

UTILISATION DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE POUR L'ÉTUDE DES ENDOSYMBIOSES MARINES APPLICATION À L'ÉTUDE DE L'ANÉMONE DE MER MÉDITERRANÉENNE *ANEMONIA VIRIDIS*

Sylvie Bénazet-Tambuté et Denis Allemand*

Observatoire Océanologique Européen, Centre Scientifique de Monaco, MC-98000 Monaco

Résumé

Afin d'étudier les relations qui existent chez les Anthozoaires entre les cellules animales et leurs endosymbiotes intracellulaires photosynthétiques (Dinoflagellés), une méthode originale basée sur le fort pouvoir de discrimination spatiale qu'offre la microscopie confocale a été développée. L'approvisionnement en carbone inorganique nécessaire à la photosynthèse des Dinoflagellés est suivi par des mesures directes du pH intracellulaire. Les mesures de pH sont réalisées à l'aide de la sonde fluorescente carboxy SNARF-AM. Les résultats préliminaires obtenus montrent une hétérogénéité dans la distribution du pH, avec un gradient de pH décroissant du Dinoflagellé vers le cytoplasme animal.

Key-words : *Cnidaria*, *Dinoflagellates*, *instruments and Techniques*, *physiology*, *symbiosis*

L'endosymbiose est caractérisée par la présence, à l'intérieur d'un organisme appelé "hôte", d'un autre organisme appelé endosymbiote. Ce type de symbiose revêt une importance écologique et physiologique majeure. L'endosymbiose modifie en effet profondément l'écologie, la physiologie, le développement et le comportement des deux partenaires (1) et représente l'un des moteurs les plus puissants de l'évolution du monde vivant (2). Cependant, les relations symbiotiques et les interactions cellulaires qui existent entre les endosymbiotes phototrophes et leurs hôtes hétérotrophes restent encore énigmatiques sur de nombreux points.

La répartition géographique de l'endosymbiose établie entre les Cnidaires Anthozoaires et leurs zooxanthelles (Dinoflagellés phototrophes du genre *Symbiodinium*) s'étend des eaux tempérées (et donc de la Méditerranée) aux régions tropicales : dans les régions tempérées, l'hôte animal est principalement l'anémone de mer alors qu'en milieu tropical l'endosymbiose est également contractée avec les coraux constructeurs de récifs (3). Les zooxanthelles sont contenues à l'intérieur des cellules endodermiques de l'hôte. Elles sont isolées du cytoplasme par une membrane d'origine animale, la membrane périsymbiotique. Les zooxanthelles permettent aux cellules animales d'être autotrophes par rapport au carbone en leur procurant des produits issus de leur photosynthèse. Pour réaliser leur photosynthèse, les dinoflagellés symbiotiques ont besoin de gaz carbonique (CO_2). Cet approvisionnement pose cependant un double problème. En effet d'une part la source majeure de carbone inorganique en milieu marin est le bicarbonate et non le CO_2 (ce dernier représentant moins de 0,5% du carbone inorganique dissous), d'autre part les Dinoflagellés ne sont pas en contact direct avec l'eau de mer, mais séparés du milieu intérieur de l'animal (coelentéron) par la cellule endodermique dans laquelle le Dinoflagellé vit en symbiose et du milieu extérieur par une couche de cellules ectodermiques, une lame basale de collagène (mésoglée) et par une couche de cellules endodermiques.

Des travaux effectués à l'Observatoire Océanologique Européen (4-9) ont montré que les cellules hôtes animales développent des systèmes originaux d'absorption et de transport transépithéliaux de bicarbonate (de type échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ décrit primitivement dans les globules rouges de vertébrés) afin de fournir du CO_2 aux symbiotes photosynthétiques. Ces études ont été réalisées au niveau de l'organisme entier ou de tissus isolés. Afin de caractériser les systèmes de transport au niveau cellulaire, il était nécessaire d'utiliser les techniques de l'imagerie cellulaire. Le transport de carbone inorganique et le pH étant deux paramètres directement liés, nous avons choisi d'étudier les variations de pH intracellulaire comme étant le reflet de modifications (stimulation ou inhibition) du transport de carbone inorganique. La différence importante de volume existant entre l'endosymbiote et le cytoplasme de la cellule hôte (qui ne représente que quelques % en volume de la cellule endodermique) rendait aléatoire toute tentative de mesure du pH avec des isotopes. L'utilisation de sondes fluorescentes permettait en revanche une étude au niveau de cellules isolées. Cependant, les techniques classiques d'imagerie cellulaire ne permettaient pas une discrimination spatiale entre le cytoplasme animal et l'endosymbiote (Fig. 1).

Grâce à sa grande capacité de discrimination spatiale, le microscope confocal nous a permis de différencier la cellule animale endodermique de la cellule algale. Cet outil permet de se positionner précisément sur l'axe z et donc de choisir le plan de coupe à étudier (Fig. 2). De plus, l'effet confocal, c'est-à-dire l'élimination des contributions lumineuses situées hors du focus, permet d'obtenir un pouvoir résolutif important dans le trajet optique axial.

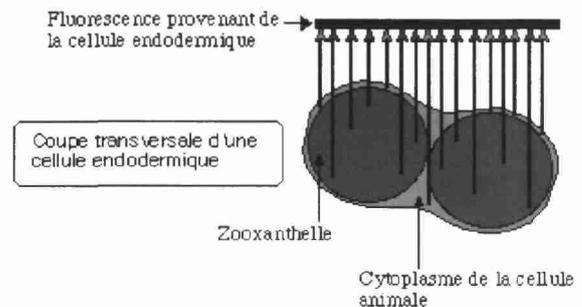


Fig. 1. Imagerie cellulaire classique. Il n'y a pas de discrimination entre la fluorescence émise par la zooxanthelle et par le cytoplasme de la cellule animale.

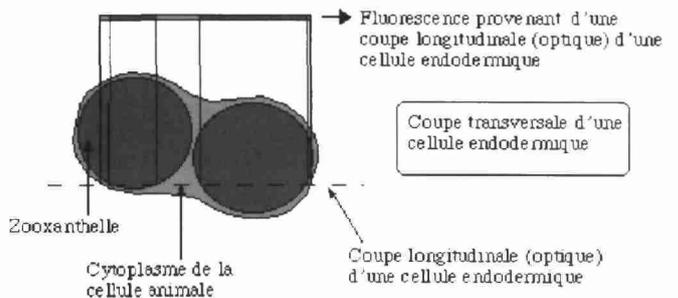


Fig. 2. Microscopie confocale. Il y a discrimination entre la fluorescence émise par la zooxanthelle et par le cytoplasme de la cellule animale.

L'étude est réalisée sur des cellules endodermiques extemporanément isolées de l'anémone de mer. Dix tentacules d'*Anemonia viridis* sont découpés transversalement et longitudinalement, puis sont rincés dans de l'EMC (NaCl 540 mM, KCl 9,5 mM, NaHCO_3 2 mM, EGTA 25 mM, pH 8,2). Les cellules endodermiques sont dissociées de l'ectoderme dans l'EMC par grattage à l'aide d'une pince courbe. Les cellules endodermiques sont reprises dans 10 ml d'EMC et sont filtrées 4 fois dans une seringue équipée d'un filtre de $30 \mu\text{m}$ de diamètre de maille. Les cellules sont centrifugées à 950 g pendant 2 min à 20°C . Le culot est repris dans 2 ml d'eau de mer filtrée et l'ensemble est homogénéisé à la pipette. De l'agarose (type VII-A, low gelling temperature, Sigma) 1,8% est préparé à 37° dans de l'eau de mer filtrée, la solution est ensuite refroidie à 22°C . 366,5 μl de la préparation cellulaire sont déposés sur la lamelle d'une chambre de culture Lab Tek et sont mélangés à de 233,4 μl d'agarose 1,8% afin d'obtenir un gel final à 0,6%. La polymérisation a lieu à température ambiante sous atmosphère humide pendant 7 min. Le gel est recouvert d'1 ml d'eau de mer filtrée. A partir d'une solution mère de carboxy SNARF1-AM, 12 mM dans de l'eau ultrapure, du carboxy SNARF1-AM 12 μM est préparé dans de l'eau de mer filtrée. Une solution à 4% d'acide pluronique dans de l'eau distillée est chauffée et passée aux ultrasons. La solution de charge comprend 0,04% d'acide pluronique et 12 μM de carboxy SNARF1-AM dans de l'eau de mer. L'eau de mer baignant les cellules dans leur gel est remplacée par la solution de charge. La charge a lieu à l'obscurité pendant 30 min, à température ambiante. Les cellules dans le gel sont rincées dans de l'eau de mer filtrée et reprises