

Analyse de la symbiose chimiotrophe chez la moule *Bathymodiolus azoricus*: une approche métaprotéomique



Cléa Bauvais¹, Isabelle Boutet¹, Arnaud Tanguy², Emmanuelle Demy³, Joëlle Vinh³, Jean Mary¹.

¹ Equipe Ecophysiologie des Invertébrés Marins en Milieux Extrêmes, UMR CNRS-UPMC 7144, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France
² Equipe Génétique de l'Adaptation aux Milieux Extrêmes, UMR CNRS-UPMC 7144, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France

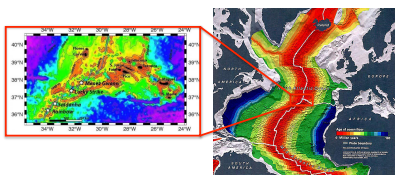
³ Unité de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, USR CNRS 3149, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, F-75005 Paris, France

Introduction

Les moules du genre *Bathymodiolus* sont des espèces endémiques des sources hydrothermales. Leur large distribution géographique fait apparaître différentes espèces comme *B. thermophilus* qui colonise la ride du Pacifique oriental, à des profondeurs de 2500 m, ou *B. azoricus*, localisée sur la dorsale médio-Atlantique, à des profondeurs s'échelonnant de 800 à 4000 m. Ces organismes constituent un modèle de choix pour l'étude de la symbiose mutualiste. En effet, certaines cellules, les bactériocytes, du tissu épithélial des branchies de ces moules hébergent des endosymbiotes chimiosynthétiques qui assurent la production primaire (énergie et matière carbonée) à partir des composés réduits dissous dans l'eau de mer environnante. Ces bactéries assurent ainsi une partie de l'apport nutritif nécessaire à la survie de l'hôte dans ces milieux extrêmes. Chez *Bathymodiolus azoricus*, la symbiose est double, les bactériocytes hébergeant deux types de γ -protéobactéries chimiotrophes physiologiquement et phylogénétiquement différentes : les bactéries sulfo-oxydantes (SOX) qui utilisent les sulfures (H_2S) comme source d'énergie et les bactéries méthanotrophes (MOX) qui utilisent le méthane (CH_4) comme source d'énergie. L'un des caractéristiques de ce modèle est la plasticité de la charge symbiotique en fonction des conditions du milieu.



Faune hydrothermal au niveau du site « Tour Eiffel » (champ hydrothermal Lucky Strike), dorsale Médio-Atlantique, 1700 m de profondeur.



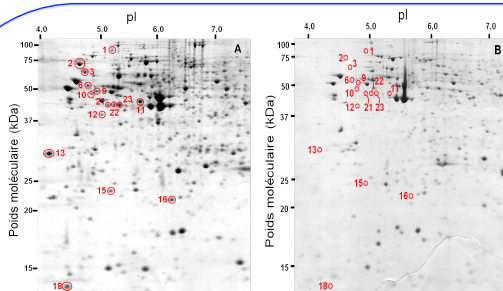
Objectifs de l'étude

A partir d'individus collectés sur deux sites hydrothermaux aux paramètres physico-chimiques bien contrastés (cf tableau ci-contre), Rainbow et Menez Gwen est-il possible de mettre en évidence:

-des protéines différenciellement exprimées en fonction du site et de l'abondance relative des symbiotes hébergés?

-des protéines impliquées dans la régulation et/ou le maintien de la charge symbiotique?

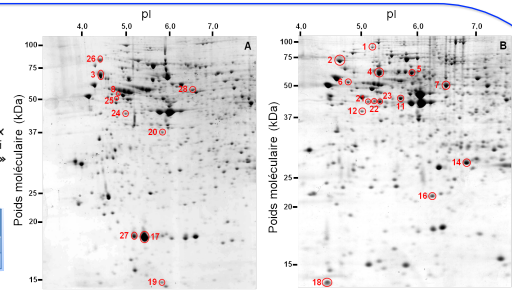
	Menez Gwen	Rainbow
Profondeur (m)	850	2300
Température (°C)	265 - 284	360 - 365
pH	4,2 - 4,8	2,8 - 3,1
Fe (mg.l ⁻¹)	1,3 - 1,6	1339
Mn (mg.l ⁻¹)	3,2 - 3,7	123
Cu (mg.l ⁻¹)	40 - 180	8900
Zn (mg.l ⁻¹)	0,16 - 0,33	10,5
Cd (mg.l ⁻¹)	1,01 - 1,34	14,6
H ₂ S (mg.l ⁻¹)	1,3 - 1,82	1 - 2,92
CH ₄ (mg.l ⁻¹)	1,7	2,5
CH ₄ : H ₂ S	0,93 - 1,31	0,99 - 2,5



Résultats

Les quantités relatives moyennes des bactéries SOX et MOX dans les deux populations de moules ainsi que pour celles « dépurées » ont été déterminées par qPCR:

Site	Abondance bactérienne
Menez Gwen	SOX + MOX
Rainbow	SOX + MOX



Spot N°	Identification	PM (kDa) Exp / Calc	pI Exp / Calc	Abondance du spot MG / MGd
1	Facteur d'élongation G1	86 / 77,436	5,2 / 4,89	86,5
2	Hsp70	69 / 68,736	4,4 / 5,02	95,8
3	Cpn60	69 / 57,615	4,6 / 4,8	7,8
6	ATP synthase F1 α	52 / 55,758	4,6 / 4,9	50,9
9	ATP synthase F1 β	49 / 50,739	4,8 / 4,95	14,9
10		48 / 49,608	4,7 / 4,88	25,0
11	Actine	44 / 42,218	5,0 / 5,37	109,6
13		43 / 31,033	5,1 / 5,47	35,3
23		42 / 44,342	5,4 / 5,61	114,0
12	Mrp-ATPase	40 / 38,591	5,0 / 7,66	44,2
13	Anhydase carbonique	30 / 38,933	5,8 / 5,50	3,4
15		23 / 20,957	5,2 / 5,5	8,0
16	AhpC	18 / 21,844	6,2 / 6,2	155,3
18	Régulateur transcriptionnel de la CspA	8 / 7,609	4,0 / 5,66	304,0
22	DsrAB	44 / 39,054	5,2 / 4,81	52,3

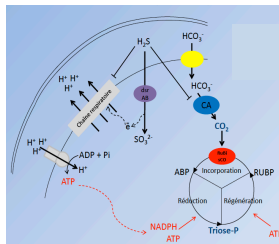
Protéines bactérienne Protéines de l'hôte

Localisations dans les voies métaboliques des symbiotes chimiosynthétiques des principales protéines identifiées.

DsrAB : Sulfite-réductase dissimilatrice (voie d'oxydation du soufre), spécifiques des bactéries sulfuroxydantes. Cet enzyme pourrait également jouer un rôle clé dans la détoxification d' H_2S via son oxydation. La différence de quantité observée entre les sites Menez Gwen et Rainbow refléterait la différence d'abondance relative des deux types de symbiote entre deux sites.

Rubisco : ribulose-1,5-diphosphate carboxylase / oxygénase (assimilation du CO_2 par carboxylation du D-ribulose 1,5 biphosphate au cours de la première étape du cycle de Calvin).

CA : Anhydase carbonique (transport et/ou fixation du CO_2)



Spot N°	Identification	PM (kDa) Exp / Calc	pI Exp / Calc	Abondance du spot MG / Rb
1	Facteur d'élongation G1	86 / 77,436	5,2 / 4,89	3,2
2	Hsp70	69 / 68,736	4,4 / 5,02	1,6
26		82 / 68,676	4,6 / 4,61	0,5
3	Cpn60	69 / 57,615	4,6 / 4,8	0,15
4		58 / 57,301	5,3 / 4,8	1,99
5	Tabuline α 3	83 / 54,558	6,0 / 6,25	2,6
6	ATP synthase F1 α	52 / 55,758	4,6 / 4,9	1,3
7	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase chaine α	50 / 52,552	6,3 / 5,6	1,8
8	ATP synthase sous-unité β	46 / 44,136	5,0 / 5,25	5,0
25	ATP synthase sous-unité β	45 / 49,608	5,0 / 4,88	0,06
11	Actine	44 / 42,218	5,0 / 5,37	9,4
21		43 / 31,033	5,1 / 5,47	9,8
23		42 / 44,342	5,4 / 5,61	5,1
12	Mrp-ATPase	40 / 38,591	5,0 / 7,66	1,2
14	Hsp30	27 / 31,312	6,4 / 7,14	3,5
16	AhpC	18 / 21,844	6,2 / 6,2	1,6
17	Cathepsine L	17 / 30,245	5,6 / 6,36	0,33
27		8 / 7,609	4,0 / 5,66	2,1
18	Régulateur transcriptionnel de la CspA	8 / 7,609	4,0 / 5,66	2,1
19	Inconnue	11 / 25,414	5,7 / 8,74	0,01
20	Ketol-acide reductoisomerase	37 / 36,685	6,1 / 6,09	---
22	DsrAB	44 / 39,054	5,2 / 4,81	2,5
24	ARN polymérase sous-unité α	44 / 36,833	5,2 / 5,43	0,1
28	ATP synthase, sous-unité α	57 / 47,199	6,2 / 5,73	0,3

La ferritine AF, protéine de l'hôte, est impliquée dans le stockage intracellulaire et la détoxification du fer. Elle est présente en plus grande abondance chez les moules provenant du site Rainbow que chez celles provenant du site Menez Gwen, probablement en réponse à la forte concentration en fer dans le milieu à Rainbow. Cependant, des résultats de transcriptomique montrent un niveau d'expression équivalent pour le gène correspondant pour les deux populations de moule \rightarrow Mise en évidence d'un mécanisme d'accumulation post-transcriptionnel?

Le précurseur de la cathepsine L est plus abondant chez les moules ayant subi un mécanisme de dépuración que chez les moules natives. Cette protéase pourrait être impliquée dans la régulation de la population de symbiotes au niveau des bactériocytes.

Conclusions et perspectives:

Dans cette étude préliminaire, nous avons analysé le métaprotéome de branchie de la moule hydrothermale *Bathymodiolus azoricus* - protéines de l'hôte et des symbiotes méthanotrophes et sulfuroxydants. Nous avons mis en évidence la variation d'expression de protéines spécifiques de l'hôte en réponse aux conditions physico-chimiques du milieu (par exemple, surexpression de la ferritine AF chez les moules provenant des sites Rainbow vs. Menez Gwen) et à la charge en symbiotes (par exemple surexpression du précurseur de la cathepsine L chez les moules « dépurées » vs. « natives »). D'autre part, nous avons pu lier le niveau d'expression de certaines protéines bactériennes jouant un rôle clé dans le métabolisme chimiosynthétique avec l'abondance relative des symbiotes MOX et SOX. Les échanges de matière étant au cœur du processus symbiotique, l'analyse du protéome membranaire doit être mis en œuvre sur le modèle *Bathymodiolus azoricus*.

Matériels et méthodes:

1- Echantillonnage:

Campagne océanographique MoMARETO (Août - septembre 2006, chef de mission J. Sarrazin), dorsale Médio-Atlantique, sites Menez Gwen (MG) et Rainbow. Dépuración d'individus de MG en aquarium d'eau de mer (sans CH_4 ni H_2S) en présence d'un cocktail métallique mimant les conditions du site Rainbow.

2- Extraction des protéines:

Branchies boyées dans N_2 liquide, protéines précipitées avec mélange Acétone - 10% TCA - 0,07% β -mercaptoéthanol. Protéines resuspendues dans 7M urea, 2M thiourée, 2% CHAPS, 1% ampholites.

3- Electrophorèse 2D:

1^{ère} dimension: Strips 17 cm, pH 4-7, réhydratation passive (12h, 50V), migration sous 10 000 V pour 60 000 V.h.
2^{ème} dimension: PAGE-SDS 12%
Coloration des gels au bleu colloïdal.

4- Analyse des gels:

Image Master 2D platinum (GE Healthcare)
Test Student sur volume relatif des spots
 $p < 0,05$ (d.d.l. = 8, $\alpha = 0,05$, $t = 2,306$)

5- Spectrométrie de masse et identification des protéines

Digestion tryptique « in-gel », peptides analysés sur 4800 MALDI-TOF/TOF Analyser (Applied Biosystems). Recherches (Mascot 2.2.04 - Matrixscience) réalisées sur les banques de séquences de protéines Uniprot, NCBI et une banque d'EST de *B. azoricus* (A. Tanguy).