

FLUX IONIQUES ET TRANSPORT DU BICARBONATE À TRAVERS LES FEUILLETS ÉPITHÉLIAUX DU TENTACULE D'*ANEMONIA VIRIDIS* (FORSSKÅL, 1775)

Sylvie BÉNAZET, Denis ALLEMAND, Jean JAUBERT

Centre Scientifique de Monaco, Observatoire Océanologique Européen, Principauté de Monaco

Chez les Cnidaires anthozoaires, le coelenteron est séparé de l'eau de mer externe par un tissu composé de deux couches épithéliales : un ectoderme en contact avec le milieu extracœlenterique et un endoderme en contact avec le milieu intracœlenterique. Les deux feuillets sont séparés par une couche de mésoglye. La communication entre le coelenteron et l'eau de mer externe se fait par l'intermédiaire d'un orifice unique "bouche" dont l'ouverture est assurée par des muscles. Deux hypothèses concernant le renouvellement du liquide coelenterique sont envisageables : soit une aspiration/expulsion d'eau par la bouche, soit des systèmes de transport transépithéliaux. Dans le but de caractériser les propriétés du tissu oral des Cnidaires, nous avons utilisé comme modèle d'étude le tentacule de l'anémone de mer *Anemonia viridis* (FORSSKÅL, 1775). Les 150 à 200 tentacules peu rétractiles de cette espèce méditerranéenne peuvent atteindre 15 cm de longueur. Le protocole expérimental choisi pour l'étude des transports ioniques est le suivant : une partie du tentacule est découpée dans le sens de la longueur, puis placée à l'intérieur d'une chambre de Ussing. La chambre de Ussing est constituée de deux hémichambres d'un volume unitaire de 200 µl. La surface utile exposée est de 0,2 cm² soit une quantité de protéines de 1,13 ± 0,068 mg. Des expériences de cinétique isotopique avec du calcium (⁴⁵Ca), du sodium (²²Na) et du chlore (³⁶Cl) ont permis de déterminer les propriétés de perméabilité des feuillets épithéliaux. L'eau de mer contenant le radioisotope est placée dans une hémichambre et l'apparition de la radioactivité est suivie en fonction du temps dans l'hémichambre opposée. L'action du cyanure 1 mM, inhibiteur des transports actifs, a été testée afin de caractériser le type de transport. Les flux entrant (c-à-d. du milieu extratentaculaire vers le milieu intratentaculaire) et sortant (c-à-d. du milieu intratentaculaire vers le milieu extratentaculaire) ont été déterminés de même que le flux net résultant de la différence entre le flux entrant et le flux sortant. Pour chaque ion testé, les valeurs du flux entrant sont superposées aux valeurs du flux sortant, le flux net est donc nul. Les valeurs des flux entrants sont reportées dans le tableau 1.

Ion	Flux entrant (nmol. min ⁻¹ .cm ⁻²)	Flux entrant (nmol. min ⁻¹ .mg Protéines ⁻¹)
Ca ²⁺	5 ± 0,45	0,88 ± 0,08
Na ⁺	540 ± 20	95,58 ± 3,54
Cl ⁻	1000 ± 200	176,99 ± 35,4

Tableau 1

Les flux sont insensibles au cyanure ce qui suggère que les ions cheminent par simple diffusion en empruntant une voie de passage paracellulaire. Dans ces conditions les coefficients de perméabilité ont pu être déterminés d'après la relation : $J_d = A \cdot C \cdot P_d$ où A est la surface membranaire, C la concentration et P_d le coefficient de perméabilité. Les valeurs des coefficients de perméabilité sont reportées dans le tableau 2.

Ion	Coefficient de perméabilité (10 ⁻⁵ cm. s ⁻¹)
Ca ²⁺	10
Na ⁺	11
Cl ⁻	2,45

Tableau 2

Ces valeurs de perméabilité comparées à celles obtenues pour d'autres épithéliums permettent de classer le tissu du tentacule d'*Anemonia viridis* parmi les épithéliums de type lâche. Un autre aspect de ce travail a consisté en l'étude du transport des ions bicarbonate à travers les feuillets du tentacule. Les cellules endodermiques contiennent en effet des dinoflagellés *Symbiodinium* sp. (FREUDENTHAL, 1962) communément appelés zooxanthelles (TRENCH, 1981). Ces zooxanthelles sont entourées d'une membrane vacuolaire d'origine animale (SMITH et DOUGLAS, 1987). Pour assurer leur taux maximal de photosynthèse, les zooxanthelles ont besoin de gaz carbonique. Le CO₂ fourni par la respiration des cellules animales et des cellules végétales (1,67 ± 0,2 nmol O₂. min⁻¹. mgProtéines⁻¹) ne suffit pas à alimenter la photosynthèse qui produit 7,19 ± 1,13 nmol O₂. min⁻¹. mgProtéines⁻¹ à une intensité lumineuse de 300 µmol. m⁻². s⁻¹. Les zooxanthelles doivent donc utiliser une autre source de carbone inorganique (C_i). Dans l'eau de mer le CO₂ dissous n'est présent qu'à la concentration de 10 µM. Le C_i est présent majoritairement sous la forme de bicarbonate (2 mM). Des expériences ont été réalisées dans des eaux de mer avec ou sans bicarbonate. Le tentacule est perfusé pendant 20 min avec le milieu désiré puis placé dans des respiromètres. L'absence de bicarbonate dans le milieu extratentaculaire et intratentaculaire provoque une inhibition de la photosynthèse de 98% par rapport aux conditions de contrôle (eau de mer de part et d'autre). Le bicarbonate est donc la source principale de C_i absorbé par les cellules animales pour être ensuite fourni aux zooxanthelles sous forme de CO₂. En absence de bicarbonate extratentaculaire, l'inhibition photosynthétique est de 67% alors qu'elle n'est que de 37% en absence de bicarbonate intratentaculaire. Ces résultats suggèrent que la source majeure de bicarbonate provient de l'eau de mer extratentaculaire et que le bicarbonate ne diffuse pas à travers les deux couches épithéliales. L'approvisionnement majoritaire en bicarbonate par le milieu extratentaculaire permet de maintenir le pouvoir tampon du milieu intratentaculaire évitant ainsi des variations du pH intratentaculaire qui sont néfastes aux fonctions cellulaires. Plusieurs mécanismes de transport des ions bicarbonate ont été décrits chez les cellules animales. Parmi eux, nous avons testé la présence éventuelle de l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻ en utilisant un inhibiteur spécifique : le SITS (4-Acétamido-4'-Diisothiocyantostilbène-2'-disulfonic acid). Le tentacule est perfusé dans de l'eau de mer avec ou sans SITS pendant 20 min puis placé dans ces mêmes conditions dans des cuves de mesure de la production d'oxygène. En présence de SITS extratentaculaire et intratentaculaire, l'inhibition est de 65% ce qui montre la présence d'un échangeur de type Cl⁻/HCO₃⁻. L'effet du SITS est plus important (50% vs 30%) lorsque l'inhibiteur est placé dans le milieu extratentaculaire que lorsqu'il est placé dans le milieu intratentaculaire. Ces résultats confirment donc que la source majoritaire de bicarbonate provient du milieu extratentaculaire mais aussi que ce bicarbonate emprunte un échangeur anionique vraisemblablement situé sur les membranes des cellules ectodermiques.

RÉFÉRENCES

FREUDENTHAL H. D., 1962. - *Symbiodinium* gen. nov. *Symbiodinium microdriaticum* sp nov., a zooxanthella : taxonomy, life cycle, and morphology. *J. Protozool.* 9 : 45-52.
SMITH D. C. & DOUGLAS A. E., 1987. - Algae in symbiosis II. With marine hosts (animals and protists). In : The biology of symbiosis. Willis A. J. & Sleight M. A. (eds). Edward Arnold, Baltimore, pp 33-46.
TRENCH R. K., 1981. - Cellular and molecular interactions in symbioses between dinoflagellates and marine invertebrates. *Pure & Appl. Chem.* 53 : 819-835.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 34, (1995).

MICROBIAL DIVERSITY IN NORTHERN ADRIATIC SEA : PRELIMINARY OBSERVATIONS

S. CARDINALI¹, M. SABEC¹, P. DEL NEGRO², P. RAMANI²

¹ International Centre for Theoretical and Applied Ecology, Gorizia, Italy

² Marine Biology Laboratory, Trieste, Italy

Marine bacteria often dominate the plankton biomass and are responsible for much of the cycling of organic matter. However, bacterial diversity is poorly understood because conventional identification methods neglect about 99% of the organisms (FUHRMAN *et al.*, 1992). Since 1993 a study of microbial diversity has been carried out in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea) using different enumeration and identification media. The experimental data obtained have been compared with epifluorescence estimation of bacterial number. A superficial water sample was collected aseptically in May 1993 in a station 300 m offshore in the Gulf of Trieste; 5 ml of the collected sample was filtered on 0,22 µm polycarbonate black membrane (Nucleopore) and stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (PORTER and FEIG, 1980) in order to detect autotrophic and heterotrophic microorganisms; the same amount was filtered on 0,22 µm polycarbonate black membrane (Nucleopore) for SEM observations which was carried out after fixing in OsO₄ freeze drying and gold coating. Serial dilutions of the same sample were inoculated (six replicates) by spreading on twelve different media : with or without natural or artificial sea water, with glucose, cellulose or chitin as carbon source (OKAZAKI and OKAMI, 1976; SCHNEIDER and RHEINHEIMER, 1991). In order to evaluate the anthropic contamination total coliforms were detected too. Results are reported on Table.

marine agar	PCA	PCA	PCA	PYA	PYA	PYS	CELL	CHI	MYS	GG	SC
DIFCO	0 NaCl	sw	asw	sw	asw						
200	300	25	50	10	20	20	10	10 ³	0	0	0

Table : viable bacteria (CFU/ml) on different media-PCA (Plate count agar), PYA (Pectone yeast extract agar), PYS (Pectone yeast extract salt solution agar), CELL (Cellulose agar), CHI (Chitine agar), MYS (Maltose yeast extract agar), GG (Glycerol glycine agar), SC (starch caseine agar), sw (seawater), asw (artificial seawater).

In spite of the absence of coliforms, terrigen contribution was evident, given the high number of colonies developing on PCA without NaCl and considering that more than half are unable to grow on marine agar. On the other hand, the 75% marine agar growing strains develop in unsalted media. These observation suggest a dominance of bacteria unaffected by NaCl, rather than purely marine bacteria. The geographical position of the Gulf of Trieste with coastal areas densely populated and with inputs of important rivers, as Isonzo and Tinavo, may explain the situation observed (DEL NEGRO *et al.*, 1993). All colonies developed on Chitine agar are Actinomycetes belonging to the genus *Sireptomycetes*, a common component of the coastal environment (GOODFELLOW and WILLIAMS, 1983). Using epifluorescence technique 5.5 x 10⁶ total cells/ml (5.8 x 10⁴ autotrophic microorganisms/ml) were detected. Although a discrepancy between epifluorescence and cultural counts may reflect the wellknown presence of unculturable microorganisms, the difference observed in this study is greater than previously reported results for the area considered (DOLZANI *et al.*, 1989). Nevertheless a longer incubation period (5-6 days) allows the development of several strains, on the higher dilution plates, belonging mainly to the genus *Rhodococcus* and to an unidentified spirillum. The SEM observation revealed a considerable amount of microorganisms of unusual shapes. Some of these have been reported previously as soil microorganisms (NIKITIN, 1973); others to the best of our knowledge, are unknown (Fig. 1 and 2). The cell wall of star shaped microorganism (Fig. 1) was studied by means of X ray microanalysis which identified the presence of silicone, a typical constituent of diatoms theca. In any case, the microorganism size may be consistent with a protistic nature.

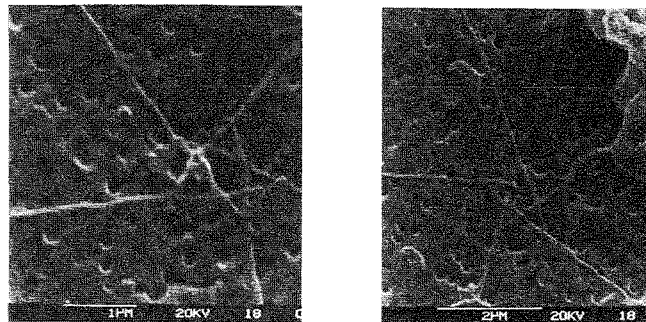


Fig.1 : Phaeocystis trichocysts (SEM observation)

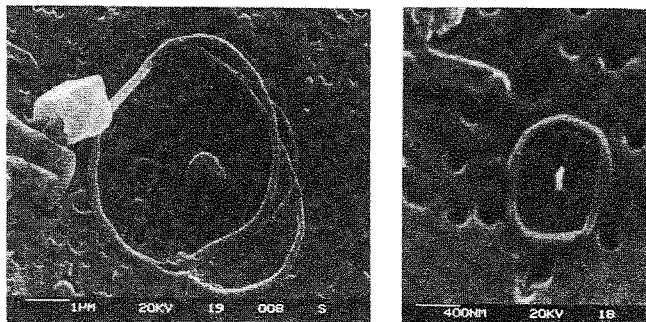


Fig.2 : Unusual shapes (SEM observation)

REFERENCES

DEL NEGRO P., MILANI L., SANZIN F., BURBA N., FONDA UMANI S., 1993 in Production, Environment and quality. *European Aquaculture Society*, 5, 18 : 569-577.
DOLZANI L., TAMARO M., VIDMAR S., GAMBOZ C., MONTI-BRAGADIN C., 1989. *Boll. Oceanogr. T. Appl.* 5 : 139-146.
FUHRMAN J.A., MCCALLUM K., DAVIS A.A., 1992. *Nature*, 365 : 148-149.
GOODFELLOW M., WILLIAM S.T., 1983. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37 : 189-216.
NIKITIN D.I., 1973. *Bull. Ecol. Res. Com.* (Stockholm), 17 : 85-92.
OKAZAKI T., OKAMI Y., 1976. In Actinomycetes : the boundary microorganisms. T. Arai ed. Topan Company Limited Tokyo : 123-161.
PORTER K.G., FEIG Y., 1980. *Limol. Oceanogr.*, 25 : 943-948.
SCHNEIDER J., RHEINHEIMER G., 1991 in Methods in aquatic bacteriology. Austin Ed. Edinburg : 73-93.