

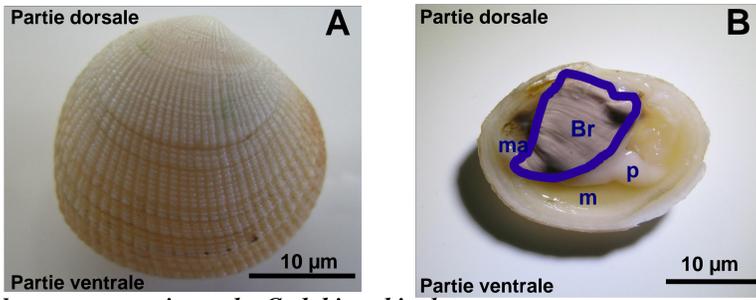
N.H Elisabeth⁽¹⁾, M-N Sylvestre⁽¹⁾, S.D.D Gustave⁽¹⁾, P. Jean-Louis⁽¹⁾, T. Césaire⁽²⁾, A. Caro⁽³⁾, J-L Mansot^(2,4) et O. Gros^(1,4).

1- UMR-CNRS 7138 Systématique-Adaptation-Evolution, Equipe Biologie de la mangrove. Université des Antilles et de la Guyane, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Département de Biologie BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe; nathalie.elisabeth@univ-ag.fr
 2- Groupe de Technologie des Surfaces Interfaces (GTSI) Université des Antilles et de la Guyane, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe.
 3- Ecosystèmes lagunaires, Université Montpellier II, UMR-CNRS-Ifremer-IRD 5119, 34095 Montpellier, France.
 4- Centre Commun de Caractérisation des Antilles et de la Guyane (C3MAG) Université des Antilles et de la Guyane, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe.

INTRODUCTION Tous les bivalves de la famille des Lucinidae vivent en symbiose avec des bactéries endocellulaires sulfo-oxydantes qu'ils hébergent dans des cellules spécialisées de leurs branchies appelées bactériocytes. Chez le bivalve côtier tropical *Codakia orbiculata*, ces cellules occupent les 2/3 supérieurs de la zone latérale du filament branchial. Dans le tiers inférieur se trouve le second type cellulaire majoritaire de la branchie : les cellules à grains. Ces cellules sont non symbiotiques et riches en protéines soufrées. Des expériences de carence nutritive permettant la décolonisation du filament branchial par les bactéries (Caro *et al.* 2009), ont montré qu'il existait une véritable plasticité, tant tissulaire que cellulaire, des filaments branchiaux. Le but de notre étude est de préciser les conséquences sur l'hôte et sur le symbiote d'une carence nutritive prolongée. Les techniques biologiques de coloration histologique et d'hybridation moléculaire nous ont permis de mettre en rapport l'organisation tissulaire de la branchie et l'évolution de la population bactérienne au sein du filament. Le métabolisme des symbiotes sulfo-oxydants conduit à la formation de granules de soufre élémentaire dans l'espace périplasmique. Ainsi, le suivi semi-quantitatif de cet élément par spectrométrie de fluorescence X durant la décolonisation a été réalisé afin d'être mis en relation avec l'évolution de la population bactérienne. Enfin, un suivi des protéines totales a été effectué par dosage afin de savoir si l'augmentation en cellules à grains conduirait à une augmentation des protéines.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique : *Codakia orbiculata* (Montagu, 1802)



Vues macroscopiques de *Codakia orbiculata*
 A: Vue externe montrant la coquille ; B: Vue anatomique montrant la branchie (Br) entourée en bleu, le pied (p), le manteau (m) et les muscles adducteurs (ma).

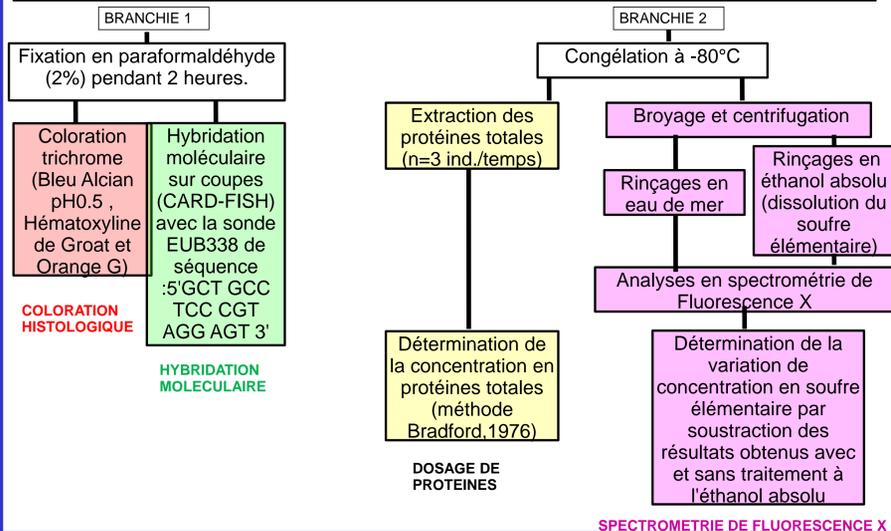


Herbier à *Thalassia testudinum* (habitat naturel)



Décolonisation bactérienne par carence nutritive durant 15 mois (laboratoire)

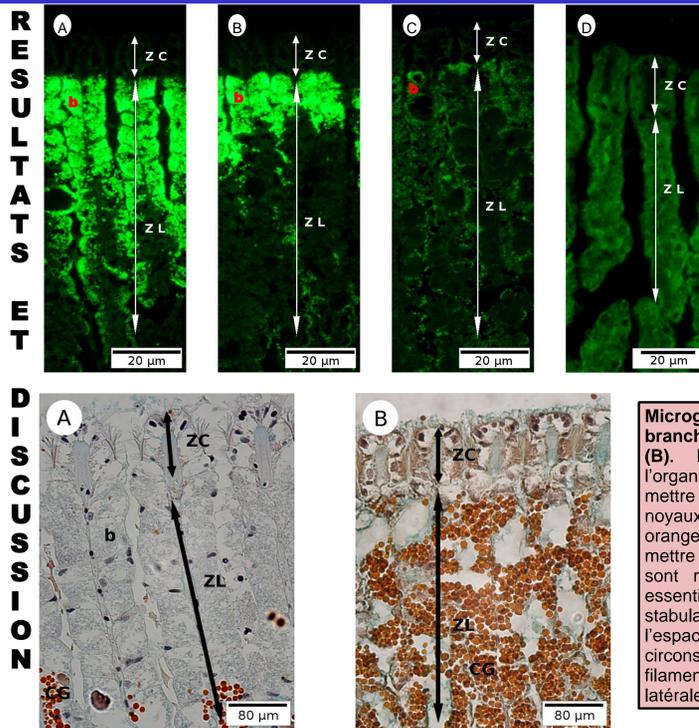
3 individus fraîchement prélevés de l'herbier à *Thalassia testudinum* sont directement sacrifiés. Ils serviront de témoins (T0). D'autres sont maintenus au laboratoire dans des bacs d'eau de mer filtrée à 0,2 µm en absence de soufre et de nourriture (stabulation). 3 individus sont sacrifiés à intervalles réguliers : 4 mois (4M), 9 mois (9M) et 15 mois (15M) de stabulation. Les deux branchies, lieux de la symbiose, subissent les traitements suivants :



CONCLUSION L'utilisation combinée de techniques biologique, biochimique et de spectrométrie de fluorescence X chez des individus ayant subi une carence nutritive prolongée a permis de mettre en évidence une perte en soufre élémentaire liée à la diminution du nombre de bactéries symbiotiques détectables dans la branchie. A cela s'associe un amaigrissement de la branchie avec réorganisation du filament branchial en faveur des cellules à grains qui ne parviennent toutefois pas à compenser la perte protéique due à l'absence des symbiotes et des bactériocytes.

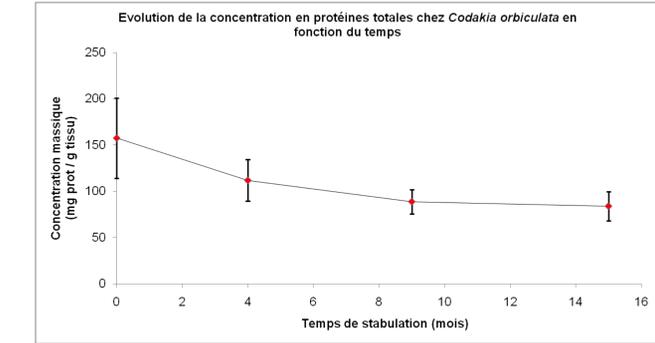
BIBLIOGRAPHIE

•Caro *et al.* 2007 Characterization of the Population of the Sulfur-Oxidizing Symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by Single-Cell Analyses AEM 73: 2101-2109
 •Caro *et al.* 2009 Effects of Long-Term Starvation on a Host Bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and Its Symbiont Population AEM 75: 3304-3313

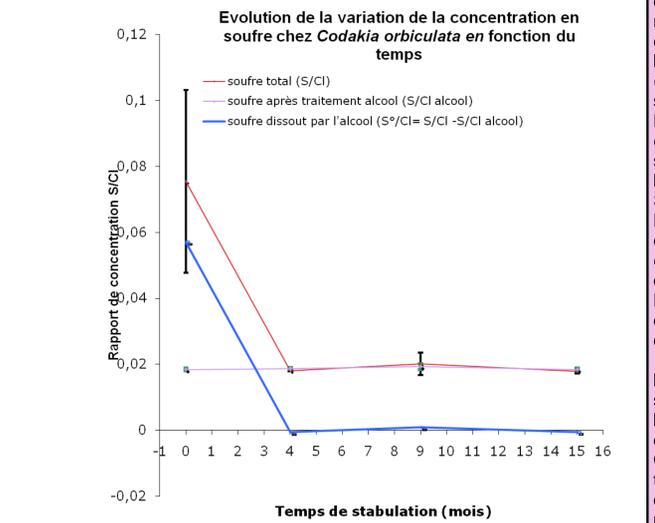


Micrographies en microscopie à fluorescence de coupes de branchies de *Codakia orbiculata* témoin (A), stabulée 4 mois (B), stabulée 9 mois (C) et stabulée 15 mois (D). La technique du Card-Fish permet de mettre en évidence les bactéries présentes dans le filament branchial. Les bactéries symbiotiques sont cantonnées aux bactériocytes (b) situés dans la zone latérale (ZL). La zone ciliée (ZC) est toujours exempte de bactéries. Ces micrographies montrent une diminution nette du nombre de bactéries détectables au fil des mois de stabulation. La décolonisation du filament branchial par les bactéries est progressive. La perte en bactéries est très marquée sur les 4 premiers mois. Après 15 mois de stabulation les bactéries symbiotiques ne sont plus détectables par la technique Card-Fish ce qui laisse supposé que le filament branchial est purgé.

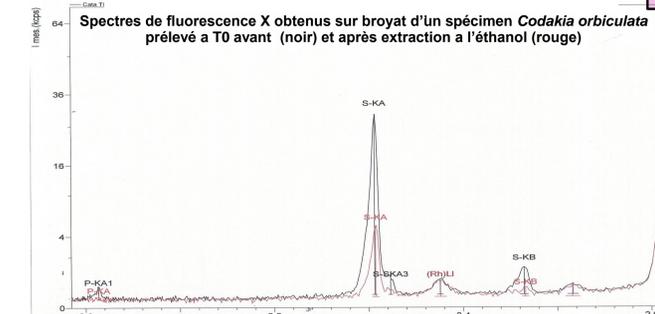
Micrographies en microscopie photonique de coupes de branchies de *Codakia orbiculata* témoin (A) et stabulée 15 mois (B). La coloration histologique trichrome permet d'étudier l'organisation tissulaire de la branchie. Le bleu alcian permet de mettre en évidence les mucocytes, l'hématoxyline de Groat colore les noyaux en noir et l'Orange G révèle les cellules à grains (CG) en orange. Chez le témoin (A), la triple coloration histologique permet de mettre en évidence une zone latérale (ZL) dont les 2/3 supérieurs sont riches en bactériocytes, et dont la partie abfrontale est essentiellement pourvue de cellules à grains. Au fur et à mesure de la stabulation, les cellules à grains vont progressivement occuper tout l'espace de la zone latérale, les bactériocytes (b) se retrouvant alors circonscrits à une étroite zone située dans la partie frontale du filament. Chez l'animal stabulé 15 mois, la quasi-totalité de la zone latérale est occupée par les cellules à grains. ZC : zone ciliée



La concentration massique en protéines totales diminue rapidement au cours des quatre premiers mois de stabulation. Cette diminution évolue plus lentement entre 4 et 9 mois et tend à se stabiliser au delà. Elle est inversement proportionnelle à l'augmentation des cellules à grains de la zone latérale. Ainsi, la diminution de la concentration massique en protéines peut être mise en relation avec les résultats obtenus en CARD FISH : la perte en protéines totales serait essentiellement liée à la disparition des bactéries et des bactériocytes. Cette diminution ne serait pas compensée par l'augmentation des cellules à grains pourtant riches en protéines soufrées. Ceci vient corroborer les résultats obtenus au laboratoire qui montrent un amaigrissement de la branchie au cours de la stabulation (résultats non présentés).



Les analyses par fluorescence X sont réalisées sur des échantillons de tissu broyés dans de l'eau de mer pour des fractions massiques tissu/eau de mer égales. La concentration en soufre sont exprimées sous forme du rapport S/Cl, le chlore de l'eau de mer étant l'étalon interne de quantification (concentration constante en chlore dans les différentes suspensions). Les courbes rouge et mauve correspondent respectivement à l'évolution de la concentration de soufre dans les broyats bruts de palourdes et après traitement des broyats à l'éthanol absolu (extraction du soufre élémentaire S) en fonction du temps de stabulation des spécimens. La courbe bleue, obtenue par différence entre les deux premières courbes, correspond ainsi à l'évolution de la concentration de soufre élémentaire S₀ (associé aux bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes) dans les spécimens en fonction du temps de stabulation. La courbe d'évolution de la concentration en soufre S₀ en fonction du temps de stabulation montre une décroissance rapide en début de stabulation pour atteindre une valeur nulle après 4 mois. Cette diminution est à mettre en relation avec la diminution des bactéries observée en Card-Fish. En effet, les bactéries symbiotiques présentent des granules de soufre élémentaire dans leur cytoplasme. La disparition de ces cellules entraînerait donc une diminution de la concentration en soufre dans la branchie. D'après Caro *et al.* 2007, la quantité de soufre élémentaire augmente avec la taille de la cellule. Au cours de la décolonisation les grandes cellules ont tendance à disparaître rapidement ce qui expliquerait la forte pente observée entre 0 et 4 mois de stabulation.



Les spectres montrent, dans la gamme de longueurs d'ondes présentée, plusieurs raies de fluorescence dont les raies K alpha et K beta du Soufre et la raie K alpha du chlore. On peut noter la constance du signal du au chlore (eau de mer) avant et après extraction à l'éthanol justifiant l'utilisation de cet élément comme étalon interne. Le signal de soufre se voit drastiquement réduit après extraction à l'éthanol