nutritifs et l'énergie lumineuse sont largement disponibles. A cette phase s'ensuit une **phase stationnaire** qui correspond à un milieu

qui s'appauvrit (Lee *et al.*, 2013). Nos résultats indiquent que la phase stationnaire survient généralement après 12 – 15 jours de culture en batch et en milieu F/2, mais qu'elle peut également survenir bien plus tard (plus de 35 jours, voir **Figure 6**, condition 4) lorsque le milieu est régulièrement renouvelé. Dans ce dernier cas, la biomasse augmente considérablement de 43 fois et atteint une densité de 302.10^4 cellules/ml, donc une augmentation notable par rapport aux expériences précédentes (**Figure 5**). Il est observé que des cultures ayant reçu une triple dose de solution mère (50X) de F/2 à J0 (**Figure 6**, condition 3) évoluent vers une phase stationnaire plus rapidement mais donne une biomasse finale plus faible (188.10^4 cellules/ml, soit 1,6 fois moins que la condition 4) que des cultures renouvelées en plusieurs fois, à J0+14 et J0+29 par une seule dose (1X). Ces observations indiquent que la phase de croissance des *Symbiodinium* spp. est limitée par la disponibilité des éléments nutritifs du milieu, en particulier les vitamines qui sont généralement fragiles au cours du temps : biotine, thiamine et vitamine B₁₂ (cyanocobalamine), composés connus pour être sensibles à la lumière, à la température et à l'oxydation, et donc aux temps de culture longs. Ces observations vont dans le même sens que celles de Drainville-Higgins (2004) qui relatent qu'un milieu F/2 enrichi par une solution de vitamines favorise d'avantage la croissance des *Symbiodinium* spp. *ex hospite*, par rapport à un milieu F/2 non enrichi.

Actuellement, il n'existe pas de milieu de culture optimisé spécifiquement pour les *Symbiodinium* spp. qui sont cultivés en routine dans des milieux généralement développés pour la culture d'organismes unicellulaires photosynthétiques. Or, il semblerait que les *Symbiodinium* spp. aient besoin de milieux encore plus riches, l'étude récente de Rodriguez *et al.* (2016) montre en effet que la croissance de *Symbiodinium kawagutii* en culture *ex hospite* est fortement augmentée lorsque le milieu est enrichi par des traces de métaux, principalement le Fe ajouté à 1,25 nM, et dans une moindre mesure en Cu, Zn et Mn. Ces métaux jouent le rôle de cofacteurs pour les superoxydes dismutases (SOD) (Stallings *et al.*, 1984; Bertini *et al.*, 1998) présentes chez les *Symbiodinium* spp. (Krueger *et al.*, 2015). Les SOD sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes (O₂⁻) en H₂O₂ qui lui est moins agressif. Les SOD jouent un rôle fondamental car l'activité photosynthétique des chloroplastes des *Symbiodinium* spp. engendrent des radicaux libres dommageables pour ces microorganismes (Dykens *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2005; Suggett *et al.*, 2008). Les métaux à l'état de traces sont aussi utilisés par d'autres enzymes cellulaires, comme celles entrant dans les réactions métaboliques liées à la photosynthèse (Raven *et al.*, 1999; Sunda, 2012; Twining et Baines, 2013).

6.3. La biosynthèse de palytoxine est-elle régie par les *Symbiodinium* spp.

Au cours des expérimentations, la présence de PITX n'a pas été détectée sur les cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolées, quelque soit l'espèce. Cependant, la toxine a été détectée sur la plaque d'analyse MALDI, autour des cellules. S'agit-il d'un artefact, d'un reliquat de PITX résiduelle du fait de cellules mal rincées ? Après avoir travaillé sur des *Symbiodinium* spp. fraîchement isolés de leur hôte, la stratégie s'est poursuivie par l'étude de leur culture. Si les

cultures ont été possibles, aucune trace de toxine n'a pu être détectée. Ces observations peuvent s'interpréter par plusieurs hypothèses :

(1) Les *Symbiodinium* spp. ne jouent aucun rôle dans la biosynthèse de la PITX. La biosynthèse s'effectuerait par d'autres symbiotes comme les bactéries. Frolova *et al.* (2000) ont en effet détecté des composés ayant des propriétés semblables à celles de la PITX chez des bactéries Gram négatives et isolées à partir de *Palythoa* sp. en utilisant des anticorps anti-PITX. Ces bactéries appartiennent aux genres *Aeromonas* et *Vibrio*. De leur côté, Seemann *et al.* (2009) ont isolé des bactéries ayant une activité hémolytique semblable à celle de la PITX à partir de *Palythoa caribaeorum*. Une autre hypothèse serait que la PITX pourrait être biosynthétisée directement par certaines espèces de *Palythoa*. Le chapitre 2 précédent et la littérature montre en effet que de la PITX et/ou des analogues sont systématiquement identifiés dans tous les échantillons d'une même espèce de *Palythoa*, même si les concentrations peuvent fortement varier. Par exemple, la PITX a été détectée dans tous les échantillons de *Palythoa heliodiscus* étudiés dans ce mémoire, Z03, Z04 et Z07, ainsi que dans l'étude de Deeds *et al.* (2011) ; les variations de concentration et la présence d'analogues dans les échantillons demeurent sans explication, et pourraient provenir des conditions environnementales ou de la variation génétique intraspécifique.

(2) Les *Symbiodinium* spp. synthétisent la PITX qui est immédiatement excrétée. De plus, la PITX est suggérée être présente dans ces cellules en quantités très faibles et non détectables, suite aux traces décelées dans la cupule du spectromètre de masse MALDI. De même, elle n'a pas été identifiée dans les milieux de culture du fait de son instabilité en milieu aqueux : il a été montré dans ce travail de thèse que la toxine doit être impérativement être conservée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 4°C et à l'abri de la lumière, et que dans ces conditions, elle est stable pendant au moins une année. La PITX ne pourrait pas s'accumuler en grandes concentrations chez les *Symbiodinium* spp. et cette capacité à s'accumuler serait un critère unique chez certaines espèces de *Palythoa*, comme *Palythoa heliodiscus*.

(3) Plusieurs microorganismes interviennent dans la biosynthèse de la PITX, et les cellules de *Symbiodinium* isolées ou en culture *ex hospite* ne peuvent réaliser à elles seules cette biosynthèse. Et pourtant, les *Symbiodinium* spp. semblent être directement responsables de la biosynthèse de zooxanthellatoxines A et B, des molécules polycétidiques de poids moléculaire équivalent mais dont la structure est très différente de celle de la PITX (Nakamura *et al.*, 1993; Onodera *et al.*, 2004; Drainville-Higgins, 2004).

(4) C'est l'hôte *Palythoa* qui induit par un signal chimique la biosynthèse de PITX chez les *Symbiodinium* spp. Ainsi, les symbiotes cultivés *ex hospite* ne sont plus sous l'influence de l'hôte et ne déclenchent pas les mécanismes de cette biosynthèse. Cette hypothèse a déjà été proposée par Frolova *et al.* (2000) qui ont observé que chez des bactéries isolées de *Palythoa* sp., la capacité à produire des composés aux propriétés semblables à celles de la PITX était rapidement perdue lorsque ces bactéries étaient cultivées *ex hospite*. Ils conclurent finalement que la biosynthèse de PITX chez ces bactéries était induite par l'hôte *Palythoa*. Le contrôle de la biosynthèse de métabolites chez les *Symbiodinium* spp. par l'intermédiaire de molécules chimiques appelées 'host

factors' et produite par l'hôte a été montré à plusieurs reprises. En effet, l'augmentation de l'activité photosynthétique et l'induction de la biosynthèse de glycérol par des *Symbiodinium* spp. fraîchement isolés de leur hôte peut être induite en ajoutant de l'homogénat (broyat) de Cnidaria dans les cultures (Muscatine, 1967; Trench, 1971a et b; Battey et Patton, 1987; Grant *et al.*, 1997). Ces host factors pourraient être des acides aminés classiques (Gates *et al.*, 1995; Withers *et al.*, 1998; Gates *et al.*, 1999; Biel *et al.*, 2007) ou particuliers comme la taurine, ou encore des acides aminés ramifiés comme les mycosporine-likes (Wang et Douglas, 1997; Cook et Davy, 2001). Cependant, dans nos expériences, l'ajout d'homogénat d'hôte dans les cultures *ex hospite* de *Symbiodinium* spp. n'a pas permis de déclencher ou d'engendrer la biosynthèse de PITX dans ces cultures après 24 h.

(5) Les paramètres de culture utilisés ici ne sont pas adaptés à la biosynthèse de PITX par les *Symbiodinium* spp.

7. Perspectives

Le choix stratégique de ce chapitre s'est porté sur les *Symbiodinium* spp. Il aurait été cependant plus rigoureux d'adopter une stratégie plus large et à plus long terme, et de considérer à la fois les *Symbiodinium* spp. et les bactéries, voire les virus, comme responsables de la biosynthèse de la toxine dans un système bi- ou tripartite à redéfinir. Par exemple, une étude de la biodiversité bactérienne par les techniques moléculaires (métagénomique, NGS) sur plusieurs populations de *Palythoa* spp., producteurs ou non producteurs de PITX, est une recherche à mettre en place dans un futur proche ; celle-ci demande un grand nombre de polypes disponibles, et surtout des compétences en biodiversité et en bioinformatique.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions

Suite à la découverte récente des propriétés anticancéreuses de la PITX (Görögh *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2013), les objectifs de ce travail visaient à rechercher un procédé pour produire cette toxine par des coraux mous. Sa commercialisation par la société japonaise Wako Pure Chemical Industries est très limitée en quantités puisque des kg de polypes de sont nécessaires pour quelques mg, et en plus elle est très chère (400 \$ les 100 µg).

L'objectif à plus long terme de la société Coral Biome est de pouvoir caractériser précisément son mode d'action, et d'initier des études précliniques contre le cancer. A l'heure actuelle, on ne sait rien sur sa biosynthèse, si ce n'est que les dinoflagellés qui vivent en symbiose avec les coraux mous sont soupçonnés d'en être à l'origine.

Découverte de *Palythoa* sp. Pc001

La PITX n'est pas un peptide mais possède une structure polycétidique, ce qui est bien plus compliqué pour élucider les mécanismes d'assemblage de cette molécule au sein des *Palythoa* spp. Ces recherches ont été orientées dès le départ par la découverte, dans les aquariums de la société Coral Biome, d'une espèce non décrite de corail mou, *Palythoa* sp. Pc001 (Z05), et qui possède des concentrations de PITX jamais égalées à ce jour, $2,22 \pm 0,41$ mg de PITX par gramme de matière fraîche de corail. Les données morphologiques et moléculaires de ce spécimen le place comme une espèce apparentée à *Palythoa* aff. *clavata*. Il vit en symbiose avec un *Symbiodinium* de clade C qui contient lui des pigments typiques des dinoflagellés, dont majoritairement la péricidine et la fucoxanthine. La PITX purifiée à partir de cette espèce possède une activité cytotoxique importante envers les cellules cancéreuses (IC₅₀ de l'ordre de la picomolaire), comparativement à des cellules non cancéreuses (IC₅₀ de l'ordre de la micromolaire), donc d'un facteur 10⁶ fois plus active. Par ailleurs, l'hypothèse que la sous-unité α de la pompe NaK ne serait pas la seule cible de la PITX est émise.

Localisation de la toxine dans l'épiderme

Pour tenter de comprendre les mécanismes de biosynthèse de la PITX chez *Palythoa* sp. Pc001, la description de la localisation de la toxine au sein des tissus du corail a été réalisée en utilisant des techniques d'imagerie couplée à la spectrométrie de masse, ce qui n'avait jamais été abordé auparavant. Il en ressort que les plus grandes concentrations de PITX sont situées dans des régions histologiques où très peu de *Symbiodinium* spp. sont présents, principalement dans l'épiderme qui forme le corps du polype et le pharynx, donc en périphérie externe et interne. La question de la biosynthèse et du stockage de cette molécule se pose alors à nouveau, notamment au regard du rôle longtemps supposé des *Symbiodinium* spp.: (i) la PITX migrerait, malgré sa taille, à

travers la membrane du symbiosome et celle des cellules hôtes par un système de transport actif, et (ii) un système de stockage spécifique serait présent au sein de ce *Palythoa* sp. toxique.

Vers la recherche d'autres *Palythoa* spp. producteurs de PITX, et une biodiversité complexe

Nous nous sommes mis à la recherche d'autres producteurs de PITX parmi les Zoantharia, en s'appuyant sur des études de biodiversité. Ainsi, l'étude phylogénétique de 29 Zoantharia a montré que, comme déjà décrit (Reimer *et al.*, 2004; Reimer *et al.*, 2006a), les espèces des genres *Palythoa* et *Zoanthus* présentent une plasticité intraspécifique importante au niveau des patrons de couleur et de la structure des colonies. Les raisons génétiques, environnementales ou symbiotiques liées à ces changements phénotypiques demeurent cependant mal connues. Il était donc nécessaire d'identifier les *Palythoa* spp. et les *Zoanthus* spp. sur la base de la génétique. La combinaison des marqueurs moléculaires COI et ITS-rDNA s'est montrée efficace pour distinguer les complexes d'espèces sœurs au sein de ces deux genres. En effet, la comparaison des arbres basés sur COI et ITS-rDNA a permis de déterminer à quel complexe d'espèces sœurs appartiennent tous les échantillons étudiés. Ce qui n'aurait pas été possible en utilisant un seul marqueur car l'arbre phylogénétique COI n'a pas permis de distinguer les complexes d'espèces sœurs dans le genre *Palythoa* et l'arbre phylogénétique ITS-rDNA a montré une paraphylie des *Zoanthus* spp. en raison de l'existence d'un allèle 'B' chez *Zoanthus sansibaricus*. Cependant, l'identification des espèces sœurs Caraïbes / Indo-Pacifique au sein des complexes n'a été possible que chez quelques *Zoanthus* spp., en raison d'une évolution lente des gènes et d'une allopatrie relativement récente des populations de Zoantharia des deux bassins océaniques. Ceci souligne l'importance de connaître l'origine des échantillons pour pouvoir les identifier avec plus de précision. Par la suite, l'étude de la relation entre la biosynthèse de PITX et la position phylogénique des *Palythoa* spp. a été entreprise. Il a été montré, par exemple, que Z03, Z04 et Z07, identifiés génétiquement comme appartenant au complexe *Palythoa variabilis* / *heliodiscus* et provenant du même bassin océanique, fournissent des quantités de PITX différentes, cette variabilité en quantité de toxine produite semble plutôt corrélée au morphotype du *Palythoa* sp. ou à l'holobionte.

Un développement industriel et pharmacologique doit nécessairement s'appuyer sur des *Palythoa* spp. hautement producteurs en PITX, tout en s'assurant une bonne reproductibilité de la qualité et de la quantité des molécules produites. Or, les résultats ont clairement montré que l'identification génétique et l'origine des Zoantharia ne sont pas des critères suffisants pour s'assurer de bons rendements en PITX. Il est donc nécessaire, au sein des complexes hautement producteurs de PITX (*Palythoa* aff. *clavata* / sp. 'sakurajimensis' et *Palythoa variabilis* / *heliodiscus*), d'identifier des morphotypes produisant de grandes quantités de toxine, en s'assurant qu'il s'agisse d'une toxine de qualité (activité anticancéreuse et taux de pureté élevés), puis de les multiplier en bassin ou en mer.

Les conditions de culture sont un autre paramètre d'importance car elles pourraient influencer sur la production et la qualité de la PITX produite par les *Palythoa* spp. En effet, Rossi *et al.* (2010)

ont trouvé 4% de PITX-b dans la PITX de chez Wako. Pourtant, nos travaux n'y ont décelé aucune trace de PITX-b, alors que l'échantillon provient de la même firme (Wako) et de la même espèce, *Palythoa tuberculosa*. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'un *Palythoa* sp. est capable de produire différentes molécules de PITX, comme Deeds *et al.* (2011) l'ont observé dans différents lots extraits de *Palythoa heliodiscus* et qui contiennent soit de la PITX, soit de la déoxy-PITX en quantités même supérieures à nos rendements actuels. La biosynthèse de différents analogues de PITX pourrait donc être liée aux conditions environnementales (récolte en mer) ou de culture en aquarium. D'ailleurs, des observations similaires ont été faites chez différentes souches d'*Ostreopsis* cf. *ovata* : une souche provenant des côtes méditerranéennes françaises produit les ovatoxines -a à -e (Brissard *et al.*, 2014), une souche d'Italie les ovatoxines -a à -f (Ciminiello *et al.*, 2012), et une autre souche du Japon les ovatoxines -a, -d et -e (Uchida *et al.*, 2013).

La culture des *Symbiodinium* spp. est-elle possible ?

Dans les cultures *ex hospite*, les *Symbiodinium* spp. doivent se réadapter à un mode de vie non symbiotique (hors de l'hôte). Lors de leur mise en culture, les *Symbiodinium* spp. rencontrent trois problèmes à surmonter :

(i) la variation la plus importante concerne le changement de pH (passage de 4 dans le symbiosome à ± 8 dans l'eau de mer) et d'ions calcium (concentration faible dans les cellules animales et élevée dans l'eau de mer)

(ii) La composition nutritive des milieux de culture est différente de celle de l'intérieur de l'hôte (notamment, les acides aminés et les acides gras).

(iii) Les *Symbiodinium* spp. isolés de leur hôte restent enfermés dans leur symbiosome qui pourrait les empêcher d'entrer en division et retarder la croissance des cultures.

L'obtention de *Symbiodinium* spp. par homogénéisation de tissus de *Palythoa* spp. et centrifugation semble la technique la plus adéquate pour produire des inocula cultivables. Il a été montré que la culture est satisfaisante et sans risque de contamination lorsqu'elle est réalisée dans un milieu F/2 et que soit l'inoculum a été préalablement incubé dans un milieu acide, soit qu'un cocktail d'antibiotiques et de l'oxyde de germanium sont ajoutés au milieu.

La culture de *Symbiodinium* spp. issus d'espèces de *Palythoa* producteurs de PITX a amené des résultats intéressants. Il a été observé que l'augmentation de la biomasse est limitée par l'appauvrissement du milieu de culture, et qu'une augmentation de cette biomasse d'un facteur 20 à 30 est possible en re-enrichissant le milieu 2 fois durant la culture. La biomasse produite reste cependant faible, et la durée de culture lente (45 jours), car les vitamines du milieu sont sensibles à la lumière et à la température à trop long terme. Un système automatique de culture renouvelée en permanence devrait donc être dorénavant utilisé en routine pour permettre d'accroître la biomasse.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de milieu de culture spécifique pour les *Symbiodinium* spp. qui sont cultivés dans des milieux développés pour la culture d'organismes unicellulaires photosynthétiques. Il semblerait, suite à nos observations, que les *Symbiodinium* spp.

aient besoin de milieux plus riche. Pour aller dans ce sens, une étude récente montre que la croissance de *Symbiodinium kawagutii* est fortement augmentée dans un milieu enrichi par des traces de métaux, dont principalement le Fe à 1,25 nM (Rodriguez *et al.*, 2016). Pour augmenter la biomasse des cultures *ex hospite* de *Symbiodinium* spp. et s'en servir comme modèles d'étude (physiologie, métabolisme), il serait intéressant, à ce stade, de combiner nos résultats sur le renouvellement du milieu de culture (tous les 15 jours) avec l'addition de traces de métaux (Fe > Cu, Zn et Mn) (Rodriguez *et al.*, 2016).

La biosynthèse de palytoxine est-elle régie par les *Symbiodinium* spp. ? La réponse reste encore en suspens. La présence de PITX n'a été détectée ni dans des cellules de *Symbiodinium* fraîchement isolés, ni dans leur culture, cela quel que soit l'espèce de *Palythoa* dont elles ont été extraites. Ce travail relate pourtant la présence de toxine autour des cellules de *Symbiodinium* lorsque celles-ci sont déposées dans une cupule (plaque de spectromètre MALDI). Nos résultats ne peuvent dire s'il s'agit d'un reliquat de PITX résiduelle provenant de l'hôte *Palythoa* ou d'une biosynthèse en faible quantité au cours du temps par les *Symbiodinium* spp.

Perspectives

Plusieurs points relatifs à la production de PITX sont évoqués à la suite :

1) Le *Palythoa* sp. Pc001 a été utilisé pour la mise au point d'un procédé d'extraction de la PLTX en utilisant des solvants organiques, la séparation sur un support sélectif, et des évaporations successives. Ce procédé a permis de disposer d'un stock de toxine suffisant pour étudier et préciser ses activités anticancéreuses. La production de PITX sur cette base peut continuer à se faire.

2) La toxine purifiée étant instable sous forme solide à 4°C, elle l'est encore plus à -20°C et à -80°C ; son stockage dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 4°C est idéal puisqu'elle a pu être conservée au moins pendant 1 an sans dégradation observée par HPLC (aire des pics). Cependant, le DMSO n'est autorisé qu'en faible quantité pour les essais cliniques. Il faut donc trouver un autre solvant liquide et injectable sans conséquences pour la santé humaine, afin de conserver la PITX au mieux et de pouvoir l'utiliser directement pour les essais précliniques.

3) Les études de biodiversité en combinaison avec la détermination de la teneur en PITX dans les espèces, a permis de sélectionner 3 *Palythoa* intéressants dont *Palythoa* sp. Pc001, pour envisager une production à grande échelle. Cependant, ce spécimen provient du commerce aquariophile et son origine géographique précise est inconnue, il est donc actuellement impossible de le récolter en quantités importantes dans le milieu naturel pour soit produire de grandes quantités industrielles de PITX soit l'utiliser pour 'ensemencer' de grands espaces de culture. Pour le moment, *Palythoa* aff *clavata* est le candidat le plus approprié car il est abondant sur les côtes de Floride et sa production peut être augmentée *via* des fermes marines.

D'autres perspectives plus académiques sont également intéressantes :

Le rôle des *Symbiodinium* spp. dans la biosynthèse de la PITX reste en suspens, tout comme celui des bactéries. Le temps et la technicité restant limités, il aurait été plus rigoureux d'organiser une stratégie plus large et de considérer à la fois les *Symbiodinium* spp., les bactéries, et l'hôte *Palythoa*, comme responsables de la biosynthèse de la toxine dans un système multi-composantes à décortiquer pas à pas. Par exemple, une étude de la biodiversité bactérienne par les techniques moléculaires modernes (métagénomique, pyroséquençage, ...) sur deux populations de *Palythoa* spp., producteurs ou non producteurs de PITX, est une recherche à mettre en place dans un futur proche. Ces travaux demanderont un grand nombre de polypes, et surtout des compétences en biodiversité et en bioinformatique.

D'autres études sont nécessaires pour déterminer le site de fixation de la PITX et les voies de signalisation déclenchées. Les observations faites dans ce travail soulèvent d'autres questions importantes : est-ce que l'action de la PITX sur les cellules cancéreuses interfère avec le métabolisme du glucose tout en réduisant le taux d'ATP ? Est-ce que le taux d'ATP dans les cellules cancéreuses est suffisant pour maintenir leur viabilité après incubation par des doses infimes (picomolaires) de PITX ? En particulier, il serait très utile d'étudier les voies de signalisation simultanément avec (i) le taux d'ATP dans les cellules cancéreuses traitées ou non par la PITX, avec (ii) des analyses transcriptomiques.

Pour effectuer une description plus précise de la localisation de la PITX dans les cellules d'une espèce de *Palythoa* et déterminer si les *Symbiodinium* spp. *in hospite* contiennent de la PITX, il devient nécessaire de faire de l'imagerie au moyen d'un microscope confocal et d'utiliser un anticorps anti-PITX pour révéler l'emplacement de la toxine. Durant ma thèse, ces expériences ont été envisagées. En effet, j'ai mis en place un partenariat avec l'équipe du Dr A. Tubaro (département des sciences de la vie, Université de Trieste, Italie) qui possède l'anticorps monoclonal anti-PITX 73D3. Des échantillons de polypes congelés ont été envoyés à cette équipe, mais la manipulation n'a pu aboutir pour des problèmes techniques liés à l'autofluorescence des coraux. Cependant, j'ai également mis en place un partenariat avec le Dr M. Poli de l'institut de recherche médicale sur les maladies infectieuses (Armée américaine) afin d'obtenir l'anticorps 73D3 pour effectuer le marquage de coupes histologiques de *Palythoa* spp., et les analyser avec un microscope confocal ; les procédures administratives sont en cours.

Enfin, l'origine de la biosynthèse de la PITX pourrait être mise à jour en utilisant la génétique inverse qui consiste à modifier l'activité d'un gène cible pour analyser les conséquences phénotypiques, en l'occurrence, la biosynthèse de PITX.

Références bibliographiques

- Alcala, A.C. (1983). Recent cases of crab, cone shell, and fish intoxication on Southern Negros Island, Philippines. *Toxicon* 21, 1–3.
- Alcala, A.C., Alcala, L.C., Garth, J.S., Yasumura, D. et Yasumoto, T. (1988). Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 26, 105–107.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Milandri, A. et Diogène, J. (2011). Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 57, 390–399.
- Antolovic, R., Brüller, H.-J., Bunk, S., Linder, D. et Schoner, W. (1991). Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of Na⁺/K⁺-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur. J. Biochem.* 199, 195–202.
- Aratake, S., Taira, Y., Fujii, T., Roy, M.C., Reimer, J.D., Yamazaki, T. et Jenke-Kodama, H. (2016). Distribution of palytoxin in coral reef organisms living in close proximity to an aggregation of *Palythoa tuberculosa*. *Toxicon* 111, 86–90.
- Armstrong, R.W., Beau, J.M., Cheon, S.H., Christ, W.J., Fujioka, H., Ham, W.H., Hawkins, L.D., Jin, H. et Kang, S.H. (1989). Total synthesis of a fully protected palytoxin carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7525–7530.
- Artigas, P. et Gadsby, D.C. (2003). Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 501–505.
- Artigas, P. et Gadsby, D.C. (2004). Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J. Gen. Physiol.* 123, 357–376.
- Artigas, P. et Gadsby, D.C. (2006). Ouabain affinity determining residues lie close to the Na/K pump ion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12613–12618.
- Arystarkhova, E., Wetzel, R.K., Asinowski, N.K. et Sweadner, K.J. (1999). The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 33183–33185.
- Attaway, D.H. et Ciereszko, L.S. (1974). Isolation and partial characterization of Caribbean palytoxin. *Proc. Second Int. Coral Reef Symp. Gt. Barrier Reef Community Brisb.*
- Azam, F. et Volcani, B.E. (1981). Germanium-silicon interactions in biological systems. In *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*, (New-York, Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 43–67.
- Babcock, R.C., Bull, G.D., Harrison, P.L., Heyward, A.J., Oliver, J.K., Wallace, C.C. et Willis, B.L. (1986). Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Mar. Biol.* 90, 379–394.
- Banaszak, A., LaJeunesse, T.C. et Trench, R.K. (2000). The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249, 219–233.
- Barott, K.L., Venn, A.A., Perez, S.O., Tambutté, S. et Tresguerres, M. (2015). Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 607–612.
- Bathey, J.F. et Patton, J.S. (1987). Glycerol translocation in *Condylactis gigantea*. *Mar. Biol.* 95, 37–46.
- Beaugé, L.A. et Glynn, I.M. (1979). Occlusion of K ions in the unphosphorylated sodium pump. *Nature* 280, 510–512.
- Béguin, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, A., Claeys, D., Horisberger, J.D. et Geering, K. (1997). The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16, 4250–4260.
- Bellocci, M., Ronzitti, G., Milandri, A., Melchiorre, N., Grillo, C., Poletti, R., Yasumoto, T. et Rossini, G.P. (2008a). A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. *Anal. Biochem.* 374, 48–55.
- Bellocci, M., Ronzitti, G., Milandri, A., Melchiorre, N., Grillo, C., Poletti, R., Yasumoto, T. et Rossini, G.P. (2008b). Addendum to “A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line” [*Anal. Biochem.* 374 (2008) 48–55]. *Anal. Biochem.* 381, 178.
- Benstein, R.M., Çebi, Z., Podola, B. et Melkonian, M. (2014). Immobilized growth of the peridinin-producing marine dinoflagellate *Symbiodinium* in a simple biofilm photobioreactor. *Mar. Biotechnol.* 16, 621–628.
- Béress, L., Zwick, J., Kolkenbrock, H.J., Kaul, P.N. et Wassermann, O. (1983). A method for the isolation of the Caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zooanthid) *Palythoa caribaeorum*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 21, 285–290.
- Bertini, I., Manganl, S. et Viezzoli, M.S. (1998). Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. *Adv. Inorg. Chem.* 45, 127–250.
- Biel, K.Y., Gates, R.D. et Muscatine, L. (2007). Effects of free amino acids on the photosynthetic carbon metabolism of symbiotic dinoflagellates. *Russ. J. Plant Physiol.* 54, 171–183.

- Bignami, G.S. (1993).** A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 31, 817–820.
- Blank, R.J. (1987).** Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* 94, 143–155.
- Boscolo, S., Pelin, M., De Bortoli, M., Fontanive, G., Barreras, A., Berti, F., Sosa, S., Chaloin, O., Bianco, A., Yasumoto, T. et al. (2013).** Sandwich ELISA assay for the quantitation of palytoxin and its analogs in natural samples. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2034–2042.
- Bou-Abdallah, F., Chasteen, N.D. et Lesser, M.P. (2006).** Quenching of superoxide radicals by green fluorescent protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1760, 1690–1695.
- Branle, F., Lefranc, F., Camby, I., Jeuken, J., Geurts-Moespot, A., Sprenger, S., Sweep, F., Kiss, R. et Salmon, I. (2002).** Evaluation of the efficiency of chemotherapy in in vivo orthotopic models of human glioma cells with and without 1p19q deletions and in C6 rat orthotopic allografts serving for the evaluation of surgery combined with chemotherapy. *Cancer* 95, 641–655.
- Brescianini, C., Grillo, C., Melchiorre, N., Bertolotto, R., Ferrari, A., Vivaldi, B., Icardi, G., Gramaccioni, L., Funari, E. et Scardala, S. (2006).** *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Eurosurveillance* 11, pii=3040.
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lémée, R., Chomérat, N., Hess, P. et Amzil, Z. (2014).** Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. *Mar. Drugs* 12, 2851–2876.
- Brissard, C., Hervé, F., Sibat, M., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z. et Herrenknecht, C. (2015).** Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification. *J. Chromatogr. A* 1388, 87–101.
- Buddemeier, R.W. et Fautin, D.G. (1993).** Coral bleaching as an adaptive mechanism. *BioScience* 43, 320–326.
- Burnett, W. (2002).** Longitudinal variation in algal symbionts (zooxanthellae) from the Indian Ocean zoanthid *Palythoa caesia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 234, 105–109.
- Burnett, W.J., Benzie, J.A.H., Beardmore, J.A. et Ryland, J.S. (1994).** High genetic variability and patchiness in a common Great Barrier Reef zoanthid (*Palythoa caesia*). *Mar. Biol.* 121, 153–160.
- Burnett, W.J., Benzie, J.A.H., Beardmore, J.A. et Ryland, J.S. (1995).** Patterns of genetic subdivision in populations of a clonal cnidarian, *Zoanthus coppingeri*, from the Great Barrier Reef. *Mar. Biol.* 122, 665–673.
- Burnett, W.J., Benzie, J.A.H., Beardmore, J.A. et Ryland, J.S. (1997).** Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. *Coral Reefs* 16, 55–68.
- Byler, K.A., Carmi-Veal, M., Fine, M. et Goulet, T.L. (2013).** Multiple symbiont acquisition strategies as an adaptive mechanism in the coral *Stylophora pistillata*. *PLoS ONE* 8. (3): e59596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059596>
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y. et Grima, E.M. (2007).** Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol. Adv.* 25, 176–194.
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.J.G., Mirón, A.S., Belarbi, E.H., Chisti, Y. et Grima, E.M. (2011).** Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga. *Process Biochem.* 46, 936–944.
- Carballeira, N.M., Emiliano, A., Sostre, A., Restituyo, J.A., González, I.M., Colón, G.M., Tosteson, C.G. et Tosteson, T.R. (1998).** Fatty acid composition of bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* and with Caribbean *Palythoa* species. *Lipids* 33, 627–632.
- Cariton, J.T. et Geller, J.B. (1993).** Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* 261, 78–82.
- Carlos, C., Torres, T.T. et Ottoboni, L.M.M. (2013).** Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Sci. Rep.* 3, 1624.
- Carmen Louzao, M., Fraga, M. et Vilariño, N. (2015).** Pharmacology of palytoxins and ostreocins. In *Phycotoxins*, L.M. Botana, and A. Alfonso, eds. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 113–135.
- Catala-Stucki, R. (1961).** Fluorescence effects from corals irradiated with ultra-violet rays. *Int. Zoo Yearb.* 2, 75–75.
- Cha, J.K., Christ, W.J., Finan, J.M., Fujioka, H., Kishi, Y., Klein, L.L., Ko, S.S., Leder, J., McWhorter, W.W., Pfaff, K.-P. et al. (1982).** Stereochemistry of palytoxin. Part 4. Complete structure. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7369–7371.
- Chesher, R.H. (1968).** Transport of marine plankton through the Panama canal. *Limnol. Oceanogr.* 13, 387–388.
- Chesher, R.H. (1972).** The status of knowledge of Panamanian echinoids, 1971, with comments on other echinoderms. *Bull. Biol. Soc. Wash.* 2, 139–158.
- Chester, R. et Jickells, T.D. (2012).** Marine geochemistry (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons).

- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C. et Melchiorre, N. (2008). Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 111–120.
- Ciminiello, P., Dell'aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Florio, C., Lorenzon, P., De Bortoli, M. et al. (2009). Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1851–1859.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F. et Pistocchi, R. (2010). Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 24, 2735–2744.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M. et Tartaglione, L. (2011). LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. *Toxicon* 57, 376–389.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Battocchi, C., Crinelli, R., Carloni, E., Magnani, M. et al. (2012). Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain: HR LC-MS(n) characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1243–1252.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Yasumoto, T., Battocchi, C., Giacobbe, M., Amorim, A. et al. (2013). Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Harmful Algae* 23, 19–27.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pelin, M., Sosa, S., Tubaro, A., Chaloin, O., Poli, M. et al. (2014). Stereoisomers of 42-hydroxy palytoxin from Hawaiian *Palythoa toxica* and *P. tuberculosa*: stereostructure elucidation, detection, and biological activities. *J. Nat. Prod.* 77, 351–357.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C. et Forino, M. (2015). Chemistry of palytoxin and its analogues. In *Phycotoxins*, L.M. Botana, and A. Alfonso, eds. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 85–111.
- Coates, A.G. et Obando, J.A. (1996). The geological evolution of the central American isthmus. In *Evolution and environment in tropical America*, (Chicago: University of Chicago press), pp. 21–56.
- Coca, R., Soler, F. et Fernández-Belda, F. (2008). Characterization of the palytoxin effect on Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum (SERCA). *Arch. Biochem. Biophys.* 478, 36–42.
- Cook, C.B., et Davy, S.K. (2001). Are free amino acids responsible for the 'host factor' effects on symbiotic zooxanthellae in extracts of host tissue? *Hydrobiologia* 461, 71–78.
- Costa, C.F., Sassi, R., Gorchach-Lira, K., LaJeunesse, T.C. et Fitt, W.K. (2013). Seasonal changes in zooxanthellae harbored by zoanths (Cnidaria, Zoantheida) from coastal reefs in northeastern Brazil. *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 8, 253–264.
- Costa, D.L., Gomes, P.B., Santos, A.M., Valença, N.S., Vieira, N.A. et Pérez, C.D. (2011). Morphological plasticity in the reef zoanthid *Palythoa caribaeorum* as an adaptive strategy. *Ann. Zool. Fenn.* 48, 349–358.
- Crouch, R.W. et Poag, C.W. (1979). *Amphistegina gibbosa* d'Orbigny from the California borderlands; the Caribbean connection. *J. Foraminifer. Res.* 9, 85–105.
- Daigo, K., Nakano, Y., Casareto, B.E., Suzuki, Y. et Shioi, Y. (2008). High-performance liquid chromatographic analysis of photosynthetic pigments in corals: an existence of a variety of epizoic, endozoic and endolithic algae. *Proc. 11th Int. Coral Reef Symp.* 1, 123–127.
- Davy, S.K. et Turner, J.R. (2003). Early development and acquisition of zooxanthellae in the temperate symbiotic sea anemone *Anthopleura ballii* (Cocks). *Biol. Bull.* 205, 66–72.
- Davy, S.K., Lucas, I.A.N. et Turner, J.R. (1996). Carbon budgets in temperate anthozoan-dinoflagellate symbioses. *Mar. Biol.* 126, 773–783.
- Davy, S.K., Allemand, D. et Weis, V.M. (2012). Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 76, 229–261.
- Debeir, O., Mégalizzi, V., Warzée, N., Kiss, R. et Decaestecker, C. (2008). Videomicroscopic extraction of specific information on cell proliferation and migration in vitro. *Exp. Cell Res.* 314, 2985–2998.
- Deeds, J.R. et Schwartz, M.D. (2010). Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* 56, 150–162.
- Deeds, J.R., Handy, S.M., White, K.D. et Reimer, J.D. (2011). Palytoxin found in *Palythoa* sp. zoanths (Anthozoa, Hexacorallia) sold in the home aquarium trade. *PLoS One* 6, e18235.
- Del Favero, G., Sosa, S., Pelin, M., D'Orlando, E., Florio, C., Lorenzon, P., Poli, M. et Tubaro, A. (2012a). Sanitary problems related to the presence of *Ostreopsis* spp. in the Mediterranean Sea: a multidisciplinary scientific approach. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48, 407–414.

- Del Favero, G., Florio, C., Codan, B., Sosa, S., Poli, M., Sbaizero, O., Molgó, J., Tubaro, A. et Lorenzon, P. (2012b).** The stretch-activated channel blocker Gd(3+) reduces palytoxin toxicity in primary cultures of skeletal muscle cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1912–1920.
- Del Favero, G., Beltramo, D., Sciancalepore, M., Lorenzon, P., Coslovich, T., Poli, M., Testai, E., Sosa, S. et Tubaro, A. (2013).** Toxicity of palytoxin after repeated oral exposure in mice and in vitro effects on cardiomyocytes. *Toxicon* 75, 3–15.
- Delbeek, J.C., Sprung, J. et Willig, C. (1998).** L'aquarium récifal: manuel d'identification et de maintenance des invertébrés marins tropicaux (Coconut Grove Fla.: Ricordea Pub.).
- Diekmann, O., Bak, R., Stam, W. et Olsen, J. (2001).** Molecular genetic evidence for probable reticulate speciation in the coral genus *Madracis* from a Caribbean fringing reef slope. *Mar. Biol.* 139, 221–233.
- Donnet, C., Arystarkhova, E. et Sweadner, K.J. (2001).** Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276, 7357–7365.
- Douglas, A.E. (2003).** Coral bleaching--how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46, 385–392.
- Dove, S.G., Hoegh-Guldberg, O. et Ranganathan, S. (2001).** Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral Reefs* 19, 197–204.
- Downs, C., Fauth, J.E., Halas, J.C., Dustan, P., Bemiss, J. et Woodley, C.M. (2002).** Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 533–543.
- Drainville-Higgins, K.E. (2004).** Isolation of marine metabolites from *Symbiodinium* species of dinoflagellates. The University of Rhode Island. Thesis. <http://search.proquest.com/docview/305153556>.
- Dröge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Dykens, J.A., Shick, J.M., Benoit, C., Buettner, G.R. et Winston, G.W. (1992).** Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura Elegantissima* and its endosymbiotic algae. *J. Exp. Biol.* 168, 219–241.
- Edgar, R.C. (2004).** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- EFSA, Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2009).** Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish - palytoxin group. *EFSA J.* 7, 1–38.
- Eskiocak, U., Ramesh, V., Gill, J.G., Zhao, Z., Yuan, S.W., Wang, M., Vandergriff, T., Shackleton, M., Quintana, E., Johnson, T.M. et al. (2016).** Synergistic effects of ion transporter and MAP kinase pathway inhibitors in melanoma. *Nat. Commun.* 7, 12336.
- Espiña, B., Cagide, E., Louzao, M.C., Fernandez, M.M., Vieytes, M.R., Katikou, P., Villar, A., Jaen, D., Maman, L. et Botana, L.M. (2009).** Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci. Rep.* 29, 13–23.
- Fautin, D.G. (2013).** Hexacorallians of the World. <http://geoportal.kgs.ku.edu/hexacoral/anemone2/index.cfm>.
- Fernández, D.A., Louzao, M.C., Vilariño, N., Espiña, B., Fraga, M., Vieytes, M.R., Román, A., Poli, M. et Botana, L.M. (2013).** The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity. *FEBS J.* 280, 3906–3919.
- Fontenele Rabelo, E., Leal Rocha, L., Barguil Colares, G. et Araujo Bomfim, T. (2014).** *Symbiodinium* diversity associated with zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) in Northeastern Brazil. *Symbiosis* 64, 105–113.
- Fosså, S.A. et Nilsen, A.J. (1998).** The modern coral reef aquarium vol. 2 (Bornheim (Germany): Birgit Schmettkamp Verlag).
- Frade, P.R., Englebert, N., Faria, J., Visser, P.M. et Bak, R.P.M. (2008a).** Distribution and photobiology of *Symbiodinium* types in different light environments for three colour morphs of the coral *Madracis pharensis*: is there more to it than total irradiance? *Coral Reefs* 27, 913–925.
- Frade, P.R., De Jongh, F., Vermeulen, F., van Bleijswijk, J. et Bak, R.P.M. (2008b).** Variation in symbiont distribution between closely related coral species over large depth ranges. *Mol. Ecol.* 17, 691–703.
- Fransolet, D., Roberty, S. et Plumier, J.-C. (2012).** Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and *Symbiodinium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 420–421, 1–7.
- Freeman, B.A. et Crapo, J.D. (1982).** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 47, 412–426.
- Frolova, G.M., Kuznetsova, T.A., Mikhailov, V.V. et Elyakov, G.B. (2000).** An enzyme linked immunosorbent assay for detecting palytoxin-producing bacteria. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 26, 285–289.
- Fujii, T. et Reimer, J.D. (2011).** Phylogeny of the highly divergent zoanthid family Microzoanthidae (Anthozoa, Hexacorallia) from the Pacific: New family of divergent zoanthids from the Pacific. *Zool. Scr.* 40, 418–431.
- Fujii, T. et Reimer, J.D. (2013).** A new family of diminutive zooxanthellate zoanthids (Hexacorallia: Zoantharia): New family of zooxanthellate zoanthids. *Zool. J. Linn. Soc.* 169, 509–522.

- Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Hakii, H., Horiuchi, T., Takayama, S. et Sugimura, T. (1986).** Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 7, 707–710.
- Fujioka, H., Christ, W.J., Cha, J.K., Leder, J., Kishi, Y., Uemura, D. et Hirata, Y. (1982).** Stereochemistry of palytoxin. Part 3. C7-C51 segment. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7367–7369.
- Fukami, H., Omori, M. et Hatta, M. (2000).** Phylogenetic relationships in the coral family Acroporidae, reassessed by inference from mitochondrial genes. *Zoolog. Sci.* 17, 689–696.
- Fukui, M., Murata, M., Inoue, A., Gawel, M. et Yasumoto, T. (1987).** Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*. *Toxicon* 25, 1121–1124.
- Fukui, M., Yasumura, D., Murata, M., Alcalá, A.C. et Yasumoto, T. (1988).** The occurrence of palytoxin in crabs and fish. *Toxicon* 26, 20–21.
- Fukuyo, Y. (1981).** Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47, 967–978.
- Furla, P., Allemand, D. et Orsenigo, M.N. (2000a).** Involvement of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase in inorganic carbon uptake for endosymbiont photosynthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R870–881.
- Furla, P., Galgani, I., Durand, I. et Allemand, D. (2000b).** Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. *J. Exp. Biol.* 203, 3445–3457.
- García-Altare, M., Tartaglione, L., Dell’Aversano, C., Carnicer, O., de la Iglesia, P., Forino, M., Diogène, J. et Ciminiello, P. (2015).** The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis cf. ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MS(n.). *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1191–1204.
- Garrett, T.A., Schmeitzel, J.L., Klein, J.A., Hwang, J.J. et Schwarz, J.A. (2013).** Comparative lipid profiling of the nidarian *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate symbiont. *PLoS ONE* 8, e57975.
- Gates, R.D., Hoegh-Guldberg, O., McFall-Ngai, M.J., Bil, K.Y. et Muscatine, L. (1995).** Free amino acids exhibit anthozoan “host factor” activity: they induce the release of photosynthate from symbiotic dinoflagellates *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7430–7434.
- Gates, R.D., Bil, K.Y. et Muscatine, L. (1999).** The influence of an anthozoan “host factor” on the physiology of a symbiotic dinoflagellate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232, 241–259.
- Gibson, C.H. et Thomas, W.H. (1995).** Effects of turbulence intermittency on growth inhibition of a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. *J. Geophys. Res.* 100, 24841.
- Gleibs, S. et Mebs, D. (1999).** Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* 37, 1521–1527.
- Gleibs, S., Mebs, D. et Werding, B. (1995).** Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 33, 1531–1537.
- Glynn, I.M. (1993).** Annual review prize lecture. “All hands to the sodium pump”. *J. Physiol.* 462, 1–30.
- Gómez-Cabrera, M. del C., Ortiz, J.C., Loh, W.K.W., Ward, S. et Hoegh-Guldberg, O. (2008).** Acquisition of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) by juveniles of the coral *Acropora longicyathus*. *Coral Reefs* 27, 219–226.
- Gonzales, R.B. et Alcalá, A.C. (1977).** Fatalities from crab poisoning on Negros Island, Philippines. *Toxicon* 15, 169–170.
- Görögh, T., Bèress, L., Quabius, E.S., Ambrosch, P. et Hoffmann, M. (2013).** Head and neck cancer cells and xenografts are very sensitive to palytoxin: decrease of c-jun n-terminale kinase-3 expression enhances palytoxin toxicity. *Mol. Cancer* 12, 12.
- Goulet, T.L., LaJeunesse, T.C. et Fabricius, K.E. (2008).** Symbiont specificity and bleaching susceptibility among soft corals in the 1998 Great Barrier Reef mass coral bleaching event. *Mar. Biol.* 154, 795–804.
- Graham, E.R., Parekh, A., Devassy, R.K. et Sanders, R.W. (2015).** Carbonic anhydrase activity changes in response to increased temperature and pCO₂ in *Symbiodinium*-zooxanthid associations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 473, 218–226.
- Grant, A.J., Rémond, M., People, J. et Hinde, R. (1997).** Effects of host-tissue homogenate of the scleractinian coral *Plesiastrea versipora* on glycerol metabolism in isolated symbiotic dinoflagellates. *Mar. Biol.* 128, 665–670.
- Guillard, R.R. et Ryther, J.H. (1962).** Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.
- Haas, M., Wang, H., Tian, J. et Xie, Z. (2002).** Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 277, 18694–18702.
- Habermann, E. (1989).** Palytoxin acts through Na⁺,K⁺-ATPase. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 27, 1171–1187.

- Habermann, E. et Chhatwal, G.S. (1982).** Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 319, 101–107.
- Habermann, E., Ahnert-Hilger, G., Chhatwal, G.S. et Beress, L. (1981).** Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 649, 481–486.
- Hall, C., Levy, D. et Sattler, S. (2015).** A case of palytoxin poisoning in a home aquarium enthusiast and his family. *Case Rep. Emerg. Med.* 2015, 621815.
- Harland, A.D. et Davies, P.S. (1995).** Symbiotic photosynthesis increases both respiration and photosynthesis in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Mar. Biol.* 123, 715–722.
- Harmel, N. et Apell, H.-J. (2006).** Palytoxin-induced effects on partial reactions of the Na,K-ATPase. *J. Gen. Physiol.* 128, 103–118.
- Hashimoto, Y., Fusetani, N. et Kimura, S. (1969).** Aluterin: a toxin of filefish, *Alutera scripta*, probably originating from a zoantharian, *Palythoa tuberculosa*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 35, 1086–1093.
- Hatta, M., Fukami, H., Wang, W., Omori, M., Shimoike, K., Hayashibara, T., Ina, Y. et Sugiyama, T. (1999).** Reproductive and genetic evidence for a reticulate evolutionary history of mass-spawning corals. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1607–1613.
- Haywick, D.W. et Mueller, E.M. (1997).** Sediment retention in encrusting *Palythoa* spp.–a biological twist to a geological process. *Coral Reefs* 16, 39–46.
- Hellberg, M.E. (2006).** No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol. Biol.* 6, 24.
- Herberts, C. (1972).** Contribution à l'étude écologique de quelques zoanthaires tempérés et tropicaux. *Mar. Biol.* 13, 127–136.
- Herberts, C. (1987).** Ordre des Zoanthaires. In *Traité de Zoologie, anatomie, systématique, Biologie Vol. 3*, (Paris (France): PP Grasse), pp. 783–810.
- Hewetson, J.F., Rivera, V.R., Poli, M.A. et Hines, H.B. (1990).** Modification of palytoxin activity and structure by visible and ultraviolet light. *Toxicon* 28, 612.
- Hilbers, F., Kopec, W., Isaksen, T.J., Holm, T.H., Lykke-Hartmann, K., Nissen, P., Khandelia, H. et Poulsen, H. (2016).** Tuning of the Na,K-ATPase by the beta subunit. *Sci. Rep.* 6, 20442.
- Hilgemann, D.W. (2003).** From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 386–388.
- Hirata, Y., Uemura, D., Ueda, K. et Takano, S. (1979).** Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (coelentrata). *Pure Appl. Chem.* 51, 1875–1883.
- Holcombe, T.L. et Moore, W.S. (1977).** Paleocurrents in the eastern Caribbean: Geologic evidence and implications. *Mar. Geol.* 23, 35–56.
- Honsell, G., De Bortoli, M., Boscolo, S., Dell'Aversano, C., Battocchi, C., Fontanive, G., Penna, A., Berti, F., Sosa, S., Yasumoto, T. et al. (2011).** Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: Detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7051–7059.
- Hunter, C.L., Morden, C.W. et Smith, C.M. (1997).** The utility of ITS sequences in assessing relationships among zooxanthellae and corals. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.* 2, 1599–1602.
- Hunter, R.L., LaJeunesse, T.C. et Santos, S.R. (2007).** Structure and evolution of the rDNA internal transcribed spacer (ITS) region 2 in the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, dinophyta). *J. Phycol.* 43, 120–128.
- Iglesias-Prieto, R., Govind, N.S. et Trench, R.K. (1993).** Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 340, 381–392.
- Ingrassia, L., Lefranc, F., Dewelle, J., Pottier, L., Mathieu, V., Spiegl-Kreinecker, S., Sauvage, S., El Yazidi, M., Dehoux, M., Berger, W. et al. (2009).** Structure-activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryl derivative) as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.* 52, 1100–1114.
- Irei, Y., Sinniger, F. et Reimer, J.D. (2015).** Descriptions of two azooxanthellate *Palythoa* species (Subclass Hexacorallia, Order Zoantharia) from the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *ZooKeys* 478, 1–26.
- Ishii, T. et Takeyasu, K. (1993).** The amino-terminal 200 amino acids of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit confer ouabain sensitivity on the sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8881–8885.
- Ito, E. et Yasumoto, T. (2009).** Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon* 54, 244–251.
- Ito, K., Urakawa, N. et Koike, H. (1982).** Cardiovascular toxicity of palytoxin in anesthetized dogs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 258, 146–154.

- Jaunin, P., Jaisser, F., Beggah, A.T., Takeyasu, K., Mangeat, P., Rossier, B.C., Horisberger, J.D. et Geering, K. (1993).** Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of beta subunits in subunit assembly, intracellular transport, and functional expression of Na,K-pumps. *J. Cell Biol.* 123, 1751–1759.
- Jones, D.S. et Hasson, P.F. (1985).** History and development of the marine invertebrate faunas separated by the central American isthmus. In *The great American biotic interchange*, F.G. Stehli, and S.D. Webb, eds. (Springer US), pp. 325–355.
- Juhl, A.R. et Latz, M.I. (2002).** Mechanisms of fluid shear-induced inhibition of population growth in a red-tide dinoflagellate. *J. Phycol.* 38, 683–694.
- Kamezaki, M., Higa, M., Hirose, M., Suda, S. et Reimer, J.D. (2013).** Different zooxanthellae types in populations of the zoanthid *Zoanthus sansibaricus* along depth gradients in Okinawa, Japan. *Mar. Biodivers.* 43, 61–70.
- Katikou, P. (2007).** Chemistry of palytoxins and ostreocins. In *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*, L.M. Botana, ed. (Blackwell Publishing), pp. 75–93.
- Kawaguti, S. (1944).** On the physiology of reef corals VI. Study on the pigments. *Palao Trop. Biol. Stn. Stud.* 2, 617–972.
- Kazandjian, A., Shepherd, V.A., Rodriguez-Lanetty, M., Nordemeier, W., Larkum, A.W.D. et Quinnell, R.G. (2008).** Isolation of symbiosomes and the symbiosome membrane complex from the zoanthid *Zoanthus robustus*. *Phycologia* 47, 294–306.
- Keller, G., Zenker, C.E. et Stone, S.M. (1989).** Late Neogene history of the Pacific-Caribbean gateway. *J. South Am. Earth Sci.* 2, 73–108.
- Kelmanson, I.V. et Matz, M.V. (2003).** Molecular basis and evolutionary origins of color diversity in great star coral *Montastraea cavernosa* (Scleractinia: Faviida). *Mol. Biol. Evol.* 20, 1125–1133.
- Kerbrat, A.S., Amzil, Z., Pawlowicz, R., Golubic, S., Sibat, M., Darius, H.T., Chinain, M. et Laurent, D. (2011).** First evidence of palytoxin and 42-hydroxy-palytoxin in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Mar. Drugs* 9, 543–560.
- Kimura, S. et Hashimoto, Y. (1973).** Purification of the toxin in a zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Seto Mar. Biol. Lab.* 20, 713–718.
- Kishi, Y. (1989).** Natural products synthesis: palytoxin. *Pure Appl. Chem.* 61, 313–324.
- Kitahara, M.V., Cairns, S.D., Stolarski, J., Blair, D. et Miller, D.J. (2010).** A comprehensive phylogenetic analysis of the Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa) based on mitochondrial CO1 sequence data. *PLoS ONE* 5, e11490.
- Klein, L.L., McWhorter, W.W., Ko, S.S., Pfaff, K.P., Kishi, Y., Uemura, D. et Hirata, Y. (1982).** Stereochemistry of palytoxin. Part 1. C85–C115 segment. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7362–7364.
- Knowlton, N. (2000).** Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420, 73–90.
- Ko, S.S., Finan, J.M., Yonaga, M., Kishi, Y., Uemura, D. et Hirata, Y. (1982).** Stereochemistry of palytoxin. Part 2. C1–C6, C47–C74, and C77–C83 segments. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7364–7367.
- Kodama, A.M., Hokama, Y., Yasumoto, T., Fukui, M., Jo Manea, S. et Sutherland, N. (1989).** Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrossoma* (mackerel). *Toxicon* 27, 1051–1053.
- Krueger, T. et Gates, R.D. (2012).** Cultivating endosymbionts – Host environmental mimics support the survival of *Symbiodinium* C15 *ex hospite*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 413, 169–176.
- Krueger, T., Fisher, P.L., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., Leggat, W. et Davy, S.K. (2015).** Transcriptomic characterization of the enzymatic antioxidants FeSOD, MnSOD, APX and KatG in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *BMC Evol. Biol.* 15, 48.
- Kudo, Y. et Shibata, S. (1980).** The potent depolarizing action of palytoxin isolated from *Palythoa tuberculosa* on the isolated spinal cord of the frog. *Br. J. Pharmacol.* 71, 575–579.
- LaJeunesse, T.C. (2001).** Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. *J. Phycol.* 37, 866–880.
- LaJeunesse, T.C. (2005).** “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Mol. Biol. Evol.* 22, 570–581.
- Lau, C., Tan, C., Khoo, H., Yuen, R., Lewis, R., Corpuz, G. et Bignami, G. (1995).** *Lophozozymus pictor* toxin: A fluorescent structural isomer of palytoxin. *Toxicon* 33, 1373–1377.
- Leal, M.C., Hoadley, K., Pettay, D.T., Grajales, A., Calado, R. et Warner, M.E. (2015).** Symbiont type influences trophic plasticity of a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *J. Exp. Biol.* 218, 858–863.
- Ledreux, A., Krysz, S. et Bernard, C. (2009).** Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 53, 300–308.

- Lee, Y.-K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H.D.T., Timlin, J.A. et Hu, Q. (2013). Basic culturing and analytical measurement techniques. In *Handbook of microalgal culture*, A. Richmond, and Q. Hu, eds. (Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 37–68.
- Lefranc, F., Mijatovic, T., Kondo, Y., Sauvage, S., Roland, I., Debeir, O., Krstic, D., Vasic, V., Gailly, P., Kondo, S. et al. (2008). Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery* 62, 211–221; discussion 221–222.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.-P., Bernard, C. et Hennion, M.-C. (2004). First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian ocean. *J. Phycol.* 40, 1042–1051.
- Levine, L., Fujiki, H., Gjika, H.B. et Van Vunakis, H. (1987). Production of antibodies to palytoxin: Neutralization of several biological properties of palytoxin. *Toxicon* 25, 1273–1282.
- Levine, L., Fujiki, H., Gjika, H.B. et Van Vunakis, H. (1988). A radioimmunoassay for palytoxin. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 26, 1115–1121.
- Lopez, J.V., Kersanach, R., Rehner, S.A. et Knowlton, N. (1999). Molecular determination of species boundaries in corals: genetic analysis of the *Montastraea annularis* complex using amplified fragment length polymorphisms and a microsatellite marker. *Biol. Bull.* 196, 80–93.
- Louzao, M.C., Ares, I.R. et Cagide, E. (2008). Marine toxins and the cytoskeleton: a new view of palytoxin toxicity. *FEBS J.* 275, 6067–6074.
- Louzao, M.C., Ares, I.R., Cagide, E., Espiña, B., Vilariño, N., Alfonso, A., Vieytes, M.R. et Botana, L.M. (2011). Palytoxins and cytoskeleton: An overview. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 57, 460–469.
- Low, M.E.Y., Sinniger, F. et Reimer, J.D. (2016). The order Zoantharia Rafinesque, 1815 (Cnidaria, Anthozoa: Hexacorallia): supraspecific classification and nomenclature. *ZooKeys* 641, 1–80.
- Maeda, M., Kodama, R., Tanaka, T., Yohizumi, H., Nomyoto, K., Takemoto, T. et Fujita, M. (1985). Structures of insecticidal substances isolated from a red alga, *Chondria Armata*. In *Proceedings of the 27th Symposium on the Chemistry of Natural Products*, (Hiroshima, Japan), p. 616.
- Malo, D. (1903). Hawaiian antiquities (Moolelo Hawaii) (Honolulu: Hawaiian gazette Company).
- Márquez, L.M., Van Oppen, M.J.H., Willis, B.L., Reyes, A. et Miller, D.J. (2002). The highly cross-fertile coral species, *Acropora hyacinthus* and *Acropora cytherea*, constitute statistically distinguishable lineages. *Mol. Ecol.* 11, 1339–1349.
- Marshall, P.A. et Baird, A.H. (2000). Bleaching of corals on the Great Barrier Reef: differential susceptibilities among taxa. *Coral Reefs* 19, 155–163.
- Martindale, M.Q., Finnerty, J.R. et Henry, J.Q. (2002). The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24, 358–365.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F. et Lisanti, M.P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 11–31.
- McCosker, J.E. et Dawson, C.E. (1975). Biotic passage through the Panama Canal, with particular reference to fishes. *Mar. Biol.* 30, 343–351.
- Medina, M., Weil, E. et Szmant, A.M. (1999). Examination of the *Montastraea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. *Mar. Biotechnol. N. Y. N* 1, 89–97.
- Mijatovic, T., Mathieu, V., Gaussin, J.-F., De Nève, N., Ribaucour, F., Van Quaquebeke, E., Dumont, P., Darro, F. et Kiss, R. (2006). Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia N. Y. N* 8, 402–412.
- Mijatovic, T., Van Quaquebeke, E., Delest, B., Debeir, O., Darro, F. et Kiss, R. (2007a). Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1776, 32–57.
- Mijatovic, T., Roland, I., Van Quaquebeke, E., Nilsson, B., Mathieu, A., Van Vynckt, F., Darro, F., Blanco, G., Facchini, V. et Kiss, R. (2007b). The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J. Pathol.* 212, 170–179.
- Miller, K. et Babcock, R. (1997). Conflicting morphological and reproductive species boundaries in the coral genus *Platygyra*. *Biol. Bull.* 192, 98–110.
- Miller, K. et Benzie, J.A.H. (1997). No clear genetic distinction between morphological species within the coral genus *Platygyra*. *Bull. Mar. Sci.* 61, 907–917.
- Moore, R.E. et Bartolini, G. (1981). Structure of palytoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2491–2494.
- Moore, R.E. et Scheuer, P.J. (1971). Palytoxin a new marine toxin from a Coelenterate. *Nature* 172, 495–498.
- Moore, R.E., Dietrich, R.F., Hatton, B., Higa, T. et Scheuer, P.J. (1975). The nature of the lambda 263 chromophore in the palytoxins. *J. Org. Chem.* 40, 540–542.

- Moore, R.E., Woolard, F.X., Sheikh, M.Y. et Scheuer, P.J. (1978).** Ultraviolet chromophores of palytoxins. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 7758–7759.
- Moore, R.E., Woolard, F.X. et Bartolini, G. (1980).** Periodate oxidation of N-(p-bromobenzoyl) palytoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7370–7372.
- Moore, R.E., Helfrich, P. et Patterson, G.M.L. (1982).** The deadly seaweed of Hana. *Oceanus* 25, 54–63.
- Moshirfar, M. (2010).** Aquarium coral keratoconjunctivitis. *Arch. Ophthalmol.* 128, 1360.
- Muscatine, L. (1967).** Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and tridacna and its control by the host. *Science* 156, 516–519.
- Nakamura, H., Asari, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T. et Murai, A. (1993).** Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon* 31, 371–376.
- Noguchi, T., Arakawa, O., Daigo, K., Sato, S., Ozaki, H., Kawai, N., Ito, M. et Hashimoto, K. (1988).** Palytoxin as the causative agent in parrotfish poisoning. *Toxicon* 26, 34.
- Nordt, S.P., Wu, J., Zahller, S., Clark, R.F. et Cantrell, F.L. (2011).** Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral. *J. Emerg. Med.* 40, 397–399.
- ODEa, A., Lessios, H.A., Coates, A.G., Eytan, R.I., Restrepo-Moreno, S.A., Cione, A.L., Collins, L.S., de Queiroz, A., Farris, D.W., Norris, R.D. et al. (2016).** Formation of the isthmus of Panama. *Sci. Adv.* 2, e1600883.
- Odorico, D.M. et Miller, D.J. (1997).** Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 14, 465–473.
- Oku, N., Sata, N.U., Matsunaga, S., Uchida, H. et Fusetani, N. (2004).** Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa* aff. *margaritae*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 43, 21–25.
- Ong, C.W., Reimer, J.D. et Todd, P.A. (2013).** Morphologically plastic responses to shading in the zoanthids *Zoanthus sansibaricus* and *Palythoa tuberculosa*. *Mar. Biol.* 160, 1053–1064.
- Onodera, K., Nakamura, H., Oba, Y. et Ojika, M. (2004).** Zooxanthellamide B, a novel large polyhydroxy metabolite from a marine dinoflagellate of *Symbiodinium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 955–958.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H. et Yasumoto, T. (1999).** Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 37, 55–65.
- van Oppen, M.J.H., Catmull, J., McDonald, B.J., Hislop, N.R., Hagerman, P.J. et Miller, D.J. (2002).** The mitochondrial genome of *Acropora tenuis* (Cnidaria; Scleractinia) contains a large group I intron and a candidate control region. *J. Mol. Evol.* 55, 1–13.
- Palmer, C.V., Modi, C.K. et Mydlarz, L.D. (2009).** Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PLoS One* 4, e7298.
- Paredes, I., Rietjens, I.M.C.M., Vieites, J.M. et Cabado, A.G. (2011).** Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union. *Toxicon* 58, 336–354.
- Patocka, J., Gupta, R.C., Wu, Q. et Kuca, K. (2015).** Toxic potential of palytoxin. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 35, 773–780.
- Patockaa, J. et Stredab, L. (2002).** Brief overview of natural non-protein neurotoxins. *ASA Newsl.* 89, 16–23.
- Paz, B., Riobó, P. et Franco, J.M. (2011).** Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Detection of phycotoxins in microalgae whole cells by MALDI-ToF MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 3627–3639.
- Pelin, M. (2011).** Toxicological effects of palytoxin after cutaneous exposure. Université de Trieste. Thèse. <http://hdl.handle.net/10077/7389>
- Pelin, M., Zanette, C., De Bortoli, M., Sosa, S., Loggia, R.D., Tubaro, A. et Florio, C. (2011).** Effects of the marine toxin palytoxin on human skin keratinocytes: role of ionic imbalance. *Toxicology* 282, 30–38.
- Pelin, M., Sosa, S., Della Loggia, R., Poli, M., Tubaro, A., Decorti, G. et Florio, C. (2012).** The cytotoxic effect of palytoxin on Caco-2 cells hinders their use for in vitro absorption studies. *Food Chem. Toxicol.* 50, 206–211.
- Pelin, M., Boscolo, S., Poli, M., Sosa, S., Tubaro, A. et Florio, C. (2013).** Characterization of palytoxin binding to HaCaT cells using a monoclonal anti-palytoxin antibody. *Mar. Drugs* 11, 584–598.
- Penna, A., Bertozzini, E., Battocchi, C., Galluzzi, L., Giacobbe, M.G., Vila, M., Garcés, E., Luglie, A. et Magnani, M. (2006).** Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods. *J. Plankton Res.* 29, 19–38.
- Perez, S. et Weis, V. (2006).** Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *J. Exp. Biol.* 209, 2804–2810.
- Perez, S.F., Cook, C.B. et Brooks, W.R. (2001).** The role of symbiotic dinoflagellates in the temperature-induced bleaching response of the subtropical sea anemone *Aiptasia pallida*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256, 1–14.

- Pettay, D.T., Wham, D.C., Pinzón, J.H. et Lajeunesse, T.C. (2011).** Genotypic diversity and spatial-temporal distribution of *Symbiodinium* clones in an abundant reef coral: *Symbiodinium* genotype diversity and stability. *Mol. Ecol.* 20, 5197–5212.
- Piel, J. (2009).** Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 26, 338–362.
- Pochon, X., Putnam, H.M., Burki, F. et Gates, R.D. (2012).** Identifying and characterizing alternative molecular markers for the symbiotic and free-living dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *PLoS ONE* 7, e29816.
- Polak, O., Loya, Y., Brickner, I., Kramarski-Winter, E. et Benayahu, Y. (2011).** The widely-distributed Indo-Pacific zoanthid *Palythoa tuberculosa*: a sexually conservative strategist. *Bull. Mar. Sci.* 87, 605–621.
- Posada, D. et Crandall, K.A. (1998).** MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 14, 817–818.
- Post, R.L., Hegyvary, C. et Kume, S. (1972).** Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247, 6530–6540.
- Quinn, R.J., Kashiwagi, M., Moore, R.E. et Norton, T.R. (1974).** Anticancer activity of zoanthids and the associated toxin, palytoxin, against Ehrlich ascites tumor and P-388 lymphocytic leukemia in mice. *J. Pharm. Sci.* 63, 257–260.
- Quod, J.-P. (1994).** *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. (Dinophyceae) dinoflagellé toxique associé à la ciguatera dans l’Océan Indien. *Cryptogam. Algol.* 15, 243–251.
- Rajasekaran, S.A., Ball, W.J., Bander, N.H., Liu, H., Pardee, J.D. et Rajasekaran, A.K. (1999).** Reduced expression of beta-subunit of Na,K-ATPase in human clear-cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* 162, 574–580.
- Ramos, V. et Vasconcelos, V. (2010).** Palytoxin and analogs: Biological and ecological effects. *Mar. Drugs* 8, 2021–2037.
- Raven, J.A., Evans, M.C.W. et Korb, R.E. (1999).** The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60, 111–150.
- Reimer, J. et Fujii, T. (2010).** Four new species and one new genus of zoanthids (Cnidaria, Hexacorallia) from the Galapagos Islands. *ZooKeys* 42, 1–36.
- Reimer, J.D. et Todd, P. (2009).** Preliminary molecular examination of zooxanthellate zoanthid (Hexacorallia, Zoantharia) and associated zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) diversity in Singapore. *Raffles Bull. Zool.* 22, 103–120.
- Reimer, J., Hirose, M. et Wirtz, P. (2010a).** Zoanthids of the Cape Verde Islands and their symbionts: previously unexamined diversity in the Northeastern Atlantic. *Contrib. Zool.* 79, 147–163.
- Reimer, J., Ishikawa, S.A. et Hirose, M. (2011).** New records and molecular characterization of *Acrozoanthus* (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) and its endosymbionts (*Symbiodinium* spp.) from Taiwan. *Mar. Biodivers.* 41, 313–323.
- Reimer, J., Irei, Y., Fujii, T. et Yang, S.-Y. (2013).** Molecular analyses of shallow-water zooxanthellate zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) from Taiwan and their *Symbiodinium* spp. *Zool. Stud.* 52, 38.
- Reimer, J.D., Ono, S., Fujiwara, Y., Takishita, K. et Tsukahara, J. (2004).** Reconsidering *Zoanthus* spp. diversity: Molecular evidence of conspecificity within four previously presumed species. *Zoolog. Sci.* 21, 517–525.
- Reimer, J.D., Ono, S., Takishita, K., Tsukahara, J. et Maruyama, T. (2006a).** Molecular evidence suggesting species in the zoanthid genera *Palythoa* and *Protopalythoa* (Anthozoa: Hexacorallia) are congeneric. *Zoolog. Sci.* 23, 87–94.
- Reimer, J.D., Ono, S., Iwama, A., Tsukahara, J. et Maruyama, T. (2006b).** High levels of morphological variation despite close genetic relatedness between *Zoanthus* aff. *vietnamensis* and *Zoanthus kuroshio* (Anthozoa: Hexacorallia). *Zoolog. Sci.* 23, 755–761.
- Reimer, J.D., Ono, S., Iwama, A., Takishita, K., Tsukahara, J. et Maruyama, T. (2006c).** Morphological and molecular revision of *Zoanthus* (Anthozoa: Hexacorallia) from Southwestern Japan, with descriptions of two new species. *Zoolog. Sci.* 23, 261–275.
- Reimer, J.D., Takishita, K. et Maruyama, T. (2006d).** Molecular identification of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) from *Palythoa* spp. (Anthozoa: Hexacorallia) in Japan. *Coral Reefs* 25, 521–527.
- Reimer, J.D., Takishita, K., Ono, S. et Maruyama, T. (2007a).** Diversity and evolution in the zoanthid genus *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) based on nuclear ITS-rDNA. *Coral Reefs* 26, 399–410.
- Reimer, J.D., Takishita, K., Ono, S., Tsukahara, J. et Maruyama, T. (2007b).** Molecular evidence suggesting interspecific hybridization in *Zoanthus* spp. (Anthozoa: Hexacorallia). *Zoolog. Sci.* 24, 346–359.
- Reimer, J.D., Ono, S., Sinniger, F. et Tsukahara, J. (2008).** Distribution of zooxanthellate zoanthid species (Zoantharia: ANthozoa: Hexacorallia) in southern Japan limited by cold temperatures. *Galaxea J. Coral Reef Stud.* 10, 57–67.

- Reimer, J.D., Nakachi, S., Hirose, M., Hirose, E. et Hashiguchi, S. (2010b).** Using hydrofluoric acid for morphological investigations of zoanthids (Cnidaria: Anthozoa): a critical assessment of methodology and necessity. *Mar. Biotechnol.* 12, 605–617.
- Reimer, J.D., Foord, C. et Irei, Y. (2012).** Species diversity of shallow water zoanthids (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) in Florida. *J. Mar. Biol.* 2012, 1–14.
- Reimer, J.D., Lorion, J., Irei, Y., Hoeksema, B.W. et Wirtz, P. (2014).** Ascension Island shallow-water Zoantharia (Hexacorallia: Cnidaria) and their zooxanthellae (*Symbiodinium*). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 1–9.
- Rhodes, L., Towers, N., Briggs, L., Munday, R. et Adamson, J. (2002).** Uptake of palytoxin- like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 36, 631–636.
- Riobó, P., Paz, B. et Franco, J.M. (2006).** Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 566, 217–223.
- Riobó, P., Paz, B., Franco, J.M., Vázquez, J.A., Murado, M.A. et Cacho, E. (2008).** Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46, 2639–2647.
- Rodrigues, A.M., Almeida, A.-C.G., Infantosi, A.F.C., Teixeira, H.Z. et Duarte, M.A. (2008).** Model and simulation of Na⁺/K⁺ pump phosphorylation in the presence of palytoxin. *Comput. Biol. Chem.* 32, 5–16.
- Romano, S.L. et Palumbi, S.R. (1997).** Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. *J. Mol. Evol.* 45, 397–411.
- Ronquist, F. et Huelsenbeck, J.P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 19, 1572–1574.
- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A. et Soprano, V. (2010).** New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 56, 1381–1387.
- Rossini, G.P. et Bigiani, A. (2011).** Palytoxin action on the Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 57, 429–439.
- Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A. et Jara, J. (1997).** Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388, 265–269.
- Ruiz, Y., Fuchs, J., Beuschel, R., Tschopp, M. et Goldblum, D. (2015).** Dangerous reef aquaristics: Palytoxin of a brown encrusting anemone causes toxic corneal reactions. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 106, 42–45.
- Ryland, J.S. et Lancaster, J.E. (2003).** Revision of methods for separating species of *Protopalythoa* (Hexacorallia : Zoanthidea) in the tropical West Pacific. *Invertebr. Syst.* 17, 407.
- Ryland, J.S. et Lancaster, J.E. (2004).** A review of zoanthid nematocyst types and their population structure. *Hydrobiologia* 530–531, 179–187.
- Ryland, J.S., Putron, S. de, Scheltema, R.S., Chimonides, P.J. et Zhadan, D.G. (2000).** Semper's (zoanthid) larvae: pelagic life, parentage and other problems. *Hydrobiologia* 440, 191–198.
- Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M. et Hoegh-Guldberg, O. (2000).** Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408, 850–853.
- Santos, S.R., Taylor, D.J. et Coffroth, M.A. (2001).** Genetic comparisons of freshly isolated versus cultured symbiotic dinoflagellates: implications for extrapolating to the intact symbiosis. *J. Phycol.* 37, 900–912.
- Santos, S.R., Gutierrez-Rodriguez, C., Lasker, H.R. et Coffroth, M.A. (2003).** *Symbiodinium* sp. associations in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* in the Bahamas: high levels of genetic variability and population structure in symbiotic dinoflagellates. *Mar. Biol.* 143, 111–120.
- Satoh, E., Ishii, T. et Nishimura, M. (2003).** Palytoxin-induced increase in cytosolic-free Ca⁽²⁺⁾ in mouse spleen cells. *Eur. J. Pharmacol.* 465, 9–13.
- Scheiner-Bobis, G. et Farley, R.A. (1994).** Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 226–234.
- Scheiner-Bobis, G., Meyer zu Heringdorf, D., Christ, M. et Habermann, E. (1994).** Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump. *Mol. Pharmacol.* 45, 1132–1136.
- Scheiner-Bobis, G., Hübschle, T. et Diener, M. (2002).** Action of palytoxin on apical H⁺/K⁺-ATPase in rat colon. *Eur. J. Biochem.* 269, 3905–3911.
- Schilling, W.P., Snyder, D., Sinkins, W.G. et Estacion, M. (2006).** Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C657–667.
- Schnitzler, C.E., Keenan, R.J., McCord, R., Matysik, A., Christianson, L.M. et Haddock, S.H.D. (2008).** Spectral diversity of fluorescent proteins from the anthozoan *Corynactis californica*. *Mar. Biotechnol.* 10, 328–342.

- Seemann, P., Gernert, C., Schmitt, S., Mebs, D. et Hentschel, U. (2009). Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 405–411.
- Shearer, T.L., van Oppen, M.J.H., Romano, S.L. et Wörheide, G. (2002). Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol. Ecol.* 11, 2475–2487.
- Sinniger, F. et Häussermann, V. (2009). Zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia: Zoantharia) from shallow waters of the southern Chilean fjord region, with descriptions of a new genus and two new species. *Org. Divers. Evol.* 9, 23–36.
- Sinniger, F., Montoya-Burgos, J.I., Chevaldonné, P. et Pawlowski, J. (2005). Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. *Mar. Biol.* 147, 1121–1128.
- Sinniger, F., Reimer, J.D. et Pawlowski, J. (2010). The Parazoanthidae (Hexacorallia: Zoantharia) DNA taxonomy: description of two new genera. *Mar. Biodivers.* 40, 57–70.
- Skou, J.C. (1988). Overview: The Na,K-pump. *Methods Enzymol.* 156, 1–25.
- Smith, D.J., Suggett, D.J. et Baker, N.R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Glob. Change Biol.* 11, 1–11.
- Smith, E.G., Ketchum, R.N. et Burt, J.A. (2017). Host specificity of *Symbiodinium* variants revealed by an ITS2 metahaplotype approach. *ISME J.* 11, 1500–1503.
- Snoeks, L. et Veenstra, J. (2012). Family with fever after cleaning a sea aquarium. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 156, A4200.
- Soffer, N. (2009). Practical applications for *Symbiodinium* grown on solid media: Culturing, fluorometry and transformations. Thèse. http://scholarlyrepository.miami.edu/oa_theses/212/
- Sosa, S., Del Favero, G., De Bortoli, M., Vita, F., Soranzo, M.R., Beltramo, D., Ardizzone, M. et Tubaro, A. (2009). Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicol. Lett.* 191, 253–259.
- Stallings, W.C., Patridge, K.A., Strong, R.K. et Ludwig, M.L. (1984). Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J. Biol. Chem.* 259, 10695–10699.
- Stat, M. et Gates, R.D. (2011). Clade D *Symbiodinium* in scleractinian corals: a “nugget” of hope, a selfish opportunist, an ominous sign, or all of the above? *J. Mar. Biol.* 2011, 1–9.
- Stat, M., Bird, C.E., Pochon, X., Chasqui, L., Chauka, L.J., Concepcion, G.T., Logan, D., Takabayashi, M., Toonen, R.J. et Gates, R.D. (2011). Variation in *Symbiodinium* ITS2 sequence assemblages among coral colonies. *PLOS ONE* 6, e15854.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857.
- Stochaj, W.R. et Grossman, A.R. (1997). Differences in the protein profiles of cultured and endosymbiotic *Symbiodinium* sp. (Pyrrophyta) from the anemone *Aiptasia pallida* (anthozoa). *J. Phycol.* 33, 44–53.
- Suggett, D.J., Warner, M.E., Smith, D.J., Davey, P., Hennige, S. et Baker, N.R. (2008). Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by *Symbiodinium* (Pyrrophyta) phylotypes with different thermal tolerances. *J. Phycol.* 44, 948–956.
- Suh, E.M. et Kishi, Y. (1994). Synthesis of palytoxin from palytoxin carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 11205–11206.
- Sun, W., Zhang, F., He, L. et Li, Z. (2014). Pyrosequencing reveals diverse microbial community associated with the zoanthid *Palythoa australiae* from the South China Sea. *Microb. Ecol.* 67, 942–950.
- Sunda, W.G. (2012). Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.* 3, 204.
- Swain, T.D. (2009). Phylogeny-based species delimitations and the evolution of host associations in symbiotic zoanthids (Anthozoa, Zoanthidea) of the wider Caribbean region. *Zool. J. Linn. Soc.* 156, 223–238.
- Swain, T.D. et Swain, L.M. (2014). Molecular parataxonomy as taxon description: examples from recently named Zoanthidea (Cnidaria: Anthozoa) with revision based on serial histology of microanatomy. *Zootaxa* 3796, 81.
- Swain, T.D., Schellinger, J.L., Strimaitis, A.M. et Reuter, K.E. (2015). Evolution of anthozoan polyp retraction mechanisms: convergent functional morphology and evolutionary allometry of the marginal musculature in order Zoanthidea (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia). *BMC Evol. Biol.* 15, 123.
- Szmant, A.M., Weil, E., Miller, M.W. et Colón, D.E. (1997). Hybridization within the species complex of the scleractinian coral *Montastraea annularis*. *Mar. Biol.* 129, 561–572.
- Takabayashi, M., Carter, D., Lopez, J. et Hoegh-Guldberg, O. (2003). Genetic variation of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*, from western Pacific reefs. *Coral Reefs* 22, 17–22.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. et Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tan, C.H. et Lau, C.O. (2000). Palytoxin: Chemistry and detection. In *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, (New York: Marcel Dekker Inc.), pp. 533–548.

- Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y. et Noguchi, T. (2003). *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oviifrons*. *Toxicon* 42, 29–33.
- Tartaglione, L., Pelin, M., Morpurgo, M., Dell'Aversano, C., Montenegro, J., Sacco, G., Sosa, S., Reimer, J.D., Ciminiello, P. et Tubaro, A. (2016). An aquarium hobbyist poisoning: Identification of new palytoxins in *Palythoa* cf. *toxica* and complete detoxification of the aquarium water by activated carbon. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 121, 41–50.
- Therien, A.G., Karlish, S.J.D. et Blostein, R. (1999). Expression and functional role of the γ subunit of the Na,K-ATPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 274, 12252–12256.
- Todd, P., Sidle, R. et Chou, L. (2002a). Plastic corals from Singapore: 2. *Coral Reefs* 21, 407–408.
- Todd, P.A., Sidle, R.C. et Chou, L.M. (2002b). Plastic corals from Singapore: 1. *Coral Reefs* 22, 306–306.
- Tokhtaeva, E., Clifford, R.J., Kaplan, J.H., Sachs, G. et Vagin, O. (2012). Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase α - β heterodimers. *J. Biol. Chem.* 287, 26115–26125.
- Tosteson, M.T., Scriven, D.R., Bharadwaj, A.K., Kishi, Y. et Tosteson, D.C. (1995). Interaction of palytoxin with red cells: structure-function studies. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 33, 799–807.
- Tran, Q., Lee, H., Park, J., Kim, S.-H. et Park, J. (2016). Targeting cancer metabolism - revisiting the Warburg effects. *Toxicol. Res.* 32, 177–193.
- Trautmann, D.A., Hinde, R., Cole, L. et Quinnell, R.G. (2001). Visualisation of the symbiosome membrane surrounding cnidarian algal cells. *Symbiosis* 32, 133–145.
- Trench, R.K. (1970). Synthesis of a mucous cuticle by a zoanthid. *Nature* 227, 1155–1156.
- Trench, R.K. (1971a). The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. I. The assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by two marine coelenterates. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 177, 225–235.
- Trench, R.K. (1971b). The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. II. Liberation of fixed formula C by zooxanthellae *in vitro*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 177, 237–250.
- Trench, R.K. et Thinh, L. (1995). *Gymnodinium linucheae* sp. nov.: The dinoflagellate symbiont of the jellyfish *Linuche unguiculata*. *Eur. J. Phycol.* 30, 149–154.
- Turk, E. et Wright, E.M. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447, 510–518.
- Twining, B.S. et Baines, S.B. (2013). The trace metal composition of marine phytoplankton. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 5, 191–215.
- Uchida, H., Taira, Y. et Yasumoto, T. (2013). Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 27, 1999–2008.
- Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y., Naoki, H. et Iwashita, T. (1981a). Further studies on palytoxin. II. structure of palytoxin. *Tetrahedron Lett.* 22, 2781–2784.
- Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y., Naoki, H. et Iwashita, T. (1981b). Further studies on palytoxin. I. *Tetrahedron Lett.* 22, 1909–1912.
- Uemura, T., Hirata, Y., Iwashita, T. et Naoki, H. (1985). Studies on palytoxins. *Tetrahedron* 41, 1007–1017.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y. et Yasumoto, T. (2001). Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2585–2588.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y. et Yasumoto, T. (1995). Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5389–5390.
- Vale-Gonzalez, C., Pazos, M.J., Alfonso, A., Vieytes, M.R. et Botana, L.M. (2007). Study of the neuronal effects of ouabain and palytoxin and their binding to Na,K-ATPases using an optical biosensor. *Toxicon* 50, 541–552.
- Valverde, I., Lago, J., Reboreda, A., Vieites, J.M. et Cabado, A.G. (2008). Characteristics of palytoxin-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 1432–1439.
- Van Goietsenoven, G., Hutton, J., Becker, J.-P., Lallemand, B., Robert, F., Lefranc, F., Pirker, C., Vandenbussche, G., Van Antwerpen, P., Evidente, A. et al. (2010). Targeting of eEF1A with Amaryllidaceae isocarboxystyryls as a strategy to combat melanomas. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 4575–4584.
- Venn, A.A., Wilson, M.A., Trapido-Rosenthal, H.G., Keely, B.J. et Douglas, A.E. (2006). The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, *Symbiodinium*. *Plant Cell Environ.* 29, 2133–2142.
- Vick, J.A. et Wiles, J.S. (1975). The mechanism of action and treatment of palytoxin poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34, 214–223.
- Vollmer, S.V. et Palumbi, S.R. (2002). Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science* 296, 2023–2025.

- Wakefield, T.S., Farmer, M.A. et Kempf, S.C. (2000).** Revised description of the fine structure of *in situ* “zooxanthellae” genus *Symbiodinium*. *Biol. Bull.* 199, 76–84.
- Walsh, G.E. et Bowers, R.L. (1971).** A review of Hawaiian zoanths with descriptions of three new species. *Zool J Linn Soc* 50, 161–180.
- Wang, J.T. et Douglas, A.E. (1997).** Nutrients, signals, and photosynthate release by symbiotic algae (the impact of taurine on the Dinoflagellate alga *Symbiodinium* from the sea anemone *Aiptasia pulchella*). *Plant Physiol.* 114, 631–636.
- Wang, J., Velotta, J.B., McDonough, A.A. et Farley, R.A. (2001).** All human Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1336–1343.
- Ware, J.R., Smith, S.V. et Reaka-Kudla, M.L. (1992).** Coral reefs: sources or sinks of atmospheric CO₂? *Coral Reefs* 11, 127–130.
- Warner, M.E., Fitt, W.K. et Schmidt, G.W. (1999).** Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8007–8012.
- Wattenberg, E.V. (2007).** Palytoxin: Exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C24–C32.
- Wattenberg, E.V. (2011).** Modulation of protein kinase signaling cascades by palytoxin. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* 57, 440–448.
- Wilcox, T.P. (1998).** Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: morphology does not recapitulate phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 436–448.
- Wiles, J.S., Vick, J.A. et Christensen, M.K. (1974).** Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon* 12, 427–433.
- Willis, B.L., Babcock, R.C., Harrison, P.L. et Wallace, C.C. (1997).** Experimental hybridization and breeding incompatibilities within the mating systems of mass spawning reef corals. *Coral Reefs* 16, S53–S65.
- Withers, K.J.T., Grant, A.J. et Hinde, R. (1998).** Effects of free amino acids on the isolated symbiotic algae of the coral *Plesiastrea versipora* (Lamarck): absence of a host release factor response. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 120, 599–607.
- WoRMS Editorial Board (2017).** World register of marine species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2017-03-02.
- Wright, E.M. (2001).** Renal Na⁽⁺⁾-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F10–18.
- Yamaguchi, H., Tanimoto, Y., Yoshimatsu, T., Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K. et Adachi, M. (2012).** Culture method and growth characteristics of marine benthic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. isolated from Japanese coastal waters. *Fish. Sci.* 78, 993–1000.
- Yasumoto, T., Yasumura, D., Ohizumi, Y., Takahashi, M., Alcalá, A.C. et Alcalá, L.C. (1986).** Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agric. Biol. Chem.* 50, 163–167.
- Young, M.R., Li, J.J., Rincón, M., Flavell, R.A., Sathyanarayana, B.K., Hunziker, R. et Colburn, N. (1999).** Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9827–9832.
- Yu, S.P. et Choi, D.W. (1997).** Na⁺-Ca²⁺ exchange currents in cortical neurons: Concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1273–1281.
- Zamolo, V.A., Valenti, G., Venturelli, E., Chaloin, O., Marcaccio, M., Boscolo, S., Castagnola, V., Sosa, S., Berti, F., Fontanive, G. et al. (2012).** Highly sensitive electrochemiluminescent nanobiosensor for the detection of palytoxin. *ACS Nano* 6, 7989–7997.
- Zamoum, T. et Furla, P. (2012).** *Symbiodinium* isolation by NaOH treatment. *J. Exp. Biol.* 215, 3875–3880.
- Zapata, M., Rodriguez, F. et Garrido, J.L. (2000).** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195, 29–45.
- Zilber-Rosenberg, I et Rosenberg, E. (2008).** Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 32(5), 723–735.

Annexe :

Classification supra-spécifique des Zoantharia

Ci-dessous, une présentation de la classification supra-spécifique actuelle de l'ordre Zoantharia avec une brève diagnose pour chaque groupe, d'après Low *et al.* (2016) :

Ordre des Zoantharia

Diagnose : Anthozoa dont les parois du corps sont généralement incrustées de sable ou de débris minéraux. Les tentacules sont toujours répartis en deux rangées. La majorité des espèces sont coloniales.

Sous-ordre Brachycnemina Haddon et Shackleton, 1891

Diagnose : Zoantharia dont les cinquièmes mésentères à partir des directifs dorsaux sont incomplets.

Comprend actuellement trois familles.

Famille Neozoanthidae Herberts, 1972

Diagnose : Zoantharia brachycnémiques zooxanthellés contenant uniquement des incrustations minérales partielles dans l'ectoderme qui s'étendent rarement à la mésoglée. Pas d'incrustations autour de l'extrémité orale au sommet des polypes.

Famille actuellement monogénérique.

Genre *Neozoanthus* Herberts, 1972

Diagnose : Voir famille ci-dessus.

Comprend actuellement 3 espèces.

Famille Sphenopidae Hertwig, 1882

Diagnose : Zoantharia brachycnémiques contenant des incrustations minérales dans l'ectoderme et la mésoglée.

Comprend actuellement 2 genres

Genre *Sphenopus* Streenstrup, 1856

Diagnose : Sphenopidae solitaires (non-coloniaux) contenant des incrustations minérales dans l'ectoderme et la mésoglée.

Comprend actuellement 4 espèces (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Palythoa* Lamouroux, 1816

Diagnose : Sphenopidae coloniaux contenant des incrustations minérales dans l'ectoderme et la mésoglée. Actuellement, toutes les espèces décrites sauf 2 vivent en symbiose avec des *Symbiodinium* spp. (Irei *et al.*, 2015)

Comprend actuellement plus de 200 espèces mais beaucoup pourraient être des synonymes en raison d'une variation morphologique intraspécifique importante (Burnett *et al.*, 1994).

Famille Zoanthidae Rafinesque, 1815

Diagnose : Zoantharia brachycnémiques avec peu ou pas d'incrustations minérales. Muscle marginal continu ou divisé et larves de type zoanthinae (Ryland and Lancaster, 2003). Toutes les espèces sont zooxanthellées et vivent en eaux tropicales et subtropicales.

Comprend actuellement 3 genres.

Genre *Zoanthus* Lamarck, 1801

Diagnose : Zoanthidae ne possédant pas d'incrustations minérales dans le coenenchyme et dont les polypes sont droits et lisses (à part pour *Zoanthus praelongus* Carlgren, 1954, qui a des polypes retombants), sans invaginations endodermiques. Le sphincter mésogléen comporte des sections distale et proximale distinctes. Un système de canaux est présent dans la mésoglée mais il ne forme pas de sinus annulaire (Swain and Swain, 2014).

Comprend actuellement plus de 150 espèces mais beaucoup pourraient être des synonymes en raison d'une variation morphologique intraspécifique importante (Burnett *et al.*, 1994, 1995; Reimer *et al.*, 2004).

Genre *Acrozoanthus* Saville-Kent, 1893

Diagnose : Zoanthidae ne possédant pas d'incrustations minérales dans la colonne/coenenchyme et souvent fixés sur la face extérieure des tubes des vers Eunice. Reproduction asexuée par bourgeonnement (Reimer *et al.*, 2011).

Genre actuellement monospécifique (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Isaurus* Gray, 1828

Diagnose : Zoanthidae ne possédant pas d'incrustations minérales dans la colonne/coenenchyme et dont les polypes sont retombants (non-érigés). Les polypes possèdent souvent des tubercules sur leur surface externe qui correspondent à une invagination endodermique, sauf chez *I. maculatus* Muirhead et Ryland, 1985, qui a des polypes lisses.

Comprend actuellement 3 espèces. Cinq espèces supplémentaires pourraient appartenir à ce genre (WoRMS Editorial Board, 2017) mais des études supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

Sous-ordre Macrocnemina Haddon et Shackleton, 1891

Diagnose : Zoantharia dont les cinquièmes mésentères à partir des directifs dorsaux sont complets.

Remarque : des études morphologiques et moléculaires récentes suggèrent que toute l'organisation taxonomique de ce sous-ordre devrait être revue (par exemple, Swain *et al.*, 2015).

Comprend actuellement 3 familles.

Famille Epizoanthidae Delage et Hérouard, 1901

Diagnose : Zoantharia macrocnémiques dont le sphincter est simple (Sinniger and Häussermann, 2009).

Remarque : des études morphologiques et moléculaires récentes suggèrent que la diagnose devrait être revue (par exemple, Swain *et al.*, 2015).

Comprend actuellement 3 genres.

Genre *Epizoanthus* Gray, 1867

Diagnose : Epizoanthidae contenant des micro-mésentères non-fertiles (Sinniger and Häussermann, 2009).

Comprend actuellement plus de 50 espèces (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Palaeozoanthus* Carlgren, 1924

Diagnose : Epizoanthidae contenant des micro-mésentères fertiles.

Remarque : Genre actuellement monospécifique qui ne contient que l'espèce type *P. reticulatus* qui n'a plus été rencontrée depuis sa première description. D'autres études sont nécessaires pour vérifier si ce genre ne correspondrait pas à *Terrazoanthus*.

Genre *Thoracactis* Gravier, 1918

Diagnose : Epizoanthidae à sphincters rudimentaires, azooxanthellés, et ne possédant pas de canaux ou de lacunes dans la mésoglée. Ils vivent sur des éponges de la classe Hexactinellida.

Remarque : Genre actuellement monospécifique qui ne comprend que l'espèce type *T. topsenti*. Bien que placé dans la famille Epizoanthidae, des études sont nécessaires pour vérifier si ce genre ne se référerait pas plutôt à la famille Parazoanthidae (Reimer *et al.*, 2010a).

Famille Hydrozoanthidae Sinniger, Reimer et Pawlowski, 2010

Diagnose : Motif d'insertion/délétion caractéristique dans le mt-16S rDNA, spécialement dans la région V5 *sensu* Sinniger *et al.* (2005). Phylogénétiquement, cette famille est plus étroitement reliée aux Zoantharia brachycnémiques (spécialement du genre *Palythoa*) qu'aux autres Zoantharia (Sinniger *et al.*, 2010).

Comprend actuellement 2 genres.

Genre *Hydrozoanthus* Sinniger, Reimer et Pawlowski, 2010

Diagnose : Hydrozoanthidae vivant en symbiose avec des espèces de la classe Hydrozoa.

Comprend actuellement 3 espèces (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Terrazoanthus* Reimer et Fujii, 2010

Diagnose : Hydrozoanthidae vivant sur des substrats rocheux et n'ayant pas de symbiose obligée avec des espèces de la classe Hydrozoa. Quelques espèces de ce genre sont vivement colorées (Reimer and Fujii, 2010).

Remarque : la diagnose de ce genre doit être revue depuis que *T. patagonichus* (Carlgren, 1898) vivant en association avec des Hydrozoa a été placé dans ce genre (Swain *et al.*, 2015).

Comprend actuellement 5 espèces. Deux espèces supplémentaires pourraient appartenir à ce genre (WoRMS Editorial Board, 2017) mais des études supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

Famille Microzoanthidae Fujii et Reimer, 2011

Diagnose : Colonies attachées à la partie inférieure (regardant vers le bas) de débris de coraux, des pierres avec aspérités, dans des étroites fissures ou occasionnellement sur des squelettes de coraux morts sur le sol marin boueux. Azooxanthellés, macrocnémiques. Les polypes sont connectés par d'étroits stolons ou solitaires. Particules de sable incrustées dans la colonne. Les particules incrustées dans l'ectoderme ont des tailles irrégulières. Les tentacules 2 ou 3 fois plus longs que le diamètre du disque oral étendu. Le bord du disque oral découpé selon un motif régulier, en forme de zigzag. (Fujii and Reimer, 2011).

Famille actuellement monogénérique.

Genre *Microzoanthus* Fujii et Reimer, 2011

Diagnose : Voir famille ci-dessus. Un sinus annulaire est présent juste sous la surface ectodermique (Swain and Swain, 2014).

Comprend actuellement 2 espèces.

Famille *Nanozoanthidae* Fujii et Reimer, 2013

Diagnose : Zoantharia macrocnémiques zooxanthellés à polypes bien développés et connectés par un stolon étroit. Des particules minérales sont incrustées dans la colonne de l'extrémité aborale jusqu'au bord du disque oral. Les particules incrustées dans l'ectoderme et légèrement dans la mésoglée ont des tailles irrégulières. Motif en zigzag, de couleur blanche sur le bord externe du disque oral. Sphincter mésogléal. Pas de lacune ou de sinus annulaire. Séquences COI et 16S rDNA significativement différentes de tous les autres genres de Zoanthidae (Fujii and Reimer, 2013).

Remarque : Les données moléculaires placent cette famille dans une position intermédiaire entre les Brachynemina et Macrocnemina, bien qu'elle soit actuellement dans les Macrocnemina. (Fujii and Reimer, 2013).

Famille actuellement monogénérique.

Genre *Nanozoanthus* Fujii et Reimer, 2013

Diagnose : Voir la famille ci-dessus.

Genre actuellement monospécifique. Une étude moléculaires indique que l'espèce européenne *Isozoanthus sulcatus* (Gosse, 1859) appartiendrait également à ce genre (Fujii and Reimer, 2013).

Genre actuellement monospécifique.

Famille *Parazoanthidae* Delage et Hérouard, 1901

Diagnose : Zoantharia macrocnémique possédant un sphincter endodermique. Les espèces de cette famille sont souvent associées à d'autres organismes qui leur servent de substrat (Sinniger and Häussermann, 2009). Cette famille exclut les espèces qui forment une monophylie avec les Brachynemina (Sinniger *et al.*, 2010).

Comprend actuellement 13 genres.

Genre *Parazoanthus* Haddon et Shackelton, 1891

Diagnose : Parazoanthidae possédant un système de canaux bien développé dans la mésoglée de la colonne qui forme un sinus annulaire. Souvent associés avec des éponges mais pas avec des espèces d'Hydrozoa. Pas de sécrétion squelettique (Sinniger *et al.*, 2010). Les incrustations minérales atteignent la surface endodermique de la mésoglée (Swain and Swain, 2014).

Comprend actuellement 15 espèces (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Antipathozoanthus* Sinniger, Reimer et Pawlowski, 2010

Diagnose : Parazoanthidae vivant uniquement sur des espèces de l'ordre Antipatharia (Anthozoa) et ne sécrétant pas de squelette.

Comprend actuellement 2 espèces.

Genre *Bergia* Duchassaing de Fombressin et Michelotti, 1860

Diagnose : Parazoanthidae possédant une délétion unique longue de 60 pb dans la région 16S-rDNA.

Comprend actuellement 3 espèces.

Genre *Bullagummizoanthus* Sinniger, Ocaña et Baco, 2013

Diagnose : Parazoanthidae possédant un motif d'insertion/délétion caractéristique dans la région 16S V5 *sensu* Sinniger *et al.* (2005).

Genre actuellement monospécifique.

Genre *Corallizoanthus* Reimer, in Reimer, Nonaka, Sinniger et Iwase, 2008

Diagnose : Parazoanthidae vivant en association avec des coraux vivant et précieux (Alcyonacea : Coralliidae). Pas de sécrétion de squelette sclérotéique. Les polypes sont d'abord, mais pas toujours solitaires (non coloniaux). Les incrustations vont jusqu'au centre de la mésoglée. Sphincter cycliquement transitionnel (Swain and Swain, 2014; Swain *et al.*, 2015).

Genre actuellement monospécifique.

Genre *Hurlizoanthus* Sinniger, Ocaña et Baco, 2013

Diagnose : Parazoanthidae associé à des espèces de la famille Primnoidae (Alcyonacea). Motif d'insertion/délétion caractéristique dans la région 16S V5 *sensu* Sinniger *et al.* (2005).

Genre actuellement monospécifique.

Genre *Isozoanthus* Carlgren, in Chun, 1903

Diagnose : Parazoanthidae possédant un sphincter endodermique marginal ainsi qu'un sinus annulaire discret dans la mésoglée.

Remarque : l'utilisation de la structure du sphincter étant remise en question pour servir de caractère diagnostique, la diagnose de ce genre est à revoir.

Comprend actuellement 17 espèces (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Kauluzoanthus* Sinniger, Ocaña et Baco, 2013

Diagnose : Parazoanthidae dont les polypes ne se contractent pas quand ils sont fixés. Motif d'insertion/délétion caractéristique dans la région 16S V5 *sensu* Sinniger *et al.* (2005).

Genre actuellement monospécifique.

Genre *Kulamanamana* Sinniger, Ocaña et Baco, 2013

Diagnose : Parazoanthidae associé avec des espèces de la sous-classe Octocorallia (Anthozoa) et sécrétant un squelette sclérotéique dont la couleur va de la couleur or au brun foncé. L'ectoderme est absent de particules minérales. Le coenchyme est bien développé et recouvre complètement l'hôte. Motif d'insertion/délétion caractéristique dans la région 16S V5 *sensu* Sinniger *et al.* (2005).

Genre actuellement monospécifique.

Genre *Mesozoanthus* Sinniger et Häussermann, 2009

Diagnose : Parazoanthidae azooxanthellés ayant une forme de croissance semblable à celle des espèces du genre *Parazoanthus*. Les polypes sont bien développés et possèdent des tentacules longs et pointus. Les polypes forment des amas reliés entre eux par un coenchyme basal. Les séquences d'ADN diffèrent significativement de celles des autres genres. Les polypes poussent principalement en petits groupes et ne sont pas connus pour coloniser des éponges de la classe Demospongiae.

Comprend actuellement 2 espèces.

Genre *Savalia* Nardo, 1844

Diagnose : Parazoanthidae ne possédant pas de système en canaux dans la mésoglée de la colonne. Ils sécrètent un squelette noir ou brun foncé et sont azooxanthellés.
Comprend actuellement 2 espèces (WoRMS Editorial Board, 2017).

Genre *Umimayanthus* Montenegro, Sinniger et Reimer, 2015

Diagnose : Parazoanthidae possédant une insertion unique et conservée longue de 9 pb ainsi qu'une délétion de 14 pb dans la région mt 16S-rDNA.
Comprend actuellement 4 espèces.

Genre *Zibrowius* Sinniger, Ocaña et Baco, 2013

Diagnose : Parazoanthidae contenant des incrustations minérales dans l'ectoderme. Les colonies sont arborescentes et ont une « forme de ventilateur ». Le squelette est doré. Le coenenchyme est bien développé et couvre complètement l'hôte. Motif d'insertion/délétion caractéristique dans la région 16S V5 *sensu* Sinniger *et al.* (2005).
Genre actuellement monospécifique.

Suborder Incertae sedis

Remarque : Actuellement, deux familles ne sont pas assignées à un sous-ordre.

Famille *Abyssoanthidae* Reimer et Fujiwara, in Reimer, Sinniger, Fujiwara, Hirano et Maruyama, 2007

Diagnose : Zoanthaires possédant des incrustations minérales et dont les polypes sont libres (non-coloniaux) et attachés à des substrats durs. Ils vivent dans les profondeurs marines abyssales autour de sources froides de méthane ou d'autres écosystèmes chimiosynthétiques.
Famille actuellement monogénérique.

Genre *Abyssoanthus* Reimer et Fujiwara, in Reimer, Sinniger, Fujiwara, Hirano et Maruyama, 2007

Diagnose : voir famille ci-dessus.
Comprend actuellement 2 espèces.

Famille incertae sedis

Genre *Stephanidium* Hertwig, 1888

Diagnose : Les polypes, unitaires, sont très petits (de 1,5 à 2,2 mm de diamètre et 1 mm de haut) et possèdent des microcnèmes et des macrocnèmes, bien que leur arrangement ne puisse pas être bien observé. Les intersections des mésentères donnent à la paroi du corps une apparence sillonnée avec des évaginations sphériques au-dessus de la zone où le sphincter est présent. Ils possèdent 26 mésentères.

Résumé

La palytoxine (PITX) est une molécule non-protéique complexe principalement produite par des espèces de Cnidaria du genre *Palythoa*, et qui figure parmi les molécules marines les plus toxiques. A l'heure actuelle, le mécanisme de sa biosynthèse et sa localisation cellulaire demeurent méconnues. Des études récentes ont mis en évidence une très forte cytotoxicité de la PITX envers des cellules cancéreuses. La cible cellulaire première est la pompe sodium/potassium qui fait office de récepteur. Le travail présenté dans ce manuscrit est le fruit d'une collaboration public/privé confidentielle et se situe en amont du développement pharmaceutique de la PITX ; il porte sur l'étude des sources biologiques de la PITX. Leur identification est nécessaire afin de développer un protocole industriel standardisé permettant d'obtenir des quantités suffisantes de toxine pour effectuer sa caractérisation chimique ainsi que les tests précliniques portant sur son activité anticancéreuse. Dans une première partie, l'activité anticancéreuse *in vitro* de la PITX a été évaluée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines. La PITX a montré un effet cytotoxique à la fois sur les lignées murines et humaines qui est 10^6 fois plus important sur les lignées cancéreuses par rapport aux lignées non cancéreuses témoins testées. La PITX utilisée dans ce travail a été purifiée à partir d'une espèce encore non décrite de *Palythoa*, et qui a été caractérisée sur la base d'une analyse phylogénétique et morphologique. Cette espèce de *Palythoa* constitue le Zoantharia dans lequel les quantités de PITX purifiée sont les plus élevées jamais enregistrées ($2,8 \pm 0,45$ mg/g). La localisation de la PITX dans les tissus de cette espèce de *Palythoa* a été décrite par des techniques innovantes d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. La deuxième partie de ce manuscrit présente une étude phylogénétique et une quantification de la PITX par HPLC chez 29 échantillons de Zoantharia. La spectrométrie de masse ESI a permis de préciser la formule chimique du type de PITX purifiée à partir de ces échantillons. La dernière partie est une étude préliminaire sur la culture *ex-hospite* des endosymbiotes unicellulaires appartenant au genre *Symbiodinium*. Les cellules des endosymbiotes ont été isolées à partir d'espèces de *Palythoa* contenant de hautes concentrations de PITX afin de tester leur implication dans la synthèse de PITX. L'optimisation des cultures ainsi que le rôle des *Symbiodinium* spp. dans la synthèse de la PITX sont abordés. En conclusion, il ressort que la PITX présente un effet anticancéreux *in vitro* très prometteur et que le moyen le plus efficace actuellement pour obtenir de la PITX en quantité importante est de l'extraire à partir d'une espèce de *Palythoa* caractérisée grâce à ce travail.

Abstract

Palytoxin (PITX) is a complex non-protein molecule produced mainly by Cnidaria species of the genus *Palythoa*. It is one of the most potent marine toxins. At present, the biosynthesis and cellular localization of the toxin remain unknown. Recent studies have demonstrated a strong cytotoxicity of PITX against cancer cells. The first cell target is the sodium/potassium pump which constitutes a receptor. The work presented in this manuscript is the outcome of a confidential public/private collaboration in prerequisite of PLTX pharmaceutical development. This work concerns the study of biological sources of PITX. Their identification is required to develop an industrial-standard protocol in order to obtain sufficient quantity of toxin to perform its chemical characterization and carry out preclinical anticancer tests. In the first part of this thesis, the *in vitro* anti-cancer activity of PITX was evaluated upon several human and murine cancerous cell lines. The cytotoxic activity of PITX was effective against human and murine cancerous lines and was 10^6 -times more powerful against cancerous lines compared to non-cancerous control lines. The PITX used in this work was purified from an undescribed species of *Palythoa* which was characterized based on phylogenetic and morphological analyses. This *Palythoa* species is the Zoantharia in which purified PITX levels are the highest ever recorded (2.8 ± 0.45 mg/g). PITX localization in tissues of this *Palythoa* species was also described by innovative MALDI mass spectrometry imaging techniques. The second part of this thesis presents a phylogenetic study of 29 samples of Zoantharia and quantification of PITX by HPLC. The ESI-mass spectrometry allowed to characterize the chemical formula of the type of PITX purified from these samples. The last part of this thesis constitutes a preliminary study on the *ex-hospite* culture of unicellular endosymbionts belonging to the genus *Symbiodinium*. Endosymbiont cells were isolated from *Palythoa* species containing high PITX concentrations in order to test their implication in PITX synthesis. Attempts of culture optimization were performed, and the role of *Symbiodinium* spp. in PITX synthesis is discussed. In conclusion, PLTX has a very promising *in vitro* anticancer activity, and the best way to obtain large quantities of PITX is the extraction from a *Palythoa* species that was characterized in this work.