

Université d'Aix-Marseille
Centre d'Océanologie de Marseille

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES
À L'UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE
SPÉCIALITÉ : BIOSCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT ET SANTÉ

par

Paola FURLA

MÉCANISMES DE TRANSPORT DE CARBONE INORGANIQUE DANS L'ASSOCIATION SYMBIOTIQUE CNIDAIRE-DINOFLAGELLÉ

Soutenue le 16 décembre 1999, devant le jury composé de :

Mme	Maria Novella Orsenigo
MM.	Denis Allemand
	François Charles Boudouresque
	Clive Ellory
	Patrick Payan
	Alain Puppo
	André Toulmond

Directeur de thèse : M. Denis Allemand

Rapporteurs : MM. Patrick Payan & André Toulmond

RÉSUMÉ

L'étude de la symbiose entre un Anthozoaire et un Dinoflagellé phototrophe présente un grand intérêt non seulement dans l'étude de la symbiose photosynthétique, mais également dans les processus de calcification car ces invertébrés sont parmi les plus importants organismes marins calcifiants. Ainsi, au sein de cette association symbiotique, les phénomènes de photosynthèse et calcification présentent un point commun : l'utilisation de carbone inorganique en tant que substrat.

Dans ce travail, nous avons étudié de manière approfondie les sources et les mécanismes de transport du carbone inorganique pour la photosynthèse algale, mais également pour le processus de calcification des coraux. Dans un premier temps, une analyse microscopique des feuilletts épithéliaux des Anthozoaires, nous a permis d'apprécier les différences structurales existant entre le tissu oral et aboral des Anthozoaires. Par la suite, l'utilisation de tentacules d'anémone de mer de Méditerranée, *Anemonia viridis*, selon divers montages expérimentaux (*in vivo*, en sac, en perfusion ou en chambre de Ussing), ainsi que la purification de la membrane apicale des cellules ectodermiques, ont permis d'établir un modèle cohérent d'absorption de carbone inorganique pour la photosynthèse. En effet, nos données ont démontré que la source majoritaire de carbone inorganique pour la photosynthèse des Dinoflagellés symbiotiques est le HCO_3^- présent dans le milieu externe, impliquant ainsi le passage du HCO_3^- à travers le feuillet épithélial ectodermique. Ce dernier peut être franchi soit par voie paracellulaire (15% du carbone inorganique total fixé par la photosynthèse), soit par voie transcellulaire (85%). L'absorption de carbone inorganique au niveau de la membrane apicale des cellules ectodermiques se fait grâce à la présence d'une H^+ -ATPase associée à une anhydrase carbonique (membranaire et cytoplasmique). Au niveau des cellules endodermiques, l'absorption de HCO_3^- du milieu externe implique la déshydratation de celui-ci en CO_2 et ion OH^- . La sécrétion des ions OH^- vers la cavité coelentérique de l'animal, provoque alors une alcalinisation du milieu coelentérique. Au final, ces résultats démontrent, la présence d'une polarité morphologique (présence des symbiotes phototrophes exclusivement au sein des cellules endodermiques) associée à une polarité fonctionnelle (absorption HCO_3^- du milieu externe et sécrétion d'ions OH^- vers le milieu coelentérique). Dans un deuxième temps, l'analyse compartimentale de l'incorporation du ^{45}Ca et du $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ dans des microcolonies de *Stylophora pistillata*, corail constructeur de

récif, nous a permis d'élucider les sources et les mécanismes de transport du carbone inorganique pour la calcification. Nos données prouvent que la source majoritaire de carbone inorganique pour la calcification est le CO₂ métabolique (à environ 70 %), alors que seulement 30 % du carbone inorganique précipité dans le squelette provient du milieu externe. De plus, nos résultats font valoir un rôle prédominant, au sein des cellules squelettogéniques, d'une anhydrase carbonique et d'un échangeur anionique dans la sécrétion du carbone inorganique vers le site de calcification. Enfin, le dernier volet de ce travail a permis d'approfondir les interactions existantes entre la calcification et la photosynthèse. L'analyse des variations, en présence de lumière, de la calcification, du pH coelentérique, de l'alcalinité total et de la concentration en HCO₃⁻ du milieu coelentérique de *Stylophora pistillata* et *Trachyphyllia geoffroyi*, ont permis de présenter un nouveau modèle de stimulation de la calcification à la lumière qui tient compte d'un rôle prépondérant du pH coelentérique.

Mots clefs : Symbiose photosynthétique - Anthozoaires - Dinoflagellé - Carbone inorganique - Photosynthèse - Calcification - Transport transépithélial - Mécanismes de concentration du carbone - Polarité fonctionnelle.

ABSTRACT

The study of interactions between an Anthozoan and a phototroph Dinoflagellate is of interest not only in order to investigate photosynthetic symbiosis, but also calcification mechanisms. Indeed, these invertebrates are the most important marine calcifying organisms. Thus, in this symbiotic association, calcification and photosynthesis have in common the use of inorganic carbon as substrate.

In this work, we investigated the sources and the mechanisms of inorganic carbon transports for algal photosynthesis and for coral calcification. We first performed microscopic studies on the epithelial layers of a sea anemone, *Anemonia viridis*, in order to further understand the structural differences between an uncalcifying (the anemone) and a calcifying Anthozoan (the coral). Afterwards, different settings of the Mediterranean sea anemone, *Anemonia viridis*, tentacle (in vivo, in bag, in perfusion or in Ussing chamber), and the purification of the apical plasma membrane of ectodermal cells, allowed to establish a coherent model of inorganic carbon absorption for the algal photosynthesis. Indeed, our data demonstrated that the major inorganic carbon source for the Dinoflagellate photosynthesis is the HCO_3^- present in the external medium, inducing the transport of the HCO_3^- across the ectodermal epithelial layer. This transport is carried through a paracellular pathway (15 % of the total inorganic carbon fixed by the algal photosynthesis), and by a transcellular pathway (85%). The inorganic carbon absorption on the apical membrane of the ectodermal cells is performed by a H^+ -ATPase associated to a carbonic anhydrase. The absorption of HCO_3^- by the endodermal cells induces its dehydration in CO_2 and OH^- ions. The OH^- ions secretion toward the coelenteric cavity, induces then an alkalisation of the medium. Finally, these results demonstrated the presence of a morphologic polarity (the phototroph symbionts are present only in the endodermal cells) associated to functional polarity (HCO_3^- absorption from the external medium and secretion of OH^- toward the coelenteron). The second part of this study describes a compartmental analysis of the ^{45}Ca and ^{14}C - HCO_3^- incorporation in microcolonies of the reef-building coral *Stylophora pistillata*. This work was performed in order to clarify the sources and the transport mechanisms of inorganic carbon for calcification. Our data demonstrated that the major source of inorganic carbon for calcification is metabolic CO_2 (70 % of the total inorganic carbon deposited in the skeleton), although only 30 % originates from the external medium. Moreover, our results

determined a predominant role of a carbonic anhydrase and an anion exchanger in the secretion, by the skeletogenic cells, of the inorganic carbon toward the calcification site. Finally, the last study performed allowed to deepen the knowledge of the interaction between calcification and photosynthesis in the association between Cnidarian and Dinoflagellates. The modification of the coelenteric pH, total alkalinity and HCO_3^- concentration in the corals, *Stylophora pistillata* and *Trachyphyllia geoffroyi*, allowed to present a new model of light-enhanced calcification which is dependent upon the coelenteric pH.

Key words: Photosynthetic symbiosis - Anthozoan - Dinoflagellate - Inorganic carbon - Photosynthesis - Calcification - Transepithelial transport - Inorganic carbon concentrating mechanism - functional polarity.