



HAL
open science

Transport du CO₂ et échanges ioniques chez un animal autotrophe, le vestimentifère *Riftia pachyptila* : étude de l'anhydrase carbonique et des transporteurs impliqués

Marie-Cécile De Cian

► To cite this version:

Marie-Cécile De Cian. Transport du CO₂ et échanges ioniques chez un animal autotrophe, le vestimentifère *Riftia pachyptila* : étude de l'anhydrase carbonique et des transporteurs impliqués. Biologie cellulaire. Paris 6, 2002. Français. NNT: . tel-01115662

HAL Id: tel-01115662

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115662>

Submitted on 12 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, PARIS VI

Spécialité : Biologie Intégrée des Invertébrés

Présentée par

Marie-Cécile DE CIAN

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de thèse :

Transport du CO₂ et échanges ioniques chez un animal autotrophe,

le vestimentifère *Riftia pachyptila*.

Etude de l'anhydrase carbonique et des transporteurs impliqués

**Thèse dirigée par le Dr. François LALLIER
Soutenue le 31 Mai 2002 devant le jury composé de :**

Pr Patrick Walsh	University of Miami, Florida, USA	Rapporteur
Dr Olivier Gros	Université Antilles-Guyane, Pointe-à-Pitre	Rapporteur
Pr Patrick Porcheron	Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur
Dr Jean-Yves Toullec	Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur
Dr Françoise Gaill	CNRS, Paris	Examineur
Dr François Lallier	Université Pierre et Marie Curie, Roscoff	Directeur de thèse

À Marie et Attilio

À mes parents, à ma soeur
À Hélène

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée à la Station Biologique de Roscoff au sein de l'équipe Ecophysiologie.

Je remercie le Professeur André Toulmond pour son accueil à la Station Biologique.

Je remercie le Docteur François Lallier pour son accueil au sein de l'équipe Ecophysiologie, pour ses conseils et sa disponibilité tout au long de ces trois années de thèse, mais aussi pour m'avoir permis de participer à deux campagnes océanographiques et m'avoir toujours encouragé à établir des collaborations extérieures.

Merci à l'ensemble de l'équipe Ecophysiologie, Michèle Regnault, Fabrice Durand, Xavier Bailly, Franck Zal, Ann Andersen, Claude Jouin-Toulmond, Fabienne Chausson, Stéphane Hourdez et Dominique LeGuen, pour leur soutien, leur aide, et pour avoir toujours su répondre à mes "exigences" du moment qui ne souffraient aucun délai !

Je voudrais sincèrement remercier Julia Morales et Stéphane Egée pour leur pertinence scientifique si précieuse dont j'ai sans doute abusé, mais aussi toute l'amitié qu'ils ont su m'accorder. Un grand merci à Nicole Guyard et Maryse Collin du service de documentation, Olivier Collin et Claude Leroux du service informatique pour leur aide efficace et rapide, le personnel de l'hôtel de France ainsi que le personnel technique. Un grand merci aussi à toutes les personnes extérieures à la station avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer, à Paris, Strasbourg, Brest et San Diego.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'être les rapporteurs et examinateurs de ce travail.

Un merci tout particulier et unique à Arnaud Lacoste, pour être à mes côtés depuis le début de cette aventure et pour m'avoir toujours soutenue, encouragée et supportée (!). Tout aussi particulier mais pour d'autres raisons, un grand merci à Marie Knockaert et Stéphane Egée pour leur générosité, leur sens de l'humour, leur esprit critique incisif et pourtant si inventif, leurs talents culinaires et leurs goûts musicaux. J'adresse également tous mes remerciements à Florent, Xavier, Isabelle, Annabelle, Thierry, Marie, Fabrice, Florence, Pascal, François-Yves, Julie, Patrick(s) qui ont tous participé activement à des moments de vie très agréables, riches en événements, en surprises, et inoubliables pour certains.

Enfin, j'adresse une pensée particulière à mes proches, extérieurs au microcosme roscovite et scientifique, et qui ont pourtant vécu et écrit une thèse à travers moi : Françoise, Yvan, Clément, Caroline, Fabienne, Philippe, Klaus, Carole, Nicole, Francis, Fabrice, Gilles, Franck, Thierry, Magali, Sandrine et Olivier.

Et Merci à toi, Hélène, amie absolue et intemporelle, qui ne lira sans doute jamais ce manuscrit !

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	8
CHAPITRE I – <i>Riftia pachyptila</i>, CO₂ et anhydrase carbonique	13
CHAPITRE II – Matériel et Méthodes d'étude	67
CHAPITRE III – Etude physiologique de la conversion du CO₂ et du maintien de l'équilibre ionique sur des bactériocytes isolés.	96
CHAPITRE IV – Localisation tissulaire de l'anhydrase carbonique cytosolique et des transporteurs membranaires associés.	126
CHAPITRE V – Caractérisation de la ou des isoformes d'anhydrase(s) carbonique(s) présente(s) chez <i>Riftia pachyptila</i>	159
CHAPITRE VI – Discussion, Conclusions et Perspectives	196
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	220

SOMMAIRE DETAILLE

INTRODUCTION GENERALE	8
CHAPITRE I – <i>Riftia pachytila</i>, CO₂ et anhydrase carbonique	13
I. Vestimentifères et écosystème hydrothermal profond	14
A. Paramètres géologiques et physico-chimiques des sources hydrothermales	16
B. Structure des peuplements hydrothermaux	18
C. Physiologie et anatomie générale de <i>Riftia pachytila</i>	21
D. La symbiose	24
1. Etablissement de la symbiose	24
2. Anatomie fonctionnelle des lobules du trophosome	27
3. Métabolisme de la symbiose	28
E. Bactéries, CO ₂ et anhydrase carbonique	34
1. Intéractions CO ₂ -bactéries	34
2. Modèle physiologique proposé en début de thèse	37
II. Les Anhydrases Carboniques (CA)	40
A. Répartition dans le monde vivant et rôles biologiques	40
B. Les familles multigéniques : structure et particularités	41
1. Les - anhydrases carboniques	41
2. Les - anhydrases carboniques	45
3. Les - anhydrases carboniques	46
C. Les fonctions biologiques	47
1. La respiration	48

2. Les principales fonctions métaboliques	50
- CA et la régulation de l'équilibre acido-basique et ionique dans les tubules rénaux	50
- CA, cycle de l'urée et néoglucogenèse	51
3. La calcification	54
4. Les phénomènes de cancérisation	55
D. Anhydrase carbonique et échanges ioniques	57
1. Les échanges de sodium, de protons et de potassium	61
2. Les échanges chlorures-bicarbonates	64
CHAPITRE II – Matériel et Méthodes d'étude	67
I. Echantillonnage - Un modèle biologique symbiotique, <i>Riftia pachyptila</i>	68
II. Physiologie à bord : Techniques de dissociation cellulaire des bactériocytes	70
A. Préparation des échantillons	70
B. Choix des milieux et conditions de culture	71
1. Deux milieux testés	71
2. Modifications majeures apportées, optimisation du protocole	71
3. Expériences de culture à plus long terme	72
C. Test d'inhibition	72
III. Physiologie au laboratoire : Traitement des échantillons	74
A. Mesure des concentrations en ions majoritaires	74
B. Mesure du pH intra- et extracellulaire	74
C. Identification des bactériocytes par hybridation <i>in-situ</i>	75

IV.	Techniques histologiques	76
	A. Fixations des tissus à bord	76
	B. Hybridation <i>in situ</i> ARN-ARN	77
	C. Immunohistocalisation	80
	D. Localisation de CA par histochimie avec le DNSA	81
	E. Microscopie électronique à transmission	82
V.	Caractérisation des protéines	83
	A. Extraction des protéines	83
	B. Western blot	84
	1. Choix des anticorps	84
	2. Immunoprécipitation	85
	C. Test d'activité enzymatique	86
	D. Détection de CA en conditions natives sur gel	87
	E. Fractionnement des extraits protéiques totaux par FPLC-HR75	88
	F. Analyse en spectrométrie de masse	89
	1. Digestion des protéines sur gel	89
	2. MALDI-TOF	90
	3. Microséquençage	91
VI.	Caractérisation moléculaire	91
	A. Dessin d'amorces pour CA et la Bande 3	91
	B. Synthèse d'ADNc, amplification par PCR, clonage et séquençage	92
	C. Criblage d'une banque d'ADNc et 5'-RACE PCR	93
	D. Hybridation des ARN sur membrane (Northern Blot)	95
	E. Analyse de séquences	95

CHAPITRE III – Etude physiologique de la conversion du CO₂ et du maintien de l'équilibre ionique sur des bactériocytes isolés. 96

Article : "Isolated bacteriocyte cell suspensions from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, a potent tool for cellular physiology in a chemoautotrophic symbiosis.

Soumis à Marine Biology (2002).

CHAPITRE IV – Localisation tissulaire de l'anhydrase carbonique cytosolique et des transporteurs membranaires associés. 126

Article : "Expression and localization of carbonic anhydrase and ATPases in the symbiotic tubeworm *Riftia pachyptila*".

Soumis à Journal of Experimental Biology (2002).

CHAPITRE V – Caractérisation de la ou des isoformes d'anhydrase(s) carbonique(s) présente(s) chez *Riftia pachyptila* 159

Article : "An insight into molecular and biochemical characteristics of carbonic anhydrases from *Riftia pachyptila*, a symbiotic invertebrate living under extreme conditions."

Soumis à Journal of Molecular Biology (2002).

CHAPITRE VI – Discussion, Conclusions et Perspectives 196

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 220

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 237

RESUME - ABSTRACT

INTRODUCTION

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans la thématique commune développée par l'équipe Ecophysiologie de la Station Biologique de Roscoff, l'étude des mécanismes d'échange de métabolites et de leurs adaptations. Ces études portent sur des organismes vivant dans des milieux marins particulièrement contraignants, la zone intertidale en régime mégatidal et les sources hydrothermales profondes, et sur diverses fonctions, comme la respiration et l'excrétion chez les animaux.

Depuis une dizaine d'années, un des modèles de prédilection de cette équipe est le vestimentifère géant des sources hydrothermales *Riftia pachyptila*. Il constitue sans doute le modèle de symbiose obligatoire avec des bactéries chimioautotrophes le plus spectaculaire jamais étudié. Cet animal, dénué de bouche et de tractus digestif à l'état adulte, présente pourtant le taux de croissance le plus élevé parmi les invertébrés marins : de 30 à 50 cm par an. Cette extraordinaire production de matière organique repose exclusivement sur l'activité métabolique des bactéries symbiotiques intracellulaires, localisées dans un organe interne particulier, le trophosome. L'hôte est par conséquent en charge de fournir aux bactéries une source d'oxygène, d'énergie (les sulfures), d'azote (les nitrates) et de carbone (le dioxyde de carbone).

Le transport du dioxyde de carbone du milieu extérieur jusqu'aux bactéries intracellulaires n'est possible qu'au travers de différentes étapes : la diffusion du CO₂ au travers de l'épiderme branchial, sa conversion en ions bicarbonates, son transport dans les liquides circulants principalement sous forme de bicarbonates, le pH interne étant élevé (7,4), son transport au travers de la membrane cellulaire du bactériocyte et enfin sa reconversion en CO₂ moléculaire avant son assimilation par la bactérie.

L'absolue nécessité d'une activité anhydrase carbonique chez *Riftia pachyptila* apparaît clairement au travers de la description de ces étapes successives de transport du CO₂ et des processus physiologiques dans lesquels intervient cette protéine. L'anhydrase carbonique est une protéine fondamentale et constitutive de tous les être vivants. Au travers de la réaction chimique qu'elle catalyse, l'hydratation du CO₂ en bicarbonates et en protons, elle apparaît nécessaire au bon déroulement de processus physiologiques aussi divers que la régulation de l'équilibre acide-base des cellules, la respiration, la photosynthèse, la digestion, la réabsorption des ions au niveau rénal, le fonctionnement du système neuro-sensoriel ou encore la reproduction. Les anhydrases carboniques sont séparées en trois familles de genes distinctes et indépendantes, les -, -, et -anhydrases carboniques, retrouvées schématiquement chez les animaux, les plantes et les bactéries respectivement.

Chez *Riftia*, l'anhydrase carbonique pourrait intervenir principalement au niveau de la branchie et du tissu symbiotique, le trophosome, et participerait au maintien de l'équilibre acide-base de la cellule. Mais compte-tenu du caractère symbiotique de ce modèle, on peut se demander si l'anhydrase carbonique est d'origine animale ou bactérienne. En d'autres termes, est-ce l'hôte qui contrôle l'approvisionnement des bactéries en CO₂, ou celles-ci sont-elles à même de puiser le CO₂ dans les liquides circulants de l'hôte ?

Nous nous sommes attachés à préciser et à mieux caractériser les acteurs cellulaires et moléculaires responsables de la conversion du CO₂ au niveau des deux tissus où ont lieu les principaux échanges ioniques. Deux raisons à cela :

Au vu des connaissances acquises sur la physiologie de *Riftia*, à l'échelle de l'organisme, ou sur celle de ses bactéries symbiotiques isolées, il nous a semblé qu'une approche cellulaire pouvait permettre de progresser dans l'étude des adaptations

physiologiques particulières à cette symbiose autotrophe. Il fallait pour cela développer un protocole de culture cellulaire adapté aux bactériocytes.

Bien que l'existence d'une anhydrase carbonique chez *Riftia* soit connue, sa localisation tissulaire et cellulaire, ainsi que ses caractéristiques biochimiques et moléculaires restaient à préciser. Outre la nécessité de ces données pour l'interprétation des résultats obtenus en physiologie cellulaire, il nous est apparu qu'un nombre extrêmement réduit d'anhydrases carboniques d'invertébrés avaient été étudiées jusqu'ici.

Deux synthèses bibliographiques permettent au lecteur de resituer ces problématiques dans un contexte plus général. L'une concerne l'écophysiologie des organismes hydrothermaux, notamment celle des associations symbiotiques d'animaux avec des bactéries chimioautotrophes sulfure-oxydantes telles que *Riftia*. L'autre recense les caractéristiques structurales et les propriétés fonctionnelles des anhydrases carboniques, connues principalement chez les vertébrés.

La deuxième partie présente l'ensemble des différentes techniques appréhendées au cours de la thèse, dans notre laboratoire, dans des laboratoires d'accueil, ou en collaboration. Les méthodes ayant nécessité une mise au point technique particulière pour pouvoir être adaptées au modèle biologique étudié sont détaillées.

La troisième partie, subdivisée en trois chapitres, présente les résultats de nos travaux sous forme de publications. Le chapitre III est consacré à l'ensemble des expériences de physiologie cellulaire réalisées à bord durant les deux campagnes océanographiques auxquelles j'ai participé. Nous présentons les conditions expérimentales établies pour l'obtention d'une suspension de cellules symbiotiques dissociées, ainsi que les différents paramètres étudiés relatifs à l'optimisation des cultures primaires de bactériocytes. Nous introduisons également les premiers tests pharmacologiques réalisés sur ces suspensions

cellulaires et principalement axés sur l'étude de la conversion du CO₂ dans les bactériocytes de *Riftia*, et l'études de transporteurs membranaires potentiellement associés.

Dans le chapitre IV, nous mettons en évidence l'existence des acteurs cellulaires révélés par les expériences de physiologie cellulaire, et précisons leur localisation tissulaire dans le trophosome, mais aussi dans la branchie. Ainsi l'anhydrase carbonique cytosolique présente chez *Riftia* apparaît colocalisée avec la V-H⁺ATPase et la Na⁺K⁺-ATPase dans les bactériocytes, la répartition de la Na⁺K⁺-ATPase n'étant pourtant pas uniforme dans l'ensemble du lobule trophosomal. Nous montrons par ailleurs que l'épiderme branchial exprime également une anhydrase carbonique et que la localisation des deux transporteurs étudiés s'apparente à une localisation épithéliale orientée.

Le chapitre V est dédié à la caractérisation moléculaire et biochimique de l'anhydrase carbonique chez *Riftia*. Nous présentons la séquence complète d'une anhydrase carbonique homologue à 95 % dans la branchie et le trophosome, et présentant de fortes similarités structurelles avec les anhydrases carboniques cytoplasmiques des vertébrés. Nous développons également l'hypothèse de l'existence d'une seconde forme d'anhydrase carbonique, membranaire, uniquement présente dans le trophosome.

La dernière partie synthétise l'ensemble de nos résultats, et présente les axes de recherche pouvant être envisagés à la suite de ce travail. Les principaux points de discussion abordés sont i) l'utilité du modèle cellulaire développé sur les bactériocytes et les applications potentielles ultérieures envisagées, ii) l'extension de la caractérisation des transporteurs ioniques existant chez *Riftia*, et enfin iii) la caractérisation approfondie de l'isoforme membranaire d'anhydrase carbonique présente dans le trophosome, une première chez les invertébrés, qui démontrerait l'existence d'une famille multigénique d'anhydrase carbonique au même titre que chez les vertébrés.

CHAPITRE I

***Riftia pachyptila*, CO₂ ET ANHYDRASE CARBONIQUE**

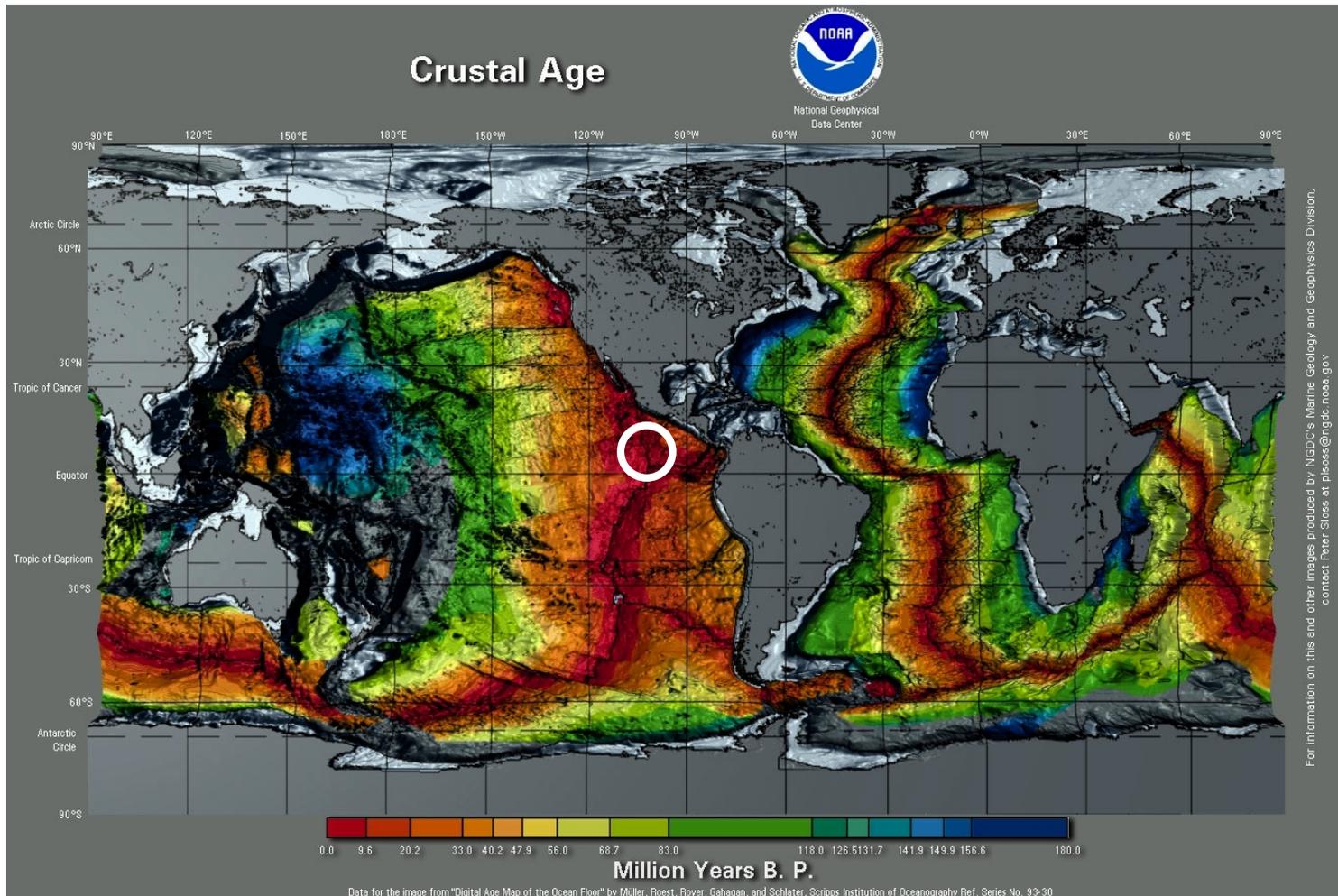


Figure 1. Planisphère représentant l'âge géologique des différentes régions du globe. Les zones les plus rouges représentent les zones les plus jeunes (<http://www.noaa.gov>). Elles correspondent aux zones d'accrétions le long desquelles se trouvent les sites hydrothermaux. Le cercle indique la localisation des sites détaillés dans la Figure 2.

CHAPITRE I

Riftia pachyptila, CO₂ et anhydrase carbonique

I. Vestimentifères et écosystème hydrothermal

La perception classique de l'écosystème abyssal est celle d'un environnement dépourvu de vie puisque dépourvu de lumière, donc de producteurs primaires, et pauvre en matière organique. Les biomasses rencontrées sur les plaines abyssales couvrant près de 66 % de la surface du globe, sont en effet généralement faibles, comprises entre 0,1 mg et 10 g/cm² (Somero et al., 1983). Pourtant, en 1976, des prises de vue effectuées par des géologues américains sur la dorsale océanique des Galápagos à 2500 mètres de profondeur (Lonsdale, 1977) ont révélé l'existence de champs d'activité hydrothermale, riches en coquilles de bivalves principalement. Des explorations sous-marines ont alors été organisées et permirent la description et la collecte des premières espèces animales associées au phénomène géologique que constituent les sources hydrothermales profondes (Ballard et Grassle, 1979; Corliss et Ballard, 1977). Plus au nord, sur la dorsale du Pacifique oriental (21°N), des équipes françaises et américaines trouvèrent quelques années plus tard des cheminées hydrothermales laissant échapper un fluide à près de 350°C, par 2600 m de profondeur (Magenheim et Gieskes, 1992; Von Damm, 1990). À présent, de nombreux autres sites ont été découverts, sur les dorsales Sud Pacifique, Médio-Atlantique, Juan des Fuca, mais aussi au niveau des bassins arrière-arc du Pacifique occidental, tendant à démontrer l'universalité des écosystèmes hydrothermaux sur l'ensemble des rifts océaniques (Figure 1). Deux segments sont pourtant plus particulièrement étudiés par les

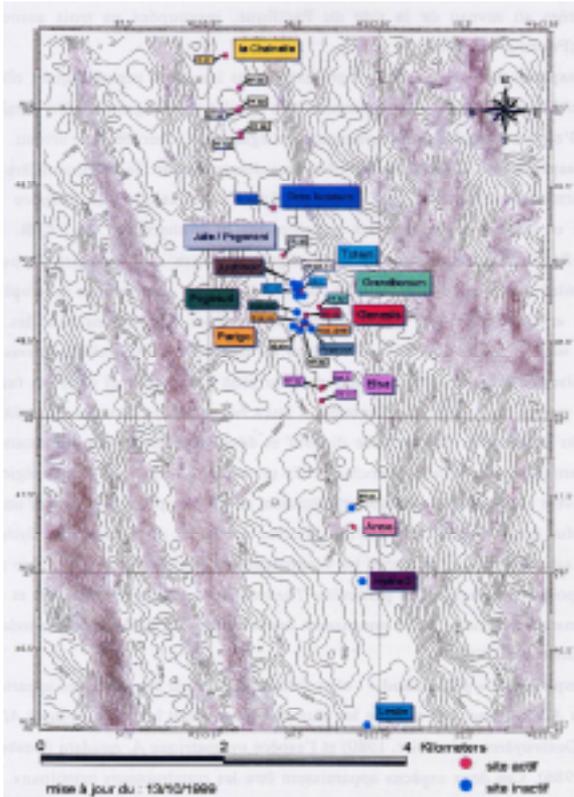
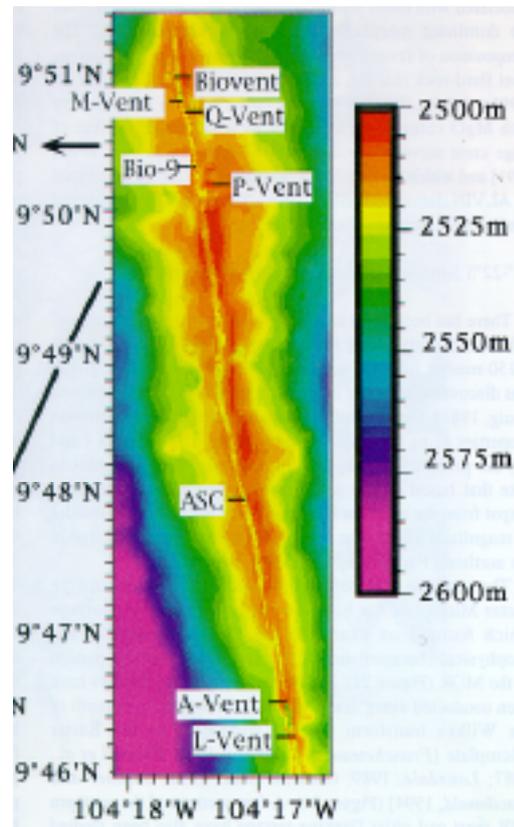


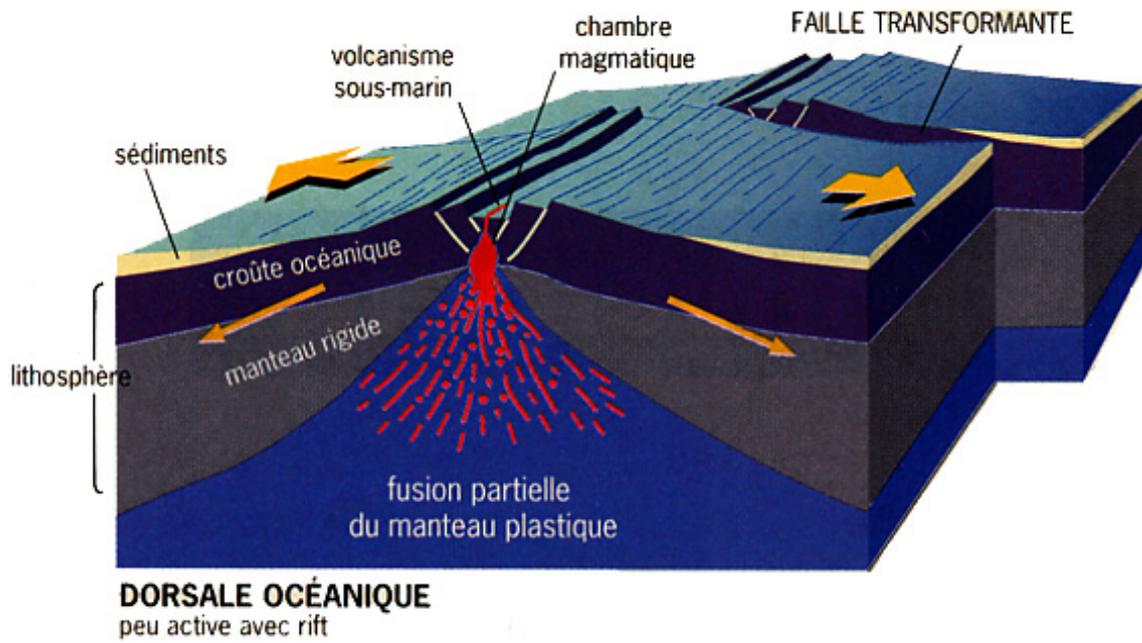
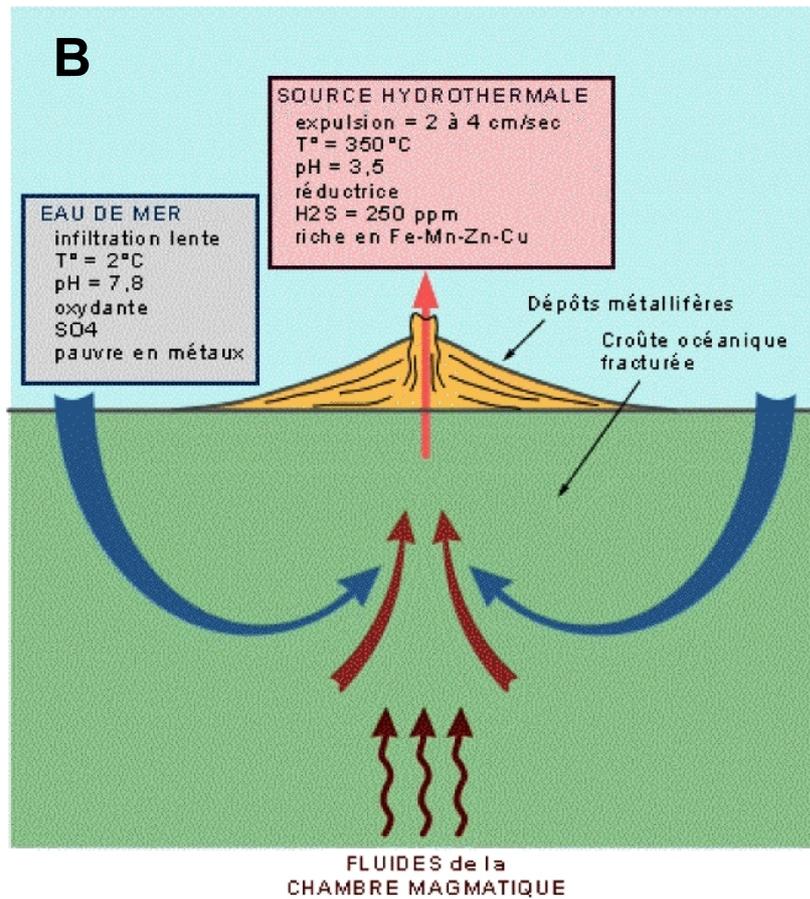
Figure 2A. Localisation des sites sur le segment 13°N généré par le logiciel ADELIE-Ifremer lors de la campagne HOPE'99.

Le segment est situé entre 12°38'N et 12°54'N de latitude et 103°50'W et 104°01'W de longitude (Fustec et al., 1987).

Figure 2B. Localisation des sites de plongée sur le segment 9°N (Shank et al., 1998) correspond à la zone atelier définie par les équipes américaines.

Coordonnées comprises entre 9°45'N et 9°52'N de latitude et 104°17'W et 104°18'W de longitude.



A**B**

scientifiques sur la Dorsale Est Pacifique (EPR) : le segment 13°N orienté dans un axe NO/SE, et dont la profondeur moyenne est de 2630 m (Figure 2A), et le segment 9°N qui constitue un véritable site-atelier pour les équipes américaines (Figure 2B, Shank et al., 1998).

A. Paramètres géologiques et physico-chimiques des sources hydrothermales

Le phénomène hydrothermal est une des conséquences du phénomène de dérive des continents. Les dorsales océaniques constituent en effet des zones d'accrétion où la croûte océanique jeune (Figure 1) est en expansion, disparaissant à l'autre bout sous une plaque continentale, plus légère, dans les zones de subduction. La vitesse d'expansion d'une dorsale varie de 1 à 2 cm par an dans l'océan Indien, jusqu'à 17 cm par an pour la dorsale Sud Pacifique. L'axe des dorsales constitue la zone où le magma terrestre, bouillonnant à plus de 1200°C, affleure à la surface du plancher océanique et se solidifie au contact de l'eau pour former la nouvelle croûte océanique. Une hypothèse de dynamique de circulation au niveau d'une source hydrothermale a été proposée par Massoth et al. (1989) et reste toujours valable aujourd'hui (Figure 3).

Figure 3A. Représentation schématique des mouvements des plaques le long d'une dorsale océanique, avec affleurement de la chambre magmatique au centre de la zone d'accrétion, qui correspond à la vallée axiale des sources hydrothermales. **Figure 3B.** Schéma descriptif de la transformation des propriétés physico-chimiques de l'eau du fond au contact de la roche en fusion au niveau d'une source hydrothermale. La formation privilégiée de fumeurs ou de zones de diffusion sera fonction du contexte pétrologique et du lieu de mélange avec le fluide hydrothermal, à la surface ou sous la surface. (Schémas trouvés sur le site internet : www.ggl.ulaval.ca/personnel/bourque)

Selon ce schéma, l'eau de mer s'infiltré dans les fissures du plancher basaltique et se trouve modifiée au contact de la source de chaleur que constitue la chambre magmatique. L'eau atteint alors une température avoisinant les 350°C mais reste en phase liquide sous la pression hydrostatique (350 atm). Elle se charge alors en composés réduits (H₂S, CH₄,

Tableau I. Caractéristiques physiques et chimiques du fluide hydrothermal de fumeurs noirs de différentes dorsales comparées à celles de l'eau de mer du fond (d'après Von Damm; 1990 modifiées par Magenheim et Gieskes, 1992)

Paramètres Conc en mM	Juan de Fuca Dorsale Sud	Dorsale Pacifique 21°N	Dorsale Pacifique 13°N	Eau de mer abyssale
Température(°C)	224-285	273-355	317-380	2
pH	3,2	3,3-3,8	3,2	7,8
Alcalinité	0	-0,50 à -0,19	-0,74 à -0,40	2,3
Li	110-1810	891-1322	688	26
Na	700-800	432-510	560	464
K	37,3-51,6	23,2-25,8	29,6	9,8
Rb	28-37	27-33	14,1	1,3
Be	95-150	10-37	-	0
Mg	0	0	0	52,7
Ca	77,3-96,4	11,7-20,8	55	10,2
Sr	230-312	65-97	175	87
Al	1,9	4,0-5,2	-	0,02
Cl	896-1090	489-579	740	541
SiO ₂	22,7-23,3	15,6-19,5	22	0,16
SO ₄	0	0	0	27,9
H ₂ S	3-4,4	6,6-8,4	4,0	0
Mn	2,6-4,5	0,7-1,0	0,8-1,2	<0,001
Fe	10,3-18,7	0,7-2,4	1,0-1,8	<0,001
Cu	<2	2-44	-	0,007
Zn	<900	40-106	-	0,01
Se	<1	1-73	-	2,5
As	0	30-452	-	27
NH ₃	0	0	-	<0,01

NH₄⁺) et en éléments métalliques (Mn²⁺; Fe²⁺, Li⁺, Cd²⁺, Zn²⁺), et devient anoxique, acide et très riche en CO₂. Le Tableau I donne les concentrations des principaux constituants des fluides hydrothermaux. Ces fluides ressortent à l'axe de la dorsale, soit sous forme de geyser (fumeurs) soit par diffusion à travers les porosités de la roche (diffuseurs). Au niveau des fumeurs, le mélange entre le fluide à 350°C et l'eau de mer froide du fond provoque la précipitation de sulfures polymétalliques et de sulfates de calcium anhydres qui, par dépôts successifs, construisent des cheminées hydrothermales pouvant atteindre plus de 10 m de haut (Fustec et al., 1987). Si par contre la zone de mélange se situe sous la surface, les ions précipités obstruent les fissures du basalte et forment des zones de diffusion, où la température sur le plancher excède rarement les 30°C.

Les sites hydrothermaux présentent également la particularité d'être instables dans le temps, avec une durée de vie variant selon la vitesse d'accrétion de la dorsale. L'activité hydrothermale se déplace le long de la vallée axiale par bonds successifs et à une vitesse variable selon le rift considéré (Fouquet et al., 1993; Lalou et al., 1985). Malgré cette représentation plus qu'hostile de l'environnement hydrothermal, c'est à l'interface fluide-eau de mer, où les conditions sont les plus drastiques, agressives, hyper variables dans le temps et fréquemment hypoxiques (Johnson et al., 1988a; Johnson et al., 1988b), que l'on observe de développement de communautés animales dont la biomasse est jusqu'à 1000 fois plus importante qu'en milieu abyssal non hydrothermal (Tunnicliffe, 1991).

B. Structure des peuplements hydrothermaux

L'écosystème hydrothermal repose sur la production chimiosynthétique bactérienne, elle-même généralement fondée sur l'utilisation de l'énergie d'oxydation des sulfures pour la

synthèse de matière organique, avec le dioxyde de carbone et le nitrate comme base carbonée et azotée, et l'oxygène comme accepteur final d'électron (Corliss et al., 1979). La microflore bactérienne qui constitue le premier maillon du réseau trophique est composée de souches chimioautotrophes ou hétérotrophes, libres ou symbiotiques, toutes présentes à une densité supérieure à celle rencontrée dans les eaux littorales de surface (Karl et al., 1980; Prieur et al., 1989). Des tapis bactériens épais, constitués de bactéries filamenteuses et coccoïdes couvrent de larges étendues de substrat constitué de composés soufrés réduits, et constituent la nourriture d'organismes brouteurs comme les gastéropodes. À ces consommateurs primaires font suite les consommateurs secondaires représentés par exemple par des crustacés et des poissons.

Ce réseau trophique hydrothermal peut paraître classique en comparaison avec ceux des écosystèmes littoraux bien que la source première d'énergie soit différente, chimique dans le cas des sources hydrothermales et lumineuse en surface. On remarque cependant que la biomasse la plus importante est constituée d'espèces de consommateurs primaires, comme les vestimentifères (*Riftia*, *Tevnia*, *Oasisia*, *Ridgeia*) (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck, 1981), les mollusques bivalves (*Calypptogena*, *Bathymodiolus*) (Cavanaugh, 1983; Fiala-Médioni, 1984) ou les gastéropodes (*Ifremeria*, *Alviniconcha*) (Bouchet et Waren, 1991), qui ont toutes développé une stratégie d'association symbiotique avec une souche bactérienne intracellulaire, permettant la transformation des composés inorganiques présents dans le milieu en composés organiques directement assimilables.

Une caractéristique majeure, commune à l'ensemble des sources hydrothermales étudiées, est que plus de 95 % des 445 espèces animales décrites sont inféodées aux sources hydrothermales (Tunnicliffe et al., 1998). Parmi elles, plus de 75 % ne sont présentes que sur un seul site, et aucune espèce n'a pu être observée sur tous les sites (Tunnicliffe et al., 1998). Les espèces hydrothermales ont toutes développé divers types d'adaptations en

fonction de la contrainte environnementale majeure qui leur est imposée, telle que la température élevée, la toxicité du fluide, les phases d'hypoxie voire d'anoxie (Childress et al., 1984; Powell et Somero, 1983).

Si l'on s'intéresse à présent plus particulièrement à la structuration des différents groupes faunistiques autour des sources hydrothermales profondes du Pacifique Oriental (EPR), on remarque une répartition caractéristique en cercles concentriques autour des cheminées, selon le seuil de tolérance des animaux à la température, à l'anoxie, à l'hypercapnie et à la toxicité du fluide (Fustec et al., 1987). En zone "hors site", la faune présente sur les basaltes frais est clairsemée, surtout constituée d'anémones de mer, d'éponges et de serpulidés, marquant la limite externe des peuplements, présentant souvent un comportement filtreur favorisé par les courants de fond. À l'approche d'un site, les crustacés, crabes et galathées, et les poissons de type *Zoarcidae* sont les premiers observés. Plus près des émanations de fluide dilué par l'eau de fond (T° de 5 à 30°C) l'espace est rempli de populations enchevêtrées de *Bathymodiolus*, *Calyptogena* et *Riftia*, toutes présentes en très forte densité. *Bathymodiolus* présente l'aire de répartition la plus étendue du fait de son régime alimentaire plus plastique, ayant conservé une capacité de filtration comme alternative à la symbiose. Enfin, les parois hautes et médianes des cheminées sont principalement colonisées par des vers alvinellidés (*i.e. Alvinella*, *Paralvinella*) vivant dans des tubes ou des cocons muqueux qu'ils sécrètent probablement pour s'isoler d'un fluide très chaud (20-60°C). On peut en conclusion distinguer trois principaux groupes faunistiques inféodés aux sources hydrothermales profondes : i) les espèces du "pôle froid" rencontrées en périphérie des sites dominées par les serpulidae, ii) les espèces du "pôle tiède" majoritairement représentées par les vestimentifères et les bivalves, et iii) les espèces dites du "pôle chaud" dominées par les alvinellidae et l'espèce sympatrique *A.caudata*.

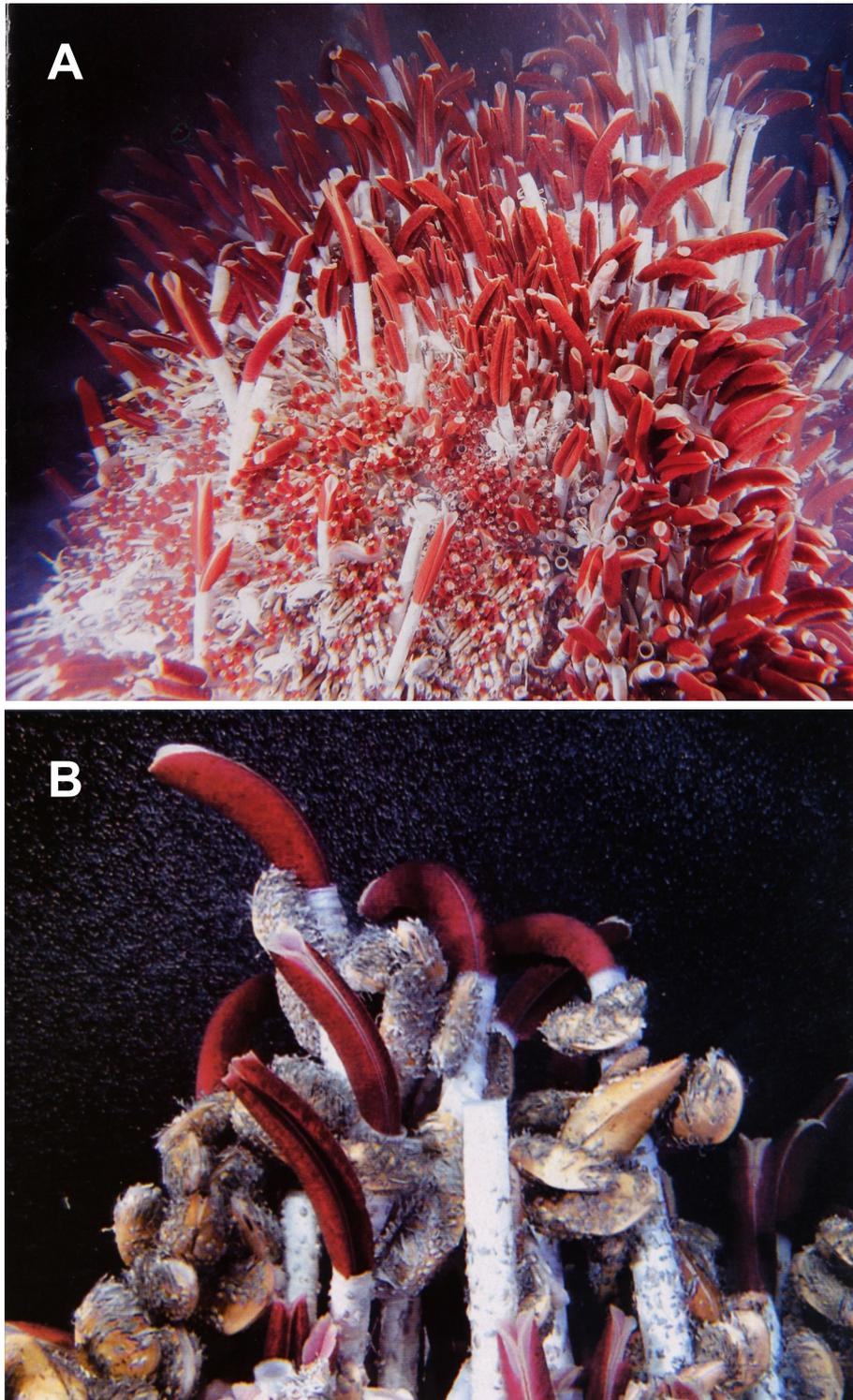


Figure 4. A Bouquets de *Riftia*. B détail du panache branchial entouré d'un nuage d'amphipodes sur des vestimentifères colonisés par des moules, indicateurs d'une relative baisse d'activité hydrothermale sur le site (Clichés National Geographic).

C. Physiologie et anatomie générale de *Riftia pachyptila*

Riftia pachyptila est un vestimentifère, taxon initialement érigé au rang de phylum (Jones, 1988) mais récemment reconnu comme appartenant au phylum des annélides (Rouse, 2001). Les vestimentifères ne sont pas strictement endémiques des sources hydrothermales, on retrouve certaines espèces au niveau des zones de suintements froids telles que le Golfe du Mexique, correspondant aux zones de subduction des plaques (Black et al., 1998). Les vestimentifères sont également présents au niveau des diapirs, zones d'accrétion combinant une phase de sédimentation et une phase de plissement, principalement aux Barbades, ou encore sur les cadavres de grands vertébrés marins en phase de décomposition où les émissions de méthane sont maximales.

Riftia pachyptila représente, depuis la découverte des écosystèmes hydrothermaux, une espèce modèle particulièrement étudiée en physiologie et biochimie comparée, pour son abondance, son taux de croissance élevé et ses modalités d'acquisition de la symbiose. Ces vers sont en effet présents sous forme de buissons à proximité des sources actives (Figure 4A), et représentent l'espèce prédominante des peuplements hydrothermaux le long de la dorsale océanique du Pacifique Oriental (Fustec et al., 1987). On les trouve au niveau du "pôle tiède" de l'écosystème hydrothermal, où la température varie de 2 à 30°C (Desbruyères et Laubier, 1982), avec comme principales espèces sympatriques le mytilidae *Bathymodiolus thermophilus* (Figure 4B), le crustacé *Bythotrephes cederstroemi* ou encore le poisson *Thermaxius cerberus*.

Les *Riftia* adultes peuvent atteindre 150 cm de haut pour un diamètre de 4 cm et une hauteur de tube de près de 2 m (Jones, 1981). Leur tube, clos à la base, est ancré sur le

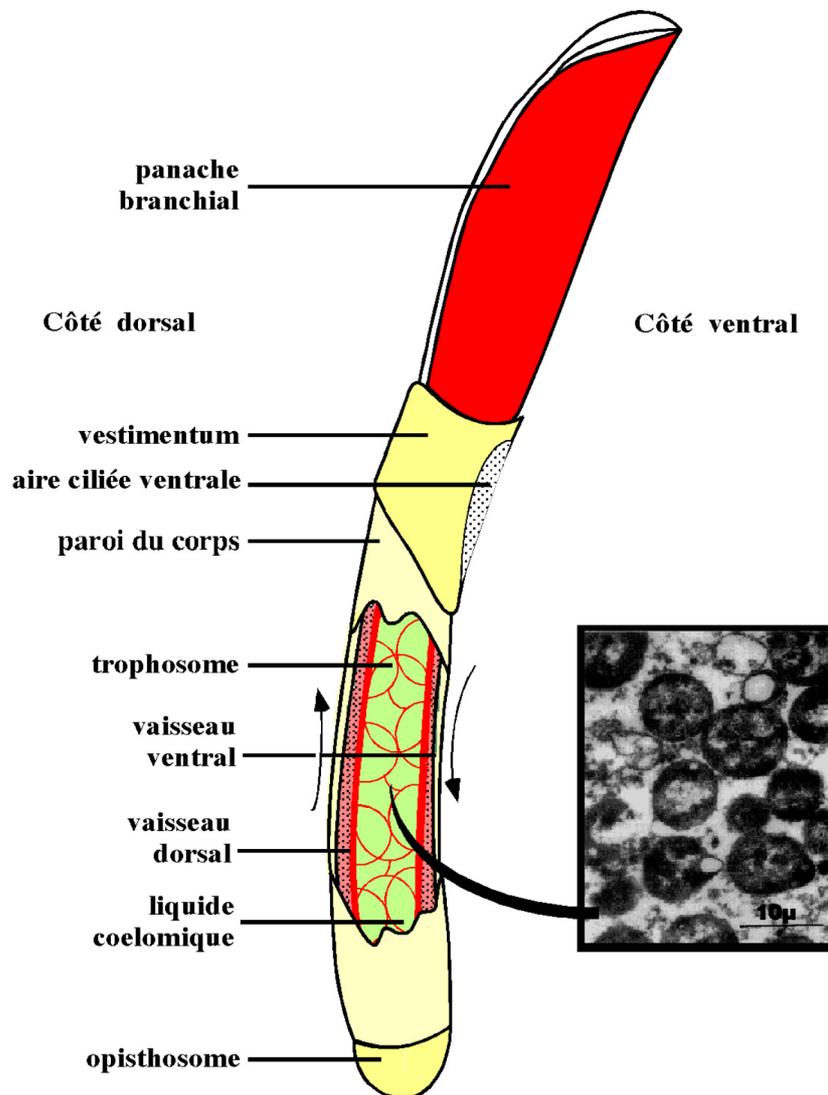


Figure 5. Représentation schématique de l'anatomie générale du vestimentifère *Riftia pachytila*. Les différentes parties du corps et le sens de la circulation sanguine dans les deux principaux vaisseaux sanguins (flèches) sont indiquées. Une vue détaillée des bactéries symbiotiques intracellulaires localisées dans le trophosome est illustrée par une photo en microscopie électronique à transmission (Cliché F. Gaill).

plancher basaltique ou les pentes des cheminées contrairement aux vestimentifères des cold seeps. Ils sont dépourvus de bouche, de tractus digestif et d'anus. L'organisation anatomique de *Riftia* est par conséquent très particulière, et l'on distingue généralement quatre parties du corps (Jones, 1981; Jones, 1988, Figure 5) :

Le panache branchial est le seul organe en contact direct avec le milieu environnant lorsque l'animal est épanoui. Il est composé d'un obturacle axial portant de nombreuses lamelles. L'obturacle est une matrice extracellulaire dense et riche en collagène. Les lamelles sont formées de filaments soudés sur les 2/3 de leur longueur, et l'extrémité libre des filaments porte des pinnules. La branchie est irriguée par le vaisseau dorsal qui envoie un vaisseau afférent dans chaque filament. Le sang oxygéné quitte les filaments branchiaux par les vaisseaux efférents et rejoint le vaisseau ventral, pour aller vers les autres organes de l'animal. L'obturacle a son irrigation propre par les deux vaisseaux obturaculaires en cul-de-sac dans la matrice. Le panache branchial assure par conséquent la majorité des échanges gazeux avec le milieu, et le maintien d'un flux net entrant d'O₂, CO₂, H₂S et NO₃⁻ en particulier. La vascularisation y est extrêmement développée ainsi que la surface d'échange totale (Andersen et al., 2002), et tous ces composés sont ensuite pris en charge par les liquides circulants.

Le vestimentum, organe contractile, est riche en fibres musculaires et en terminaisons nerveuses. Il permet à l'animal de se maintenir fermement dans son tube. C'est dans ce compartiment corporel que se trouve l'élargissement du vaisseau dorsal, assimilé à la pompe cardiaque du ver. Le vestimentum présente deux particularités externes : une zone ciliée ventrale, et deux "ailes" se rejoignant du côté dorsal, permettant une distinction rapide de la face ventrale et dorsale de l'animal pour les prélèvements sanguins par exemple. La distinction mâle-femelle sur critère externe est également

possible par la présence d'une paire de sillons antérieurs ciliés du côté dorsal, associée à l'appareil génital mâle (Jones, 1981; Jones, 1988).

Le tronc est constitué de la paroi du corps, épaisse et musculeuse, et d'une vaste cavité coelomique abritant plusieurs organes : un système vasculaire très ramifié, les gonades et le trophosome. Ce dernier tissu remplit toutes les fonctions métaboliques et abrite les bactéries symbiotiques intracellulaires localisées dans les bactériocytes. Quand le ver acquiert sa maturité sexuelle, les gonades se développent autour du vaisseau ventral et du vaisseau mésentérique du trophosome et s'intercalent entre les lobules de ce dernier.

L'opisthosome sert de point d'ancrage de l'animal à la base de son tube, et est particulièrement riche en glandes à chitine contribuant à la synthèse du matériel tubulaire. Cette partie postérieure, segmentée, porte des soies en crochet, semblable aux uncini des annélides.

Enfin, *Riftia* secrète un tube blanc nacré de nature chitino-protéique (Gaill et Hunt, 1986) dans lequel il peut se rétracter entièrement. La chitine est sécrétée par des glandes spécifiques, qui sont distribuées dans l'épiderme du vestimentum, de la paroi du corps et de l'opisthosome, (Shillito, 1994; Ravaux et al., 1998).

Riftia pachyptila est donc un animal "autotrophe", dépourvu de tractus digestif, constituant une symbiose stricte avec une souche bactérienne chimiolithoautotrophe. Les bactéries endosymbiotiques sont vacuolisées dans le cytoplasme de cellules spécialisées, les bactériocytes, ce type cellulaire constituant la majeure partie du trophosome, et permettent la transformation des composés inorganiques présents dans les liquides circulants en composés organiques directement assimilables par le ver (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck, 1981).

D. La symbiose

On dit d'une symbiose qu'il s'agit d'une association de deux ou plusieurs organismes, appartenant à des groupes taxonomiques différents, qui permet à chacun des partenaires de vivre avec un bénéfice réciproque et partagé. On peut distinguer deux types de symbioses : les endosymbioses, où les symbiotes sont intracellulaires, logés dans des cellules différenciées appelées bactériocytes, et les épisymbioses, où les symbiotes se trouvent à l'extérieur des cellules de leur hôte. Ces deux types de symbioses revêtent généralement un caractère obligatoire et irréversible. La frontière entre la définition d'un symbiote et celle d'un parasite ou d'un pathogène est donc ténue, puisque le coût de ces organismes sur la valeur sélective de l'hôte n'est pas toujours immédiatement perceptible ou quantifiable.

1. Établissement de la symbiose

Les associations symbiotiques existent chez beaucoup d'invertébrés. Elles ont été décrites dès les années 60 (Buchner, 1965) mais n'ont été étudiées de manière plus approfondie que depuis une dizaine d'années (Moran et Baumann, 2000). Les aspects les plus développés par la communauté scientifique restent les questions relatives à l'origine évolutive de ces endosymbioses, et les modifications adaptatives qui en découlent. Les bactéries constituant une symbiose intracellulaire et obligatoire avec leur hôte sont connues pour devenir non cultivables une fois la symbiose établie, et être le plus souvent transmises de façon verticale, c'est à dire comprises dans le patrimoine génétique parental transmis d'une génération à l'autre.

La symbiose établie entre les vestimentifères et des bactéries sulfo-oxydantes appartenant au groupe des α -protéobactéries est par conséquent assez paradoxale dans le sens où, malgré une dépendance fonctionnelle très forte entre les deux partenaires et l'impossibilité jusqu'à présent de mettre en culture la bactérie une fois vacuolisée dans le cytosol des bactériocytes de l'hôte, la transmission de cette souche bactérienne reste horizontale, c'est-à-dire acquise nouvellement à partir de l'environnement à chaque génération. En effet, la reproduction des vestimentifères se fait par fécondation externe, et les gamètes sont dépourvus de bactéries. Les très jeunes larves vivant dans la colonne d'eau ou tout juste recrutées possèdent encore un tube digestif fonctionnel et exempt de bactéries (Cary et al., 1989; Southward, 1988; Young et al., 1996). Différents travaux axés sur la phylogénie comparée des vestimentifères et des symbiotes bactériens ont également conclu à l'absence de co-évolution entre l'hôte et son symbiote (Figure 6, Laue et Nelson, 1997; Feldman et al., 1997; Nelson et Fisher, 2000). En ce qui concerne l'étude du développement larvaire, les embryons de *Riftia* ont pu être observés jusqu'au stade trochophore nageant avec deux bandes ciliées sur le plan équatorial (Figure 7, Marsh et al., 2001; Southward, 1988). Les étapes ultérieures du développement, ainsi que la phase de recrutement correspondant vraisemblablement à la transition juvénile cilié filtreur à juvénile symbiotique, dépendant des bactéries, restent peu décrites du fait du manque d'échantillons correspondant exactement au stade recherché. La description la plus précise sur le recrutement des jeunes larves a été publiée par Southward en 1988, sur l'espèce *Ridgeia piscesae*. Le début du processus d'acquisition de la symbiose commence, pour cette espèce, chez les larves mesurant environ 0,3 mm de longueur, immédiatement après le recrutement et la sécrétion du tube. On observe ensuite un décalage entre le début du recrutement et l'acquisition de la symbiose proprement dite, correspondant probablement au temps qu'il faut à la larve pour trouver la bonne souche dans son environnement.

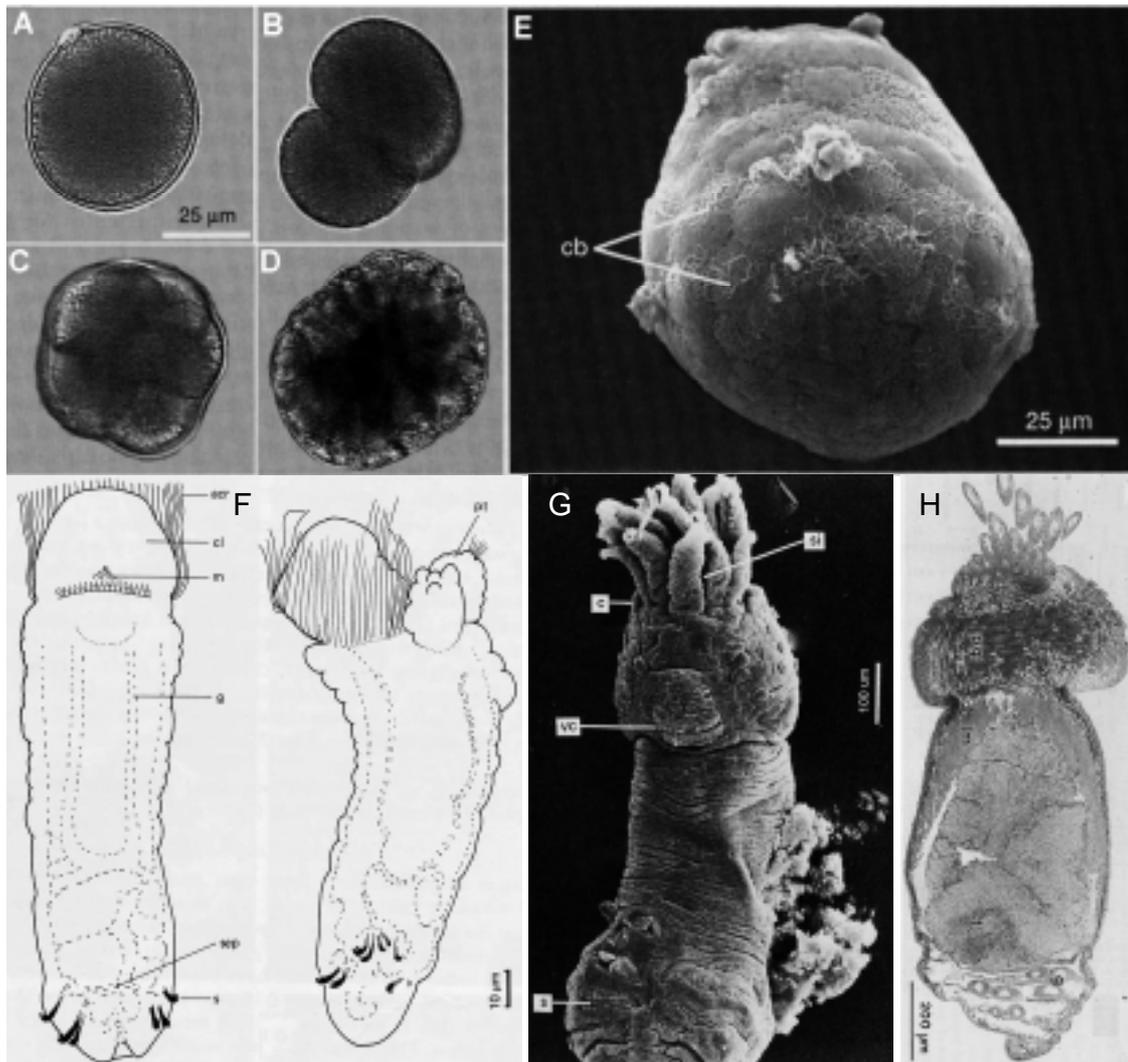


Figure 7. Chronologie des différentes étapes du développement larvaire chez *Riftia pachyptila*. **A-D** Développement précoce, en microscopie optique, obtenu en aquarium pressurisé à 250 atm et 2°C (D'après Marsh *et al.*, 2001). Extrusion du premier globule polaire à J+1 (**A**), stade 2 cellules asymétriques après 3 jours (**B**), stade 8 cellules atteint au bout de 7 jours (**C**), et enfin stade 128 cellules (14 jours, **D**). **E** Larve trochophore nageante possédant 2 bandes ciliées équatoriales (cb), mais pas de bouche après 34 jours; microscopie électronique à balayage (MEB). **F** Schéma en vue ventrale et latérale de *Ridgeia* de 0,15 mm de long possédant une bouche du côté ventral (m), les bandes ciliées (acr), 2 tentacules primaires (pt) un tube digestif (g), un septum (sep), et des crochets larvaires (s) (D'après Southward 1988). **G** Vue ventrale d'un juvénile de *Ridgeia* après recrutement d'après Southward (1988) en MEB. Sont visibles les ailes du vestimentum (c), l'aire ciliée ventrale (vc), la segmentation de l'opisthosome (s) et le siphon ventral (si). **H** Coupe longitudinale d'un juvénile de taille similaire mettant en évidence les proportions relatives des différentes parties du corps (D'après Bright *et al.*, 2000).

De même, le tractus digestif et la bouche de la larve restent fonctionnels après le développement de la première paire de tentacules et la multiplication interne de la souche bactérienne symbiotique).

De nouvelles perspectives d'études peuvent être envisagées à présent, avec la mise au point d'une technique de fécondation *in-vitro* suivie d'une incubation sous pression des jeunes embryons dans des mini-enceintes pressurisées, ou d'une remise en conditions *in-situ* directement au niveau des sources, approches récemment illustrées par les travaux du groupe de Donal Manahan et Craig Young (Marsh et al., 2001).

2. Anatomie fonctionnelle des lobules du trophosome

À partir du moment où la souche bactérienne pénètre les premières cellules de l'hôte, la nature et la fonction des cellules composant le tractus digestif se modifient profondément. Après le recrutement, trois phases critiques se succèdent : i) la coexistence du tractus digestif et d'un tissu en voie d'infection le jouxtant ; ii) un tractus digestif rudimentaire résiduel et un trophosome au stade 1 lobule ; et iii) la disparition complète du tractus digestif concomitante avec le passage du stade 1 lobule au stade multi-lobules. De plus, les récents travaux de Monika Bright (2001) ont relancé le débat sur l'origine embryologique du tissu donnant le trophosome : contrairement aux descriptions de Gardiner et Jones (1993) et Southward (1988) l'origine endodermique du trophosome serait à écarter au profit d'une origine mésodermique.

Le trophosome est un tissu avec une dynamique et un renouvellement cellulaire très particuliers. Le tissu présente une architecture similaire à celle des îlots hépatiques. Il s'articule autour des vaisseaux ventral et dorsal, et de très nombreuses connexions capillaires existant entre les deux. Chaque lobule, unité fonctionnelle du trophosome, est irrigué à sa périphérie par un réseau de vaisseaux afférents, et en son centre par un vaisseau

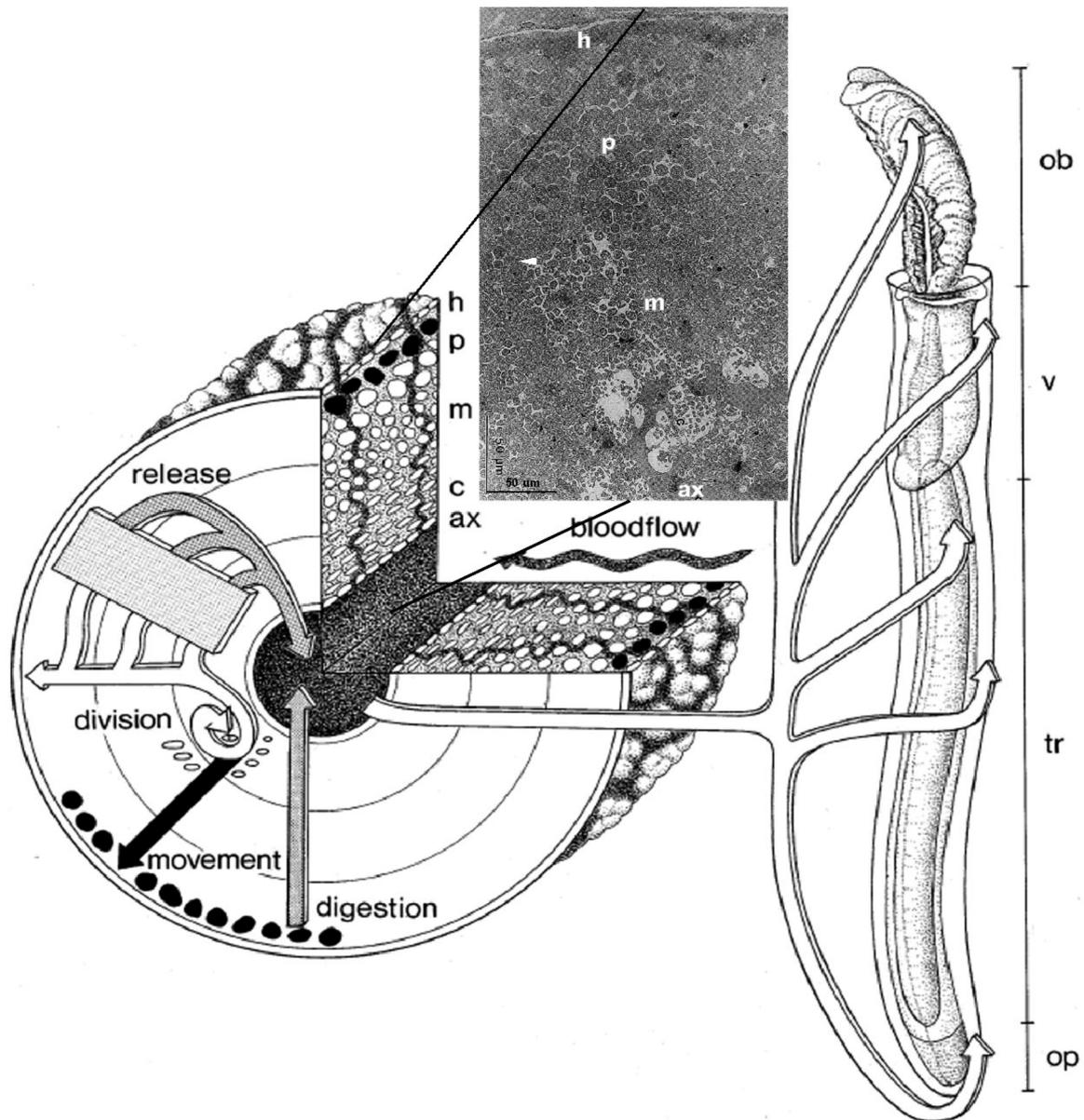


Figure 8. Schéma illustrant la circulation sanguine et la migration des bactériocytes au sein d'un lobule de trophosome. Le sang oxygéné et riche en HS^- et CO_2 circule de la périphérie du lobule vers son centre. Le vaisseau axial collecte l'ensemble du sang efférent et l'achemine vers le vaisseau dorsal du vestimentifère, où la circulation se fait de l'opisthosome vers le panache branchial. Les bactériocytes les plus jeunes sont en phase de division active à proximité des cellules non symbiotiques bordant le vaisseau axial, puis migrent progressivement vers la périphérie du lobule en se chargeant en éléments nutritifs et vacuoles bactériennes, pour finalement être lysés à l'extrême périphérie, sous la bordure externe constituée de cellules péritonéales. Les différents types cellulaires d'un lobule, la succession des bactériocytes, et les sinus veineux transverses (flèche) sont visibles sur le cliché de MET. Abréviations : ax : vaisseau axial entouré d'une couche de cellules non symbiotiques; c zone centrale; h : cellules péritonéales non symbiotiques; m : zone médiane; p : zone périphérique (D'après Bright *et al.*, 2000).

axial efférent (Figure 8). Ce dernier est entouré d'une couche de cellules non symbiotiques et peu différenciées. Les bactériocytes constituent la partie centrale du lobule, traversée par un réseau capillaire très dense. Enfin, en périphérie du lobule on retrouve une couche de cellules non symbiotiques, les cellules péritonéales (Figure 8). La dynamique des bactériocytes est inverse à celle de la circulation sanguine au sein d'un lobule. En effet, les bactériocytes les plus jeunes jouxtent le vaisseau efférent axial, se chargent en inclusions bactériennes et transitent vers l'extrémité du lobule, où se trouvent les cellules les plus vieilles.

3. Métabolisme de la symbiose

L'originalité du mode symbiotique établi entre *Riftia* et ses bactéries repose en partie sur le fait que la différenciation du tissu symbiotique soit totalement internalisée, privant les symbiontes de tout contact direct avec le milieu environnant, contrairement aux autres organismes symbiotiques marins, endémiques des sources hydrothermales profondes (les bivalves par exemple) ou côtiers (les anémones par exemple). Cet état de fait suggère la dépendance totale de la bactérie symbiotique vis-à-vis de son hôte, que ce soit pour une source d'oxygène, d'énergie (H₂S), d'azote (NO₃⁻) ou de carbone (CO₂). L'inverse est également vrai puisqu'une fois la symbiose établie, l'hôte perd toute capacité d'ingérer quelque nourriture que ce soit. C'est à partir de ces différents composés inorganiques, puisés dans l'environnement extérieur par diffusion (O₂, CO₂) ou transport actif (HS⁻, NO₃) au niveau de l'épithélium branchial (Childress et al., 1993; Girguis et al., 2000; Goffredi et al., 1997a; Goffredi et al., 1997b) et véhiculés par le sang et le liquide coelomique, que les bactéries assureront la production de l'ensemble des composés azotés et carbonés indispensables à son métabolisme, mais aussi à celui de l'hôte. Dans l'environnement de *Riftia*, les proportions relatives des principales formes chimiques de carbone et de sulfures

disponibles sont très différentes de celles mesurées dans les liquides circulants du vestimentifère, du fait de la différence de pH existant entre les deux compartiments et d'une forte capacité des liquides circulants à lier ces molécules.

L'azote. Compte-tenu du fort taux de croissance de *Riftia* (de 30 à 50 cm par an, Lutz et al., 1994) et de l'absence de tractus digestif excluant toute ingestion de composés organiques azotés par filtration, l'existence d'une source d'azote exogène, en plus de l'azote métabolique produit par le ver lui-même, apparaît indispensable. Rau (1981) a démontré par mesure d'isotopes stables ¹⁵N dans les tissus de *Riftia*, que la source d'azote du ver n'était vraisemblablement pas d'origine organique, d'autant plus que les concentrations en acides aminés libres trouvées au niveau des sites EPR sont extrêmement faibles (de l'ordre de 200 pM, Hentschel et Felbeck, 1993). Les concentrations en ammonium dans l'eau sont également faibles (3 μM), et la source d'azote exogène la plus probable reste le nitrate (NO₃⁻), présent dans l'eau à des concentrations avoisinant les 40 μM (Girguis et al., 2000; Johnson et al., 1988b). Il peut être métabolisé par les symbiotes comme accepteur final d'électron, alternatif à l'oxygène, dans la chaîne respiratoire bactérienne, mais peut aussi être réduit en ions nitrites (NO₂⁻) et ammonium (NH₄⁺) via la nitrate réductase et la nitrite réductase bactériennes (Hentschel et Felbeck, 1993; Lee et Childress, 1994). Cependant, une fois les nitrates réduits en ammonium par les symbiotes, ce sont ces ions NH₄⁺ qui semblent être le substrat direct des réactions enzymatiques assimilatives bactériennes (De Cian et al., 2000; Girguis et al., 2000; Minic et al., 2001). Ils permettent la biosynthèse d'acides aminés essentiels et non essentiels dans le compartiment bactérien, ainsi que l'approvisionnement de voies métaboliques comme le cycle ornithine-urée impliquant notamment la glutamine synthétase, la carbamoyl phosphate synthétase, l'aspartate transcarbamylase et l'ornithine transcarbamylase, les voies de synthèse et de dégradation

des bases puriques et pyrimidiques, ou encore le système uricolytique (De Cian et al., 2000; Girguis et al., 2000; Lee et al., 1999; Minic et al., 2001; Simon et al., 2000).

Les principales inconnues concernant le métabolisme de l'azote chez *Riftia* restent les mécanismes d'entrée de ces ions, leur mode de transport et de neutralisation dans les liquides circulants, et leur relarguage au niveau des bactériocytes.

Les sulfures sont présents à de faibles concentrations dans le milieu extérieur (inférieures à 300 μ , (Childress et al., 1991; Goffredi et al., 1997a)) comprenant 90 % d'H₂S moléculaire et 10 % d'ions HS⁻. Or, malgré un niveau basal d'entrée d'H₂S par diffusion au niveau de l'épithélium branchial, la principale source de sulfures pour le ver semble être liée à l'incorporation des ions HS⁻ (représentant à peine 30 μ dans le milieu extérieur) par transport actif au niveau de la branchie (Childress et al., 1991; Goffredi et al., 1997a). Ces sulfures doivent être acheminés du milieu environnant jusqu'aux bactériocytes en grandes quantités, puisque leur oxydation par les bactéries symbiotiques constitue l'unique source d'énergie de celles-ci. Ils doivent également être transportés sans causer de dommages physiologiques à l'hôte compte tenu de leur haut pouvoir cytotoxique. *Riftia* possède deux types d'hémoglobines extracellulaires sanguines, et une hémoglobine supplémentaire coelomique (Zal et al., 1996 a, b). Ces hémoglobines ont la particularité de lier à la fois l'oxygène et les sulfures sur deux sites différents et de manière réversible, permettant le transport de ces composés depuis le panache branchial jusqu'aux bactéries intracellulaires où ils sont relargués et immédiatement métabolisés (Arp et al., 1985; Arp et al., 1987; Childress et al., 1991; Zal et al., 1998). Ainsi, alors que les concentrations totales d'H₂S atteignent fréquemment 12 mM dans le sang et 6 mM dans le liquide coelomique (Childress et al., 1984; Childress et al., 1991), les concentrations en sulfure libre restent inférieures à 10 μ , et la majeure partie des sulfures est présente sous forme liée à des

cystéines libres présentes sur les chaînes de globines, permettant une accumulation considérable des réserves de sulfures dans les liquides circulants.

Pour les sulfures comme pour les nitrates, certaines étapes du transport de ces composés sont toujours indéterminées. Ainsi, les mécanismes qui permettent i) l'entrée des ions HS⁻ au niveau de la branchie, ii) le transport des ions HS⁻ libérés au travers de la membrane cytoplasmique des bactériocytes, restent à éclaircir. Ils pourront être approfondis, entre autres, par une meilleure connaissance des types de canaux ioniques présents dans l'épithélium branchial et les bactériocytes de *Riftia pachyptila*.

Le dioxyde de carbone. Le panache branchial baigne dans une eau à pH 6 où la forme CO₂ moléculaire est abondante (2,5 mM). Le CO₂ diffuse aisément à travers les membranes biologiques, son incorporation se faisant principalement au niveau de l'épithélium branchial. Une fraction de ce CO₂ est convertie en bicarbonate, sans doute grâce à l'action d'une anhydrase carbonique (Kochevar et al., 1993). Après diffusion et/ou transport ionique, le CO₂ est ensuite accumulé dans les liquides circulants de *Riftia* jusqu'à des concentrations de l'ordre de 30 à 50 mM, majoritairement sous forme HCO₃⁻ compte tenu du pH élevé et du fort pouvoir tampon du sang et du liquide coelomique. Cette accumulation est auto-entretenu par la différence de pH existant entre le milieu externe et le milieu interne du ver. Les ions HCO₃⁻ sont acheminés jusqu'aux bactériocytes, mais la fraction carbonée transportée et neutralisée par sa liaison aux pigments respiratoires reste inférieure à 50 % (Childress et al., 1993; Kochevar et al., 1993; Toulmond et al., 1994). Enfin, ces ions HCO₃⁻ sont nécessairement reconvertis en CO₂ moléculaire pour pouvoir être utilisé par les symbiotes de *Riftia*, ceux-ci n'acceptant pas les ions HCO₃⁻ comme source de carbone.

Les points restant à étudier pour mieux comprendre la physiologie du carbone chez *Riftia* concernent l'identification de la ou des molécules responsables du pouvoir tampon des

liquides circulants, mais surtout le mode de transport à travers les membranes des cellules de l'épithélium branchial et du trophosome. La relation tripartite établie chez *Riftia* entre le CO₂, les bactériocytes et les bactéries symbiotiques intracellulaires, ainsi que la caractérisation des acteurs cellulaires potentiellement impliqués seront développés plus spécifiquement dans les sections suivantes.

Le caractère strictement autotrophe de *Riftia* par rapport au métabolisme de ces éléments chimiques a été démontré par l'équipe de Jim Childress (1991). La figure 9 illustre en effet l'inversion du flux de dioxyde de carbone observé chez *Riftia* en fonction des concentrations en sulfures disponibles pour le ver, et par conséquent pour les bactéries. Ainsi, en l'absence de sulfures, *Riftia* présente un comportement animal classique consommant de l'oxygène et rejetant du dioxyde de carbone (+2,5 $\mu\text{mole CO}_2/\text{g/h}$). Par contre, en présence de sulfures, le métabolisme énergétique bactérien est activé et l'on

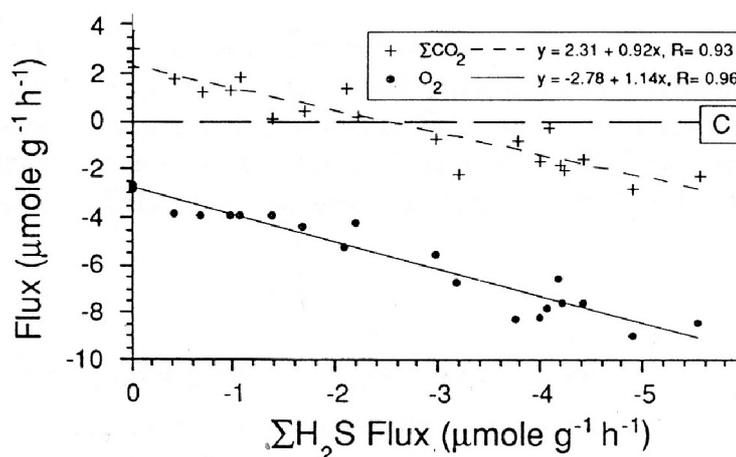


Figure 9. Flux métaboliques observés chez *Riftia pachyptila* une fois l'animal repressurisé, mesurés dans un respiromètre en circuit d'eau ouvert. Les cercles noirs représentent les flux d'oxygène, et les croix les flux de CO₂, tous deux en fonction des concentrations ambiantes en sulfures imposées (Childress *et al.*, 1991).

observe une augmentation de la consommation en oxygène couplée au passage d'un flux net sortant de CO₂ à un flux net entrant de CO₂, métabolisé par la bactérie.

Le métabolisme bactérien

Le compartiment bactérien apparaît indispensable au métabolisme de l'ensemble des composés inorganiques véhiculés par les liquides circulants de l'hôte. Comme nous venons de le voir, les symbiotes de *Riftia* ont un métabolisme exclusif à l'égard des principaux éléments inorganiques véhiculés par les liquides circulants. Ainsi, seuls les sulfures seront oxydés pour fournir de l'ATP, contrairement à la plupart des autres modèles de symbiose sulfo-oxydantes qui acceptent également les sulfites ou thiosulfates comme source d'énergie (Wilmot et Vetter, 1990). La bactérie serait par ailleurs capable de synthétiser des groupements cystéines utilisés ensuite dans le compartiment eucaryote pour la synthèse de thiotaurine à partir d'hypotaurine, intervenant dans le métabolisme du soufre de *Riftia* et pouvant constituer une réserve intracellulaire de soufre consécutive (Pruski et al., 1998). Les nitrates seront réduits jusqu'au stade ammonium par deux enzymes exclusivement bactériennes, la nitrate- et la nitrite réductases, et le pool d'ions NH₄⁺ disponibles sera utilisé pour la synthèse de glutamine *via* la glutamine synthétase, première étape des voies conduisant au cycle de l'urée, à la synthèse des bases pyrimidiques, ou encore à la synthèse des phosphagènes (Lee et Childress, 1994; De Cian et al., 2000; Minic et al., 2001). Le dioxyde de carbone moléculaire quant à lui, sera incorporé dans le cycle de Calvin-Benson de la bactérie *via* la Rubisco, aboutissant à la synthèse de composés simples comme le ribulose 1,5-biphosphate, puis le succinate, le glutamate et le pyruvate (Felbeck et Jarchow, 1998). Cependant, la contribution bactérienne semble se limiter à la première étape de transformation des produits bruts, puisque toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme de ces trois composés étudiées jusqu'à présent se sont révélées présentes dans

le cytoplasme du bactériocyte, mais absentes des extraits de bactéries purifié : *i.e.* la carbamoyl phosphate synthétase, l'aspartate transcarbamylase ou encore l'ornithine transcarbamylase (Felbeck et Jarchow, 1998; Minic et al., 2001; Pruski et al., 1998).

Si l'on s'intéresse enfin à la nature des relations métaboliques de la bactérie vers l'hôte, deux modes de transfert des produits bactériens ont été proposés :

i) le transfert se fait au cours du processus de phagocytose des bactériocytes à la périphérie des lobules, où de fréquentes figures de lyses ont été décrites (Bosch et Grassé, 1984; Hand, 1987)

ii) la bactérie n'est pas lysée, mais est capable de sécréter de petites molécules comme le succinate et le glutamate, assimilables par l'hôte (Felbeck, 1985; Felbeck et Jarchow, 1998).

Ces deux modes de transferts ne sont cependant pas exclusifs et peuvent coexister au sein du trophosome afin de subvenir aux besoins métaboliques conséquents de *Riftia*.

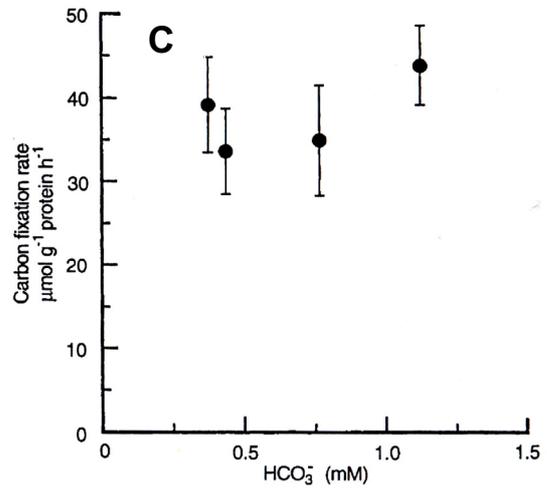
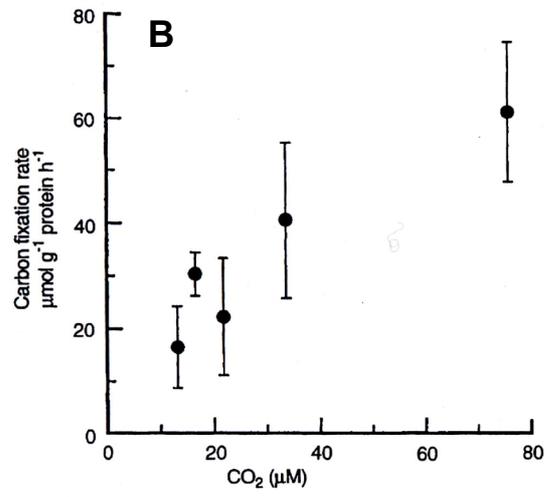
E. Bactéries, CO₂ et anhydrase carbonique

1. Interactions CO₂-bactérie

Pour l'ensemble des bactéries autotrophes, qu'elles soient photoautotrophes ou chimioautotrophes, la présence et le rôle fonctionnel d'une anhydrase carbonique apparaît crucial, du fait de la nécessité de fixation du CO₂ via le cycle de Calvin-Benson. L'enzyme responsable de cette fixation, la Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco), possède généralement une affinité pour le CO₂ assez faible (K_M de l'ordre de 100-150 μM), et les bactéries développent leur excellente capacité de concentration du CO₂ en particulier *via* l'anhydrase carbonique comme enzyme clé du processus. La source

de carbone est généralement présente dans l'environnement sous forme de CO₂ et de bicarbonate, mais dans des proportions très différentes selon qu'on se place dans les eaux acides ou basiques. En effet, les processus biologiques mis en place par les cyanobactéries par exemple pour subvenir à leurs besoins en carbone reposeront majoritairement sur un transport actif de HCO₃⁻ (Miller et al., 1991), espèce chimique dominante dans une eau à pH 7,9. Ainsi, l'hypothèse de l'existence d'une activité anhydrase carbonique située à la surface extérieure des cellules et permettant de transformer rapidement le bicarbonate en CO₂ pour faciliter son transport a pu être vérifiée chez quelques espèces de cyanobactéries et d'algues (Axelsson et al., 1999; Fukuzawa et al., 2000; Miller et al., 1991). Par opposition, dans l'eau de la zone de mélange des sources hydrothermales à pH acide de l'ordre de 6, le CO₂ devient l'espèce chimique majoritaire. Ceci pourrait conduire les bactéries endémiques à utiliser préférentiellement le CO₂ par simple diffusion, du fait du maintien d'un gradient entrant.

Une fois la source de carbone dans le cytosol de la cellule, si la plupart des organismes autotrophes possèdent une Rubisco capable d'accepter le CO₂ et le bicarbonate comme substrat carboné, l'assimilation se fait dans tous les cas de façon préférentielle avec le CO₂ (Kozliak et al., 2000). Afin d'éviter les phénomènes de fuite du CO₂ une fois le bicarbonate converti dans le cytosol de la bactérie, les bactéries possèdent en général une compartimentation de leur cytosol, avec un organite constitué de corps protéiques polyhédraux, les carboxysomes, qui contiennent l'anhydrase carbonique et la majeure partie de la Rubisco (Shively et English, 1991). C'est le cas des cyanobactéries (Price et Badger, 1991) mais aussi de certaines bactéries chimioautotrophes utilisant le CO₂ comme source de carbone telles que *Thiobacillus* et *Nitrosomonas*, et dont le cytosol contient des structures analogues aux carboxysomes (Shively et English, 1991).



Le cas des symbiontes de *Riftia* est particulier à plusieurs titres compte tenu des processus classiquement connus exposés ci-dessus. Brièvement, ces symbiontes ont un besoin exclusif d'oxygène, de nitrates, d'ions HS⁻ et de CO₂ moléculaire, et les liquides circulants contiennent de l'oxygène et des ions HS⁻ sous forme liés aux hémoglobines et qu'il faut pouvoir dissocier, des nitrates, dont on ne sait pas s'ils sont libres ou combinés à une autre molécule, et enfin des ions bicarbonates.

Si l'on s'intéresse à présent uniquement au métabolisme carboné de la bactérie, on ne peut que souligner l'importance des interfaces liquide circulant-bactériocyte-bactérie. En effet, malgré sa localisation interne au sein du trophosome conduisant à une dépendance complète vis-à-vis des différentes formes ioniques des composés inorganiques disponibles dans les liquides circulants de l'hôte, la souche symbiotique de *Riftia* n'exprime qu'une seule forme de Rubisco, la forme II (Shively et al., 1998), acceptant exclusivement le CO₂ moléculaire comme élément de départ du cycle de Calvin-Benson (Scott et al., 1999). Une étude ultrastructurale parallèle à ces résultats a permis de démontrer l'absence de carboxysomes dans le cytosol des bactéries (Figure 10), aussi bien chez *Riftia pachyptila*

Figure 10. Utilisation du carbone par les bactéries symbiotiques de *Riftia pachyptila* tiré des travaux de Scott *et al.*, (1999). **A.** Clichés de coupes transversales de bactéries en microscopie électronique à transmission. 1) Présence de carboxysomes dans le cytosol de la bactérie libre sulfoxydante chimioautotrophe *Thiobacillus neapolitanus* (flèches). 2) et 3) Absence de telles structures dans le cytosol de symbiontes de *Ridgeia piscesae* provenant de deux sites différents, et de *Riftia pachyptila* (cliché non visible). **B.** Effet dose-réponse significatif représentant le taux de fixation du carbone par les symbiontes isolés de *Riftia* en fonction de la concentration en CO₂ moléculaire ([HCO₃⁻] constante à 0,84 mM). **C.** Taux de fixation du carbone maintenu constant et à valeur basse quand on remplace la source de carbone par des concentrations croissantes de HCO₃⁻ ([CO₂] constante à 3 μM).

que chez *Ridgeia piscesae*, une autre espèce de vestimentifère symbiotique rencontrée dans des zones à plus faible activité hydrothermale (Scott et al., 1999). L'ensemble de ces observations contraste avec la stratégie d'optimisation de l'utilisation et de la séquestration du CO₂ mise en place par la majorité des bactéries autotrophes, les cyanobactéries en particulier (Price et Badger, 1991; Yu et al., 1994). La situation peut paraître d'autant plus paradoxale quand on sait que la bactérie symbiotique de *Riftia* est totalement tributaire des apports en carbone de son hôte et que les besoins de celui-ci sont gigantesques (taux de croissance de 30 à 50 cm par an; Lutz et al., 1994), et qu'elle se traduit par une signature en ¹³C particulièrement élevée chez *Riftia* par rapport aux autres symbioses chimioautotrophes, et même aux autres vestimentifères, combinaison d'une ségrégation de ¹²C par l'isoforme II de la Rubisco et d'une utilisation en flux tendu lié au métabolisme élevé (Scott et Cavanaugh, 2001).

2. Modèle physiologique proposé en début de thèse

Le modèle de symbiose très particulier que constituent *Riftia* et sa souche bactérienne sulfo-oxydante apparaît privilégier la disponibilité optimale des différents composés inorganiques essentiels au métabolisme de l'ensemble en amont du compartiment bactérien. En effet, les liquides circulants se révèlent être le compartiment clé, réserve immédiate de sulfures (6-12 mM) et d'oxygène (400 µM) par le biais des hémoglobines, mais aussi d'azote (nitrates jusqu'à 3 mM, ammonium 150-250 µM) et de carbone (30-50 mM). Dans le cas du carbone plus particulièrement, la mise à disposition permanente de CO₂ moléculaire pour les bactéries à partir des bicarbonates circulants passe par conséquent par nécessaire présence d'une ou plusieurs isoformes d'anhydrase(s) carbonique(s), qui semblent indispensables à une circulation et à une interconversion de CO₂/HCO₃⁻ optimales dans le tissu symbiotique.

En conclusion, l'hypothèse de départ de mon travail de thèse reposait sur la présence d'enzymes et transporteurs clés, l'anhydrase carbonique et un échangeur anionique de type Bande III, dans le panache branchial et le trophosome de *Riftia*, permettant d'expliquer les mécanismes de transport et de conversion du dioxyde de carbone dans l'animal, depuis son entrée par diffusion, jusqu'à son utilisation par la bactérie. Le modèle physiologique illustrant le processus d'acquisition du CO₂ (Figure 11) a été proposé par (Goffredi et al., 1998; Goffredi et al., 1999). Selon ce schéma, le CO₂ diffuse au travers de l'épiderme branchial du fait de la forte P_{CO₂} extérieure (13 kPa), liée aux faibles pH (5,6 à 6,0) et à des concentrations en CO₂ totale jusqu'à 7 mM (Goffredi et al., 1997b). Une fois dans les cellules épidermiques branchiales, l'anhydrase carbonique cytosolique (Kochevar et al., 1993) permet d'équilibrer les concentrations en CO₂ et HCO₃⁻ et de maintenir un pH extracellulaire stable et alcalin, de l'ordre de 7,4 (Goffredi et al., 1997b). Le CO₂ et les ions HCO₃⁻ sont transportés par le sang, mais les ions HCO₃⁻ sont largement majoritaires, les liquides circulants ayant un pouvoir tampon très élevé permettant de supporter des

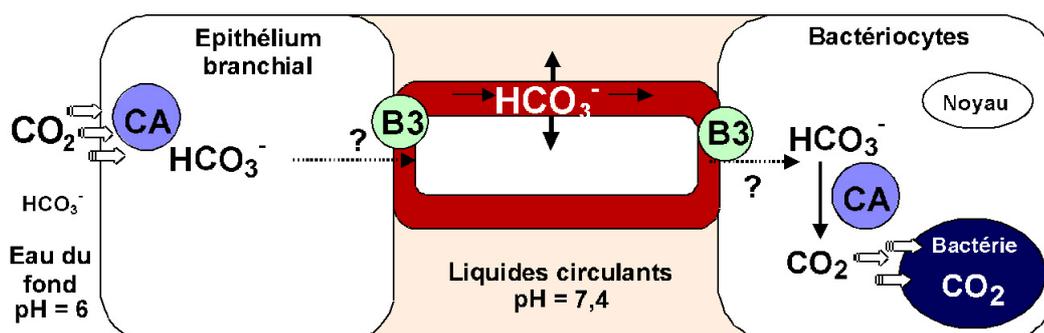


Figure 11. Modèle physiologique illustrant les différentes étapes du transport et de la conversion du CO₂ au travers des compartiments corporels de *Riftia* : l'épiderme branchial, les liquides circulants et le trophosome. Abréviations : B3 : Bande III, CA : anhydrase carbonique.

concentrations totales de CO₂ de 50 mM tout en maintenant un pH de 7,4 (Childress et al., 1993; Toulmond et al., 1994). Chez *Riftia*, les hémoglobines vasculaires et coelomiques sont extracellulaires, et ne participent que faiblement à la liaison des ions bicarbonates. Par ailleurs, le sang est dépourvu de cellules sanguines et les coelomocytes du liquide coelomique sont très peu nombreux. Par conséquent, les éléments responsables de la liaison des ions bicarbonates et du fort pouvoir tampon des liquides circulants sont vraisemblablement des macromolécules extracellulaires, *Riftia* ne possédant pas d'équivalent des globules rouges de vertébrés. Pour atteindre le compartiment bactérien, les ions HCO₃⁻ sont ensuite transportés activement au travers de la membrane cellulaire des bactériocytes. Leur effet sur l'équilibre osmotique et ionique de la cellule est très probablement contrebalancé par un flux d'ions Cl⁻ ou SO₄²⁻. Une fois dans le cytosol des bactériocytes, l'activité anhydrase carbonique catalyse la reconversion des ions HCO₃⁻ en CO₂, lequel entre enfin dans le cycle de Calvin-Benson de la bactérie.

Le travail réalisé au cours de cette thèse porte par conséquent sur la caractérisation physiologique, biochimique et moléculaire de l'anhydrase carbonique, enzyme clé des processus de conversion du CO₂ chez le vestimentifère symbiotique *Riftia pachyptila*, ainsi que sur l'étude des transporteurs ioniques associés à l'activité anhydrase carbonique et impliqués dans les phénomènes d'équilibre acide-base et d'équilibre ionique cellulaires.

II. Les Anhydrases Carboniques (CA)

A. Répartition dans le monde vivant et rôles biologiques

L'anhydrase carbonique, fut découverte il y a 70 ans par Brinkman, Margaria, Meldrum et Roughton en 1932 (Brinkman et al., 1932; Meldrum et Roughton, 1933) par addition de sang humain dans une chambre contenant du CO₂, provoquant une accélération significative de la transformation du CO₂ en bicarbonate. Au travers de la réaction que l'anhydrase carbonique catalyse de façon réversible : l'hydratation du CO₂ en bicarbonates et protons, cette protéine apparaît comme fondamentale parmi toutes les familles d'enzymes connues. Elle est en effet impliquée dans des processus aussi divers que les échanges de gaz, d'ions et de fluides, la régulation du pH intra- et extracellulaire, ou encore la production préférentielle de protons ou de bicarbonates en fonction du contexte physiologique.

Historiquement, le premier rôle qui lui ait été attribué fut celui de la régulation de l'équilibre acide-base et de la respiration. Mais récemment, de nombreux travaux de recherche ont permis de mieux connaître les différentes isoformes d'anhydrase carbonique (CA) chez les mammifères, et d'établir leur implication dans un nombre remarquable de processus physiologiques tels que la (dé-)calcification, la digestion, la contraction des muscles squelettiques, le fonctionnement du système neuro-sensoriel ou encore la reproduction (Chegwidden et al., 2000). Chez les mammifères également, certaines isoformes, ne possédant pas d'activité CA, sont pourtant transcrites et impliquées dans les

voies de signalisation moléculaire, la croissance cellulaire, et peut-être les processus d'oncogénèse.

Chez les plantes supérieures et les algues, l'anhydrase carbonique intervient dans le phénomène de photosynthèse, principalement et chez les bactéries, elle peut pour certaines espèces être impliquée dans le transport de dioxyde de carbone ou de bicarbonates. Au travers de la découverte de nouveaux gènes codant les diverses isoformes, trois grandes familles de gènes, indépendantes d'un point de vue évolutif, ont pu être établies : les α -, β - et γ -anhydrase carboniques, retrouvées respectivement dans les trois grands groupes cladistiques : les animaux, les plantes et algues, et les eubactéries. En dehors de la thématique axée sur la physiologie et la caractérisation biochimique de la protéine, ces familles de gènes constituent un excellent modèle d'études d'évolution convergente d'une fonction catalytique (Kisker et al., 1996; Lindskog, 1997), des relations structure – fonction par mutagenèse dirigée, ou encore de génétique.

B. Les familles multigéniques : Structure et particularités

1. Les α -anhydrases carboniques

Ce sont des métalloenzymes liant un atome de zinc au niveau de leur site catalytique. Elles sont généralement monomériques, avec une masse moléculaire autour de 30 kDa. Toutes les CA du règne animal appartiennent aux α -anhydrase carboniques. Mais des β -CA ont également été décrites chez les plantes (*i.e. Dunaliella salina*, Fisher et al., 1996), les eubactéries (*i.e. Neisseria gonorrhoeae*, Chirica et al., 1997), et même les virus (variole de l'homme, Shchelkunov et al., 1993), démontrant le caractère à la fois ancestral et primordial de cette protéine (Hewett-Emmett et Tashian, 1996). Jusqu'à présent, 14

isoformes ont été décrites comme appartenant à cette famille, dont 11 seulement sont actives : CA I à CA VII, CA IX, et CA XII à CA XIV. Les 3 restantes, CA VIII, CA X et CA XI sont dénommées "CA-related proteins" et leur perte d'activité est attribuée à des substitutions sur un ou plusieurs des résidus histidine, participant à la formation de la poche contenant le zinc, essentiels à l'activité de conversion du CO₂/HCO₃⁻.

Chez les vertébrés, la localisation sub-cellulaire et la distribution dans les tissus varient en fonction des isoformes (Tableau II). Quatre sont cytoplasmiques, CA I, II, III, et VII. L'isoforme CA II est la plus étudiée du fait de l'ubiquité de son expression (Sly et Peiyi, 1995), de son fort niveau d'activité (Khalifah, 1971), et de son rôle avéré dans l'ostéoporose, les déficiences rénales et la calcification cérébrale (Sly et Peiyi, 1995).

Tableau II. Expression des gènes d' - anhydrase carbonique (nd : non déterminée)

Isoforme	Localisation sub-cellulaire	Expression dans les tissus
CA I	Cytoplasmique	Globules rouges, intestin
CA II	Cytoplasmique	Ubiquiste, tous les tissus
CA III	Cytoplasmique	Muscle rouge, tissu adipeux
CA IV	Associée à la membrane externe	Cerveau, tube digestif, yeux, poumons, reins
CA VA	Mitochondriale	Muscle squelettique, foie, reins
CA VB	Mitochondriale	Partout sauf dans le foie
CA VI	Sécrétée	Glandes salivaires
CA VII	Cytoplasmique	Cerveau, poumons, ubiquiste mais faiblement active
CA-RP VIII	nd	Cellules de Purkinje
CA IX	Transmembranaire avec un domaine extracellulaire	Muqueuse gastrique, tumeurs
CA-RP X	nd	Cerveau, placenta
CA-RP XI	Sécrétée	Cerveau
CA XII	Transmembranaire avec un domaine extracellulaire	Varié, et particulièrement la prostate, le colon, les reins
CA XIII	nd	nd
CA XIV	Transmembranaire avec un domaine extracellulaire	Varié, et particulièrement le cœur et les reins

Les structures cristallines de 5 isoformes ont déjà été décrites dans la littérature (Stams et Christianson, 2000) et soulignent l'homologie structurale des isoformes et la conservation des sites actifs avec une même architecture, commune à l'ensemble des α -CA (Figure 12). La figure 13 montre clairement la poche contenant le zinc entouré des 3 résidus histidines indispensables à l'activité de la protéine (Lindskog, 1997). Par alignement des séquences primaires d' α -CA provenant d'organismes très différents, la comparaison des résidus putativement impliqués dans la formation de la poche catalytique révèle la très grande conservation du motif impliqué dans le maintien de l'activité de la protéine (Tashian et al., 2000, Tableau III).

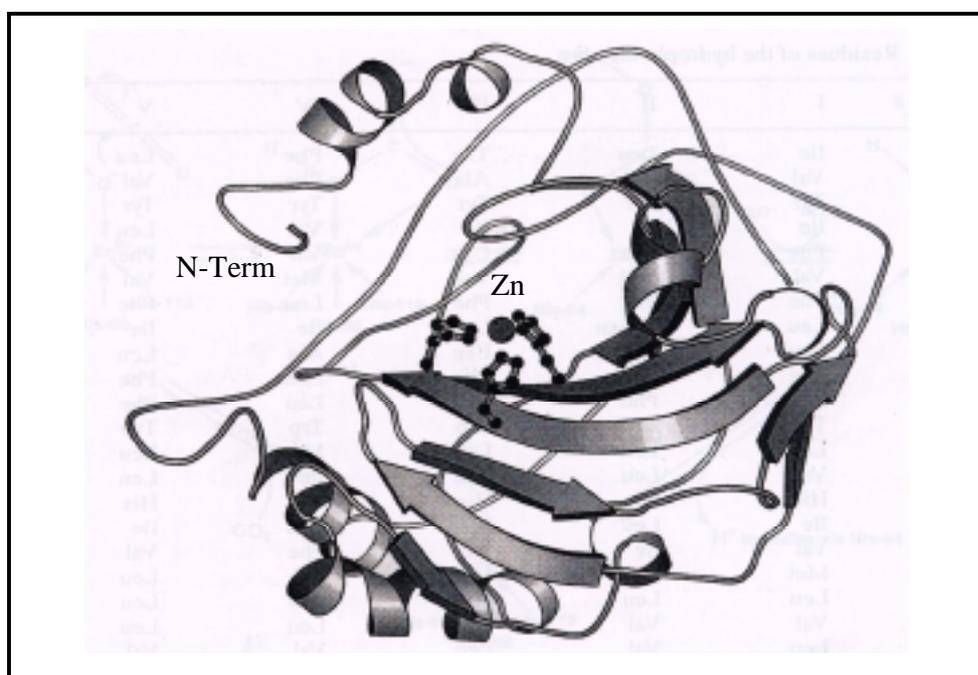


Figure 12. Modélisation de la structure tridimensionnelle de l'anhydrase carbonique CA II humaine, représentative de la structure des 5 α -anhydrases carboniques déjà décrites. Les hélices sont représentées par les rubans et les feuillets par les flèches. La protéine possède un seul domaine actif représenté ici par une molécule de zinc, au centre, entourée des 3 résidus histidines en position 94, 96 et 119, avec H₂O ou OH⁻ comme quatrième ligand. La molécule est monomérique, quasi sphérique à l'exception de la région N-terminale plus éloignée du reste de la molécule. Le nombre d'hélices est faible et elles sont localisées à l'extérieur de la molécule (Tiré de Stams et Christianson, 2000).

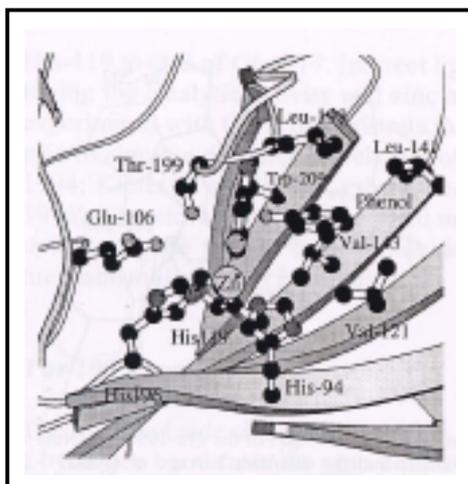


Figure 13. Environnement de la poche catalytique de l'anhydrase carbonique II humaine. Les principaux résidus impliqués dans la stabilisation du site actif sont indiqués (Tiré de Christianson et Fierke, 1996).

Dans un premier temps, le groupement Zinc-OH attaque la liaison hydrogène de la molécule de CO₂, générant du bicarbonate qui se fixe sur le zinc, puis est remplacé par une molécule d'H₂O :

$$\text{EZn-OH}^- + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{EZn-HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{EZn-H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^-$$

Le complexe zinc-OH est ensuite régénéré par le transfert d'un proton à partir du complexe Zinc-H₂O. C'est cette étape de transfert de proton qui semble limitante dans la réaction enzymatique, du moins pour les enzymes à très fort taux d'activité (CA II, IV ou VII) pour lesquelles le résidu histidine en position 64 (His 64) facilite le processus en agissant comme un canal à protons (Figure 14) (Duda et al., 2001; Hakansson et Wehnert, 1992) :

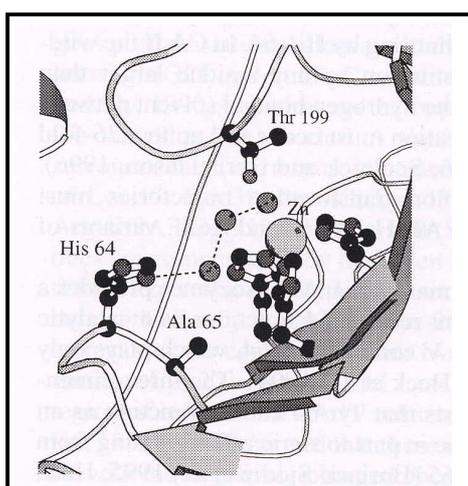


Figure 14. Transfert des protons par interaction du résidu His-64 avec l'élément lié au zinc par l'intermédiaire d'un réseau de molécules solvant schématisées par les sphères grises non annotées (Tiré de Hakansson et Wehnert, 1992).

2. Les β - anhydrases carboniques

Cette famille multigénique est divisée en trois groupes monophylétiques différents représentant les eubactéries, les monocotylédones et les dicotylédones. Les β -CA ont été étudiées principalement chez les plantes supérieures du fait de leur rôle primordial dans la physiologie de la photosynthèse. Elles sont exprimées principalement dans le cytoplasme des cellules mésophylles (Kimber et Pai, 2000) et leur fonction principale est de faciliter l'entrée et la conversion du CO₂ entre l'espace stomatique et le stroma chloroplastique où il sera fixé par l'enzyme Ribulose Biphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO). Cependant, l'importance de CA dans le mécanisme de concentration du CO₂ au cours de la photosynthèse a également pu être mis en évidence chez la cyanobactérie *Synechococcus icfa* (Badger et Price, 1989; Price et Badger, 1991). Leur activité d'hydratation du CO₂ est souvent supérieure à celle des α -CA. Elles sont également sensibles aux sulfonamides, mais différentes des α -CA par leur manque d'activité estérase.

D'un point de vue structural, elles sont toutes multimériques et composées de sous-unités monomériques (PM 24 kDa) contenant chacune un atome de zinc. L'assemblage des monomères est variable entre espèces et au sein d'une espèce en fonction de l'environnement de la protéine. Ainsi, la CA produite par *E. coli*, incluse dans l'opéron cyn, apparaît impliquée dans la prévention de déplétion du CO₂ pendant la dégradation du cyanate par la bactérie d'un point de vue fonctionnel (Guilloton et al., 1992). Elle se présente sous forme dimérique en présence de bicarbonate, et sous forme tétramérique en son absence (Cronk et al., 2001). La structure cristalline d'anhydrases carboniques appartenant au groupe des β -CA a récemment été réalisée chez *E. coli* (Cronk et al., 2001), chez l'algue rouge *Porphyridium purpureum* (Mitsubishi et al., 2000), chez l'Archae *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Strop et al., 2001) et chez la dicotylédone *Pisum*

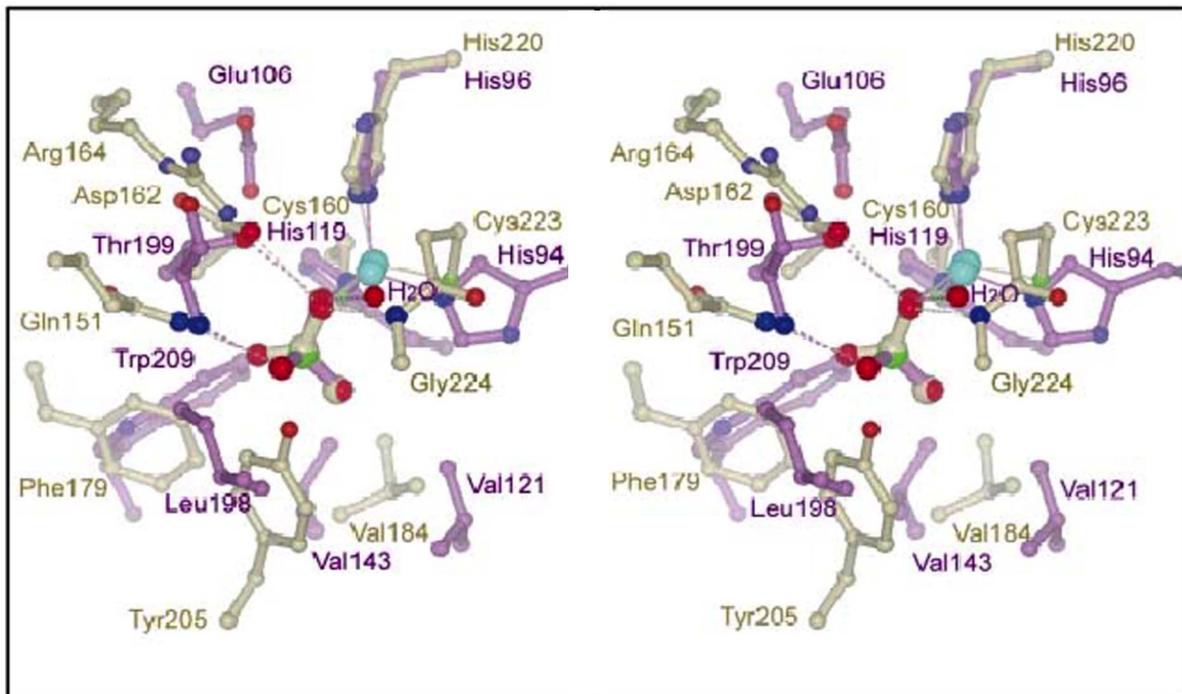


Figure 15. Comparaison de l'organisation des résidus participant à la formation du site catalytique par superposition de β -CA et de l'image inversée de α -CA, déterminée par Hakansson *et al.* (1992). L'architecture correspondant aux α -CA est représentée en bleu et celle correspondant aux β -CA en beige. Les ligands respectifs du zinc sont également représentés : His-96, His-94 et His-119 pour α -CA, contre His 120, Cys 223 et Cys 160 pour β -CA (Kimber et Pai, 2000).

sativum (Kimber et Pai, 2000). L'analyse du site catalytique de la -CA chez *Pisum sativum* révèle certaines caractéristiques semblables à celles des -CA. En effet, Kimber et Pai (2000) ont démontré, par superposition du site actif des -CA et de l'image miroir du site actif des -CA, la conservation de groupes fonctionnels équivalents entre les deux sites et l'existence d'un arrangement géométrique semblable (Figure 15).

3. Les γ - anhydrases carboniques

La famille des -CA ne comporte jusqu'à présent qu'une seule anhydrase carbonique isolée, caractérisée et cristallisée à partir d'une Archae méthanogène : *Methanosarcina thermophila* (Kisker et al., 1996). Cette anhydrase carbonique est située sur la face extérieure de la membrane cellulaire et serait impliquée dans le transport du CO₂, produit avec le méthane à partir de l'acétate, et sa conversion extracellulaire en bicarbonate. C'est un trimère composé de 3 sous-unités (PM 23 kDa) possédant chacune un site actif contenant un atome de zinc, situé à l'interface de chacun des monomères. Chaque zinc est lié à deux résidus histidine d'une sous-unité et à un résidu histidine d'une des deux autres sous-unités. Malgré cette originalité structurale du site actif, les propriétés catalytiques restent très semblables à celles des -CA, constituant un bon exemple d'évolution convergente (Kisker et al., 1996). Bien que plusieurs CA aient été décrites depuis dans diverses autres bactéries par homologie de séquences, peu de travaux ont pu y associer directement une activité enzymatique (Hewett-Emmett, 2000), excepté chez deux souches de bactéries chimioautotrophes assimilant le CO₂, *Thiobacillus* et *Nitrosomonas* (Kozliak et al., 2000), et chez plusieurs souches de bactéries hétérotrophes du genre *Neisseria* (*i.e.* *N. sicca* et *N. gonorrhoea*). Pour ces dernières, la croissance a pu être inhibée en présence d'acétazolamide, inhibiteur spécifique de CA, et l'anhydrase carbonique a pu être mise en évidence par western blot (Nafi et al., 1990).

C. Les fonctions biologiques

La fonction physiologique de l'anhydrase carbonique chez les êtres vivants peut être généralisée à l'action de facilitation du transport de proton et/ou de bicarbonate au travers des membranes cellulaires. Cette fonction trouve sa justification dans des processus aussi divers que l'élimination du CO₂ produit dans les tissus de l'organisme *via* le compartiment sanguin et les poumons, le transport rapide de protons, ion relativement imperméable aux membranes biologiques, ou la résorption de sodium couplée à l'excrétion de protons au niveau des tubules rénaux (Henry, 1996). Théoriquement, CA est nécessaire uniquement dans le cas où la réaction non catalysée d'hydratation-deshydratation du CO₂ ne serait pas suffisamment rapide au sein du compartiment corporel considéré, et retarde les échanges. Mais étant donnée la nature des molécules catalysées par CA, on peut considérer son implication dans l'ensemble des processus physiologiques ou biochimiques existants (Tableau IV). En cela, il faut noter que la perméabilité membranaire des trois espèces ioniques générées par l'anhydrase carbonique n'est pas la même. En effet, à l'inverse du CO₂ qui diffuse facilement au travers des membranes cellulaires, ces dernières sont beaucoup moins perméables aux ions HCO₃⁻, et encore moins aux ions H⁺.

Les travaux les plus aboutis sur les fonctions de CA ont été effectués sur les érythrocytes (Itada et Forster, 1977; Jacobs et Stewart, 1942; Swenson, 2000 pour revue) et la respiration en général, mais aussi sur les mécanismes de régulation ionique (Haussinger et Gerok, 1985; Henry, 1984). Dans cette introduction, seuls quelques-uns des processus physiologiques impliquant l'anhydrase carbonique seront détaillés à titre d'exemple et choisis pour leur éventuel parallèle avec les situations rencontrées chez les invertébrés et *Riftia* plus particulièrement.

1. La respiration

La présence d'anhydrase carbonique pulmonaire et érythrocytaire conditionne réellement l'efficacité du transport et de l'élimination du CO₂ par l'organisme. L'échange CO₂ et O₂ entre les tissus et les poumons doit en effet être optimal pour permettre le maintien d'un excellent équilibre acido-basique et un temps de transit et d'échange avec le sang capillaire extrêmement bref de l'ordre de 0,5 à 1 seconde. Chez les mammifères cette activité CA est restreinte aux érythrocytes, aucune anhydrase carbonique extracellulaire n'a été mise en évidence dans le compartiment sanguin. Cependant, l'isoforme CA-IV est présente dans l'endothélium vasculaire, et orientée sur la surface externe de la membrane épithéliale pulmonaire (Crandall et O'Brasky, 1978). Elle permet une interconversion CO₂/HCO₃⁻ extrêmement rapide et complète dans le plasma, évitant ainsi l'allongement de la durée de transit du CO₂ entre les compartiments sanguin et pulmonaire qui conduirait à une augmentation de la P_{CO2} sanguine. Les érythrocytes, de même que les cellules gastriques

Tableau IV. Processus physiologiques et biochimiques au sein desquels l'anhydrase carbonique est susceptible d'intervenir, l'espèce chimique produite étant indiquée au-dessus de chaque liste.

$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	\longleftrightarrow	$\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$
Respiration		Régulation sécrétrice en acide ou base
Equilibre acide-base		Equilibre acide-base
Rythme ventilatoire (animaux terrestres)		Rythme ventilatoire (animaux marins)
		Échanges ioniques
		Calcification
Fixation du carbone		Fixation du carbone
Photosynthèse		Gluconéogenèse, cycle de l'urée
Chémoréception		Modification des propriétés de liaison de l'oxygène par l'hémoglobine

pariétales, renferment les plus grandes concentrations de CA, soit de 20 à 150 μM et 100 à 24000 unités/ml (Maren, 1967; Swenson, 1991). L'isoforme CA-II est largement majoritaire dans les érythrocytes, CA-I étant présente mais avec un niveau d'activité plus faible (Maren et al., 1980). Depuis peu, les travaux de Brion et al. (1997) ont pu mettre en évidence de très faibles concentrations en CA-III dans les globules rouges humains et de souris, représentant 1-2 % des CA totales, et 0,04 % de l'activité totale. On notera qu'il existe une synergie au sein des globules rouges entre l'hémoglobine et CA-II : la liaison du CO₂ avec l'hémoglobine augmente l'activité catalytique de CA-II et induit une activation du processus d'excrétion des protons par augmentation du nombre de sites acceptant les ions H⁺ à la surface de l'hémoglobine (Figure 16).

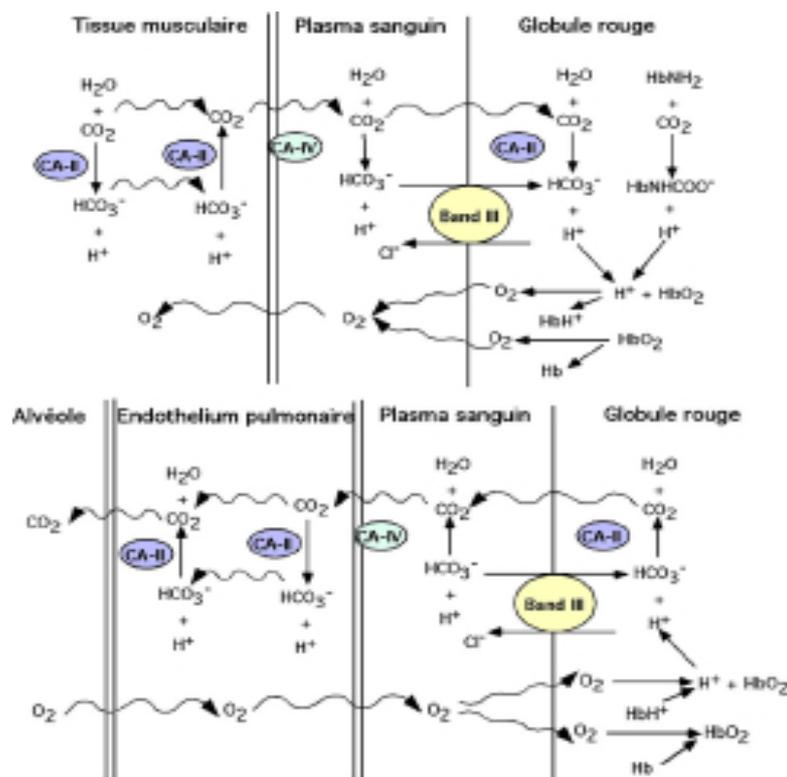


Figure 16. Schéma des réactions chimiques (flèches droites) et étapes de diffusion (flèches sinusoïdes) du CO₂ et de O₂ lors des échanges gazeux entre les muscles et le sang d'une part, et le sang et les poumons d'autre part chez les mammifères (D'après Swenson et al., 1991).

2. Les principales fonctions métaboliques

CA et la régulation de l'équilibre acido-basique et ionique dans les tubules rénaux

Trois isoformes de CA ont pu être identifiées dans le rein des mammifères jusqu'à présent : CA-II, CA-IV et CA-V. L'activité CA dans le rein représente à peine 20 % de celle mesurée dans les érythrocytes (Maren et Ellison, 1967), et 95 % de cette activité peut être attribuée à l'isoforme CA-II (Maren et Ellison, 1967). Les travaux de Brown et collaborateurs (1990) et de Schwartz et al. (1999) ont permis de mettre en évidence l'existence de l'isoforme CA-IV dans des régions particulières des glomérules et tubules rénaux. Le groupe de Ridderstrale et al. (1992) a par ailleurs pu mieux préciser la contribution de cette isoforme dans la résorption du bicarbonate grâce à l'utilisation de souris transgéniques n'exprimant pas l'isoforme CA-II. La principale fonction des tubules proximaux du rein est de réabsorber les ions Na⁺ dans les cellules épithéliales en échange d'ions H⁺ libérés dans le lumen, ainsi que les ions HCO₃⁻ destinés à passer dans le compartiment sanguin pour une régulation du pH sanguin optimale. Si l'on considère les trois compartiments impliqués : le lumen – les cellules épithéliales du tubule – et le sang, deux isoformes d'anhydrase carbonique interviennent au cours du processus de réabsorption des ions HCO₃⁻. Dans un premier temps, les ions H⁺ sont libérés dans le lumen *via* un antiport Na⁺/H⁺ et une pompe type V-H⁺ ATPase. L'anhydrase carbonique membranaire CA-IV, présente sur la surface externe de la membrane apicale de l'épithélium, catalyse alors la réaction de transformation du bicarbonate présent dans le lumen et des ions H⁺ excrétés en CO₂ et H₂O. Ces deux éléments rentrent ensuite dans la cellule par diffusion et osmose, et l'isoforme cytoplasmique CA-II permet alors la régénération rapide d'ions H⁺ et HCO₃⁻. Enfin, le bicarbonate produit transite au travers de la membrane basolatérale de l'épithélium vers le sang, *via* un transporteur bicarbonate (Boron et al., 1997; Maren et Ellison, 1967).

CA, cycle de l'urée et néoglucogénèse

Le dioxyde de carbone (CO₂) et l'ammonium (NH₃) sont les principaux produits du catabolisme des carbohydrates et de l'azote, et sont éliminés par diverses voies d'excrétion. Dans des conditions physiologiques de pH, la forme HCO₃⁻ est présente en quantités de l'ordre de deux fois supérieures au CO₂, et la majorité des enzymes impliquées dans des réactions de carboxylation utilisent préférentiellement le bicarbonate (Figure 17). La présence d'anhydrase carbonique dans des tissus tels que le foie, les reins ou les muscles se révèle par conséquent primordiale pour faciliter l'interconversion CO₂/HCO₃⁻ et permettre

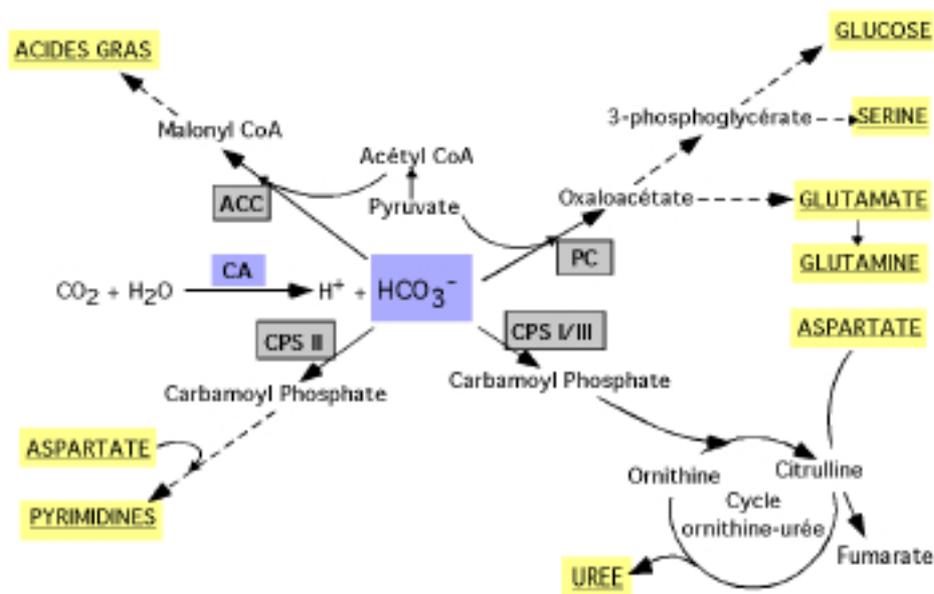


Figure 17. Voies métaboliques faisant intervenir des réactions de carboxylation qui requièrent du bicarbonate comme substrat. Les enzymes de carboxylation sont encadrées. L'anhydrase carbonique est impliquée dans la synthèse des produits soulignés. Leur synthèse a généralement lieu dans trois tissus principaux : le foie, les reins et les tissus adipeux.

Abréviations : ACC : acétyl CoA carboxylase; CA : anhydrase carbonique, CPS I/III : carbamoyl phosphate synthétase I et III; CPS II : carbamoyl phosphate synthétase II; PC : pyruvate carboxylase.

un approvisionnement de quantités suffisantes de bicarbonates, pour un grand nombre de voies métaboliques impliquant des réactions de carboxylation (Chegwidden et al., 2000; Henry, 1996). Ainsi, les étapes en amont des voies de néoglucogénèse, de synthèse d'acides aminés, de lipogénèse, d'uréogénèse ou encore de biosynthèse de bases pyrimidine nécessitent la présence d'enzymes de carboxylation à partir du bicarbonate, et sont par conséquent largement favorisées par l'activité anhydrase carbonique (Figure 17).

Les voies métaboliques faisant intervenir différentes isoformes de CA dans des processus combinés de transport et de métabolisme pur sont celles de l'uréogénèse et de la néoglucogénèse. La figure 18 illustre le rôle des différentes CA dans le transport de CO₂ et de NH₃ chez les vertébrés. Le processus de néoglucogénèse a lieu principalement dans le foie chez les mammifères, et la première étape de cette voie est une étape de carboxylation du pyruvate *via* la pyruvate carboxylase (PC), enzyme strictement mitochondriale. L'implication d'une isoforme CA mitochondriale (CA-V) dans cette voie a été démontrée sur des hépatocytes intacts, par une baisse de 65 % d'incorporation de NaHCO₃ marqué au ¹⁴C par la PC en présence d'acétazolamide (Dodgson et Forster, 1986).

La première réaction du cycle de l'urée est catalysée par la carbamoyl phosphate synthétase. Elle permet la formation de carbamoyl phosphate à partir de HCO₃⁻ et NH₃. Cette réaction est également localisée dans les mitochondries chez les mammifères. Là encore, l'isoforme CA-V est nécessaire pour la production de bicarbonate en quantités suffisantes pour toutes ces réactions. Son implication a été mise en évidence pour la première fois par inhibition de la synthèse de citrulline en présence d'acétazolamide sur des mitochondries isolées de foie de cochon d'Inde (Dodgson et al., 1983).

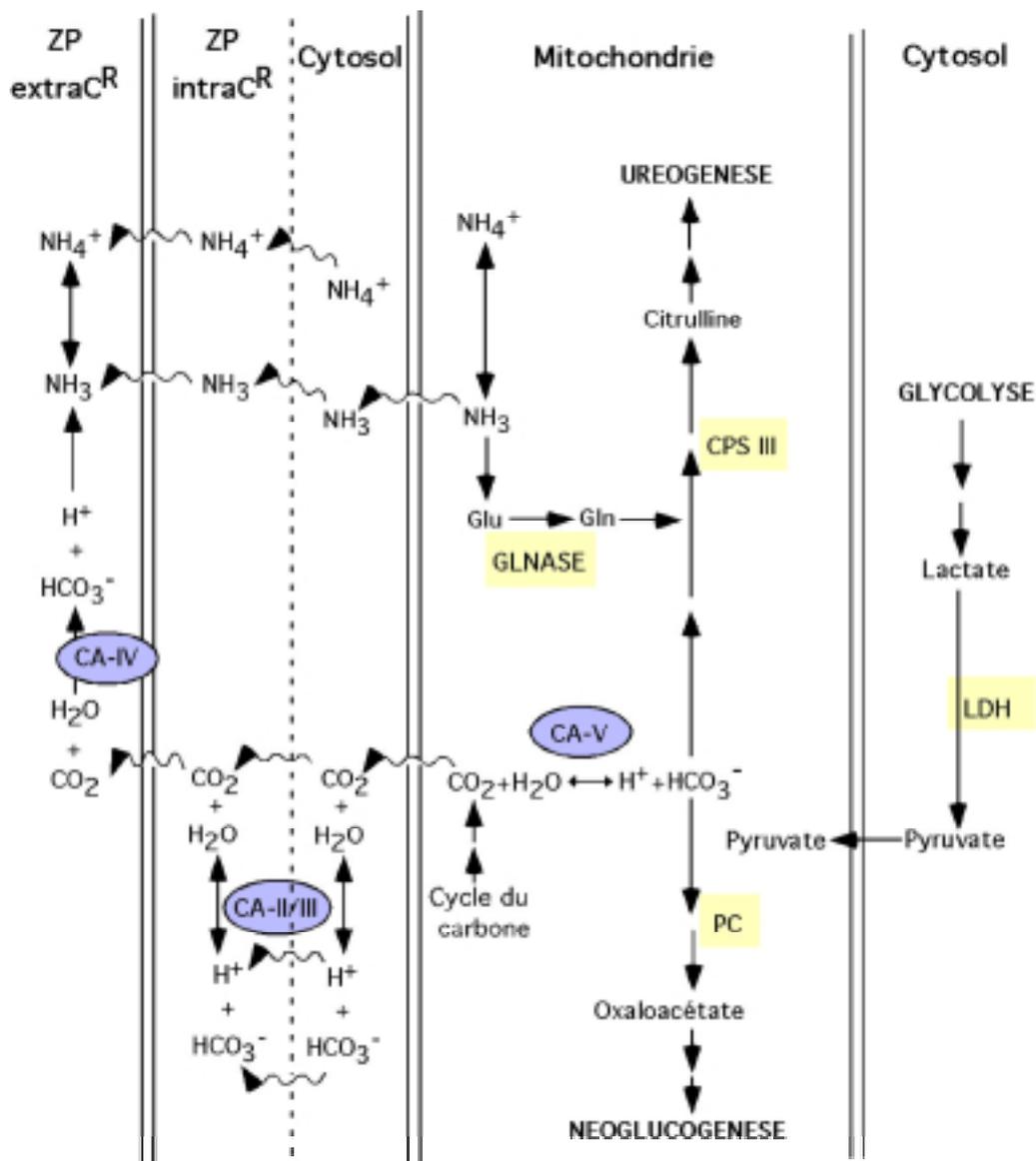


Figure 18. Schéma représentant l'implication de quatre isoformes d'anhydrase carbonique (encadrées), deux cytosoliques (CA-II, III), une membranaire (CA-IV) et une mitochondriale (CA-V), dans différentes étapes du transport de NH₃ et de CO₂ (réactions chimiques : flèches droites, et étapes de diffusion : flèches sinusoïdes) dans les cellules de vertébrés, ainsi que dans les voies de néoglucogénèse et d'uréogénèse. Les principales enzymes associées à ces voies métaboliques sont encadrées (D'après Henry, 1996). Abréviations : CPS III : carbamoyl phosphate synthétase III; GLNase : glutaminase; intra^CR et extra^CR : intracellulaire et extracellulaire; LDH : lactate deshydrogénase; PC : pyruvate carboxylase; ZP : zone périmembranaire.

3. La calcification

Le processus de calcification-décalcification compte parmi les fonctions physiologiques qui nécessitent la présence de bicarbonate. La réaction qui lie de façon réversible le bicarbonate et le calcium pour former du carbonate de calcium (CaCO₃) peut par conséquent être facilitée par la présence d'anhydrase carbonique permettant le maintien des formes chimiques HCO₃⁻, H⁺, CO₂ et H₂O disponibles. La précipitation du carbonate de calcium est un processus fondamental chez les vertébrés (*i.e.* calcification osseuse, synthèse de coquille d'œufs), mais également chez un grand nombre d'invertébrés, les mollusques, les crustacés et les coraux en particulier. Lucas et Knapp (1996) ont notamment démontré le rôle clé de l'anhydrase carbonique dans la formation des sclérites calcaires chez l'octocoralliaire *Leptogorgia virgulata*. On remarquera l'importance relative des coraux dans la capacité à former des biominéraux calcaires puisque chaque année, 10 millions de tonnes de carbonate de calcium sont séquestrées dans des espèces animales constituant les récifs coralliens et les atolls, très largement répartis à l'échelle du globe dans les habitats estuariens et marins (Simkiss et Wilbur, 1989). CA a également été associée à la formation de carbonate de calcium dans des tissus tels que la muraille des balanes (Costlow, 1959) et les coquilles des bivalves (Wilbur et Jodrey, 1955), la cuticule des crustacés décapodes (Giraud, 1981) ou la glande coquillière des oiseaux (Common, 1941). De manière comparable à la calcification des cartilages chez les mammifères, l'intervention potentielle d'une anhydrase carbonique extracellulaire, en plus de l'isoforme intracellulaire, dans l'initiation de la calcification a été suggérée par Giraud-Guille (1984) chez le crabe *Carcinus maenas*. La démonstration de son implication a été faite par l'utilisation d'inhibiteurs de CA tels que l'acétazolamide et l'observation de leurs effets sur le processus de calcification. Ainsi la formation de sphérulites calcaires dans la carapace des crabes est inhibée en présence d'acétazolamide (Giraud, 1981). Il en est de même pour les spicules

calcaires d'embryons d'oursin (Mitsunaga et al., 1986), et la formation de la coquille d'œuf chez les oiseaux s'est avérée complètement inhibée en l'absence de CA active (Benesch, 1984). Le cycle de mue chez les crustacés décapodes apparaît par ailleurs être un excellent modèle d'étude du rôle de CA dans la régulation de la précipitation des sels de calcium puisque les crustacés remobilisent les dépôts de CaCO₃ provenant de leur ancienne carapace pour former la nouvelle après la mue (Henry et Kormanik, 1985). Le rôle de CA dans la décalcification est cependant généralisable à un grand nombre d'invertébrés marins, les gastéropodes carnivores (*i.e. Nucella lapillus*) et les spongiaires (*i.e. Cliona celata*) en particulier sécrétant de l'anhydrase carbonique pour dissoudre la coquille calcaire de leurs proies (Pearse et al., 1987).

Chez les mammifères, Cuervo et al. (1971) ont pu mettre en évidence une activité CA dans des échantillons extraits de la matrice extracellulaire entourant le cartilage en voie de calcification, et formuler l'hypothèse que CA intervenait par régulation du pH extracellulaire et maintien de celui-ci à une valeur favorisant la précipitation du phosphate de calcium. Ces résultats ont par la suite été confirmés et l'isoforme impliquée, CA-II, a été mise en évidence dans la matrice extracellulaire sous forme de petites vésicules membranaires (Sauer et al., 1994). Mais si le rôle de CA-II dans la calcification des cartilages est avéré, son rôle dans la décalcification et la résorption des os l'est tout autant (Minkin et Jennings, 1972), toujours par la méthode d'ajout des inhibiteurs de CA. Enfin, l'activité CA-II est également apparue nécessaire au cours du processus de maturation et de différenciation des ostéoclastes (Lehenkari et al., 1998).

4. Les phénomènes de cancérisation

Au travers de la réaction qu'elle catalyse : la régulation de l'abondance relative de CO₂ et HCO₃⁻ dans les tissus, l'anhydrase carbonique doit être impliquée dans les processus de

croissance cellulaire nécessitant des ions bicarbonates comme substrat carboné. Le rôle cellulaire de CA a été démontré dans la synthèse des bases pyrimidiques *via* la carbamoyl phosphate synthétase (CPS II), dans la synthèse d'acides aminés non essentiels comme l'aspartate, la glutamine ou la glycine *via* la pyruvate carboxylase (PC), ou encore la synthèse de molécules structurales tels que les lipides membranaires (cf. § II.C.2) (Chegwidden et al., 2000). Or dans le cas des cellules cancéreuses, l'augmentation du taux de division implique une augmentation du taux de synthèse des nucléotides lors de la réplication, mais aussi de tous les autres composants cellulaires, nécessitant par conséquent une augmentation de la production de bicarbonate par activation de CA. L'inhibition de croissance de cellules cancéreuses humaines a été démontrée pour la première fois par (Chegwidden et Spencer, 1995) en incubant la souche U937 provenant d'un lymphome histiocytaire avec de l'éthoxzolamide et du méthazolamide, deux inhibiteurs spécifiques de CA. La recherche sur l'utilisation des inhibiteurs de CA en thérapie anti-cancéreuse continue, puisque ces inhibiteurs déjà utilisés dans des cas de glaucome et plus généralement en ophtalmologie et stomatologie, s'avèrent présenter moins d'effets secondaires que les agents cytotoxiques utilisés jusque-là en cancérologie. Même sans être utilisés de façon exclusive, l'emploi des inhibiteurs de CA provoque une acidification du cytoplasme des cellules, expérimentée par exemple sur un fibrosarcome de souris (Teicher et al., 1993), et cette acidification augmente le pouvoir cytotoxique local de certaines drogues permettant de décupler leur action sans augmenter la quantité prescrite initialement.

On notera que deux isoformes de CA ont récemment été mises en évidence et directement associées au phénomène de tumeurs cancéreuses : CA-IX, exprimée par exemple dans des cas de tumeurs colorectales, de façon spécifique en phase de prolifération anarchique (Saarnio et al., 1998), et CA-XII, surexprimée dans les cellules cancéreuses du rein et du

poumon (Tureci et al., 1998). Les premières pistes sur le traitement de certains carcinômes ont récemment été proposées par l'équipe d'Ivanov et collaborateurs (Ivanov et al., 1998) par la mise en silence des deux gènes codant CA-IX et CA-XII par le produit du suppresseur de gènes Von Hippel-Lindau (VHL).

D. Anhydrase carbonique et échanges ioniques

La cellule est perpétuellement confrontée à des modifications extra- et intracellulaires d'osmolarité corrélées à des mouvements d'eau, de concentrations ioniques ou encore de concentrations en solutés organiques. Elle doit par conséquent mettre en place des mécanismes lui permettant de réguler efficacement son volume cellulaire et son équilibre acido-basique, afin de se prémunir des dysfonctionnements métaboliques, physiologiques ou biologiques que pourraient entraîner de trop importantes perturbations de l'équilibre ionique. La constance du volume cellulaire, au travers des échanges ioniques, des gradients de pression osmotique et du maintien du pH intracellulaire, garantit en partie le bon fonctionnement de chaque type cellulaire, mais également l'accomplissement de processus touchant à la prolifération, la maturation et la différenciation cellulaire (Lang et al., 1998). Les membranes lipidiques des cellules et des organites cellulaires sont imperméables aux molécules hydrophiles, ions, sucres, acides aminés, peptides neurotransmetteurs ou drogues, qui doivent par conséquent transiter *via* des protéines transporteurs associées aux membranes, véritables points de contrôle physiologique de la cellule. Le transport de ces molécules est généralement couplé à un échange ou co-transport des ions H⁺, Na⁺, Cl⁻ ou K⁺. On distingue généralement deux types de protéines membranaires : i) les canaux, souvent à ouverture inductible, spécifiques d'une espèce ionique, et ne laissant passer les

ions que dans le sens de leur gradient électrochimique, et ii) les transporteurs, pouvant transporter plus d'une espèce ionique, au même moment (co-transport ou antiport), et présentant un comportement de saturation en fonction de la concentration en ions, avec une cinétique de type Michaelis-Menten. Les transports actifs nécessitent une dépense d'énergie cellulaire par le biais de l'hydrolyse d'ATP. Ce type de transport est connu pour divers ions (Na^+ , H^+ , Ca^{2+}) ayant pour caractéristique d'avoir un potentiel d'équilibre éloigné du potentiel de membrane.

La régulation à long terme de l'état d'équilibre dynamique d'une cellule peut être modélisée par un bon équilibre entre le fonctionnement de pompes, transporteurs actifs qui utilisent de l'ATP pour transporter les solutés contre leur potentiel électrochimique, et l'activité des échangeurs, cotransports et canaux ioniques, par lesquels les solutés franchissent la membrane dans le sens de leur gradient électrochimique (concept de pompe-fuite) (Egée, 1998; Hoffmann et Ussing, 1992; Ussing, 1960).

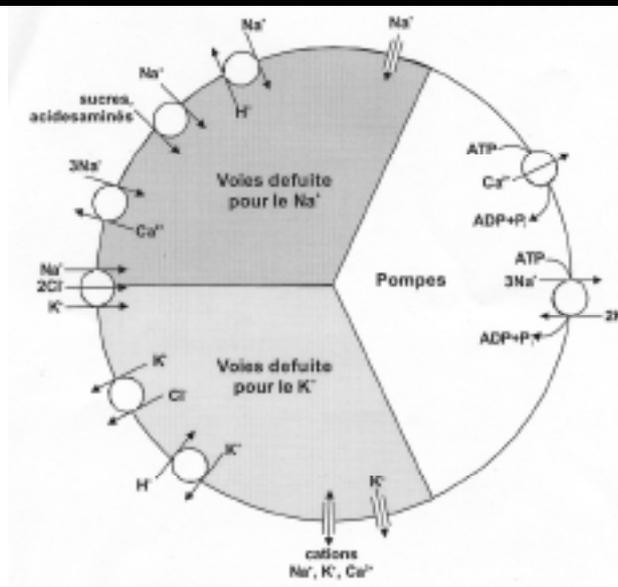


Figure 19. Modèle de régulation de l'état d'équilibre dynamique d'une cellule-type par le biais des transporteurs actifs (pompes) et des transporteurs passifs (fuites) pour les cations Na^+ , K^+ et Ca^{2+} (D'après Egée, 1998).

Les cellules possèdent une grande variété de voie de transport membranaire, certaines sont constitutives, d'autres sont spécifiques d'un type cellulaire particulier. Les modèles cellulaires classiquement utilisés pour l'étude des voies de transport membranaires et de leur réponse à des stimuli aussi divers que l'hypoxie, les chocs hypo- ou hyperosmotiques, ou la stimulation hormonale sont les globules rouges et les épithéliums (*i.e.* pulmonaires, gastriques ou branchiaux). La figure 20 illustre les mouvements de CO_2 et d' O_2 qui traversent la membrane par diffusion, modifiant ainsi l'état acide-base de la cellule, et la mise en place des processus de compensation par transport des ions et substances organiques grâce à des voies des transport particulières.

L'anhydrase carbonique joue un rôle central dans l'état d'équilibre ionique de la cellule, par le biais de la régulation du pH intracellulaire et ce, grâce à son interaction combinée avec divers acteurs cellulaires que nous détaillerons plus loin.

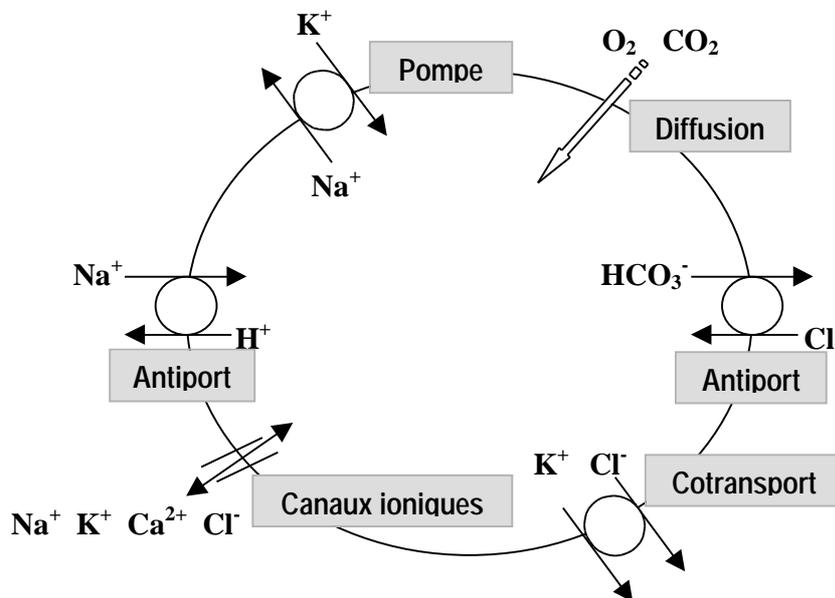


Figure 20. Représentation schématique des processus de diffusion et de transport existant sur la membrane des globules rouges (Egée, 1998).

Ainsi les cellules eucaryotes expriment au niveau de leur membrane plasmique une multitude de transporteurs leur permettant de réguler efficacement leur pH : les pompes à protons H^+ ATPases, les canaux à protons, les transporteurs ioniques comme les antiports Na^+ - H^+ , les transporteurs HCO_3^- sodium dépendants, les échangeurs $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ sodium indépendants, les échangeurs Cl^-/OH^- ou encore les cotransports lactate- H^+ (Figure 21) (Puceat, 1999).

Dans la suite du chapitre, nous détaillerons plus particulièrement les échangeurs responsables du transport de protons souvent associés aux mouvements de sodium d'une part, et les échangeurs faisant intervenir le transport de bicarbonates d'autre part, ces deux espèces ioniques constituant les produits directs de la réaction catalysée par l'anhydrase carbonique. Le CO_2 est une petite molécule non chargée, perméable aux membranes lipidiques, ubiquiste dans les tissus animaux et produit en quantité importante par le cycle

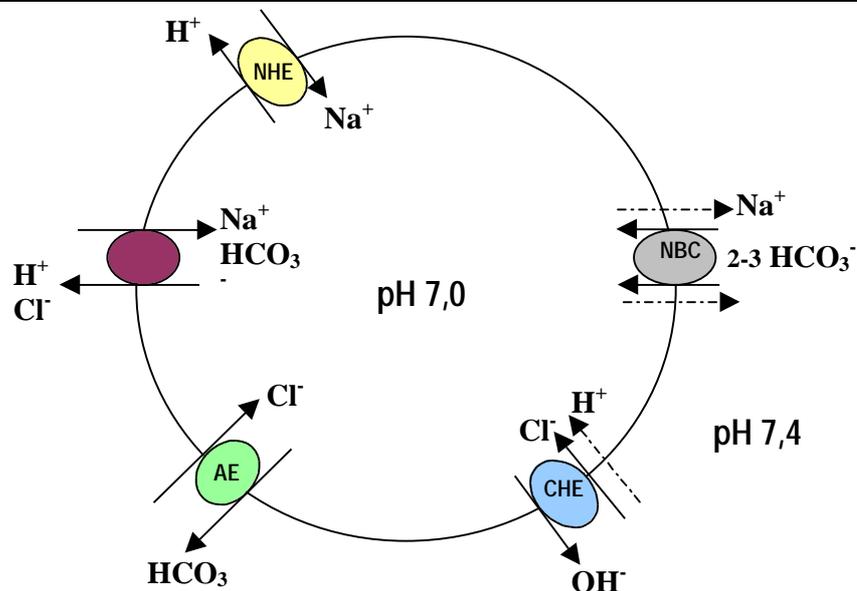


Figure 21. Schéma des types de transporteurs ioniques de la cellule plus particulièrement impliqués dans le régulation du pH intracellulaire. NBC : cotransport HCO_3^- Na^+ -dépendant; NHE : antiport Na^+ - H^+ ; échangeur anionique AE ; CHE : échangeur Cl^-/H^+ .

Tableau V. Liste des inhibiteurs spécifiques des principaux transporteurs et échangeurs membranaires des cellules eucaryotes.

Produit	Action, cibles	Concentrations	Solvant	Fournisseur
Amiloride	Inhibe l'échangeur Na^+/H^+ , les canaux Na^+ et certains cationiques	1-100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Acétazolamide	Perméant cellulaire, inhibe toutes les anhydrases carboniques	100 μM -1mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Acide flufénamique	Inhibe la Bande 3 et certains canaux cationiques non sélectifs	100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Acide niflumique	Inhibe la Bande 3 et le cotransport KCl	100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Benzolamide	Imperméant cellulaire, inhibe les anhydrases carboniques extracellulaires et membranaires	100 μM	DMSO	Wyeth-Ayerst Research (USA)
DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid)	Inhibe la Bande 3, les canaux Cl^- , le cotransport KCl	100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Furosémide	Inhibe la Bande 3 et le cotransport KCl	500 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Glibenclamide	Inhibe les canaux Cl^- de la famille CFTR et canaux K-ATP	100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
NEM (N-ethylmaleimide)	Inhibe les H^+ ATPases, non spécifique	2 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate)	Inhibe les canaux Cl^-	50-100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich
Bafilomycine	Inhibe la pompe H^+ ATPase			
Ouabaine	Inhibe la pompe Na^+/K^+ ATPase	100 μM	DMSO	Sigma-Aldrich

du métabolisme oxydatif. Le transport de protons au travers des membranes cellulaires requiert, quant à lui, un transporteur membranaire nécessitant de l'ATP. Le gradient électrochimique de la cellule est en effet maintenu principalement par l'action des pompes membranaires H⁺-ATPases, Na⁺/H⁺-ATPases ou Na⁺/K⁺-ATPases, internes à la membrane cellulaire. Enfin, le bicarbonate transite par le biais d'autres protéines transporteurs comme l'échangeur anionique Cl⁻/HCO₃⁻ de type Bande III principalement chez les vertébrés, mais des canaux anioniques, moins sélectifs; peuvent également prendre en charge les ions HCO₃⁻ (Cabantchik et Greger, 1992). Les inhibiteurs respectifs de chacun de ces transporteurs sont indiqués dans le tableau V, qui sera repris dans le chapitre II - Matériel et Méthodes d'étude.

1. Les échanges de sodium, de protons et de potassium

L'antiport Na⁺-H⁺ est un échangeur électroneutre permettant d'activer la sortie des ions H⁺ en cas de choc acide dans le cytosol de la cellule. Cette sortie de protons est compensée par un entrée équivalente d'ions sodium. Cet échangeur est largement réparti dans les divers types cellulaires eucaryotiques connus, mais peut exister sous différentes isoformes en fonction du tissu considéré, sa sensibilité à l'inhibiteur amiloride étant variable selon le tissu dont il est issu (Counillon et al., 1993). Jusqu'à présent, 6 isoformes différentes appartenant à la famille multigénique des NHE (échangeurs Na-H) ont été identifiés (Puceat, 1999 pour revue). La structure de cette protéine membranaire chez les vertébrés, ainsi que les domaines d'interactions avec l'amiloride sont indiqués dans la figure 22. La partie C-terminale présente plusieurs sites de phosphorylation, suggérant son implication dans la régulation des stimuli neurohormonaux et des échanges ioniques. Un site sensible à l'osmolarité et aux changements de volumes a par ailleurs été mis en évidence au niveau du domaine NH₂-terminal, et l'antiport Na⁺-H⁺ apparaît inhibé dans le cas d'un choc hypo-

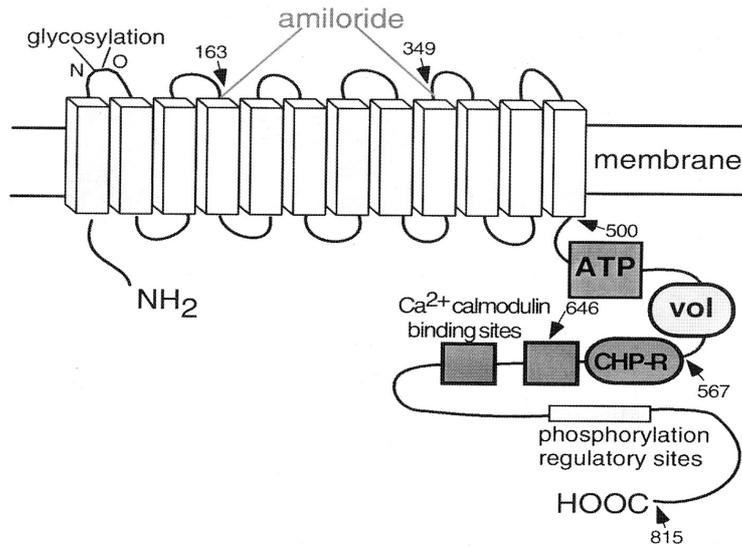


Figure 22. Structure d'un antiport $\text{Na}^+\text{-H}^+$. Les principaux domaines impliqués dans les différents types de régulations de l'activité du transporteur sont détaillés dans le texte ci-contre. Les domaines cibles de l'amiloride sont également indiqués. Vol : domaine sensible aux changements de volume cellulaire; CHP-R : domaine de liaison à la calcineurine. La position des acides aminés clés est indiquée par les flèches (Pucéat, 1999).

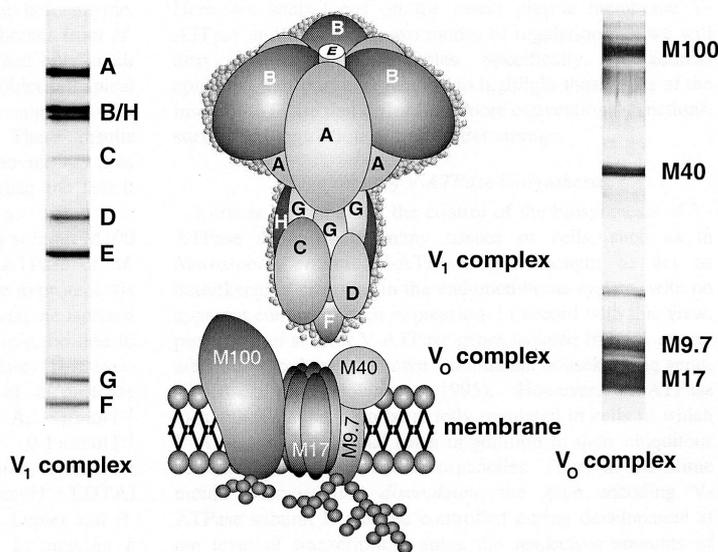


Figure 23. Modèle structural d'agencement des différentes sous-unités qui constituent la pompe à protons de type $\text{V-H}^+\text{ATPase}$, établies à partir d'une détermination par cristallographie. Le complexe V_0 reste intégralement lié à la membrane plasmique ou vacuolaire, alors que le complexe V_1 peut s'associer à V_0 de manière réversible. Le processus d'association-dissociation des deux sous-unités peut constituer un moyen de régulation de la biosynthèse et de l'activité de la $\text{V-H}^+\text{ATPase}$ (Wieczorek *et al.*, 2000).

osmotique et suractivé par une hypertonicité. Les sites de régulation de l'activité du transporteur en fonction du pH sont eux répartis tout au long de la protéine, l'intégrité de la partie C-terminale étant particulièrement critique. L'existence de cet antiport Na⁺-H⁺ présentant des caractéristiques similaires a également été démontrée depuis peu chez un certain nombre d'invertébrés marins, les crustacés décapodes en particulier, car constituant un modèle biologique de choix pour l'exposition *in-vivo* à des chocs hypo-hyperosmotiques et à de fortes variabilités du milieu (Ahearn et al., 1999; Ahearn et al., 2001; Byrne et Dietz, 1997; Towle et al., 1997; Towle et Weihrauch, 2001).

La pompe de type V-H⁺ATPase est elle responsable de l'extrusion massive de protons hors de la cellule. Sa principale caractéristique est de générer un fort gradient de pH et électrochimique de part et d'autre de la membrane des cellules eucaryotiques en utilisant de l'ATP pour maintenir ce flux de protons contre leur gradient électrochimique. La V-H⁺ATPase est composée d'un domaine cytoplasmique (V₁), considéré comme l'unité régulatrice, et d'un domaine transmembranaire (V₀) (Figure 23, Nelson, 1992; Weihrauch et al., 2001) sur lequel se fixe la bafilomycine, son principal inhibiteur. Sa répartition est variable selon le type cellulaire considéré, mais elle est présente en quantité maximale dans les membranes apicales de compartiments corporels comme le muscle, la peau, l'épithélium intestinal ou les poumons chez les vertébrés, et les branchies, le tractus digestif et le plasma chez les invertébrés. Tous ces compartiments doivent en effet faire face à une production de protons conséquente, pouvant perturber fortement l'équilibre osmotique, acide-base et ionique de la cellule s'ils ne sont pas éliminés efficacement (Nelson et al., 2000; Towle et Weihrauch, 2001). Elle est par ailleurs responsable de l'acidification de certains organites des cellules eucaryotiques. Leur activité est par conséquent intimement liée à celle de l'anhydrase carbonique, l'activation de l'ensemble de ces transporteurs

permettant de préserver un équilibre acide-base dynamique au cours du temps, garantie du bon fonctionnement des fonctions physiologiques et biologiques de la cellule.

La pompe ionique électrogénique Na⁺-K⁺ATPase a tout d'abord été mis en évidence dans les cellules excitables (i.e. axones, fibres musculaires) mais son activité a par la suite été élargie à quasiment tous les types cellulaires animaux (Lebovitz et al., 1989). Inhibibée par la ouabaine, cette protéine transmembranaire est elle aussi impliquée dans les principaux processus physiologiques connus incluant l'osmorégulation, la régulation du volume cellulaire, le transport d'acides aminés et de sucres ou encore le maintien de l'état d'excitabilité membranaire. Au travers de tous ces processus, sa principale fonction est d'assurer le maintien du gradient électrochimique entre les ions sodiums et potassiums au travers de la membrane cellulaire, utilisant l'hydrolyse d'une molécule d'ATP pour échanger trois ions sodium sortant contre deux ions potassium entrant.

Face à ces rôles multiples se pose la question du mode de régulation de ce transporteur dans les cellules, par modifications post-traductionnelles et/ou régulations à court terme de son activation. Chez les mammifères, les gènes de quatre isoformes correspondant aux sous-unités α et d'au moins trois correspondant aux sous-unités β constituant la Na⁺-K⁺ATPase ont été identifiés, auxquels s'ajoutent deux sous-unités γ exprimées spécifiquement dans le rein. L'ensemble des combinaisons possibles entre ces différentes sous-unités s'avère donc être le premier moyen de régulation de la pompe Na⁺-K⁺ATPase selon le tissu et le type cellulaire considéré (Jorgensen, 2001), mais une fois constituées, toutes les architectures protéiques sont sensibles à une régulation à long terme via les stéroïdes et les hormones stéroïdiennes. Des régulations intervenant de manière plus ponctuelle ont également pu être mises en évidence au travers des divers sites de phosphorylation accessibles aux protéines kinases A et C, des sites de liaison à l'ATP et

aux ions magnésium, ou encore des sites de transfert d'énergie présents dans les domaines transmembranaires de la protéine. Les Na⁺-K⁺ATPases exprimées dans les néphrons ont été démontrées comme dépendantes d'un grand nombre de facteurs endocrines tels que l'hormone parathyroïde, la dopamine, ou encore les prostaglandines, le glucagon, la calcitonine et l'angiotensine agissant principalement sur le taux de transport des ions sodiums de la pompe ionique (Bertorello et Katz, 1993; Ewart et Klip, 1995; Jorgensen, 2001).

Les premières caractérisations structurales des pompes Na⁺-K⁺ATPase ont pu être publiées chez des invertébrés comme *C. elegans* ou *D. melanogaster*, des bactéries, des levures et des plantes au travers du travail de séquençage du génome de tous ces organismes modèles. Seules quelques caractérisations fonctionnelles ont été publiées jusqu'à présent chez ces organismes, principalement les crustacés comme le crabe (Towle et Weihrauch, 2001) ou l'écrevisse (Grosell et al., 2002), ou la Drosophile (Lebovitz et al., 1989; Sun et al., 2001).

2. Les échanges chlorures-bicarbonates

Parmi les transporteurs membranaires d'ions HCO₃⁻ (Tableau VI) fréquemment cités pour leur rôle primordial dans la régulation du pH cellulaire (Boron et al., 1997), on mentionnera notamment la famille multigénique d'échangeurs Cl⁻/HCO₃⁻ (Bande III), les échangeurs HCO₃⁻/Cl⁻ sodium dépendants impliqués dans l'extrusion de protons, les co-transporteurs Na⁺:HCO₃⁻ provoquant généralement une acidification du cytoplasme et pour lesquels le ratio de Na⁺ et HCO₃⁻ varie selon le tissu considéré, ou encore le co-transporteur K⁺:HCO₃⁻ mis en évidence pour la première fois dans l'axone de calmar (Zhao et al., 1995).

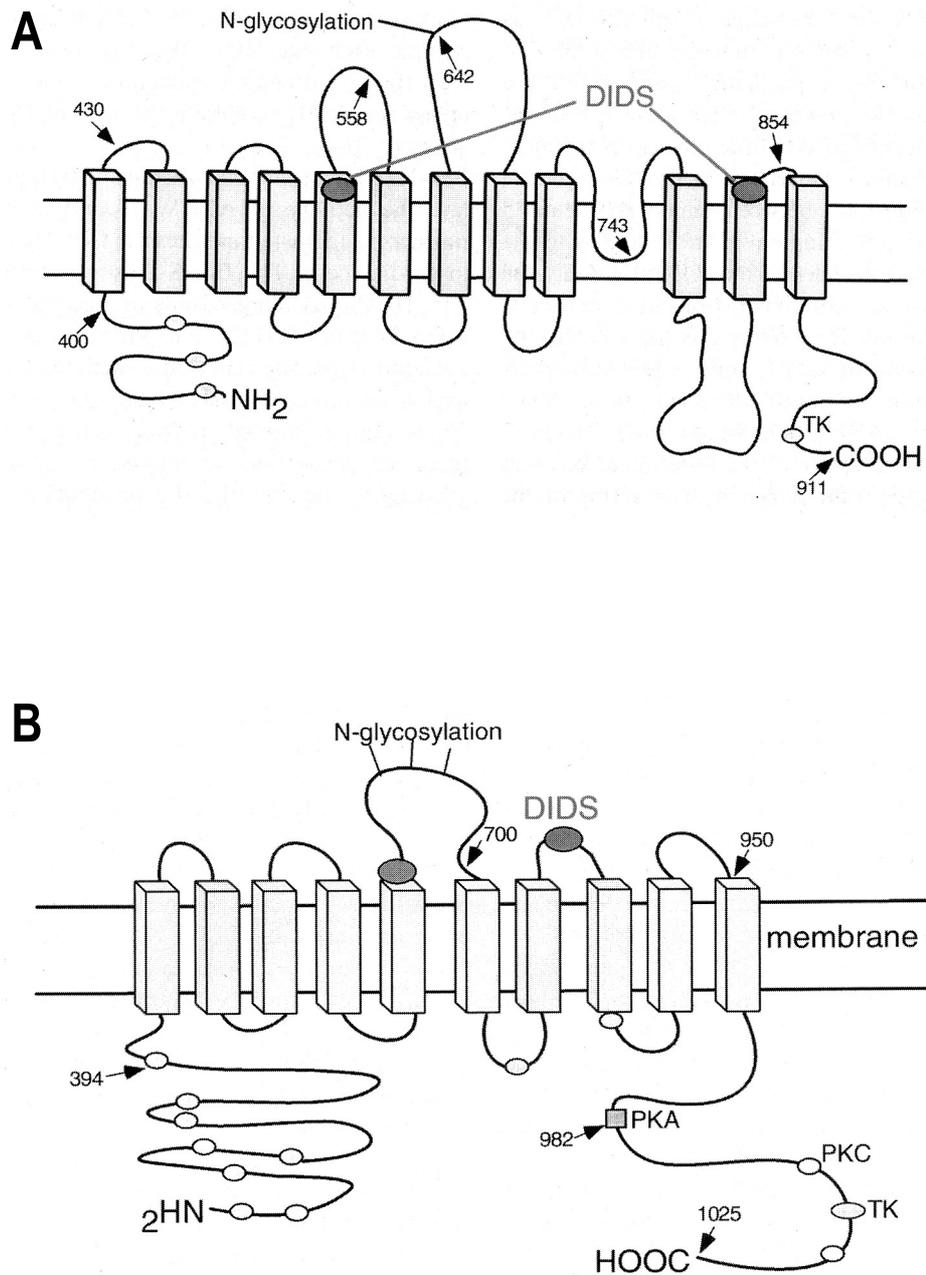


Figure 24. A Structure typique d'un échangeur anionique $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sodium indépendant de type Bande 3 (AE1). **B** Structure d'un cotransporteur $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ (NBC3). La position des acides aminés clés ainsi que les sites de glycosylation de chaque transporteur sont indiqués sur les schémas. Les domaines cibles pour le DIDS sont également indiqués et sont localisés sur des domaines transmembranaires différents en fonction du type de transporteur. Abréviations : TK : site de phosphorylation par tyrosine kinase, PKC : site de phosphorylation par la protéine kinase C et PKA : site de phosphorylation par la protéine kinase A (Pucéat, 1999).

La structure de deux échangeurs fréquemment présents à la surface des cellules eucaryotiques, l'échangeur anionique de type Bande III et le cotransporteur $Na^+HCO_3^-$, est illustrée dans la figure 24. Ces protéines sont toutes deux des glycoprotéines, généralement activées en phase d'alcalinisation du pH intracellulaire et permettant la ré-acidification de celui-ci. Dans le globule rouge humain, l'inter-relation entre l'anhydrase carbonique de type CA-II et l'échangeur anionique de type Bande III est poussée à l'extrême puisque Parkes et Coleman (1989) ont démontré la capacité des membranes érythrocytaires à lier CA-II et à stimuler son activité enzymatique, et Vince et Reithmeier (1998, 2000) ont démontré l'existence d'un site de liaison à CA-II sur région carboxy-terminal de la Bande III (AE1).

Tableau VI. Principales protéines transporteurs d'ions bicarbonates dans les cellules animales. Mention des ions associés à l'échange ou au co-transport de HCO_3^- , et effets des mouvements ioniques sur le pH intracellulaire.

Nomenclature	Intracellulaire	Extracellulaire	pH intracellulaire
Bande III, Echangeur anionique Cl^-/HCO_3^-	HCO_3^-	Cl^-	acidification
Co-transporteur $K^+:HCO_3^-$	K^+ HCO_3^-		acidification
Co-transporteur $1:3 Na^+:HCO_3^-$	Na^+ $3HCO_3^-$		acidification
Echangeur Cl^-/HCO_3^- Na^+ dépendant	Cl^-, H^+	Na^+, HCO_3^-	alcalinisation
Co-transporteur $1:2 Na^+:HCO_3^-$		Na^+ $2HCO_3^-$	alcalinisation
Co-transporteur $1:1 Na^+:HCO_3^-$		Na^+ HCO_3^-	alcalinisation

Mais l'une des caractéristiques majeures de la famille multigénique de la Bande III, en dehors de son rôle dans la régulation du pH intracellulaire, est d'être impliquée dans des fonctions physiologiques aussi variées que la voie de la glycolyse dans le globule rouge, les signaux de reconnaissance du système immunitaire, la régulation du volume cellulaire, ou encore la plasticité du cytosquelette du globule rouge.

Cependant, ces protéines ont principalement été identifiées et étudiées chez les mammifères. Elles ont également pu être caractérisées chez les poissons mais aucun transporteur de type Bande III fonctionnel n'a pu être mis en évidence chez la lamproie, pas plus que chez les invertébrés (Bogdanova et al., 1998; Byrne et Dietz, 1997; Cameron et al., 2000; Cameron, 1996).

Le travail réalisé au cours de cette thèse essaiera de mettre en relation les différents acteurs cellulaires décrits au cours de ce chapitre avec le modèle de biologie symbiotique que constitue le vestimentifère *Riftia pachyptila*. Au travers des nouveaux outils développés, la mise au point de suspensions de bactériocytes viables en particulier, nous nous attacherons à mieux caractériser la ou les isoformes d'anhydrase carbonique potentiellement existantes chez *Riftia*, mais aussi à colocaliser cette protéine avec les transporteurs membranaires introduits dans ce chapitre.

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES D'ETUDE

CHAPITRE II

Matériel et Méthodes d'étude

I. Echantillonnage - Un modèle biologique symbiotique, *Riftia pachyptila*

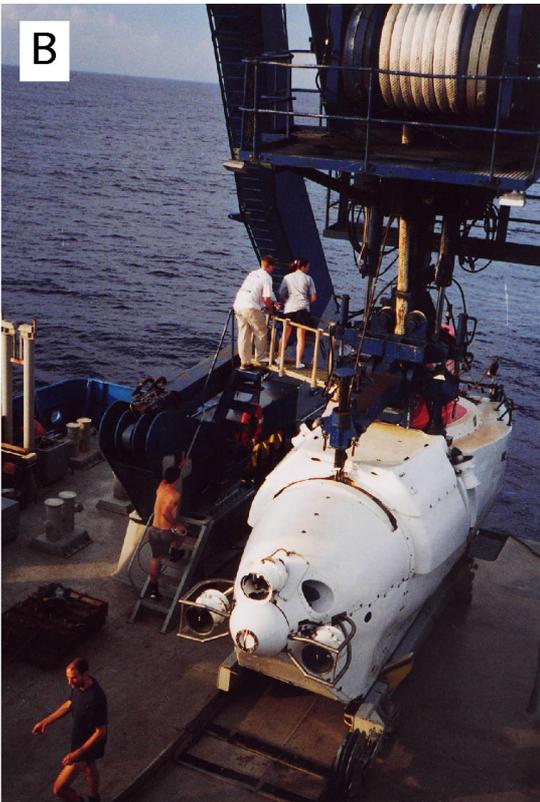
Les spécimens de *Riftia pachyptila* proviennent des sites 9°5'N et 12°50'N de la dorsale Est-Pacifique (EPR), à environ 2600 mètres de profondeur, pendant les campagnes océanographiques HOPE '99 (avril-mai 1999, chef de mission F.L. Lallier) et MAY 2000 (avril-mai 2000, chef de mission C.R. Young). La récolte des animaux a été effectuée lors de plongées quotidiennes avec les submersibles "Nautilie" (Ifremer; Figure 25A) et "Alvin" (Woods Hole Oceanographic Institute; Figure 25B), à l'aide du bras télémanipulé. Les animaux prélevés sont ensuite placés dans un caisson isotherme situé à l'avant du sous-marin (Figure 25C), afin de les maintenir pendant toute la durée de la plongée à une température inférieure à 10°C. L'ensemble d'une plongée typique dure 8 heures, dont 5 heures de travail sur le fond, avec une équipe composée d'un co-pilote, d'un pilote et d'un scientifique lors des campagnes françaises, et d'un pilote, d'un scientifique et d'un scientifique junior dans le cas des campagnes américaines.

La compartimentation du caisson isotherme ainsi que les moyens alternatifs de récolte d'animaux au fond (nasses, aspirateur, ascenseur indépendant, bouteilles en titane) permettent d'éviter les phénomènes de prédation avant la remontée en surface, mais l'état physiologique des animaux arrivant à bord est souvent critique. Leur environnement a été

A



B



C

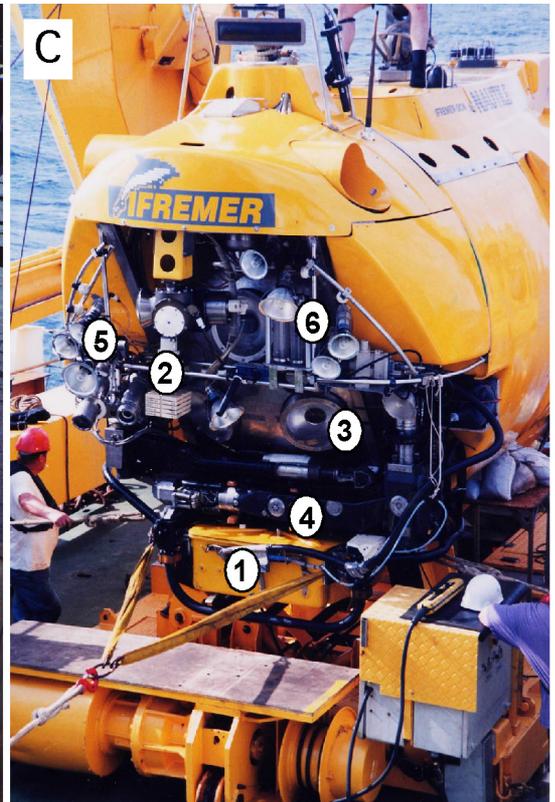
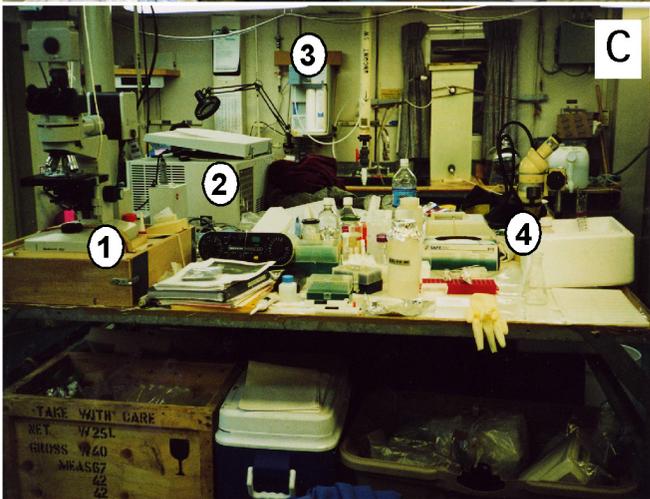
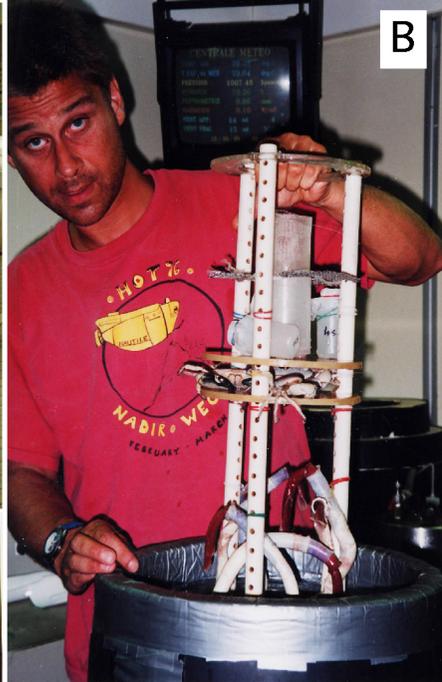


Figure 25. Submersibles utilisés en campagne. **A.** Sous-marin "Nautile" (Ifremer) remonté à bord du navire océanographique "Atalante" (Ifremer). **B.** Mise à l'eau du sous-marin "Alvin" (Woods Hole), sur le pont arrière du navire "Atlantis" (Woods Hole) où monte le personnel scientifique. **C.** Vue détaillée de l'avant du "Nautile". Les animaux récoltés au fond sont maintenus dans le caisson isotherme 1. Marqueur de sites 'Petit Poucet' 2; hublots pilote et scientifique 3; bras télémanipulé 4; caméras 5; systèmes d'éclairage 6. Clichés pris pendant les missions HOPE '99 et May 2000.



perturbé par la dépressurisation, la composition chimique de l'eau est modifiée car restée en vase clos pendant plusieurs heures. De plus, la température n'est pas toujours maintenue à moins de 10°C, dans le cas où certains échantillons prélevés restent coincés dans le joint et rompent l'étanchéité du caisson. La résistance des animaux à toutes ces perturbations est variable selon l'espèce considérée. Ainsi, *Alvinella pompejana* ou *Paralvinella grasslei*, annélides inféodés au pôle chaud des cheminées hydrothermales, n'ont jusqu'à présent pas pu être maintenues à bord, ni à pression ambiante, ni après repressurisation immédiate en aquarium. À titre d'exemple sur les méthodes d'études disponibles à bord, une des alternatives pour étudier la physiologie des animaux du pôle chaud, et en particulier leur comportement face aux températures élevées, a été de trouver une espèce sympatrique d'*A. pompejana*, *Hesiolyra bergi*, résistante à la remontée et à la repressurisation (Shillito et al., 2001).

Par contre, *Riftia pachyptila* peut dans la plupart des cas, sauf blessure, être repressurisé en aquarium (*i.e.* IPOCAMP; Figure 26A, 26B) et retrouver un métabolisme qu'on suppose

Figure 26. Organisation du travail à bord. **A.** Aquarium pressurisé IPOCAMP vu de face avec le panneau de commande de pressurisation et de débit d'eau, développé par Bruce Shillito (Equipe Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, UPMC, Paris). **B.** Sortie des animaux après repressurisation. Plusieurs espèces peuvent être pressurisées en même temps par un système d'étagement dans l'aquarium. Les *Riftia* sont immergés sans être sortis de leur tube et attachés pour être maintenus en position verticale. **C.** Plan de travail pendant la mission américaine May 2000 : microscope à épifluorescence et appareil photo 1, centrifugeuse 2, sortie eau ultrapure 3, loupe binoculaire 4. **D.** *Riftia* sortis de leur tube après dépressurisation et avant dissection (Cliché Frank Zal, UMR 7127 SBR Roscoff, HOT TIME '97).

assez proche de celui existant *in-situ*. Les nombreux travaux de Childress et collaborateurs, pionniers de la repressurisation, l'ont démontré à bien des égards (Mickel et Childress, 1982 a, b). Seuls les spécimens présentant un comportement de réflexe contractile (Figure 26D) en réaction au toucher seront utilisés pour être soit :

- remis immédiatement sous-pression, pour isolement des bactériocytes par exemple
- disséqués et fixés pour étude histologique
- disséqués et conservés dans l'azote liquide en vue d'un travail de biochimie et de

biologie moléculaire

II. Physiologie à bord : Techniques de dissociation cellulaire des bactériocytes

A. Préparation des échantillons

Les animaux utilisés pour ces expériences ont été choisis sexuellement immatures pour éviter la présence de gonades dans le trophosome, avec une taille comprise entre 5 et 10 cm de longueur, et avec un trophosome de couleur verte indiquant le non-épuisement des réserves en sulfure du ver (Felbeck et Jarchow, 1998; Fisher et al., 1989). Les individus sélectionnés sur le seul critère de taille au départ, souvent trouvés accrochés sur les tubes des adultes, ont été placés en aquarium pressurisé pendant 4 à 16 heures, dès leur arrivée à bord. Les aquariums utilisés sont thermostatés à 13°C, capables de repressuriser les animaux à 210 atm, et avec circulation d'eau de mer en circuit ouvert.

Après dépressurisation (1 à 2 min), les animaux ont été disséqués immédiatement. Le trophosome a été partiellement stérilisé par une brève immersion dans l'éthanol 70 %, puis

Tableau VII. Composition en sels (g/L) des milieux de culture cellulaire modifiés utilisés lors des campagne en mer HOPE '99 et May 2000. Comparaison avec la solution "Riftia Saline" classiquement utilisée pour les expériences de biochimie.

Composition pour 1 Litre	M-199 Hanks Medium pH 7,6	Qtés totales de sels dans M-199 Utilisé en 2000	L-15 Leibovitz Medium pH 7,6	Qtés totales de sels dans L-15 Utilisé en 1999	Riftia Saline pH 7,5
M-199	10,6				
L-15			13,9		
Bis-Tris Propane					14,10
NaCl	15,4	23,4	20,2	28,2	23,4
KCl	0,49	0,90	0,54	0,94	0,22
MgSO₄-7H₂O	5,80	5,90	1,00	1,20	7,88
CaCl₂-2H₂O	1,30	1,48	0,80	0,98	1,62
Na₂SO₄	2,13	2,13			
MgSO₄				0,20	
NaHCO₃	0,35	0,35			
Glucose	2	2	2		
Na₂S	0,048	0,048	0,048		

rincé trois fois dans le milieu de culture avant d'être découpé en petits morceaux pour faciliter la dissociation.

B. Choix des milieux et conditions de culture

1. Deux milieux de culture de cellules de vertébrés ont été testés en raison du succès de leur utilisation pour la culture cellulaire chez d'autres invertébrés marins (Birmelin et al., 1999; Toullec et al., 1996). Ils ont été modifiés pour obtenir une osmolarité théorique de 1100 mOsm. La composition chimique a été adaptée pour se rapprocher si possible de la composition de la "Riftia Saline" (Tableau VII), élaborée en fonction des mesures chimiques faites sur les liquides circulants de *Riftia* (Fisher et al., 1988) et modifiée par (Toulmond et al., 1994). En 1999, le L-15 et le M-199 ont été choisis également pour leur différence de concentrations en cations divalents. L'absence ou la faible concentration de cations divalents (L-15) devait favoriser la dissociation des cellules (Toullec et al., 1996), alors que le M-199 était plus riche en $MgSO_4$ et $CaCl_2$. La compensation ionique s'est faite sur le KCl déjà présent dans les milieux de culture originaux. En 2000, le milieu M-199 a été préféré au L-15 car les bactériocytes dissociés présentaient le taux de mortalité le plus faible dans ce milieu, et l'absence de cations divalents n'avait pas provoqué de meilleures dissociations (Tableau VII).

2. Modifications majeures apportées et optimisation du protocole :

- i) L'ajout d'une source de sulfure par le biais du Na_2S .
- ii) Le bullage à l'azote avant utilisation pour abaisser la concentration en oxygène à $7 \mu M$, plus adaptée au métabolisme des bactéries symbiotiques (Scott et al., 1999).

Tableau VIII. Liste des différents inhibiteurs spécifiques des principaux transporteurs et échangeurs membranaires des cellules eucaryotes. Les inhibiteurs testés dans le cadre de la thèse figurent en gras. Ceux qui se sont révélés intéressants à tester sur les cellules dissociées de trophosome et de branchie sont également mentionnés.

Produit	Action, cibles	Concentrations	Solvant	Fournisseur
Amiloride	Inhibe l'échangeur Na⁺/H⁺, les canaux Na⁺ et certains cationiques	1-100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Acétazolamide	Perméant cellulaire, inhibe toutes les anhydrases carboniques	100 µM-1mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Acide flufénamique	Inhibe la Bande 3 et certains canaux cationiques non sélectifs	100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Acide niflumique	Inhibe la Bande 3 et le cotransport KCl	100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Benzolamide	Imperméant cellulaire, inhibe les anhydrases carboniques extracellulaires et membranaires	100 µM	DMSO	Wyeth-Ayerst Research (USA)
DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid)	Inhibe la Bande 3, les canaux Cl⁻, le cotransport KCl	100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Furosémide	Inhibe la Bande 3 et le cotransport KCl	500 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Glibenclamide	Inhibe les canaux Cl⁻ de la famille CFTR et canaux K-ATP	100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
NEM (N-ethylmaleimide)	Inhibe les H ⁺ ATPases, non spécifique	2 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate	Inhibe les canaux Cl⁻	50-100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Bafilomycine	Inhibe la pompe H ⁺ ATPase	100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich
Ouabaine	Inhibe la pompe Na ⁺ /K ⁺ ATPase	100 µM	DMSO	Sigma-Aldrich

iii) Le maintien des cations divalents dans la solution de dissociation primaire afin de destabiliser les membranes le moins possible.

iv) Le rejet des méthodes de dissociation enzymatique à l'aide de pronase-trypsine-collagénase, provoquant le fractionnement des membranes cellulaires dans l'heure qui suit le traitement.

v) Le prélèvement des cellules dissociées dans le milieu toutes les 5 minutes pour ne pas les laisser trop longtemps sous agitation (Figure 27).

3. Expériences de culture à plus long terme :

Les cellules fraîchement isolées ont été transférées dans des flasques de culture et diluées dans un milieu de culture supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal ou 10 % de liquide coelomique non congelé, centrifugé et pré-filtré sur 0.22 μm . Les courbes de viabilité ont été établies toutes les 3 heures pendant les 24 premières heures, puis toutes les 12 heures par coloration d'exclusion à l'iodure de propidium (Boehringer-Mannheim). Aucun comportement d'attachement des cellules sur les flasques n'a pu être observé lors de ces expériences.

C. Test d'inhibition

Après comptage sur cellule de Mallassez et dilution des cellules à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml, la suspension a été répartie en aliquots de 500 μl dans des cryotubes et maintenue à 10°C. Nous avons choisi de concentrer nos expériences sur quelques inhibiteurs permettant d'obtenir une première estimation des cibles membranaires potentiellement présentes chez *Riftia* : l'amiloride, l'acétazolamide, l'acide niflumique, le benzolamide, le DIDS, et le NPPB (Tableau VIII).

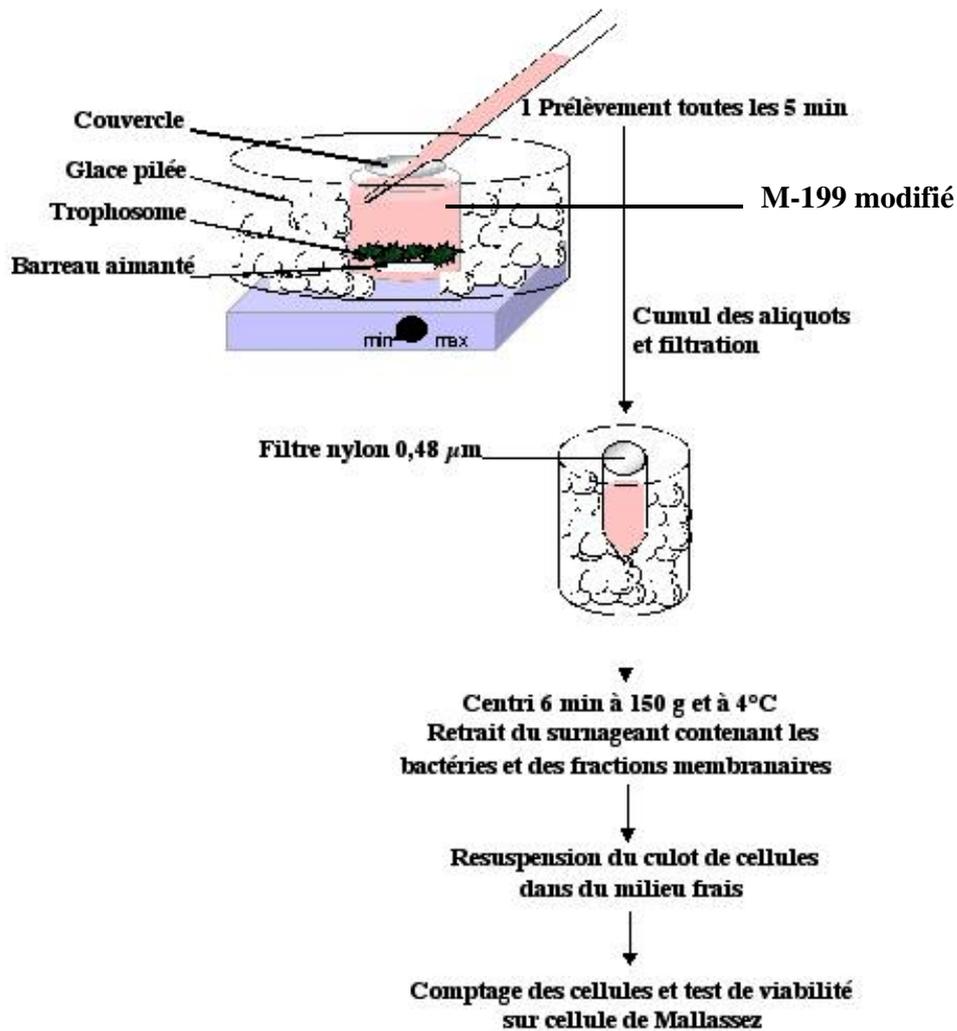


Figure 27. Protocole de dissociation mécanique des bactériocytes du trophosome de *Riftia pachyptila* dans un milieu de culture M-199 modifié. Les cellules une fois comptées sont aliquotées à $1,5 \times 10^6$ cellules par ml dans le même milieu pour les expériences d'inhibition de CA et des ATPases.

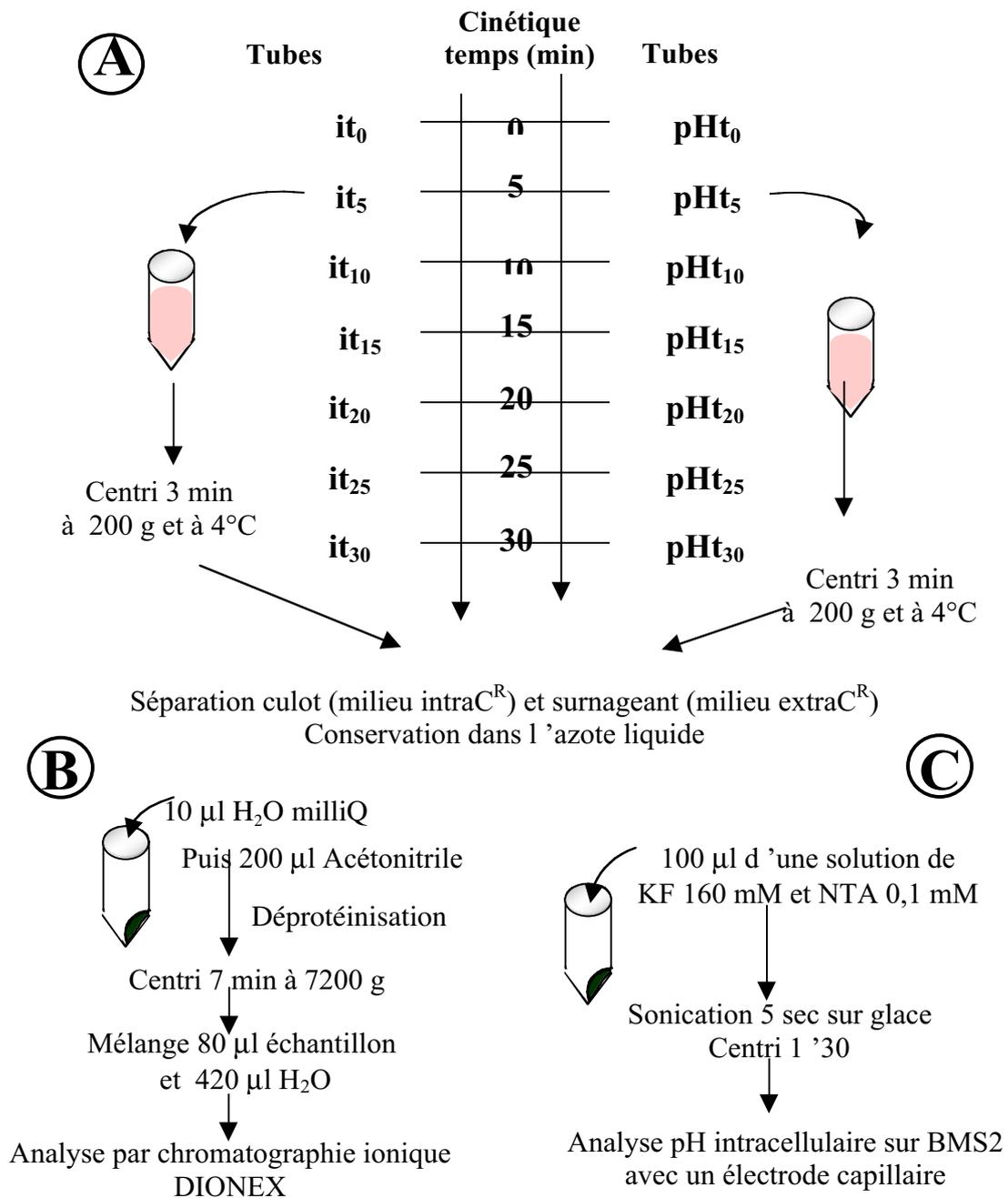


Figure 28. Description des différentes étapes du test d'inhibition mis au point sur les suspensions cellulaires de bactériocytes isolés à partir du trophosome de *Riftia*. Partie A réalisée à bord, parties B et C réalisées au laboratoire sur les échantillons conservés dans l'azote liquide. Abréviations : BMS2 : Blood MicroSystem pH analyser; KF : fluorure de potassium ; NTA : acide nitrilotriacétique.

La figure 28A illustre le protocole de cinétique mis au point à bord en chambre thermostatée à 10°C. Les aliquots de 500 µl à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml ont été placés dans des cryotubes dont le bouchon était percé avec une aiguille pour perfuser les tubes avec des mélanges gazeux 78% N₂ et 22 % O₂ ou 78 % N₂, 21 % O₂ et 1% CO₂. Le t₀ correspond à l'ajout d'inhibiteur dans le 1^{er} tube, immédiatement centrifugé. Les aliquots ont ensuite été centrifugés toutes les 5 minutes pour culotter les cellules, et le surnageant a été séparé du culot et mis dans un nouveau tube avant congélation et stockage des 2 tubes dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse.

III. Physiologie au laboratoire : Traitement des échantillons

A. Mesure des concentrations en ions majoritaires

La figure 28B illustre le protocole choisi pour le traitement des échantillons correspondant aux différents temps de la cinétique d'inhibition. Les variations de concentrations en ions dans le compartiment extracellulaire suite à l'ajout d'inhibiteurs se sont révélées trop faibles pour pouvoir être détectées. Le surnageant analysé par chromatographie ionique DIONEX redonne en effet la composition ionique du milieu de culture choisi, sans plus d'informations. Nous avons donc simplement analysé les variations en ions dans le compartiment intracellulaire en fonction du temps et de l'inhibiteur ajouté.

B. Mesure du pH intra- et extracellulaire

Lors de la cinétique d'inhibition à bord (Figure 28A), les surnageants et les culots ont été

exposés le moins longtemps possible à l'air pour éviter toute équilibration, ont été mis rapidement sous atmosphère d'azote liquide et ont été maintenus dans l'azote liquide jusqu'aux analyses. La mesure de pH avec un analyseur type BMS2 Radiometer présente deux avantages : pouvoir être effectuée sur des échantillons de très faible volume (40-50 μ l) et mesurer un pH sans contact de l'échantillon avec l'air puisqu'il est aspiré dans une électrode capillaire. La mesure du pH extracellulaire est faite directement sur les 500 μ l de surnageant récupérés à bord après centrifugation et séparation du culot de cellules. Pour l'analyse des pH intracellulaires (Figure 28C) correspondant aux culots de cellules obtenus à bord, nous avons choisi la méthode de Pörtner et al. (1990). Elle est fondée sur le principe d'ajout d'une solution à pouvoir tampon nul dans l'échantillon. Ainsi le pH mesuré est attribué entièrement au pH de l'échantillon, après s'être assuré que les proportions choisies entre les concentrations en Fluorure de Potassium (KF) et en Acide NitriloTriacétique (NTA) correspondent au type d'échantillon analysé défini par Pörtner et al. (1990). Dans notre cas, c'est une solution à 160 mM KF et 0,1mM NTA qui a été retenue (Figure 28C) car développée par Pörtner et al. pour les mesures de pH chez les invertébrés marins plus particulièrement.

C. Identification des bactériocytes par hybridation *in-situ*

Les bactériocytes isolés à bord ont été fixés dans 4% de paraformaldéhyde pendant 1h puis rincés et stockés dans du tampon phosphate salin 0,1 M, pH 7,4, 1100 mOsm pour identification ultérieure au laboratoire. Afin de discriminer si les échantillons utilisés pour les tests d'inhibition étaient i) des cellules et ii) des cellules contenant des bactéries symbiotiques du groupe des α -bactéries, nous avons suivi le protocole décrit par Amann (1995) et Schönhuber et al. (1999). Ce protocole détaille la technique d'hybridation *in-situ*

en "whole cell" utilisant des sondes ADN oligonucléotidiques marquées à la "HorseRadish Peroxidase" (HRP) et détectées ensuite avec le kit "Tyramide Signal Amplification" (NEN). Les lames sont enfin colorées au DAPI pour visualiser l'ensemble des noyaux eucaryotes et procaryotes.

Quatre sondes ont été testées sur nos échantillons, trois spécifiques de l'ADN 16S des trois grands groupes de bactéries , et , et une dernière spécifique de l'ADN 18S eucaryotique (Giovannoni et al., 1988) permettant une visualisation exclusive du noyau du bactériocyte (Tableau IX).

Tableau IX. Séquences des sondes utilisées d'après Manz et al. (1992).

Nom des sondes	Séquence 5'-3'	Spécificité
ALF Ab	CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG	Groupe des -bactéries
BET 42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	Groupe des -bactéries
GAM 42a	GCCTTCCCACATCGTTT	Groupe des -bactéries Souche symbiotique de <i>Riftia</i>
EUK 1209R	GGGCATCACAGACCTG	Eucaryotes

IV. Techniques histologiques

A. Fixations des tissus à bord

Lors de la mission HOPE '99 principalement, nous avons fixé l'ensemble des tissus de *Riftia* de 11 façons différentes selon le but histologique envisagé par la suite et les commentaires bibliographiques recensés sur les fixations de tissus d'invertébrés marins, et

Tableau X. Descriptif et références bibliographiques correspondantes de l'ensemble des fixations testées pendant la mission HOPE '99 en fonction du but expérimental recherché. Abréviations : PBS : tampon phosphate, PFA : paraformaldéhyde, Gluta : glutaraldéhyde, tampon caco : tampon cacodylate.

But	Nom	Fixation	Référence	Organisme initial
Ultrastructure MET	Gluta/PBS	4% glutaraldéhyde en tampon PBS 0.1M pH7.3 + 10% sucrose + CaCl ₂	Gardiner '85	Riftia
	Gluta/Caco	4% glutaraldéhyde en tampon PBS 0.1M pH7.2. 1 nuit à 4°C. Rincage cacodylate + stockage PBS	Gardiner '85	Riftia
	SPAFG	1% PFA + acide picrique en PBS + 0.45M sucrose + glutaraldéhyde 3% pH 7.3. 2h à 4°C. Stockage PBS	Weistheide '88	Meiofaune
Immunoloc	Bouin	Bouin 24h. Paraffine ou éthanol 70%, Inclusion OCT et congélation	Baillie '98	Tridacna
	Carnoy	Carnoy 1 nuit. Inclusion araffine	Balsamo '94	Oreille de Poulet
	Méthanol	100% Méthanol à -20°C 30' à 1h. Congélation dans l'azote liquide		
	ParaGP	0.1% glutaraldéhyde + PFA froid 4% + acide picrique 0.2% en PBS 0.1M pH 7.4, 3h à 4°C. Inclusion paraffine	Rahim '88	Saumon
	PGF	2% glutaraldéhyde + 4% formaldéhyde + 0.05% acide picrique en tampon cacodylate 0.1M; 2-3h à T° ambiante. Sucrose 8% dans tampon cacodylate 0.2M pH 7.3. 1 nuit à 4°C. Inclusion OCT et congélation	Sugai '80	Muqueuse gastrique souris
Immuno-Gold	ParaG	4% PFA froid-0.1% gluta ds PBS. 0.1M pH 7.4 2-3h 4°C, rincage PBS, déshydratation, inclusion Lowicryl	Rahim '88	Saumon
	Gluta/Para	2,5% gluta + 2% PFA en tampon caco 0,1M pH 7,3. 1% OsO ₄ + 1,5% K ₄ [Fe(CN) ₆] en tampon cacodylate 0,1M pendant 1h. Deshydratation et inclusion Epon	Sender '98	Muscle cardiaque Rat
Hybridation in-situ		4% PFA en tampon PBS 0.1M pH 7.4 2 à 5h. 30% sucrose en PBS 0.1 M pendant 2jours. Deshydratation et inclusion paraffine	Balsamo '94	Oreille de Poulet
Témoin Histo		Tissu lavé avec la solution "Riftia saline". Inclusion OCT et congélation dans l'azote liquide	Sender '98	Muscle cardiaque Rat
Histochimie	Gluta/PB	4% glutaraldéhyde en PBS 0.15 M pH 7.4 à +4°C, 2h. Rincage PBS. 10% sucrose en PBS pendant 30'. 25% sucrose en PBS pendant 1 nuit. OCT et congélation	Just '94	Blatte
	FGC	2% formaldéhyde + 0.2% glutaraldéhyde en tampon cacodylate 0,1M à 4°C 1h. 30% sucrose en tampon cacodylate. Inclusion OCT et congélation	Riehl '90	CNS de Sangsue
	ParaGC	4% PFA + 3% gluta en tampon caco 0.05 M pH 7.4. Sucrose 5 à 20% en tampon caco. OCT et congélation	Okamura '96	Oreille de Porc
DNSA		Tissu lavé avec la solution "Riftia saline". Inclusion OCT et congélation dans l'azote liquide	Just '94	Blatte
		Cryocoupes et collage sur lames traitées à la poly-lysine à -28°C. Postfixation avec 1 goutte de méthanol froid. 2% formaldéhyde + 0.2% glutaraldéhyde en tampon cacodylate 0.1M 4°C 1h. 30% sucrose en tampon cacodylate. Inclusion OCT et congélation	Riehl '90	CNS de Sangsue
Cellules isolées	Bactériocytes Bactéries	4% paraformaldéhyde pendant 15' à +4°C. Rincage PBS et stockage PBS 2.5% glutaraldéhyde en solution "Riftia saline" ou eau de mer artificielle	Ce travail	<i>Riftia pachyptila</i>
Biochimie	Congélation	Dissection des tissus. Rincage dans la solution "Riftia Saline". Congélation à l'azote liquide	Ce travail	<i>Riftia pachyptila</i>

l'expérience antérieure du laboratoire. Le tableau X récapitule l'ensemble des types de fixations essayées avec les références bibliographiques correspondantes. Seules celles grisées sont été utilisées jusqu'à présent au laboratoire et font l'objet d'une description dans ce chapitre.

B. Hybridation *in-situ* ARN-ARN

La technique d'hybridation *in-situ* permet de localiser les ARN messagers par hybridation de l'ARN cible choisi avec une sonde ARN ou ADN antisens (Tableau XI), c'est-à-dire dont la séquence correspond au complémentaire inverse de la séquence de l'ARN cible, sur des coupes de tissus ou des embryons ou cellules entiers (Technique de "whole cell").

La séquence obtenue est un fragment de 225 paires de bases, identique à 46 % et similaire à 65 % avec la séquence CA d'anémone, cloné dans un vecteur KS (Stratagène) et dont nous nous sommes servi comme matrice pour synthétiser une sonde ARN marquée à la DIG (Figure 29) selon les instructions de Boehringer-Mannheim.

Tableau XI. Séquence d'amorces dégénérées dessinées sous le logiciel OLIGO-4 à partir de séquences protéiques consensus retrouvées dans l'ensemble des isoformes d'anhydrases carboniques déjà séquencées (Base de données NCBI). La séquence de CA publiée chez l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (NCBI : AF140537) a servi de référence pour estimer la position des amorces sur la séquence putative d'anhydrase carbonique chez *Riftia*. Code de dégénérescence des bases nucléotidiques : N= A/C/G/T; R= A/G; Y= C/T.

Jeu d'amorces	Séquence (5' → 3')	Position sur l'ADNc d' <i>A. elegantissima</i>
Amorce sens CA4A	GAG CAR TTY CAY TTY CAY TGG	282-303
Amorce antisens CA8	CGG ART ANG TCC ART ART C	582-601

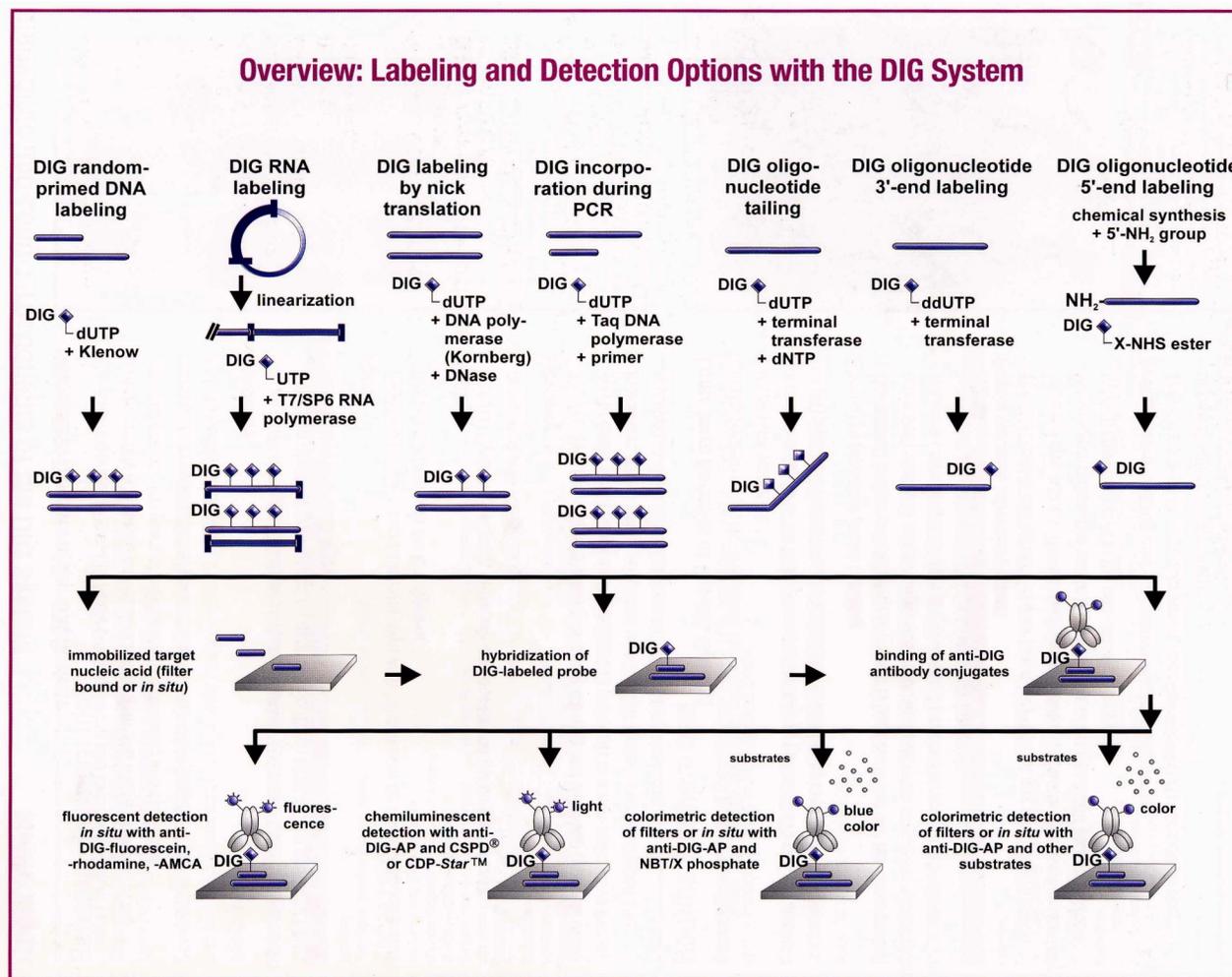


Figure 29. Marquage et détection des ARNs sur coupes histologiques avec le système DIG.
Schéma extrait du manuel d'hybridation *in-situ* de Boehringer Mannheim (ISH-Handbook, 1998)

Par contre, le protocole de pré-traitement des tissus avant l'hybridation proprement dite avec la sonde ARN marquée a nécessité un certain nombre de mises au point détaillées ci-dessous. En effet, le principal problème rencontré fut le décollement des coupes après hybridation à 45°C, surtout les coupes longitudinales de juvéniles de *Riftia* avec une grande surface de tissu à hybrider.

PROTOCOLE PREPARATIF A L'HYBRIDATION *IN-SITU*

1) Préparer toute la verrerie, les solutions et le plan de travail en conditions RNase-free en préambule à toute expérience

2) Préparation des coupes

- Lames préparées au Biobond à 2% dans de l'acétone, selon les instructions du fabricant (BBInternational). La gélatine et la poly-lysine se sont révélées être des matrices adhérentes trop faibles ne pouvant maintenir le tissu sur la lame jusqu'à la fin du protocole.

- Coupes à 5 ou 7µm sur un microtome (Jung, Heidelberg, Allemagne), déposées sur les lames, séchées une nuit à +40°C puis conservées à l'abri de la poussière.

3) Solutions stocks

- Tampon Phosphate (PBS) NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 0.1 M, pH 7.4

- Paraformaldéhyde (PFA) Solution stock à 20% dans H₂O DEPC à préparer dans les 4 jours avant utilisation

- SSC Solution stock 20X SSC Pour 500 ml

NaCl 3M (PM 58.44) 87.66 g

Sodium citrate 300mM (PM 294.1) 44.12g

Ajuster le pH=7.0 avec NaOH et autoclaver.

- HCl 0.2 N (36%= 12N) : 8.33 ml HCl 12N pour 500 ml final

- Tri-éthanol-amine (TEA) 0.1 M, pH 8.0 (PM 185.7) à ajuster avec des pastilles de soude.

A préparer extemporanément

4) Prétraitement des coupes

- Déparaffinage dans 2 bains de toluène pendant 5'
 - Réhydratation par 5 séries décroissantes d'éthanol : 100-100-95-95-70 % et un bain de PBS

- Post-fixation PFA 4% -PBS	15 mn	T° ambiante
- Rinçages PBS	2x5 mn	T° ambiante
- Déprotéinisation HCl 0.2 N	10 mn	T° ambiante
- Bain de SSC 2X	10 mn	70°C
- Rinçages PBS	2x5 mn	T° ambiante
- Acétylation TEA 0.1M pH=8	2 mn	250 ml à T° ambiante
+650 µl Anhydride acétique	5 mn	Sous agitation magnétique
+650 µl Anhydride acétique	5 mn	
- Rinçages PBS	2x5 mn	
- Perméabilisation membranaire Protéinase K 50µg/ml	10 mn	37°C en chambre humide
- Rinçages PBS	2x5 mn	4°C
- Déshydratation par séries croissantes d'éthanol inverse à la première série		
- Séchage étuve	10 mn	37°C
- Laisser refroidir	5 mn	T°C ambiante
- Congélation de stockage dans boîte hermétique à -80°C jusqu'à 2 semaines.		

5) Après les étapes d'hybridation et de rinçage standard décrites dans le protocole de Boehringer-Mannheim, **la révélation** choisie a été celle de l'utilisation d'un anticorps anti-digoxygénine couplé à l'alcaline phosphatase, puis de l'application du substrat de l'alcaline phosphatase (NBT/BCIP) provoquant une coloration brune sur les coupes.

Les coupes ont été observées en microscopie optique (Leitz Laborlux D), photographiées sur film inversé, et scannées et éditées sous Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc., San José, USA).

C. Immunohistolocalisation

Les tissus fixés au méthanol (Tableau X) et stockés dans l'azote liquide ont été inclus à leur base uniquement dans de l'OCT et coupés à l'aide d'un Micro cryotome à -25°C . Les cryocoupes d'épaisseur comprise entre 7 et 10 μm ont été placées sur lames recouvertes de poly-lysine et ont ensuite été post-fixées pendant quelques minutes dans une solution de méthanol à -20°C contenant 0,3 % de peroxyde d'hydrogène afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Après rinçage dans un tampon phosphate salin (PBS 10 mM phosphate et 150 mM NaCl), les coupes ont été saturées avec du PBS contenant 10 % de sérum normal de chèvre (NGS), 1 % d'albumine bovine (BSA) et 0,3 % de Tween 20, pendant 1 heure avant le dépôt de l'anticorps primaire. Les coupes ont ensuite été incubées 2 heures à 37°C avec un anticorps primaire, préalablement dilué au 1:50^e dans du PBS contenant 1 % NGS, 1 % BSA et 0,3 % Tween 20. Après un nouveau rinçage au PBS, une incubation d'1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire de lapin ou de souris couplé à la "HorseRadish Peroxidase" (HRP) dilué au 1:3000^e, et un dernier lavage, le marquage d'immunolocalisation a été révélé par application d'une solution de 4-chloro-1-naphtol (ImmunoPure, Pierce Biotech) jusqu'à apparition d'une coloration bleu-violette sur les coupes observées en microscopie optique (Leitz Laborlux D). Les clichés ont été pris sur film inversé (Wild Photoautomat MPS 45), scannés et édités sous Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc., San José, USA).

D. Localisation de CA par histochimie avec le DNSA

Plusieurs alternatives à l'immunohistolocalisation sont proposées dans la littérature pour la détection de l'anhydrase carbonique sur coupes histologiques. La méthode de Hansson (1967) peut être appliquée à la microscopie optique et électronique. Elle repose sur le principe de précipitation des sels de cobalts contenus dans la solution d'incubation en présence d'anhydrase carbonique à la surface des coupes histologiques (Sugai et Ito, 1980). La méthode décrite par Pochhammer et al. (1979) repose sur la formation d'un complexe entre l'anhydrase carbonique et un inhibiteur fluorescent de son site actif, le DNSA (1-diméthylamino-naphthalène-5-sulfonamide). Sous une même excitation U.V. à 390 nm, le DNSA a la particularité d'émettre à une longueur d'onde différente selon qu'il est lié à CA (468 nm), ou libre en solution (580 nm) (Chen et Kernohan, 1967; Dermietzel et al., 1985). C'est cette méthode qui a été utilisée sur les tissus de *Riftia* fixés au méthanol pendant HOPE '99 (Tableau X). Un dernier protocole a été publié plus récemment (Brubaker et al., 1999) pour la localisation *in-vivo* de l'anhydrase carbonique, sur cellules non fixées, par incubation de celles-ci avec un composé fluorescent couplé à un inhibiteur de CA : Bodipy 558/568-modified Acétazolamide (Molecular Probes). Cependant l'observation de ce composé *in-situ* nécessite l'utilisation d'un filtre très particulier, associée à une observation en microscopie confocale, technique malheureusement inaccessible à bord d'un navire océanographique en campagne.

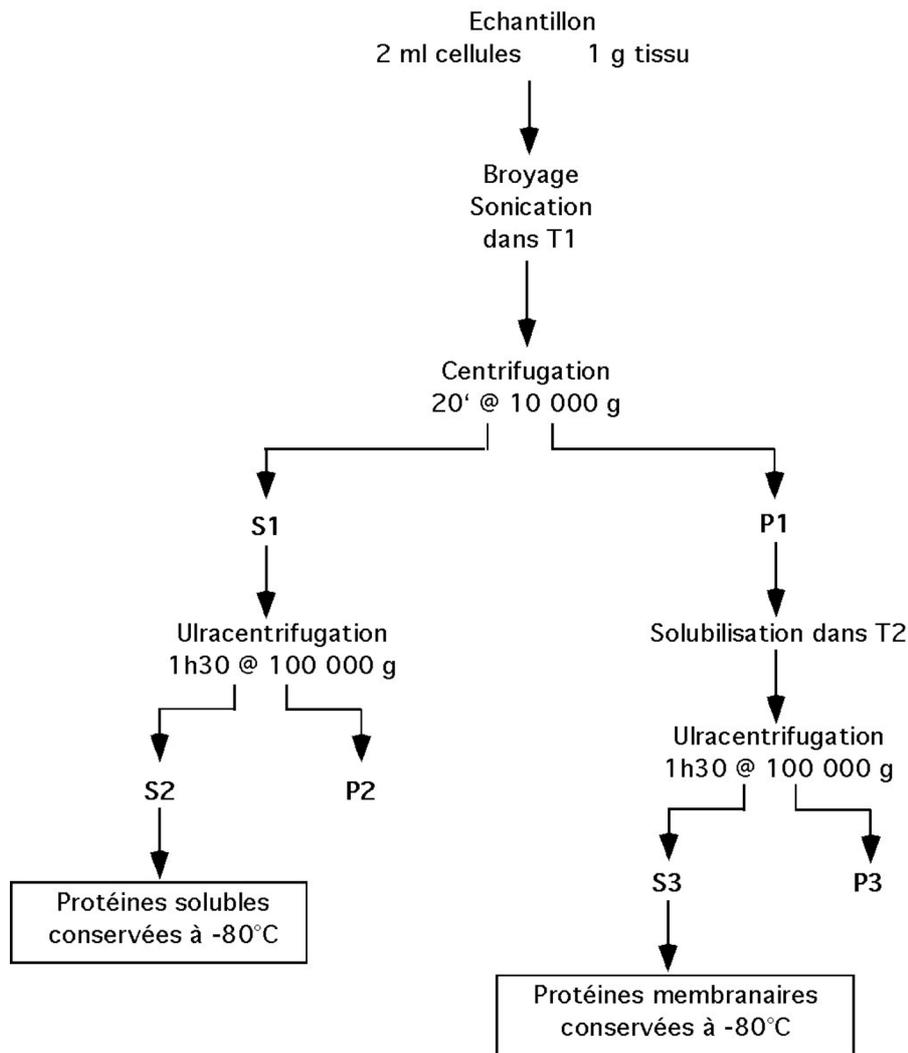
Les marquages obtenus avec le DNSA ont été observés avec un microscope confocal (CLSM, Fluoview, Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) équipé d'un laser pulsé (Mira 900, Coherent, Santa Clara, A, USA) pour obtenir une excitation à 470 nm. Les images ont été intégrées sous Fluoview (Olympus Optical) et éditées sous Photoshop 5.5.

E. Microscopie électronique à transmission

Afin de localiser plus précisément CA dans les bactériocytes de *Riftia* et pour établir la présence ou non d'isoforme membranaire en plus de l'isoforme cytoplasmique déjà démontrée. Les échantillons inclus dans le LR-White ont été coupés à 60 nm avec un ultramicrotome Leica Ultracut UCT puis déposés sur des grilles de nickel 50 barres pioloformées et traitées comme suit (toutes les étapes ont été faites sur goutte; tampon phosphate = PBS 0,1 M, pH 7,4) :

- Saturation des coupes dans PBS-5 % BSA-5 % NGS 10 mn
- 3 Rinçages dans PBS-1 % BSA-1 % NGS-0,1% Tween 20 Passages
- Incubation Ac primaire dans même tampon (1/50^e à 1/10^e) 1 heure
- 5 Rinçages PBS-1% BSA 2 mn
- Incubation Ac secondaire PBS+ 0,01% gélatine de poisson 1 heure
(couplé à des billes d'or colloïdal 10-15 nm, dilution 1/20^e)
- 5 Rinçages à l'eau ultrapure 2 mn
- Stabilisation du marquage dans PBS-glutaraldéhyde 1 % 5 mn
- Rinçage à l'eau et séchage
- Contraste à l'acétate d'Uranyle 5% dans de l'eau distillée et Citrate de plomb.

Les grilles ont été observées à l'aide un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200X, et les clichés ont été tirés sur film noir et blanc (Ilford, Mutligrade IV).



T1 : Tampon de lyse et d'extraction : Tampon Tris HCl 50 mM, pH 7,5
 200 mM sucrose
 150 mM KCl
 5 µg/ml chymostatine
 10 µg/ml aprotinine et leupeptine
 2 mM EDTA
 1 mM Pefablock

T2 : Tampon de lyse des membranes : Tampon Tris d'extraction 7 volumes
 (Brion et al 1997) Triton X-100 à 1% 3 volumes
 Saponine à 0,2 % 1 volume

Figure 30. Schéma du protocole d'extraction des protéines cytosoliques et membranaires mis au point à partir de cellules dissociées et de tissus frais congelés chez *Riftia pachyptila*.

V. Caractérisation des protéines

A. Extraction des protéines

A bord, des aliquots de 2 ml à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml provenant des expériences d'inhibition de CA ont été centrifugés à 200 g pendant 5 minutes. Les culots de cellules ont été conservés dans l'azote liquide pour des analyses biochimiques ultérieures. Les tissus (trophosome, vestimentum, paroi du corps et panache branchial) ont été disséqués immédiatement après le tri des animaux, rincés dans le tampon "Riftia Saline", et plongés dans l'azote liquide. Le protocole d'extraction suivi (Figure 30) est le même pour 2 ml de suspension cellulaire et 1 g de tissu. L'un et l'autre ont été broyés dans 4 ml de tampon d'extraction sur glace. Les broyats ont été soumis aux ultra-sons 2 fois pendant 30 sec pour homogénéiser l'extrait, puis l'homogénat a été centrifugé 20 min à 10 000 g et à 4°C (S1 + P1).

Le surnageant issu de la première centrifugation (S1) contient les protéines cytosoliques et a été ultracentrifugé 1h30 à 100 000 g et à 4°C, à l'issue de laquelle le surnageant (S2) a été prélevé et conservé à - 80°C. Le culot issu de la première centrifugation (P1) contient les membranes et autres organites cellulaires. Le culot (P1) a été lavé deux fois avec le tampon d'extraction, puis solubilisé 2 heures dans 2 ml de tampon de lyse. La solubilisation du culot a été achevée par le même protocole de sonication que précédemment, puis l'homogénat a été ultracentrifugé (cf. § précédent) et le surnageant (S3) a été conservé à -80°C.

Les échantillons destinés à l'électrophorèse ont été aliquotés à 50 µg et mélangés au tampon de charge pour électrophorèse (Laemmli, 1970). Pour l'électrophorèse bi-dimensionnelle, les protéines contenues dans les échantillons S2 et S3 ont été précipitées dans 5 volumes d'acétone-TCA 10% à -20°C pendant 1 heure, puis centrifugées à 15 000g pendant 25 min. Le culot protéique (200 µg) a ensuite été resuspendu directement dans le tampon d'électrophorèse bi-dimensionnelle modifié comme suit :

<u>Tampon de réhydratation IPG strips (Biorad) :</u>	Thiourée	2 M
	Urée	7 M
(3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate) CHAPS		4 %
	Pharmalytes	0,6 %

B. Western blot

1. Choix des anticorps

Plusieurs anticorps ont été testés, tous dirigés contre des protéines de vertébrés.

Ainsi l'anticorps primaire de lapin anti-zebrafish CA (Dr P. Linser, Whitney Laboratory, University of Florida, St Augustin, USA) n'a pas reconnu la CA de *Riftia* sur western blot. Par contre l'anticorps de lapin anti-poulet CA (Dr P. Linser) s'est révélé très spécifique de l'isoforme cytoplasmique de CA chez *Riftia* et a donc pu être utilisé avec confiance pour les expériences d'immunolocalisation. Pour la recherche d'une isoforme membranaire, l'utilisation de l'anticorps de lapin anti-poumon de rat CA (Dr Sly, St Louis University, Medicine School, St Louis, USA) a permis de révéler 3 bandes majoritaires uniquement dans la fraction membranaire du trophosome, mais a également réagi avec les isoformes cytosoliques, ce qui en fait un anticorps non discriminant pour notre étude immunohistologique.

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre la sous-unité $V-H^+$ ATPase de 60 kDa de la levure a été obtenue chez Molecular Probes et utilisé au 1:500^e pour les western blots. Les anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la sous-unité Na^+K^+ -ATPase de poulet ("5") et contre le cotransporteur Na-K-Cl humain ("T4"), et utilisés au 1:1000^e, ont été fournis par l'Université d'Iowa (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA). Les premiers essais avec des antisérums non purifiés se sont révélés infructueux car le titre en anticorps était très bas d'une part, et le degré de conservation des épitopes entre les protéines recherchées chez *Riftia* et des cellules de souris était faible d'autre part. Mais après commandes des ascites correspondant à ces anticorps prépurifiés et concentrés, la réponse sur western blot s'est avérée positive pour l'ensemble des protéines recherchées.

2. Immunoprécipitation

Compte tenu des résultats obtenus en western blot avec les anticorps dirigés contre CA cytosolique et CA membranaire, nous avons voulu essayer un protocole d'immunoprécipitation sur billes de Protein A Sépharose CL-4B (Sigma-Aldrich), moyen rapide pour purifier une protéine d'intérêt :

<u>Tampon d'immunoprécipitation (IP):</u>	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Tris-HCl	25 mM, pH 7,5

Interactions protéine-anticorps : 0,9 ml de tampon IP + 100 μ l cytosol (S2) + 4 μ l Ac-I^R

Laisser tourner sur roue pendant au moins 2 heures à T° ambiante

Préparation des billes :

- i) Réhydratation de 250 mg de Protein A Seph. dans PBS à 4°C pendant 2 heures
- ii) Saturation dans tampon IP 1 heure sur roue à 4°C, centri 28000 rpm, 1 min
- iii) Eliminer le surnageant à la pipette

Incubation avec le cytosol : Ajouter 1ml de milieu d'interaction sur le culot
1 heure à 4°C sur roue, centri 28000 rpm, 1 min

Rinçage du culot (3x) : Tris HCl 50 mM, pH 7,5, 150 mM KCl, 1% NP40, 1 mM EDTA

Rinçage (2x) et séchage : Tris HCl 50 mM, pH 7,5, 150 mM KCl, centri, sécher à la pipette

Récupération des protéines immunoprécipitées, correspondant potentiellement aux isoformes membranaires et cytosoliques en fonction de l'anticorps utilisé, par élution en ajoutant 12 µl d'eau et 3 µl de tampon de charge 5x (Laemmli, 1970) et chauffage à 100°C pendant 3 min.

C. Test d'activité enzymatique

Ce test a été réalisé dans un but qualitatif permettant d'identifier la présence l'anhydrase carbonique dans les échantillons, et non strictement quantitatif avec mesure précise du niveau d'activité de la protéine. Les protocoles de mesures de l'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique sont habituellement fondés sur la modification du pH de la solution de révélation en présence de CA et de CO₂. Cette variation de pH peut être matérialisée et quantifiée par l'ajout d'un indicateur coloré tel que le bleu de bromothymol (BTB, bleu à 7,6 et jaune à 6,0) ou le bleu de bromocrésol (bleu à 6,8 et jaune à 5,2).

Les extraits protéiques totaux de *Riftia* contenant potentiellement de l'anhydrase carbonique on été dilués dans un tampon spécifique maintenu sur glace :

Tampon Véronal :

Véronal	25 mM, pH 8,2
EDTA	5 mM
DTT	5 mM
MgSO ₄	10 mM

Ajouter 7 µg/ml de BTB au tampon véronal et saturer 200 ml d'eau en CO₂ sur glace

Mélanger sur glace 700 µl de tampon véronal+BTB
50 µl d'échantillon et homogénéiser par inversion

Le t_0 de la réaction est donné par l'ajout de 500 μ l d'eau saturée en CO_2 à 0°C .

La mesure de l'activité enzymatique correspond au temps écoulé pour passer d'un pH de 8,2 (bleu) à un pH de 6,0 (jaune) en présence de CA, divisé par le temps écoulé pour passer du pH 8,2 au pH 6,0 quand l'échantillon protéique a été bouilli pendant 5 min avant expérience (hydratation non catalysée du CO_2) (Drescher, 1978; Weis et al., 1989).

D. Détection de CA en conditions natives sur gel

- Différents systèmes de migration ont été testés (Manchenko, 1994) :

i) système continu en Tris-Borate-EDTA (TBE), pH 8,6 où la composition du gel d'amidon est la même que celle des tampons de migration.

ii) système discontinu sur gel d'amidon avec tampon de migration Borate pH 8,2 et tampon de gel Tris-HCl pH 8,5.

iii) Gradient de polyacrylamide 4-26 % et gel standard 12,5 % en conditions natives

- Ainsi que différents protocoles de détection :

i) révélation indirecte par coloration au Fast Blue RR (Manchenko, 1994)

ii) révélation directe par application d'un des trois colorants :

Rouge phénol 0,1 % dans Tampon véronal 0,1 M, pH 9,0

Bleu de Bromocrésol 0,1 %

Bleu de Bromothymol (BTB) 0,1 %

Puis bullage de CO_2 pur à la surface du gel, sur glace, ou sur carboglace (atmosphère enrichie en CO_2), jusqu'à l'apparition de bandes jaunes pour le rouge phénol et le BTB, et de bandes fluorescentes sous lampe UV pour le bleu de bromocrésol.

Aucune activité estérase n'a pu être détectée chez *Riftia pachyptila* par ces méthodes, et l'identification du nombre d'isoformes s'est révélée hasardeuse et non reproductible du fait de la courte durée du maintien de la coloration, et de la mauvaise résolution des bandes obtenues en gel d'amidon.

E. Fractionnement des extraits protéiques totaux par FPLC-HR75

Les extraits protéiques totaux correspondant aux fractions cytosoliques ou membranaires obtenues à partir de la branchie et du trophosome ont été fractionnés sur système FPLC (Pharmacia LKB-Pump P-500) avec une colonne SuperdexTM 75 HR (10/30) (Pharmacia Biotech) pour séparer les protéines de haut poids et de faible poids moléculaire avec un optimum de séparation entre 3 et 70 kDa. Les fractions ont été récoltées à l'aide d'un collecteur FRAC-100 (Pharmacia-Biotech). Ce fractionnement s'est révélé utile pour i) la première étape de purification des protéines d'intérêt avant passage en chromatographie inversée et microséquencage par la méthode d'Edmann (cf. § suivant II.V.F.), et ii) la séparation des protéines avant détermination d'activité enzymatique. Brièvement, les protéines extraites ont été conservées dans du tampon véronal (cf. § II.V.C.) préservant leur structure native et leur activité en théorie, sans sucrose pour éviter le colmatage de la colonne. Les échantillons ont été injectés par une boucle d'injection de 200 μ l, à un débit de 400 μ l/min et récoltés en fractions de 400 μ l à partir de la fraction 7, le volume écoulé jusqu'alors correspondant au volume mort de la cellule : 7,4 ml. L'ensemble des fractions numérotées a été conservé à -80°C jusqu'à l'analyse d'activité ou le microséquencage.

F. Analyse en spectrométrie de masse

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg dirigé par Alain Van Dorrselaer (ULP-CNRS UMR 7509, ECPM, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex, France). Les différentes étapes techniques consécutives à l'isolement de bandes d'intérêt sur gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie, ou au fractionnement des extraits protéiques totaux par FPLC ont été effectuées dans ce laboratoire.

1. Digestion des protéines sur gel

Les protéines d'intérêt ont été visualisées après SDS-PAGE sur gel d'acrylamide à 12 % par coloration au bleu de coomassie R-250, et excisées par découpage des bandes à l'aide d'une lame de rasoir à usage unique. Le morceau de gel a été fractionné, lavé avec 100 μ l d'une solution de bicarbonate d'ammonium NH_4HCO_3 à 25 mM, et agité à l'aide d'un vortex pendant 8 min. Le gel a ensuite été deshydraté par deux ajouts successifs de 100 μ l d'acétonitrile sous agitation pendant 8 min, puis séché sous vide pendant 15 min. Le gel a été recouvert avec 100 μ l d'une solution de NH_4HCO_3 25 mM et DTT 10 mM et incubé à 57°C pendant 1h. Le surnageant a ensuite été éliminé pour reprendre les deux étapes de lavage avec la solution de NH_4HCO_3 à 25 mM et d'acétonitrile trois fois, puis le séchage sous vide. L'étape de digestion des protéines contenues dans le gel s'est faite sur la nuit à 35°C en ajoutant à 1 volume de gel sec 3 volumes d'une solution de NH_4HCO_3 à 25 mM contenant 12,5 ng/ μ l de trypsine. Les fragments de gel ont enfin été centrifugés avant ajout d'un mélange contenant 70 % d'acétonitrile, 5 % d'acide formique (HCOOH) et 25 % d'eau et sonication pendant 5 min. Cette opération a été répétée deux fois pour extraire un

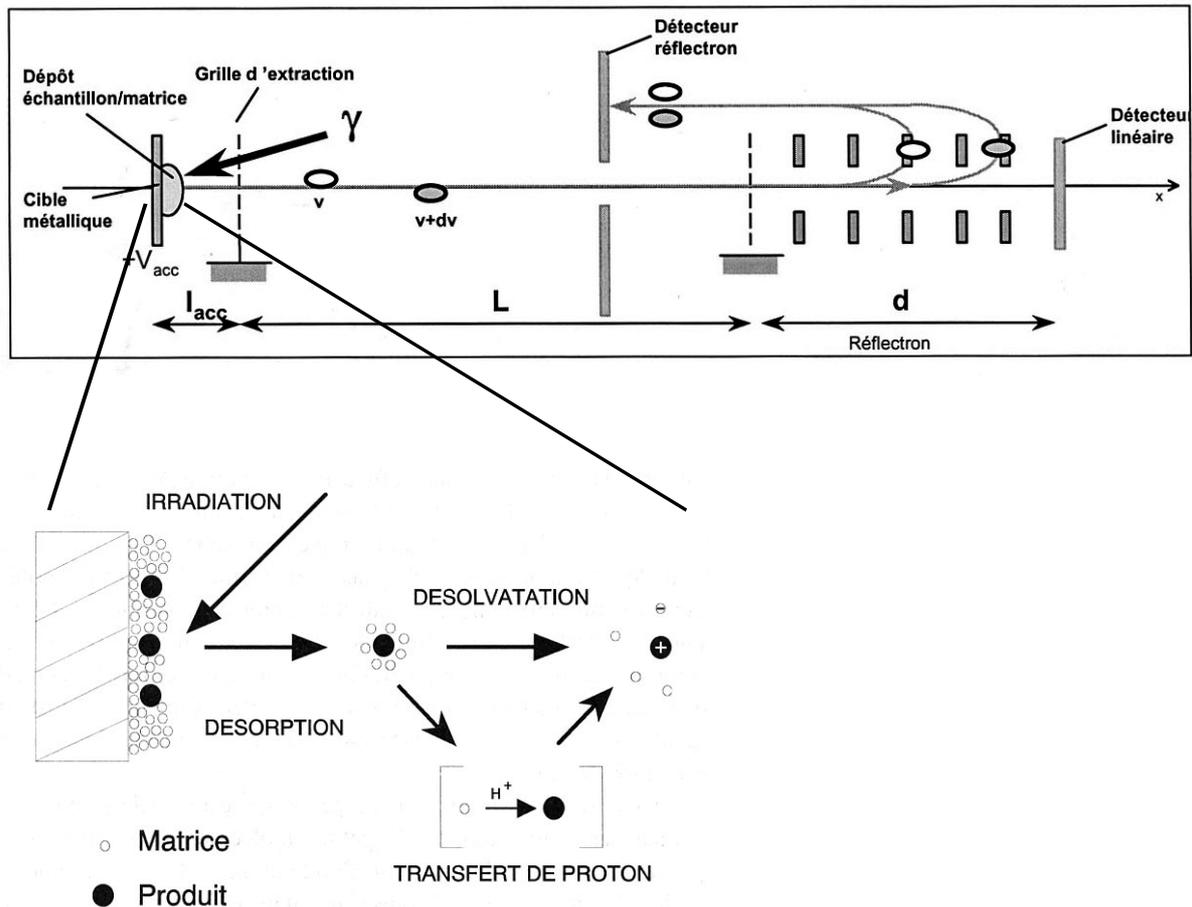


Figure 31. Schéma de fonctionnement du spectromètre de masse de type MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) couplé à un analyseur TOF (Time of Flight) en mode réflectron. Le principe d'ionisation de l'échantillon est le suivant : une irradiation au laser UV provoque l'excitation de l'échantillon et de la matrice co-cristallisés, leur passage en phase gazeuse (désolvation) et un transfert de charges positives vers les molécules d'échantillon (désorption). Les ions générés, habituellement monochargés, sont accélérés (I_{acc}) par application d'un champ électrique à haute tension (20keV) et envoyés dans un tube de vol maintenu sous vide. L'analyseur en temps de vol (TOF) sépare les ions en fonction de leur vitesse. Pour une population d'ions, la vitesse moyenne de chacun est inversement proportionnelle à la racine carrée de son rapport m/z ; ainsi les ions dont le rapport m/z est le plus petit arriveront les premiers sur le détecteur en mode linéaire (L). L'ajout d'un réflectron (d) dans le tube permet d'optimiser la méthode de focalisation des ions sans augmenter la taille de l'instrument et de mettre tous les ions de même rapport m/z sur un seul plan au niveau du détecteur. Le réflectron est constitué d'un miroir électrostatique qui impose un champ électrique opposé à la progression des ions. Les ions font donc demi-tour, et les plus énergétiques pénètrent le plus profondément dans le champ de réflectron (ovale gris), et arriveront sur le détecteur après les ions les moins énergétiques (ovale blanc).

maximum de protéines du gel. Finalement, le volume de surnageant obtenu a été réduit à 4 μ l sous flux d'azote auquel a été ajouté 1 μ l d'eau contenant 5 % d'acide formique. Des aliquots de 0,5 μ l ont été utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

2. MALDI-TOF

Les mesures de masse ont été réalisées sur un spectromètre de masse Bruker de type BIFLEX IIITM (MALDI-TOF : désorption et ionisation laser assistée par une matrice, suivie d'une analyse par temps de vol). Cet appareil réglé en mode réflectron a été utilisé à un potentiel d'accélération maximal de 19 kV (Figure 31). L'ionisation a été effectuée avec un laser à azote de longueur d'onde 337-nm avec une fréquence de tir de 3 Hz. Le signal issu du détecteur a été digitalisé à une fréquence de 2 GHz. L'échantillon a été déposé sur la cible selon la méthode du "sandwich". Une première couche de matrice en solution (acide cyano-4-hydroxycinnamique saturé dans l'acétone) a été cristallisée par projection et évaporation rapide de 0,5 μ l de matrice. Une goutte de 0,5 μ l d'une solution aqueuse d'acide formique à 5% a ensuite été déposée sur cette première couche de matrice. Puis 0,5 μ l d'échantillon ont été déposés, suivi d'un dépôt de 0,2 μ l d'une solution de matrice saturée dans un mélange à 50 % d'acétonitrile et 50 % d'eau. L'ensemble de la préparation a été séché sous vide et rincée trois fois avec une solution aqueuse d'acide formique à 5%. La calibration du spectromètre de masse a été effectuée à l'aide de standards internes comprenant quatre peptides : l'angiotensine 1046,542 Da, la substance P 1347,736 Da, la bombésine 1620,807 Da et des fragments de trypsine autolysée 842,510 Da, 2211,107 Da. L'acquisition des données brutes a été effectuée sous le logiciel XACQ, et leur traitement et la génération des spectres a été effectuée sous le logiciel XMASS.

3. Microséquençage

L'échantillon contenant les fractions protéiques purifiées par FPLC a été déposé sur une cartouche de dessalage de type ProSpin ou ProSorb (Applied Biosystems) équipée d'une membrane de PVDF (ProBlott™). Il a ensuite été centrifugé (ProSpin) et lavé à trois reprises avec de l'eau de manière à éliminer toutes traces de sel qui pourrait perturber le séquençage. L'échantillon ainsi dessalé a pu être directement microséquencé. La séquence N-terminale des protéines ayant été transférées sur une membrane de PVDF a été déterminée par la méthode de dégradation d'Edmann sur un microséquenceur (Applied Biosystems 473 A). Les protéines d'intérêt peuvent également être purifiées par HPLC. Elles sont déposées sur un filtre en fibre de verre prétraité avec un polymère (BioBrene, Applied Biosystems). Les acides aminés convertis en phénylthiohydantoïne-amino acide (PTH-aa) sont chromatographiés par HPLC sur une colonne de phase inverse Browlee PTH C₁₈ (220 mm x 2,1 mm, granulométrie 5 µm), et la détection des PTH-aa est réalisée à 269 nm.

VI. Caractérisation moléculaire

A. Dessin d'amorces pour CA et la Bande III

Les couples d'amorces testés ont été dessinés à partir des blocs de séquences conservées après alignement d'un maximum de séquences protéiques différentes disponibles dans les bases de données GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Le dessin de ces amorces a été réalisé à l'aide du logiciel Oligo 4.0, et la sélection des amorces (Tableau XII) s'est fait selon quatre critères : i) le degré de dégénérescence, dû à la

redondance du code génétique, défini inférieur à 192 dans la mesure du possible, ii) l'absence de zones de repliements internes des amorces ou de zones favorisant la formation d'hétéro- ou d'homodimères, iii) la proportion plus grande de résidus G et C dans la tête d'ancrage de l'amorce en 3' et en 5', et enfin iv) la température d'hybridation. Pour CA et la Bande III, la position théorique des amorces sur la séquence a pu être estimée par extrapolation des séquences publiées de CA d'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (n° d'accès GenBank AF140537) et de Bande III de truite *Onchorhynchus mykiss* (S24318) respectivement.

Tableau XII. Séquences des amorces sélectionnées pour amplifier par PCR un fragment correspondant à l'anhydrase carbonique ou à la Bande III à partir d'ADNc de branchie, de trophosome, de vestimentum ou de paroi du corps. N, A/C/G/T; R, A/G; Y, C/T.

Couple d'amorces	Tm(°C)	Position	Séquence nucléotidique (5' 3')
CA4A Forward	56,9	246-267	GAG CAR TTY CAY TTY CAY TGG
CA8 Reverse	54,5	450-469	CGG ART ANG TCC ART ART C
CA For	58	103-123	GTG TAA GCA AGA AGT CAA CC
CA Rev	58	825-843	TAC TGA TGA CGG CGC TG
RaceCA2b Rev	58,4	223-244	CTT TGT ATT CGT TGC CCA GTG
Anchor Rev	57	Partie 3' non traduite	CTC CTC TCC TCT CCT CTT
AE1 For	62	1188-1211	GCN GTI ATY TTY ATY TAY TTY GC
AE2 For	55	1437-1455	RYN TGG RTB GGI YTY TGG
AE3 For	60	2011-2031	CNT TYC CNG YIT GGA TGA TG
AE4 Rev	52	2241-2259	RAV CRN TTG CGN GTR TG
AE5 Rev	62	2393-2415	CCD TAC ATR RAI AAR TAD CCD AA
AE6 Rev	61	2520-2543	TAR VVI TGV AAR RAI GTR TAC TC

B. Synthèse d'ADNc, amplification par PCR, clonage et séquençage

Brièvement, les tissus de *Riftia* congelés à bord immédiatement après dissection, ont été broyés dans un mortier traité au RNase Zap (détergent éliminant les RNases) et sous azote

liquide. Environ 150 mg de poudre ont été ajoutés à 1 ml de RNable (Eurobio). L'extraction des ARN totaux a été effectuée par ajouts successifs de phénol acide, de phénol/chloroforme, et de chloroforme pur. Les ARN messagers polyadénylés ont ensuite été séparés des ARN totaux sur une colonne contenant des billes de cellulose sur lesquelles ont été fixés des oligo(dT) (mRNA Purification Kit; Amersham Pharmacia). Enfin, les ARN messagers purifiés ont été quantifiés, aliquotés et conservés à -80°C.

La synthèse des ADNc a été réalisée par transcription reverse, d'après les instructions du fabricant en utilisant la MMLV-Reverse Transcriptase (Stratagène) dans le mélange réactionnel suivant : 2 µl de tampon de réaction 5x, 1µl de BSA (5 µg/µl), 1-2 µg d'ARNm, 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl d'amorce oligo (dT)₁₈ ou ancree (cf. Tableau XI) (150 ng/µl) et 3 µl d'eau DEPC. Les ADNc obtenus ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Différentes réactions de PCR ont été réalisées en fonction de la matrice d'ADNc et des couples d'amorces testés (Tableau XI), en utilisant la Taq Polymérase de Sigma-Aldrich et l'appareil à PCR Gen Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer). Les fragments amplifiés ont été clonés dans le vecteur TOPO-PCRII, utilisé pour transformer les bactéries TOPO 10, selon les instructions du fabricant, l'ensemble étant fourni dans le kit TOPO-TA Cloning (Invitrogen). Le séquençage des clones positifs a été réalisé par séquençage cyclique sur séquenceur automatique (Vistra DNA Sequencer 725), avec le kit Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit (Amersham).

C. Criblage d'une banque d'ADNc et 5'-RACE PCR

Les ARN messagers de *vestimentum* et de *branchie* ont servi de matrice à la construction de la banque d'ADNc effectuée au laboratoire par Xavier Bailly. Les ADNc double-brin

obtenus après reverse transcription ont été fractionnés sur une colonne de Sephacryl S-400 (Pharmacia Biotech). Seuls les ADNc de taille comprise entre 500 et 2000 paires de bases ont été sélectionnés, avec une quantité initiale d'ARN messagers de 5 µg recommandée par le fabricant pour la synthèse de la banque d'ADNc orientée " ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit" (Stratagène, La Jolla, CA, USA). Le titre de la banque obtenue est de 7×10^7 pfu/ml. Le fragment cloné de CA (225 pb), obtenu par PCR avec le couple d'amorces CA4for et CA8rev (Tableau XI), a été marqué au dCTP³² radioactif et utilisé comme sonde pour cribler la banque d'ADNc.

Le principe de la RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) consiste à ajouter une séquence connue à l'extrémité 5' ou 3' des ADNc, qui servira de cible à une amorce universelle qui, couplée à une amorce spécifique interne, permettra d'amplifier les extrémités par PCR. Ici, le but était d'amplifier la partie 5' de la séquence nucléotidique d'anhydrase carbonique non obtenue par criblage de la banque d'ADNc. Le kit 5'/3' RACE (Roche Diagnostics) a été utilisé, en remplaçant l'ajout de dATPs par l'ajout de dCTP à l'extrémité 5' des ADNc grâce à l'action de la Terminal Déoxynucléotidyl-Transférase (TDT, Amersham). Deux réactions de PCR identiques ont ensuite été nécessaires pour amplifier spécifiquement un fragment de 700 pb.

Conditions de PCR : 1 µl de matrice avec queue polyC (provenant directement de 25 µl du milieu réactionnel de la TDT), 10 pmol d'amorce polyG (16), 10 pmol d'amorce CA2b Rev (Tableau VI), 2,5 µl de tampon de réaction 10x, 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de dNTP (5 mM) et 1 µl de Taq polymérase (Sigma-Aldrich). La PCR a été effectuée durant 35 cycles, 30 secondes par phase, et 55°C comme température d'hybridation. Dans la seconde réaction de PCR, 10 µl de produit de PCR ont servi de matrice.

D. Hybridation des ARN sur membrane (Northern Blot)

Les ARN messagers ont été séparés par taille sur un gel dénaturant (150 ml) : 1,5g d'agarose, 109 ml d'eau ultrapure, 25,5 ml de formaldéhyde et 15 ml de tampon MEN 10x (MOPS 200mM pH7,0, EDTA 10 mM, Acétate d'ammonium 50 mM). Puis les ARNm ont été transférés avec un tampon 20x SSC sur membrane de nylon Hybond N (Amersham) à l'aide d'un Vacuum Blotter (Appligène). La même sonde CA marquée au dCTP³² a été utilisée pour le northern blot et le criblage de banque (cf. § II.VI.C). Le protocole d'hybridation suivi est celui décrit par Church et Gilbert (1984). La révélation a été effectuée par contact des membranes avec des écrans sensibles scannés à l'aide d'un Phosphor-Fluor Imageur (STORM, Molecular Dynamics).

E. Analyse de séquences

L'ensemble des séquences utilisées pour l'identification des zones conservées entre protéines d'espèces différentes et la construction des amorces provient de la base de données de NCBI. L'identification des fragments clonés et séquencés au laboratoire a été effectuée par comparaison de séquences en utilisant le programme BLAST (NCBI, Altschul et al., 1990). Les alignements multiples de séquences ont été obtenus grâce au logiciel ClustalX (Thompson et al., 1997). Les informations sur les séquences nucléotidiques concernant les motifs en 5' et 3', les phases ouvertes de cadre de lecture, la structure 2D et 3D, ont été obtenues par traitement des séquences par des logiciels disponibles sur les sites internet de UTRScan, Infobiogen et Expasy. Enfin les analyses phylogénétiques ont été effectuées grâce au logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1989).

CHAPITRE III

ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA CONVERSION DU CO₂ ET DU

MAINTIEN DE L'EQUILIBRE IONIQUE SUR DES

BACTERIOCYTES ISOLES

**Isolated bacteriocyte cell suspensions from the hydrothermal
vent tubeworm *Riftia pachyptila*, a potent tool for cellular
physiology in a chemoautotrophic symbiosis**

Marie-Cécile DE CIAN*¹, Ann C. ANDERSEN¹, Jean-Yves TOULLEC³, Isabelle BIEGALA², Jean-Claude CAPRAIS⁵, Bruce SHILLITO⁴ and François H. LALLIER¹

¹ Equipe Ecophysiologie, UMR 7127 CNRS-UPMC and ² Equipe Phytoplancton Océanique, UMR 7127 CNRS-UPMC, Station Biologique, BP 74, F-29682 Roscoff Cedex, France

³ Laboratoire "Biogénèse des Peptides Isomères" UMR Physiologie et Physiopathologie UPMC and ⁴ Laboratoire de Biologie Marine, UMR 7622, CNRS-UPMC, 4 Place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05, France

⁵ IFREMER DRO/EP, Centre de Brest, BP 70, F-29280 Plouzané, France

Running head: Isolated bacteriocyte suspensions from *Riftia pachyptila*

*** Corresponding address:**

Marie-Cécile De Cian
Ecophysiologie, Station Biologique
Place Georges Teissier, BP 74
29682 Roscoff cedex, France
Tel: + 33 2 9829 2323
Fax: + 33 2 98 29 23 24
E-mail: decian@sb-roscoff.fr

Soumis à : Marine Biology

Summary

The hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* relies entirely on its intracellular chemoautotrophic symbionts to sustain its metabolism. Due to the internal location of the symbionts, the host must provide them with inorganic metabolites, including carbon. This study describes a tool for studying cell processes occurring in a bacteria-containing cell by the dissociation of trophosome cell types. The physiological assays performed on cell preparations focused on carbon dioxide conversion and transport processes. Trophosome tissue was mechanically dissociated resulting in cell suspensions enriched in small sized bacteriocytes, which were viable for several hours. In addition, medium-term cell cultures were also attempted. As a start to the understanding of CO₂ related metabolism of these cells, we were interested in evidence of carbonic anhydrase isoforms, ATPases and chloride exchangers. Variation in intracellular and extracellular pH, and in intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride were followed after addition of selective inhibitors. The data presented here suggest the occurrence of potential cytosolic and membrane-associated carbonic anhydrase isoforms in the bacteriocytes, proton-driven sodium-ATPases and a well-represented anion transporter exchanging intracellular chloride against extracellular anion.

CHAPITRE IV

LOCALISATION TISSULAIRE DE

L'ANHYDRASE CARBONIQUE CYTOSOLIQUE ET DES

TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES ASSOCIÉS

**Expression and localization of carbonic anhydrase and ATPases in the
symbiotic tubeworm *Riftia pachyptila***

Marie-Cécile DE CIAN*, Ann C. ANDERSEN, Xavier BAILLY and François H. LALLIER

Equipe Ecophysiologie, CNRS-UPMC UMR 7127 CEOBM, Station Biologique, BP 74, F-
29682 Roscoff Cedex, France

Running head: Carbonic anhydrase and ATPases in *Riftia pachyptila*

Key words: Vestimentifera, carbonic anhydrase, V-H⁺ATPase, Na⁺K⁺-ATPase,
immunolocalization, in-situ hybridization.

* Corresponding address:

Marie-Cécile De Cian
Ecophysiologie, Station Biologique
Place Georges Teissier, BP 74
29682 Roscoff cedex, France
tel: + 33 2 9829 2323
fax: + 33 2 9829 2324
e-mail: decian@sb-roscoff.fr

Soumis à : Journal of Experimental Biology

Abstract

The symbiotic tubeworm *Riftia pachyptila* needs to fuel its chemoautotrophic symbiotic bacteria with inorganic carbon. CO₂ is transported from the surrounding water to the bacteriocytes located in the trophosome, through the branchial plume and the body fluids. Previous studies have demonstrated the implication of carbonic anhydrase (CA) and proton pumps (ATPases) at various steps of CO₂ transport. The present study describes the expression pattern of cytosolic CA using an RNA probe and its histochemical and immunocytochemical localization in the trophosome and branchial plume of *Riftia*. Immunolocalization of V-H⁺-ATPase and Na⁺K⁺-ATPase were also investigated and related to CA localization. In the branchial plume, CA is expressed and localized in the most apical region of the branchial epithelium close to the surrounding water. V-H⁺-ATPase is mostly co-localized with CA and both enzymes probably allow CO₂ entry against the concentration gradient while regulating intracellular pH. Na⁺K⁺-ATPase is mostly restricted to the basal part of epithelial cells and likely participates in CO₂ transport to the body fluids. In the trophosome lobules, cytosolic CA is expressed and found in bacteriocytes and peritoneal cells. Hypotheses on its role in bicarbonate and CO₂ interconversion to fuel the symbiotic bacteria is discussed.

CHAPITRE V

CARACTERISATION DE LA OU DES

ISOFORMES D'ANHYDRASE(S) CARBONIQUE(S)

PRESENTES CHEZ *Riftia pachyptila*

**Molecular and biochemical characteristics of carbonic anhydrases
from *Riftia pachyptila*, a symbiotic invertebrate from deep-sea
hydrothermal vents**

Marie-Cécile DE CIAN*¹, Xavier BAILLY¹, Julia MORALES², Alain VAN
DORSSELAER³ and François H. LALLIER¹

¹ Equipe Ecophysiologie, ² Equipe Cycle Cellulaire et Développement, CNRS-UPMC
UMR 7127 CEOBM, Station Biologique, BP 74, F-29682 Roscoff Cedex, France

³ Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, CNRS-ULP UMR 7509, ECPM,
25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex, France

Keywords: symbiosis, carbonic anhydrase, cDNA sequence, phylogenetic analysis,
MALDI-TOF, cytosolic and membrane-bound isoforms.

Running head : Carbonic anhydrase in *Riftia pachyptila*

*** Corresponding address:**

Marie-Cécile De Cian
Ecophysiologie, Station Biologique
Place Georges Teissier, BP 74
29682 Roscoff cedex, France
tel : + 33 2 98 29 23 23
fax : + 33 2 98 29 23 24
e-mail : decian@sb-roscoff.fr

Soumis à : Proteins

Abstract

The symbiotic hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* needs to supply its internal bacterial symbionts with carbon dioxide, their inorganic carbon source. The aim of this study was to characterize the carbonic anhydrase (CA) involved in CO₂ transport and conversion at various steps in the plume and the symbiotic tissue, the trophosome. A complete 1209 pb cDNA has been sequenced from the trophosome and identified as a putative α -CA based on BLAST analysis and the similarities of total deduced amino-acid sequence with those from GenBank database. In the plume, the putative CA sequence obtained from cDNA library screening was 90 % identical to the trophosome CA, except in the first 77 nucleotides downstream the initiation site identified on trophosome CA. A phylogenetic analysis showed that the annelidan *Riftia* CA (CARp) emerges clustered with invertebrate CAs, the arthropodan *Drosophila* CA and the cnidarian *Anthopleura* CA. This invertebrate cluster appeared as a sister group of the cluster comprising mitochondrial and cytosolic isoforms in vertebrates: CAV, CAI II and III, and CAVII. However, amino-acid sequence alignment showed that *Riftia* CA was closer to cytosolic CA than to mitochondrial CA. Combined biochemical approaches revealed two cytosolic CA with different molecular weights and pIs in the plume and the trophosome respectively, and the occurrence of a membrane-bound CA isoform in addition of the cytosolic one in the trophosome. The physiological roles of cytosolic CA in both tissues and supplementary membrane-bound CA isoform in the trophosome in the optimization of CO₂ transport and conversion are discussed herein.

CHAPITRE VI

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VI

Discussion, conclusions et perspectives

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles données sur le métabolisme du carbone chez le vestimentifère symbiotique des sources hydrothermales, *Riftia pachytila*. Nos travaux ont permis de mieux caractériser sur un plan moléculaire, biochimique et histologique, une enzyme-clé du transport et de la conversion du carbone, l'anhydrase carbonique. Ils ont également permis de mettre en évidence et de localiser différents types de transporteurs ioniques potentiellement associés au transport du carbone et liés au métabolisme particulier de la symbiose. Le choix des transporteurs présentés dans cette thèse a été fait par rapport à leur implication forte dans le maintien d'un équilibre dynamique cellulaire, et à leur niveau d'interaction avec l'anhydrase carbonique. Nos recherches ont été concentrées sur deux compartiments corporels, le panache branchial et le trophosome, apparus comme primordiaux dans le processus d'acheminement du CO₂ de l'environnement extérieur vers les bactéries symbiotiques d'après les travaux initiés en collaboration avec l'équipe de Jim Childress. Enfin, plusieurs techniques ont été mises au point au cours de cette thèse, l'approche cellulaire et l'hybridation *in situ* en particulier, qui bien que très spécifiques au modèle biologique *Riftia*, pourront être utilisées dans le cadre de thématiques scientifiques multiples dont certaines seront évoquées au cours de ce chapitre.

Caractérisation des anhydrases carboniques

La caractérisation moléculaire d'une anhydrase carbonique (CA) à partir du trophosome (Chapitre V) nous a permis de décrire cette protéine comme appartenant aux α -CA, communément retrouvée chez les animaux. Chez les vertébrés, la classe des α -CA est une famille multigénique, dont les produits protéiques se différencient les uns des autres par leur localisation cellulaire (cytosolique, mitochondriale, membranaire ou sécrétée). La CA du trophosome de *Riftia* est cytosolique. D'un point de vue structural, elle est proche des CA de deux invertébrés, l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima*, et la drosophile. Une séquence à 90 % identique à la CA du trophosome a également été mise en évidence dans le panache branchial, mais la séquence de la partie N-terminale reste incomplète, puisque le résidu méthionine initiateur n'a pas été retrouvé, suggérant que les clones obtenus sont tronqués. De plus, les 15 premiers acides aminés déduits de la séquence nucléotidique de la CA branchiale sont différents de ceux obtenus à partir de la séquence de la CA du trophosome. L'hypothèse de l'existence de deux isoformes de CA cytoplasmiques tissu-spécifiques est peu probable, les deux séquences nucléotidiques étant identiques à 100 % en dehors de cette région N-terminale. Néanmoins, des arguments d'ordre biochimique et physiologique tendent à maintenir cette hypothèse tant que l'indétermination n'est pas levée par un microséquençage de la protéine en N-terminal, actuellement en cours, ou une nouvelle série d'amplifications de la partie 5' par RACE PCR sur le cDNA branchial. En effet, les deux protéines correspondant aux séquences nucléotidiques décrites (Chapitre V) présentent des poids moléculaires, mais également des points isoélectriques, différents selon le tissu considéré (Chapitre V), et les travaux de Kochevar et al. (1993) révèlent différentes propriétés catalytiques pour les CA des deux

tissus, la CA branchiale présentant un K_M et une V_{max} plus faible que la CA du trophosome.

En dehors de la caractérisation d'une ou deux (?) CA cytoplasmiques chez *Riftia*, nous avons également recherché l'existence d'une CA associée aux membranes cellulaires. Seul le premier pan de cette étude a été effectué au cours de cette thèse, focalisé sur la mise en évidence d'une CA membranaire par western blots. Un anticorps polyclonal anti-CA IV de rat a été utilisé, et n'a réagi qu'avec les extraits protéiques membranaires du trophosome. Nous avons cherché à préciser la nature des protéines immunoréactives à cet anticorps chez *Riftia*, après séparation sur gel d'électrophorèse uni- et bidimensionnelles, et par test d'activité enzymatique après purification partielle (Chapitre V). Trois protéines de poids moléculaire 50, 42 et 39 kDa et avec un point isoélectrique respectif de 5,4, 5,1 et 5,1 ont été révélées par immunoblot, dans la fraction des protéines membranaires du trophosome uniquement. Une activité CA a pu leur être attribuée après fractionnement de l'extrait protéique total par filtration sur colonne de gel Sephadex.

La révélation de trois bandes dans l'extrait des protéines membranaires du trophosome peut paraître surprenante. Cependant, chez les vertébrés, l'isoforme de CA associée à la membrane présente des poids moléculaires variables, dépendants du nombre de résidus glycosylés, l'une des modifications post-traductionnelles les plus importantes pour l'activité enzymatique de cette protéine étant l'étape de glycosylation (Sly et Peiyi, 1995; Wistrand et al., 1999; Zhu et Sly, 1990). Ainsi, on trouve des CAs membranaires de type CA-IV avec des poids moléculaires variant par exemple de 52 à 36 kDa chez le rat (Waheed et al., 1992), ou de 46 et 30 kDa chez la souris (Brion et al., 1994). Cette gamme de poids moléculaire, ainsi que les points isoélectriques théoriques des CA-IV de vertébrés correspondent aux caractéristiques biochimiques trouvées chez *Riftia*. Pour vérifier

l'hypothèse d'une glycosylation de la CA membranaire chez *Riftia*, il serait intéressant dans un premier temps de prolonger le temps de solubilisation des protéines membranaires dans le triton X-100 pour étudier l'évolution des proportions relatives des formes à 50, 42 et 39 kDa en western blot. Le couplage d'un traitement de ces protéines par la Peptide-N-Glycosidase F (Karhumaa et al., 2001; Schwartz et al., 1999) avec une analyse en spectrométrie de masse permettrait également de quantifier le nombre de sites de glycosylation présents.

De manière plus générale, divers types de tests d'inhibition permettent également de discriminer les différentes isoformes de CA chez les mammifères et pourraient être appliquées aux CA purifiées à partir du trophosome et de la branchie de *Riftia*. Ainsi, les travaux réalisés par le groupe de Brion (1994, 1997) ont permis de discriminer l'isoforme CA-IV des autres isoformes par sa résistance au sodium-docécylo-sulfate (SDS). L'activité de CA-IV est en effet inhibée par l'acétazolamide, partiellement par l'iodure de sodium (NaI), mais insensible au SDS. Les isoformes cytoplasmiques CA-I, II et III ont, quant à elles, des sensibilités différentes à ces trois inhibiteurs : toutes sont inhibées par le SDS, mais alors que l'isoforme CA-I sera complètement inhibée en présence de 10 mM de NaI, l'isoforme CA-II ne le sera qu'à 40 % et l'isoforme CA-III qu'à 15 %.

Une approche alternative aux tests d'inhibition a été testée au cours de cette thèse, reposant sur l'obtention de séquences peptidiques des CA membranaires potentielles par spectrométrie de masse, mais aucun signal majoritaire n'a pu être détecté du fait d'un trop grand nombre de protéines présentes dans les échantillons. Différents protocoles d'immunoprécipitation des isoformes de CA avec leurs anticorps respectifs ont donc été testés. Le protocole ayant donné le meilleur rendement est détaillé dans le chapitre II, mais ce rendement s'est tout de même avéré trop faible pour purifier efficacement les protéines.

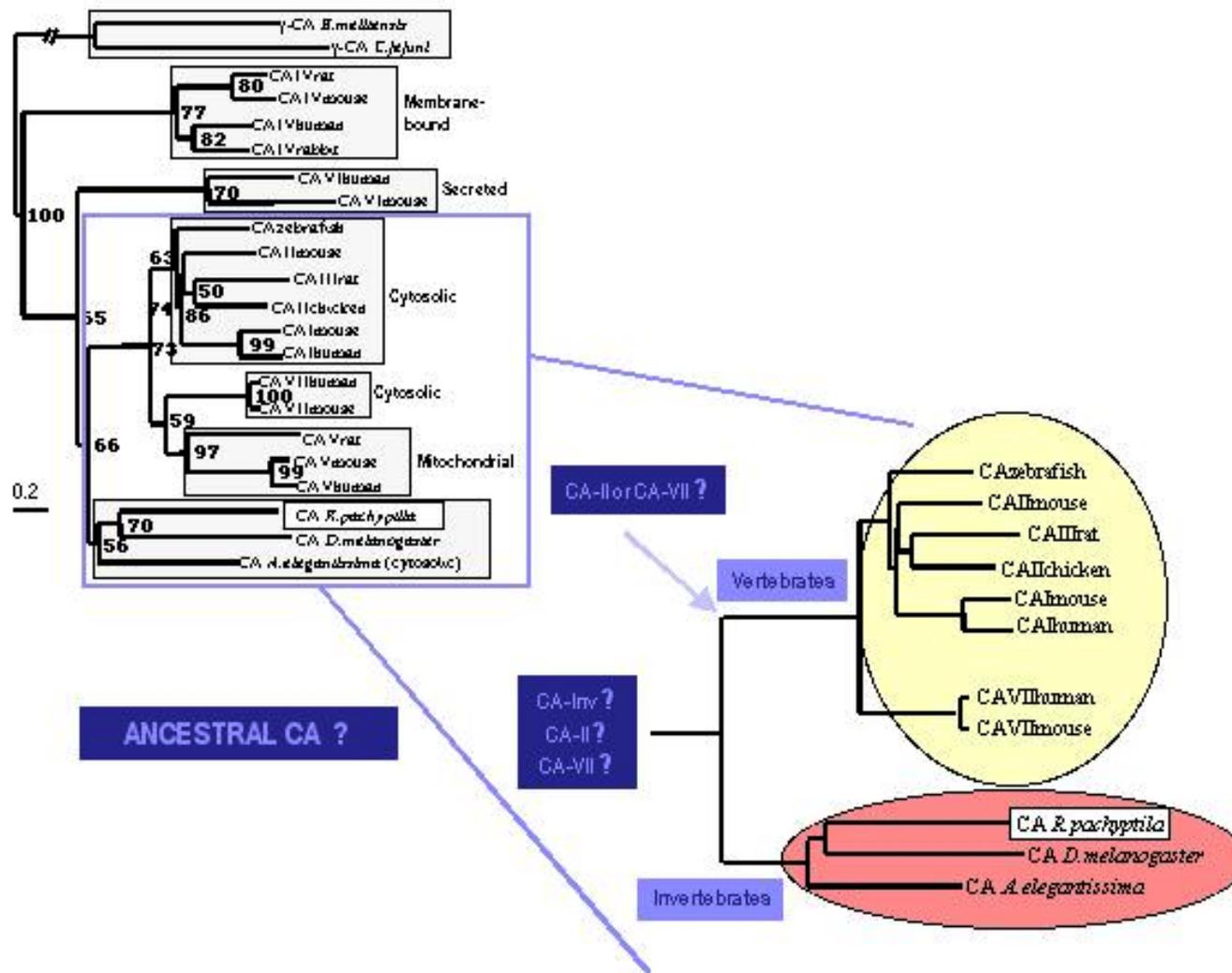
L'identification formelle de cette protéine comme étant une anhydrase carbonique membranaire apparentée aux isoformes IV, IX, XII ou XIV des vertébrés constituerait une donnée importante dans l'étude de la phylogénie moléculaire de ces protéines. En effet, l'existence d'une isoforme d'anhydrase carbonique membranaire n'a pour l'instant été mise en évidence que chez les vertébrés. Sa caractérisation chez un invertébré remettrait en question l'origine de cette isoforme, pour l'instant associée à l'émergence des mammifères, et démontrerait la pré-existence d'une famille multigénique réelle de CA chez les invertébrés.

Différents gènes, dont la séquence correspondrait à des gènes codant différentes CA potentielles ont déjà été identifiés chez deux invertébrés modèles, le nématode *Caenorhabditis elegans* et l'arthropode *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000; Reboul et al., 2001), mais ces données reposent uniquement sur des homologies de séquences criblées à partir du génome complet, et n'ont pas fait l'objet d'une étude sur l'existence du transcrit et la fonctionnalité de la protéine correspondante. Certaines séquences décrites en particulier chez *C. elegans* révèlent de très fortes similitudes avec des séquences correspondant à des isoformes sans activité connue d'hydratation du CO₂ chez les vertébrés. Ces premières données sont pourtant très informatives puisqu'elles confortent l'idée que rechercher différentes isoformes de CA exprimées au sein d'un organisme invertébré ne relève pas d'une hypothèse absurde. Ceci est d'ailleurs renforcé par la mise en évidence de CA membranaire par des approches physiologiques et pharmacologiques chez des organismes aussi variés que les crustacés (Henry, 1987), les échinodermes (Chen et Lawrence, 1986) ou les bivalves (Boer et Witteveen, 1980). Mais ces études préliminaires n'ont pas abouti pour l'instant à une caractérisation complète de ces protéines.

Historiquement, les anhydrases carboniques ont tout d'abord été caractérisées chez les animaux comme appartenant toutes à une même famille multigénique, celle des α -CA. Puis des séquences d'ADNc de protéines à activité CA trouvées dans les chloroplastes de plantes, ne présentant aucune homologie avec les séquences d' α -CA, ont été classées dans le groupe des β -CA. Parallèlement, une β -CA a été mise en évidence dans l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Fukuzawa et al., 2000), et une β -CA chez *Escherichia coli* (Guilloton et al., 1992). Enfin, une troisième classe de CA a pu être identifiée, les γ -CA, présentes chez des Archae et certaines cyanobactéries (Kisker et al., 1996).

Le cas des anhydrases carboniques représente donc un modèle d'évolution moléculaire particulièrement intéressant pour l'étude des phénomènes de convergence fonctionnelle, ces trois grandes familles de gènes étant complètement indépendantes les unes des autres. De plus, la recherche récente des gènes de CA chez tous les organismes dont on dispose du génome complet, ou par approche EST, a révélé la co-existence surprenante de séquences d' α -, β - et γ -CA chez *Arabidopsis thaliana*, et de séquences de α - et β -CA chez *E. coli* et *Synechococcus* (Hewett-Emmett et Tashian, 1996). Ces nouvelles données remettent en question le postulat énoncé en début de paragraphe, selon lequel les α -CAs seraient propres au règne animal, et que les β - et γ -CA constituerait une famille de gènes éloignés du groupe des α -CA, et spécifiques des règnes végétal et bactérien respectivement. Ceci étant, cette hypothèse repose uniquement sur des comparaisons de séquences génomiques ou issues de banques EST, sans aucune indication sur la réelle existence i) des transcrits et ii) des protéines correspondantes ayant une activité d'hydratation du CO₂ avérée dans les organismes étudiés.

Dans ce contexte, l'étude des anhydrases carboniques et la mise en évidence sur un plan fonctionnel de l'existence d'une famille multigénique réelle chez *Riftia pachyptila* en



particulier, et chez les invertébrés en général s'avère très intéressante. Les invertébrés représentent en effet un ensemble important d'un point de vue évolutif par le nombre et la diversité des taxons qu'ils représentent. Les CAs d'invertébrés pourraient être intermédiaires entre les CAs de plantes ou de bactéries et les CAs de vertébrés, seuls êtres vivants supposés jusqu'alors disposer de plusieurs isoformes de CA fonctionnelles, tissu- ou cellule-spécifiques. Montgomery et al. (1991) et Hewett-Emmett et Tashian (1996) ont reposé le problème de l'identité de la CA ancestrale à partir de laquelle ont émergé toutes les isoformes actuelles chez les vertébrés : est-ce une isoforme de type CA-II ou CA-VII ?

Les données apportées par nos travaux (Chapitre V) permettent de compléter le maigre jeu de données disponibles sur l'identification des séquences de CA exprimées chez les invertébrés et pourraient contribuer à l'identification de la CA ancestrale (Figure 32). Jusqu'à présent, les seules séquences disponibles chez les invertébrés et pour lesquelles l'existence de la protéine ait été démontrée sont des séquences d' -CA cytosoliques. Mais elles se regroupent entre séquences d'invertébrés et ne se groupent avec aucune isoforme actuelle des -CA de vertébrés. Ces séquences correspondent-elles à des séquences propres aux invertébrés (CA-Inv), ou sont-elles orthologues des isoformes CA-II ou CA-VII (Figure 32) ? L'analyse par BLAST de la séquence de *Riftia* et de celle d'anémone révèle une homologie plus forte avec les isoformes de type CA-II. Mais il faudrait augmenter la quantité de séquences disponibles pour affiner cette analyse. D'autre part, la question de la forme ancestrale de CA correspondant aux isoformes actuelles connues ne s'est posée qu'au sein du groupe des vertébrés. Si l'on parvenait à faire la démonstration de

Figure 32. Arbre phylogénétique non raciné obtenu à partir de l'alignement de 21 séquences de CA compilées à l'aide du logiciel PHYLIP, et utilisé dans le Chapitre V. Hypothèses sur les relations phylogénétiques des isoformes de CA entre les vertébrés et les invertébrés pouvant être formulées à partir de cet arbre.

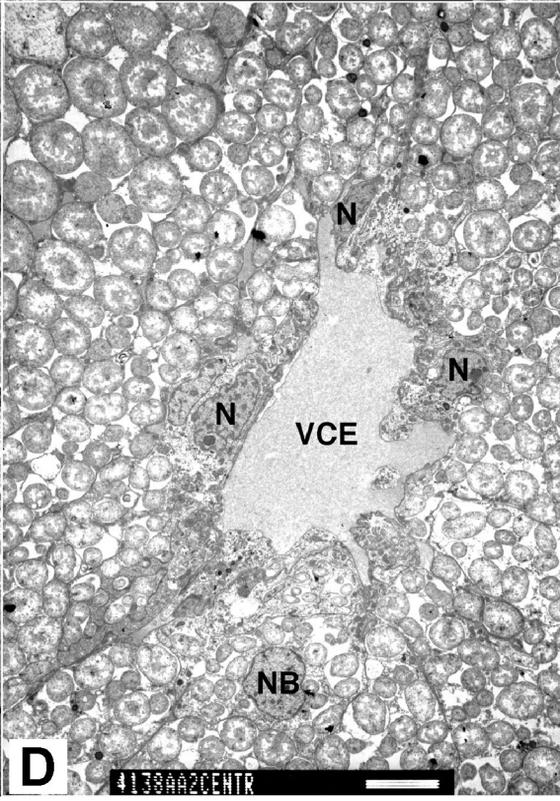
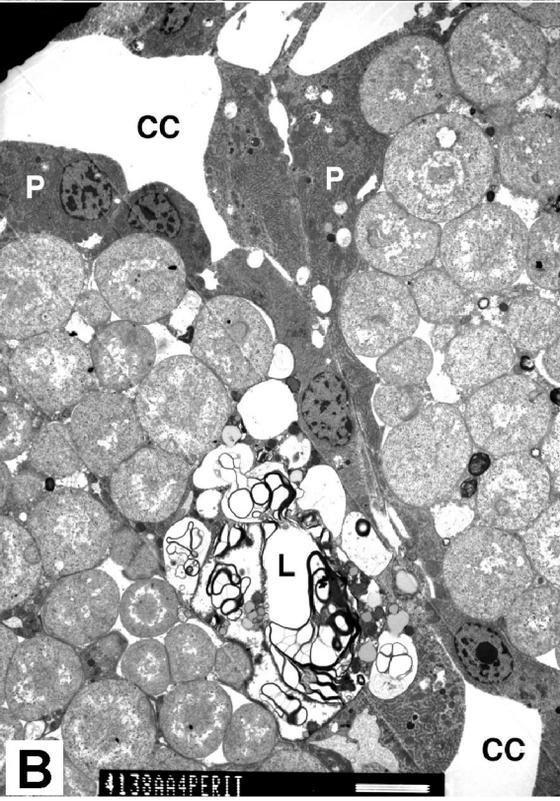
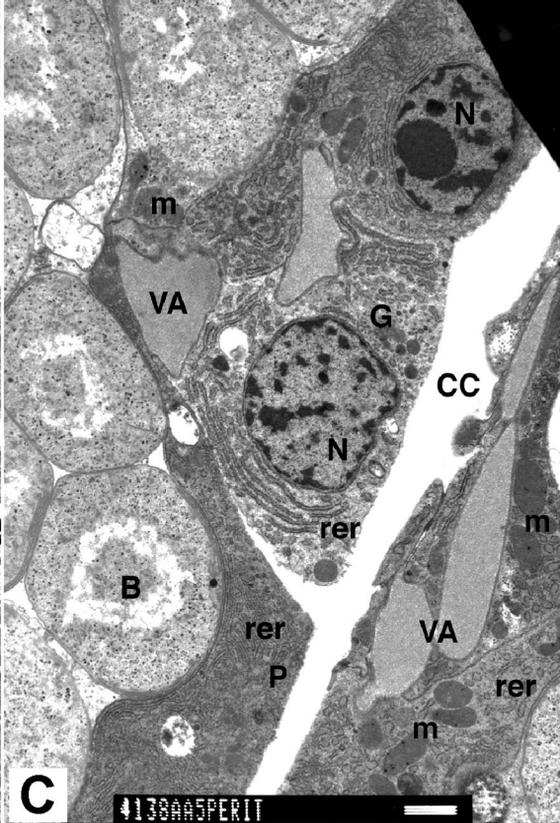
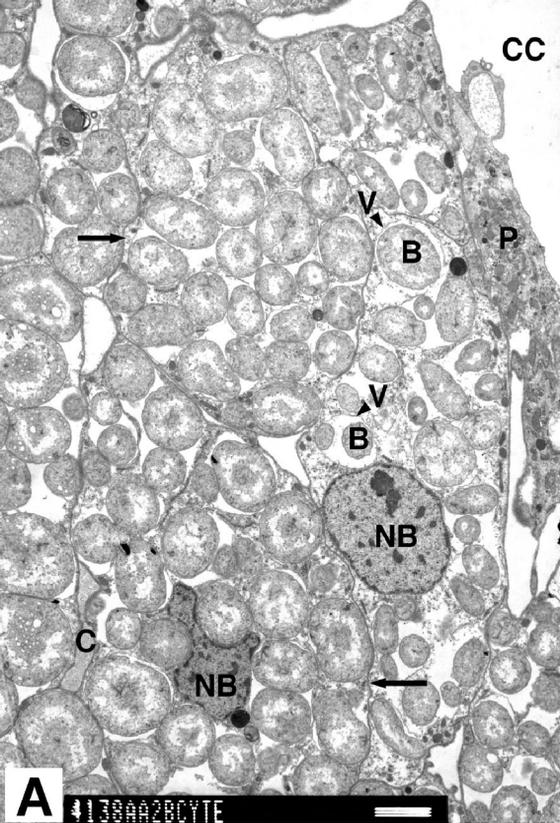
l'existence d'autres isoformes au sein d'un même organisme invertébré, en particulier celle d'une isoforme associée à la membrane comme suggéré sur un plan biochimique par nos travaux, la question de l'émergence de la famille multigénique des -CA serait à reposer en faisant intervenir des organismes mieux distribués sur le plan phylogénétique.

Caractérisation des échanges membranaires au niveau des bactériocytes

Nos travaux se sont focalisés plus particulièrement sur les échanges ioniques membranaires liés à l'activité bactérienne d'incorporation du CO₂, au niveau des lobules du trophosome et des bactériocytes. L'implication de CA dans la régulation du pH intracellulaire et dans l'équilibre ionique de la cellule est donc très forte et suppose l'activation de transporteurs ioniques contrebalançant son action.

Les différents résultats donnés par l'immunolocalisation (Chapitre IV), les westerns blots (Chapitres III et IV) et les tests pharmacologiques sur bactériocytes isolés (Chapitre III), nous ont permis de mettre en évidence les différents acteurs cellulaires impliqués dans le transport et la conversion du CO₂ au niveau des bactériocytes.

Mais avant de pouvoir formuler de nouvelles hypothèses sur la physiologie du trophosome, nous avons cherché à mieux comprendre l'organisation ultrastructurale des différents types cellulaires qui le composent. Nous avons donc analysé les particularités structurales pouvant être impliquées dans ces échanges membranaires dans un premier temps, et caractérisé certains échangeurs ioniques par immunohistocalisation et utilisation de bactériocytes isolés dans un deuxième temps. Les premiers travaux sur la localisation cellulaire des échangeurs ioniques par immunogold sur des coupes ultrafines



de trophosome ont également été initiés au cours de cette thèse, mais devront être poursuivies en améliorant la technique de fixation des tissus à bord, permettant de préserver une meilleure antigénicité du tissu. Les clichés de la figure 33 illustrent la structure des différents types cellulaires qui composent un lobule et les interactions possibles. Sur le cliché 33A, les délimitations cellulaires entre bactériocytes sont bien visibles, ainsi que les membranes vacuolaires entourant les bactéries. La zone de jonction inter-lobules est particulièrement riche en vaisseaux sanguins afférents (Cliché 33B,C) chargés d'oxygène et d'ions HS^- , NO_3^- et HCO_3^- . On remarquera la très forte activité métabolique des cellules péritonéales bordant les lobules, indiquée par un réticulum endoplasmique rugueux très développé et la présence de nombreuses mitochondries dans le cytoplasme. Dans les bactériocytes, les vacuoles bactériennes représentent environ 95 à 98 % du volume cytoplasmique, le peu d'espace restant étant occupé par les mitochondries

Figure 33. Ultrastructure du trophosome de *Riftia*. (Coupes et photos Ann Andersen). **A.** Vue générale, à l'intérieur de la cavité coelomique (CC), des lobules périphériques du trophosome, bordés de cellules péritonéales (P). Les flèches montrent les membranes plasmiques des bactériocytes, cellules de 15-20 μm de long et de moins d'une dizaine de μm de large, avec un noyau (NB). Les bactéries (B), par une ou plusieurs, sont contenues dans des vacuoles, dont on voit les membranes (tête de flèche, marquée V). Un capillaire (C) traverse le lobule. Echelle 2 μm . **B.** Les cellules péritonéales (P), bordant deux lobules, se touchent au sein de la cavité coelomique (CC). Les bactéries âgées les plus périphériques s'autodétruisent en formant des corps myéliniques, au niveau de plages de lyse (L). Echelle 5 μm . **C.** Détail du cytoplasme des cellules péritonéales montrant l'extension très importante du réticulum endoplasmique rugueux (rer), attestant d'une intense activité sécrétrice. Une zone golgienne (G) est observable près d'un noyau (N). Les mitochondries (m) sont nombreuses, à la fois dans les cellules péritonéales et dans les bactériocytes, autour des vacuoles bactériennes (B). Les vaisseaux sanguins afférents (VA), limités seulement par une fine lame vasculaire collagénique, s'insinuent entre les cellules péritonéales. Echelle 1 μm . **D.** Vue du centre d'un lobule trophosomal avec le vaisseau central efférent (VCE), bordé d'une couche de cellules non symbiotiques, dont on voit les noyaux (N). NB indique le noyau d'un jeune bactériocyte. Echelle 5 μm .

(Cliché 33A,D). La distance entre les liquides circulants et les bactéries apparaît donc très faible (une dizaine de μm au plus), renforçant l'idée qu'une modification des conditions de pH ou de l'équilibre ionique à la périphérie du bactériocyte pourrait permettre d'expliquer nombre des échanges métaboliques effectués dans ce tissu. Ces modifications sont-elles d'ordre exclusivement chimique ou sont-elles catalysées par des transporteurs et des enzymes, associés à la membrane des bactériocytes ? Quelle est la localisation précise de isoforme membranaire de CA dans les bactériocytes par rapport aux liquides circulants ? Enfin, comment s'organisent les échanges intercellulaires au sein d'un lobule et quels sont les transporteurs les plus impliqués dans le maintien de l'équilibre dynamique cellulaire ? Ces données révèlent l'intérêt d'une localisation à l'échelle ultrastructurale de transporteurs de type pompe H^+ -ATPase, Na^+ - K^+ -ATPase, ou encore d'échangeurs anioniques (*i.e.* cotransporteur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), en parallèle d'une mise en évidence par l'approche cellulaire, cette dernière étant celle qui a été privilégiée au cours de cette thèse.

Les bicarbonates (HCO_3^-) sont majoritairement présents à des concentrations de l'ordre de 20 à 30 mM dans le liquide coelomique et le sang vasculaire qui irriguent largement les lobules. Le métabolisme sulfo-oxydant des bactéries produit par ailleurs

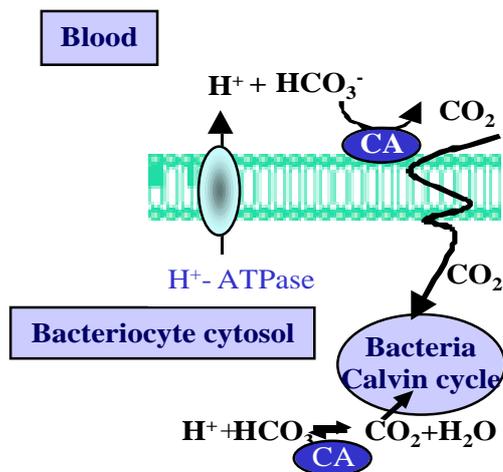


Figure 34. Schéma hypothétique des mécanismes cellulaires activés dans les membranes des bactériocytes de *Riftia pachyptila*. Echanges relatifs au transport de carbone étant possibles en conditions physiologiques.

d'importantes quantités de protons qui sont vraisemblablement excrétés par des transporteurs de type H^+ -ATPase, K^+/H^+ -ATPase ou des antiports Na^+/H^+ . Enfin, les ions bicarbonates doivent être convertis en CO_2 moléculaire, avec une grande efficacité, pour pouvoir être assimilés par la bactérie symbiotique de *Riftia* (Figure 34).

L'incubation de bactériocytes isolés en présence de deux inhibiteurs spécifiques de l'anhydrase carbonique : i) l'acétazolamide (AZ), inhibiteur très perméant aux membranes plasmiques et donc susceptible d'inhiber l'ensemble des isoformes présentes, qu'elles soient cytosoliques, membranaires ou mitochondriales (Figure 35A), et ii) le benzolamide (BZ), inhibiteur beaucoup moins perméant, nous ont permis de mettre en évidence une isoforme d'anhydrase carbonique associée à la membrane externe du bactériocyte (Figure 35B). En effet, AZ a induit une acidification du pH extracellulaire et un déséquilibre du pH intracellulaire. BZ n'a, quant à lui, pas eu d'effet significatif sur le pH intracellulaire, mais a également induit une acidification du pH extracellulaire, suggérant l'existence d'une CA associée à la membrane externe des bactériocytes. Cette enzyme pourrait catalyser la

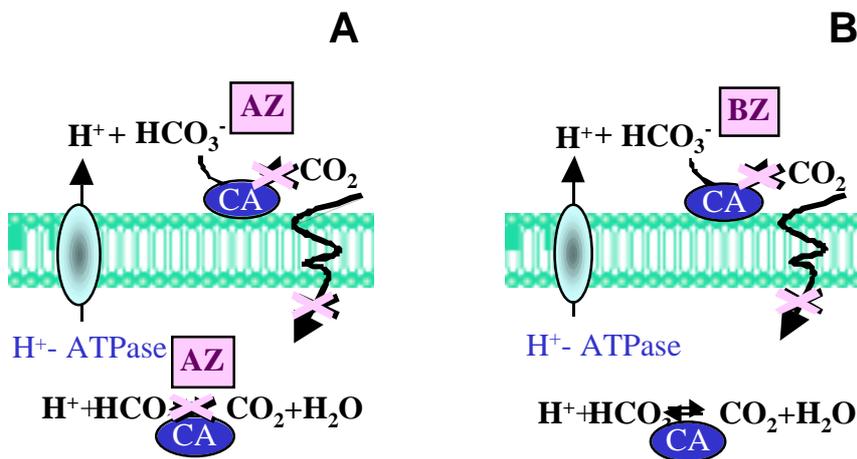


Figure 35 A-B. Mécanisme d'action des inhibiteurs spécifiques de CA sur le pH extra- et intracellulaire (AZ) et sur le pH extracellulaire uniquement (BZ).

conversion rapide des ions bicarbonates et des protons présents à la surface immédiate des cellules en CO₂ moléculaire, permettant sa diffusion rapide au travers de la membrane et son incorporation dans le cycle de Calvin de la bactérie. L'anhydrase carbonique membranaire de type CA-IV joue en effet le même rôle, mais dans le sens inverse au niveau des membranes pulmonaires des mammifères, facilitant le recyclage du bicarbonate sanguin en CO₂ qui est éliminé par diffusion au travers des alvéoles pulmonaires (Sly et Peiyi, 1995; Wu et al., 1998).

L'interaction de la CA associée à la membrane plasmique avec des transporteurs ioniques impliqués dans les échanges chlorures-bicarbonates a par ailleurs été proposée au niveau du globule rouge humain par (Wistrand et al., 1999). Les expériences effectuées avant et au cours de la thèse n'ont pas permis de mettre en évidence l'existence supposée d'un échangeur anionique chlorures-bicarbonates de type Bande III chez *Riftia*, pourtant bien connu chez les vertébrés et évoqué chez les crustacés (Lucu, 1989; Sheltar et Towle, 1989). Aucune modification des concentrations intracellulaires de chlorures ou du pH intracellulaire n'a pu être mise en évidence par l'approche pharmacologique sur les suspensions de bactériocytes isolés (Chapitre III) en présence de DIDS ou de SITS, deux inhibiteurs spécifiques de la Bande III. Différentes amorces dégénérées ont par ailleurs été conçues à partir de séquences consensus de Bande III de mammifères (chapitre II) et testées sur de l'ADNc de branchie et de trophosome, sans qu'aucun fragment cloné ne corresponde à une séquence de Bande III. Enfin, une approche par immunolocalisation de la protéine sur coupes histologiques avait précédemment été tentée au sein de l'équipe par Ann Andersen, mais n'avait pas permis de détecter la présence d'une Bande III chez *Riftia pachyptila*.

L'utilisation du NPPB sur les mêmes suspensions cellulaires de bactériocytes a, quant à elle, permis de mettre en évidence un transporteur échangeant des ions chlorures intracellulaires contre des cations ou anions extracellulaires. Peu d'expériences complémentaires ont pu être effectuées au cours de cette thèse sur l'exploration des canaux anioniques chez *Riftia*, mais les premières immunolocalisations d'un cotransporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, par western blots, sur des extraits protéiques totaux de branchie et de trophosome ont donné des résultats intéressants qui mériteraient d'être approfondis. L'existence d'un cotransporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ couplé à un canal potassique a en effet été démontrée chez les crustacés par Ahearn et al. (1999) et Riestenpatt et al. (1996).

Une hypothèse alternative peut être proposée à l'issue de cette série d'expériences : un transporteur pourrait permettre l'échange des ions sodium et bicarbonates extracellulaires contre des protons et des ions chlorures intracellulaires (Figure 36). Un tel transporteur a en effet déjà été mis en évidence chez les invertébrés et ses caractéristiques correspondent à celles mises en évidence dans les bactériocytes de *Riftia* au cours de nos travaux. Ce transporteur est en effet sensible au NPPB, dépendant du pH et de la concentration en sodium extracellulaire, et pourrait participer à hauteur de 50 % à l'excrétion de protons (Taylor et al., 1991; Thomas, 1989). Chez *Riftia*, compte-tenu du contexte symbiotique et

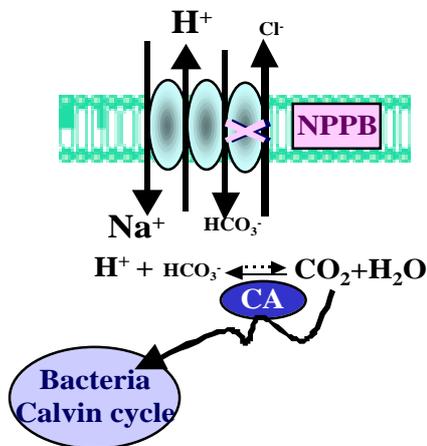


Figure 36. Cible potentielle du NPPB présente à la surface des bactériocytes, et influence possible sur l'orientation de la réaction catalysée par l'anhydrase carbonique (CA).

des besoins métaboliques des bactéries, un tel transporteur pourrait échanger différentes espèces anioniques avec les ions bicarbonates comme les nitrates, les sulfures ou les sulfates. La mise au point d'expériences utilisant des isotopes stables ou radioactifs comme traceurs pourrait se révéler très intéressante pour l'étude du métabolisme et de la nature des échanges ioniques entre les bactériocytes et le milieu extracellulaire.

La production de protons en quantité massive par le métabolisme de la bactérie et par l'activité CA est un facteur physiologique auquel le bactériocyte doit faire face en permanence. Les échanges sodiques au travers des membranes cellulaires sont généralement des échangeurs de type antiport Na^+/H^+ , Na^+/K^+ -ATPases ou des canaux sodium couplés à des pompes H^+ -ATPases. Au niveau des bactériocytes de *Riftia*, nos résultats semblent indiquer une prédominance de l'échangeur Na^+/H^+ ou d'un canal sodique couplé à une pompe à protons, par rapport à l'échangeur de type Na^+/K^+ -ATPase. En effet, aucune modification des concentrations intracellulaires en potassium ($[\text{K}^+]_i = 73,62 \pm 8,46$), n'a pu être mise en évidence sur les bactériocytes incubés en présence d'amiloride (Chapitre III). De plus, l'immunolocalisation de cet échangeur n'a été positive que sur la partie la plus périphérique du lobule, sans co-localisation systématique avec l'anhydrase carbonique cytosolique ni la V-H^+ -ATPase (Chapitre IV). Ces résultats confirment les données publiées par Goffredi et Childress (2001), qui suggèrent une régulation majoritaire des échanges de protons par des échangeurs Na^+/H^+ ou des pompes électrogéniques H^+ -ATPase, par rapport à un niveau d'activité plus faible de la Na^+/K^+ -ATPase chez *Riftia*. Notre travail a également permis de mettre en évidence un niveau d'expression très élevé de la V-H^+ -ATPase dans les bactériocytes (Chapitre IV), associé à l'existence d'un fort gradient électrochimique de protons entre le cytosol des bactériocytes (pH 6.4-6.6) et le compartiment extracellulaire (pH 7.5-7.6). Ces résultats suggèrent une participation

importante de cet échangeur dans la régulation du pH et de l'équilibre ionique de la cellule. Il est potentiellement présent dans les membranes des vacuoles acides des bactériocytes et dans la membrane cytoplasmique, seul ou associé à un canal sodium, et dans ce cas inhibé par l'amiloride (Figure 37). L'efflux massif de protons généré par la V-H⁺-ATPase pourrait en effet faciliter le transport de sodium dans la cellule et permettre le maintien de ce fort gradient électrochimique observé entre les milieux intra- et extracellulaires (Bury et Wood, 1999). L'activation majoritaire d'un échangeur de type antiport Na⁺/H⁺ ne génère habituellement qu'une différence de pH maximale de l'ordre de 0,2 unités (Ehrenfeld et Klein, 1997), alors que nous avons observé une différence de 1 à 1,2 unités pH lors de nos expériences sur les suspensions de bactériocytes (Chapitre III).

Les H⁺-ATPases sont constitutives de toutes les cellules, et ont un rôle primordial dans la conversion énergétique. Par l'hydrolyse d'ATP, elles sont capables de générer une force motrice de protons conséquente, permettant de faciliter les échanges ioniques, qui peuvent à leur tour permettre à la cellule de régénérer son ATP par le biais d'autres complexes protéiques membranaires. Chez les invertébrés, l'étude du rôle essentiel de la pompe

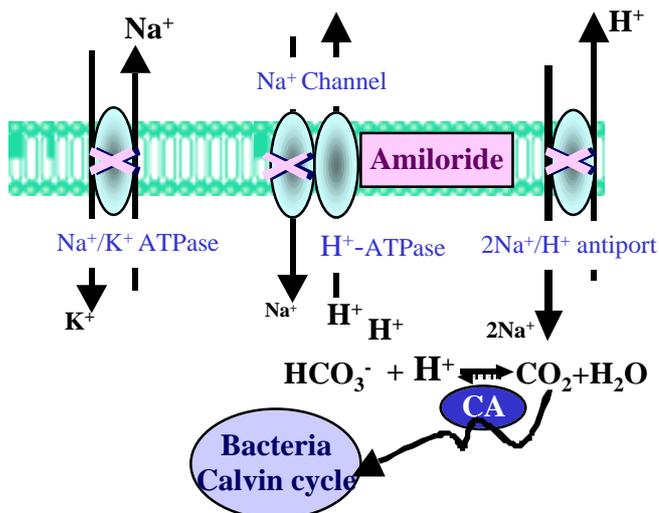


Figure 37. Cibles potentielles de l'amiloride sur les membranes plasmiques des bactériocytes. Schéma des principaux transporteurs sodium-protons sensibles à l'amiloride, et impliqués dans la régulation du pH intracellulaire.

H⁺-ATPase, dans le maintien du pH cytosolique et de l'équilibre a été mise en évidence dans la branchie de crabes euryhalins (Weihrauch et al., 2001), et dans la membrane plasmatique du tractus digestif d'insectes (Wieczorek et al., 2000). Plus généralement, l'activation des pompes H⁺-ATPases est liée à un transport transmembranaire actif de protons dans des types cellulaires épithéliaux riches en mitochondries (Harvey, 1992; Klein et al., 1997; Towle et Weihrauch, 2001). Chez *Riftia*, les bactériocytes ne correspondent pas à la définition classique d'une cellule épithéliale, ne possédant pas l'orientation classique membrane apicale vs membrane basale. Cependant, l'hébergement de bactéries intracellulaires symbiotiques utilisant les ions HS⁻, NO₃⁻ et HCO₃⁻/CO₂ comme source d'énergie, d'azote et de carbone, leur confère la propriété d'être traversés par un flux net unidirectionnel de ces ions, de l'extérieur du lobule vers le vaisseau efférent central à chaque lobule. D'autre part, les bactériocytes présentent de nombreuses mitochondries dans les espaces intervacuolaires, caractéristique commune avec les cellules épithéliales.

Enfin, en complément d'une pompe H⁺-ATPase active dans les bactériocytes, l'antiport 2Na⁺/H⁺ (Figure 37), ubiquiste, déjà mis en évidence chez les invertébrés (Ahearn et al., 2001) pourrait être recherché chez *Riftia*. Il est en effet sensible à l'amiloride, régule le pH intracellulaire et les concentrations en sodium. Il serait capable d'assurer un large éventail de fonctions grâce à la présence de deux sites de liaison de cations monovalents pouvant également lier un cation divalent, et permettre ainsi de maintenir l'équilibre ionique des cellules, sans nécessité pour elles d'exprimer d'autres transporteurs plus spécialisés.

En conclusion, le modèle physiologique du transport du CO₂ proposé chez le vestimentifère symbiotique *Riftia pachyptila* à l'issue de ce travail de thèse est schématisé par la figure 38. Il représente l'ensemble des protéines qui ont pu être identifiées, ou dont

Sea Water
pH 6.4

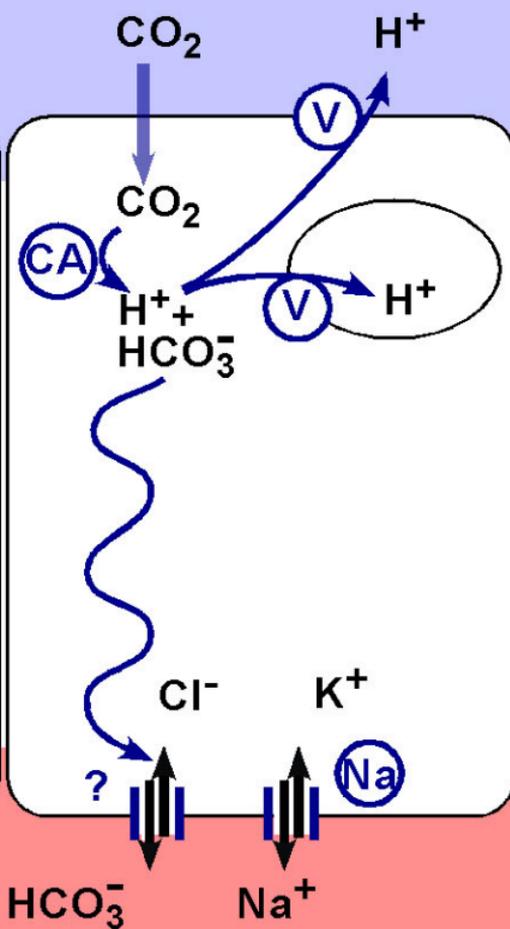
apical side

vacuole

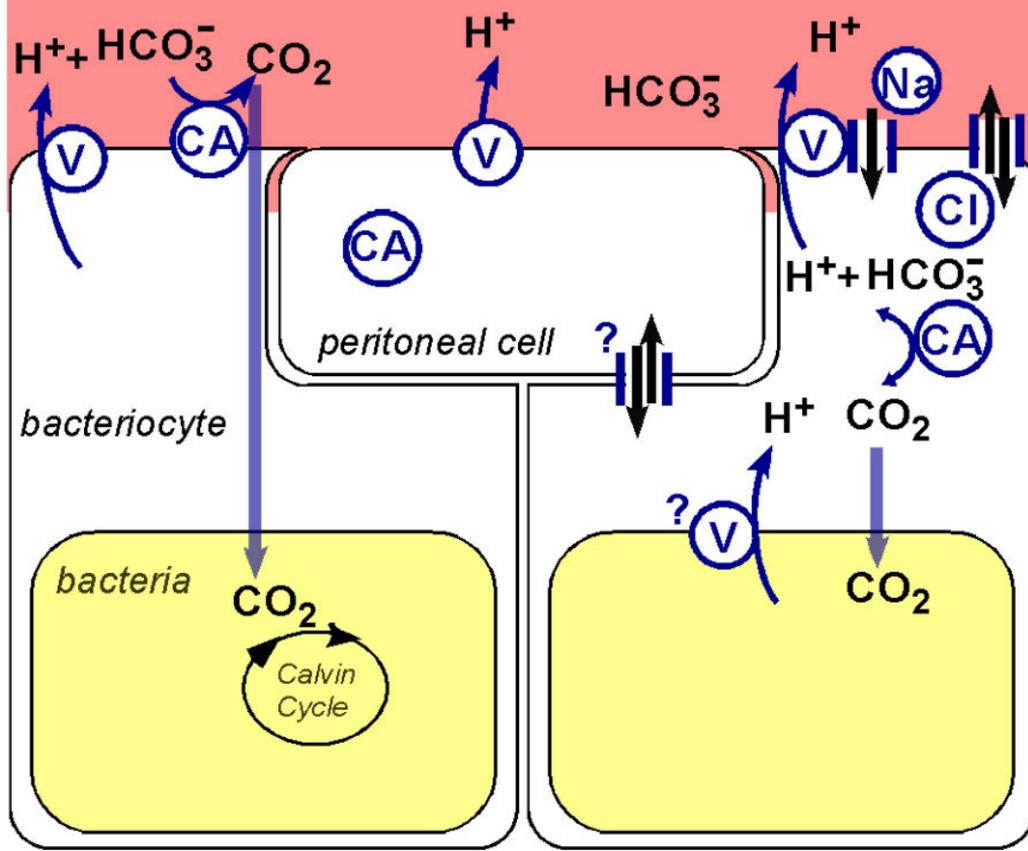
gill epithelial cell

pH 6.8

basal membrane



Body Fluid
pH 7.4



l'existence a pu être suggérée par la combinaison de différentes approches techniques, et précise les différents points clés pour l'équilibre acide-base et les échanges ioniques dans le la branchie et le trophosome.

Le CO₂ traverse l'épithélium branchial par diffusion. Une partie passe directement dans les liquides circulants, l'autre partie est convertie dans le cytosol des cellules épithéliales en bicarbonates et protons grâce à l'activité CA. Cette enzyme permet de maintenir l'équilibre acide-base des cellules, chargées d'excréter une grande partie des protons présents dans les liquides circulants. Cette excrétion se fait principalement par l'activation d'une pompe à protons de type V-H⁺-ATPase localisée sur la membrane apicale des cellules épithéliales, ou sur les membranes de vacuoles cytosoliques permettant la séquestration et la neutralisation de ces ions. Les échanges d'ions sodium entre le cytosol et les liquides circulants, généralement associés au transfert d'ions potassium ou de protons, sont ici régulés par une Na⁺/K⁺-ATPase localisée sur la membrane basale des cellules épithéliales. Les liquides circulants sont capables d'accumuler de grandes quantités de carbone, majoritairement sous forme d'ions bicarbonates, mais constituent également un compartiment de réserve de nombreux ions, nécessaires aux symbiotes. On notera *Riftia* ne possède que très peu de cellules sanguines et de coelomocytes dans ses liquides circulants, ses hémoglobines circulantes étant exclusivement extracellulaires. Le transport des ions bicarbonates ne se fait donc pas *via* les erythrocytes.

Figure 38. Modèle physiologique illustrant les différentes étapes du transport et de la conversion du CO₂ au travers des compartiments corporels de *Riftia pachyptila*. Affinements du modèle proposé par (Goffredi et al., 1998) par des transporteurs ioniques identifiés ou supposés absents comme la Bande III, et hypothèses sur l'existence d'une deuxième isoforme d'anhydrase carbonique associée à la membrane au niveau des bactériocytes uniquement, en plus de l'isoforme cytosolique. Abréviations : Cl : co-transporteur anionique; CA : anhydrase carbonique; Na : Na⁺/K⁺-ATPase; V : V-H⁺-ATPase.

A proximité des lobules du trophosome, les ions bicarbonates peuvent être transportés de façon active au travers des membranes des bactériocytes. Ils seraient dans ce cas échangés contre des ions chlorures intracellulaires *via* un co-transporteur anionique. Ils peuvent être également convertis en CO₂ grâce à une CA associée à la membrane plasmique, et traverser les membranes du bactériocyte et des vacuoles bactériennes par diffusion. Lorsque la bactérie est en présence non limitante d'ions HS⁻, de nitrates et de CO₂, son activité métabolique est maximale et génère d'importantes quantités de protons. Les concentrations intracellulaires de ces ions sont régulées par le bactériocyte *via* une pompe à protons, localisée sur l'ensemble de la membrane plasmique, sans localisation particulière, et sur les membranes de vacuoles acides contenues dans le cytosol. Ce transporteur est également présent sur les membranes plasmiques des cellules péritonéales, en périphérie des lobules. Ces cellules, ainsi que les bactériocytes les plus périphériques, sont par ailleurs les seuls à exprimer une pompe de type Na⁺/K⁺-ATPase.

Au travers de cette synthèse du métabolisme du carbone et des échanges ioniques chez *Riftia pachyptila*, quelques questions permettant de mieux préciser les futures problématiques concernant la physiologie de *Riftia* ont pu être posées, auxquelles l'utilisation des outils apportés pendant cette thèse permettront de répondre. Comment se font les échanges ioniques entre bactérie et bactériocytes et quels sont les transporteurs impliqués ? De la même façon, quels types d'échanges existent entre bactériocytes et cellules péritonéales, ces dernières étant métaboliquement très actives et en contact direct avec les vaisseaux sanguins afférents, comme décrit précédemment ? Enfin, quelle est la nature des transporteurs anioniques de la branchie et du trophosome impliqués dans le transport de bicarbonates, et quelle est sont-ils spécifiques d'une seule espèce anioniques ou sont-ils polyvalents ?

Perspectives d'études

L'étude de la physiologie de la symbiose obligatoire entre *Riftia* et les bactéries chimioautotrophes sulfoxydantes par le biais d'une approche cellulaire devrait constituer à l'avenir une approche complémentaire à celles effectuées à l'échelle de l'organisme entier, ou au contraire à l'échelle de la bactérie isolée. L'obstacle majeur à cette approche restera l'aspect sporadique de sa mise en œuvre, tributaire du calendrier des campagnes en mer, mais nous soulignerons ici les points que l'utilisation de suspensions de bactériocytes isolés pourrait permettre de résoudre.

Les transporteurs ioniques chez *Riftia* apparaissent comme un élément-clé dans les processus cellulaires liés aux échanges métaboliques entre hôte et symbiontes. En effet, la majeure partie des molécules nécessaires aux bactéries symbiotiques chimioautotrophes sont chargées et nécessitent l'activation d'un transport actif pour franchir les différentes barrières membranaires leur permettant de passer du milieu environnant jusqu'aux vacuoles bactériennes.

La quasi totalité des sulfures est présente dans le sang et le liquide coelomique sous une forme liée à des cystéines libres localisées sur les chaînes de globines, ce qui permet une accumulation considérable des réserves de sulfures dans les liquides circulants. Cependant, les mécanismes qui permettent l'entrée des ions HS^- à travers l'épithélium branchial, la cinétique de dissociation de l'hémoglobine et des sulfures à la proximité des bactéries, et enfin le transport des ions HS^- libérés au travers de la membrane cytoplasmique des bactériocytes restent mal connus. Ce dernier point mériterait d'être abordé à l'échelle cellulaire en utilisant les différentes approches complémentaires développées dans ce travail sur le CO_2 .

De la même façon, pour les nitrates, certaines étapes du transport sont toujours indéterminées. Par l'activation de quels transporteurs ces ions franchissent-ils la barrière épithéliale ? Les mécanismes cellulaires impliqués sont-ils les mêmes au niveau des bactériocytes ? Comment l'équilibre des ions ammonium, produits en très grandes quantités et incorporés dans de nombreuses réactions enzymatiques, est-il maintenu ?

Les échanges de molécules organiques entre bactéries et hôte restent également mal comprises. On sait par exemple que la bactérie exporte vers l'hôte des métabolites assimilables tels que le succinate et le glutamate (Felbeck, 1985; Felbeck et Jarchow, 1998). Inversement, il est probable que la bactérie puisse réutiliser certains produits du catabolisme de l'hôte, comme la créatinine, l'urée ou l'urate par exemple (De Cian et al., 2000). Par ailleurs, le métabolisme d'un certain nombre d'acides aminés, et notamment les acides aminés soufrés tels que la cystéine, la taurine, l'hypotaurine et la thiotaurine, fait certainement intervenir des échanges entre bactéries et cytosol des bactériocytes. Ces acides aminés soufrés pourraient constituer une réserve intracellulaire de sulfures conséquente et non toxique (Pruski et al., 1998), mais ils pourraient également jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la fonction de nombreuses protéines comme récemment suggéré par les travaux de Yancey (Yin et al., 2000; Yancey, 2001).

Tous ces échanges de molécules organiques supposent l'existence de modes de transfert transmembranaires particuliers dont l'étude pourrait bénéficier d'une approche cellulaire. On peut en effet envisager des tests d'inhibition sur les suspensions de bactériocytes, lorsque les inhibiteurs spécifiques des protéines cibles choisies sont connus, ou des expériences mettant en jeu des molécules marquées servant de traceurs.

Si le modèle physiologique proposé à l'issue de ce travail ne semble applicable qu'à peu d'autres organismes symbiotiques, la perspective d'une approche comparée au sein des vestimentifères doit être mentionnée. L'étude des espèces colonisant les zones de suintements froids, comme *Lamellibrachia* ou *Escarpia* sp., pourrait s'avérer très intéressante. Ces animaux forment en effet une symbiose avec une souche bactérienne très proche de celle de *Riftia* mais leur taux de croissance est l'un des plus faibles que l'on connaisse (Bergquist et al., 2000), contrairement à *Riftia*, et les mécanismes d'acquisition des sulfures par exemple sont différents puisqu'il sont puisés dans le sédiment et non dans l'eau environnante du panache branchial (Julian et al., 1999). Dans ce contexte, il est judicieux de s'interroger sur le mode d'acquisition du CO₂ et des nitrates pour les symbiontes de *Lamellibrachia* :

- existe-t-il une diffusion du CO₂ dans les racines du vestimentifère directement au travers de la paroi du corps, dépourvue de tube et hautement perméable aux sulfures ?

- le processus d'acquisition du CO₂ est-il totalement découplé de celui du soufre, avec un passage obligé par l'épithélium branchial et les liquides circulants comme dans le cas de *Riftia* ?

- Qu'en est-il du métabolisme azoté, encore peu étudié ?

On peut également aborder le problème de la symbiose sous un angle ontogénétique: un certain nombre de processus nécessaires au fonctionnement de l'association sont sans doute mis en place lors de l'acquisition de la symbiose. Chez *Riftia*, l'expression de l'anhydrase carbonique dans la branchie et le trophosome pourrait être induite au moment de la phase d'acquisition et de la différenciation du tractus digestif

présent chez l'embryon en tissu symbiotique. Une telle induction par la symbiose a en effet été décrite chez l'anémone de mer, *Anthopleura elegantissima* où CA a pu être utilisé comme véritable indicateur de l'état physiologique des cellules des tentacules en phase d'acquisition de la symbiose (Weis et al., 2000). L'induction de CA par la symbiose chez *Riftia* pourrait également être accompagnée par l'induction de l'expression d'autres protéines, les échangeurs ioniques en particulier, impliqués dans le métabolisme bactérien du soufre, et de l'azote. L'extension de la caractérisation moléculaire et biochimique de ces transporteurs ioniques chez *Riftia* pourrait donc se révéler très intéressante puisque l'on peut supposer l'existence de transporteurs potentiellement nouveaux ou du moins modifiés, compte tenu de l'orientation particulière des échanges ioniques chez cet organisme symbiotique où la plupart des flux, classiquement sortants chez les organismes hétérotrophes, sont entrants.

Une approche de type EST (Etiquette de Séquences Transcrites) sur l'hôte pourrait constituer un bon outil de criblage des protéines différemment exprimées avant et après l'acquisition de la symbiose. Ce projet, en complément du séquençage de la totalité du génome bactérien quasiment achevé par le groupe de H. Felbeck, pourrait se révéler très informatif sur les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place au cours de l'acquisition de la symbiose.

Un des problèmes majeurs lié à ce type d'approche est celui de l'échantillonnage. Dans le cas de *Riftia*, il faudrait idéalement construire les banques EST à partir de trois populations d'ARN messagers polyadénylés différents : la première provenant de jeunes stades larvaires aposymbiotiques, la deuxième provenant de stades larvaires en phase d'internalisation des bactéries symbiotiques et la troisième provenant de stades juvéniles ou adultes chez lesquels la symbiose est complètement intégrée et fonctionnelle. Pour l'instant on ne dispose aisément que de la troisième. La première population pourrait être obtenue

grâce aux travaux des groupes de Craig Young et Donal Manahan sur la fécondation et le développement précoce de *Riftia* en aquarium pressurisé, développé également par l'équipe de Françoise Gaill sur un autre modèle (Pradillon et al., 2001). Ces travaux ont pour l'instant permis d'observer des larves au stade trochophore nageantes, mais il faudrait synchroniser les stades de développement et optimiser le pourcentage de larves atteignant ces stades afin de disposer d'une quantité suffisante d'ARNm. L'obtention de la seconde population d'animaux en phase d'acquisition de la symbiose reste problématique. Il s'agit de l'étape clé manquante du développement de *Riftia*, importante pour de nombreux axes de recherche dédiés à la biologie des organismes symbiotiques des sources hydrothermales. Si certains individus correspondant à ce stade précis sont trouvés lors de récoltes massives de larves dans la colonne d'eau à proximité des sources, le type de fixation non adapté ou encore l'insuffisance quantitative de tels stades reste un obstacle conséquent à l'avancée des recherches.

Afin d'approfondir les points évoqués jusqu'ici dont l'induction possible d'enzymes clés impliquées dans le métabolisme hôte-symbiontes, l'idéal serait de travailler sur un modèle plus accessible de symbiose internalisée et induite par transmission environnementale, comme c'est le cas du bivalve *Codakia orbicularis* (Gros et al., 1996, 1998, 1999). Mais *Riftia* reste à ce jour le seul organisme connu à avoir développé un tissu contenant les bactéries symbiotiques, sans aucun contact avec le milieu environnant, soumettant les symbiontes à une dépendance totale et exclusive vis-à-vis des liquides circulants de l'hôte. Les profondes adaptations physiologiques qui en découlent sont encore la source de nombreuses interrogations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, M., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E. and al.,** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Ahearn, G. A., Duerr, J. M., Zhuang, Z., Brown, R. J., Aslamkhan, A. and Killebrew, D. A.** (1999). Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiol Biochem Zool* **72**, 1-18.
- Ahearn, G. A., Mandal, P. K. and Mandal, A.** (2001). Biology of the $2\text{Na}^+/\text{1H}^+$ antiporter in invertebrates. *Journal of Experimental Zoology* **289**, 232-244.
- Altschul, S. F., Fish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Amann, R. I.** (1995). In situ identification of micro-organisms by whole-cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Mammals* **3.3.6**, 1-15.
- Andersen, A. C., Jolivet, S., Claudinot, S. and Lallier, F. H.** (2002). Biometry of the branchial plume in *Riftia pachyptila*, the hydrothermal vent tubeworm (Vestimentifera; Annelida). *Can. J. Zool.* (accepted 11 Dec. 2001).
- Arp, A. J., Childress, J. J. and Fisher, C. R., Jr.** (1985). Blood gas transport in *Riftia pachyptila*. *Bull. Biol. Soc. Wash.* **6**, 289-300.
- Arp, A. J., Childress, J. J. and Vetter, R. D.** (1987). The sulfide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *J. Exp. Biol.* **128**, 139-158.
- Axelsson, L., Larsson, C. and Ryberg, H.** (1999). Affinity, capacity and oxygen sensitivity of two different mechanisms for bicarbonate utilization in *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta). *Plant Cell Environ* **22**, 969-978.
- Badger, M. R. and Price, G. D.** (1989). Carbonic anhydrase activity associated with cyanobacterium *Synechococcus* PCC7842. *Pl. Physiol.* **89**, 51-60.
- Ballard, R. D. and Grassle, J. F.** (1979). Return to oases of the deep (strange world without a sun). *Natl. Geogr.* **156**, 680-703.
- Benesch, R.** (1984). Carbonic anhydrase and calcification. *Ann. NY Acad. Sci* **429**, 457-458.
- Bergquist, D. C., Williams, F. M. and Fisher, c.** (2000). Longevity record for deep-sea invertebrate. *Nature* **403**, 499-500.
- Bertorello, A. M. and Katz, A. I.** (1993). Short-term regulation of renal Na,K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *American Journal of Physiology* **265**, F743-F755.
- Birmelin, C., Pipe, R. K., Goldfarb, P. S. and Livingstone, D. R.** (1999). Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Marine Biology* **135**, 65-75.

- Black, M. B., Trivedi, A., Maas, P. A. Y., Lutz, R. A. and Vrijenhoek, R. C.** (1998). Population genetics and biogeography of vestimentiferan tube worms. *Deep Sea Res Pt II Top St Oce* **45**, 365-382.
- Boer, H. H. and Witteveen, J.** (1980). Ultrastructural localization of carbonic anhydrase in tissues involved in shell formation and ionic regulation in the Pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research* **209**, 383-390.
- Bogdanova, A. Y., Sherstobitov, A. O. and Gusev, G. P.** (1998). Chloride transport in red blood cells of lamprey *Lampetra fluviatilis*: Evidence for a novel anion-exchange system. *J Exp Biol* **201**, 693-700.
- Boron, W. F., Hediger, M. A., Boulpaep, E. L. and Romero, M. F.** (1997). The renal electrogenic $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransporter. *J. Exp. Biol.* **200**, 263-268.
- Bosch, C. and Grassé, P. P.** (1984). Cycle partiel des bactéries chimioautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophore Vestimentifère). II. L'évolution des bactéries symbiotiques et des bactériocytes. *C. R. Acad. Sci. Paris(ser.III)* **299**, 413-419.
- Bouchet, P. and Waren, A.** (1991). *Ifremeria nautilei*, nouveau gastéropode d'évents hydrothermaux, probablement associé à des bactéries symbiotiques. *C. R. Acad. Sci. Paris, sér. III* **312**, 495-501.
- Bright, M., Keckeis, H. and Fisher, C. R.** (2000). An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Mar Biol* **136**, 621-632.
- Bright, M.** (2002). The development of the trophosome in Vestimentifera. In *Second International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology*, (ed. D. E. Ifremer, Brest), pp. 82. 8-12th October, Brest, France.
- Brinkman, R., Margaria, R., Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. W.** (1932). The CO_2 catalyst present in blood. *J. Physiol. (Lond)* **75**, 3-4 (Meeting of March 12, 1932). Addendum by Meldrum, N.U. and Roughton, F.J.W.
- Brion, L. P., Cammer, W., Satlin, L. M., Suarez, C., Zavilowitz, B. J. and Schuster, V. L.** (1997). Expression of carbonic anhydrase IV in carbonic anhydrase II-deficient mice. *Amer J Physiol Renal Physiol* **42**, F234-F245.
- Brion, L. P., Suarez, C., Zhang, H. and Cammer, W.** (1994). up-regulation of carbonic anhydrase isozyme IV in CNS myelin of mice genetically deficient in carbonic anhydrase II. *Journal of Neurochemistry* **63**, 360-366.
- Brown, D., Xhu, X. L. and Sly, W.** (1990). Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells. *PNAS* **87**, 7457-7461.
- Brubaker, K. D., Mao, F. and Gay, C. V.** (1999). Localization of carbonic anhydrase in living osteoclasts with Bodipy 558/568-modified acetazolamide, a thiadiazole carbonic anhydrase inhibitor. *J Histochem Cytochem* **47**, 545-550.
- Buchner, P.** (1965). *Endosymbiosis of Animals With Plant Microorganisms*. New York: Interscience Publishers.

- Bury, N. R. and Wood, C. M.** (1999). Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. *Am. J. Physiol.* **277**, R1385-R1391.
- Byrne, R. and Dietz, T.** (1997). Ion transport and acid-base balance in freshwater bivalves. *J Exp Biol* **200**, 457-65.
- Cabantchik, Z. I. and Greger, R.** (1992). Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.* **262**, C803-C827.
- Cameron, B. A., Gilmour, K., Forster, R., Ko, K. and Tufts, B. L.** (2000). Unique distribution of the anion exchange protein in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *J Comp Physiol B* **170**, 497-504.
- Cameron, B. A., S.F. Perry, C. Wu, K. Ko, B.L. Tufts.** (1996). Bicarbonate permeability and immunological evidence for an anion exchanger-like protein in the red blood cells of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *J. Comp. Physiol. B* **166**, 197-204.
- Cary, S. C., Felbeck, H. and Holland, N. D.** (1989). Observations on the reproductive biology of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **52**, 89-94.
- Cavanaugh, C. M.** (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulfide-rich habitats. *Nature* **302**, 58-61.
- Cavanaugh, C. M., Gardiner, S. L., Jones, M. L., Jannasch, H. W. and Waterbury, J. B.** (1981). Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* **213**, 340-342.
- Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J. and Spencer, I. M.** (2000). The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 343-363.
- Chegwidden, W. R. and Spencer, I. M.** (1995). Sulphonamide inhibitors of carbonic anhydrase inhibit the growth of human lymphoma cells in culture. *Inflammopharmacology* **3**, 231-239.
- Chen, C. P. and Lawrence, J. M.** (1986). Localization of carbonic anhydrase in the plumula of the tooth of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Acta Zoologica* **67**, 27-32.
- Chen, R. F. and Kernohan, J. C.** (1967). Combination of bovine carbonic anhydrase with a fluorescent sulfonamide. *J. Biol. Chem.* **24**, 5813-5823.
- Childress, J. J., Arp, A. J. and Fisher, C. R.** (1984). Metabolic and respiratory characteristics of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Mar. Biol.* **83**, 109-124.
- Childress, J. J., Fischer, C. R., Favuzzi, J. A., Kochevar, R., Sanders, N. K. and Alayse, A. M.** (1991). Sulfide-driven autotrophic balance in the bacterial symbiont-containing hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones. *Biol. Bull.* **180**, 135-153.
- Childress, J. J., Lee, R. W., Sanders, N. K., Felbeck, H., Oros, D. R., Toulmond, A., Desbruyères, D., Kennicut II, M. C. and Brooks, J.** (1993). Inorganic carbon uptake in hydrothermal vent tubeworms facilitated by high environmental PCO₂. *Nature* **362**, 147-149.

- Chirica, L. C., Elleby, B., Jonsson, B. H. and Lindskog, S.** (1997). The complete sequence, expression in *Escherichia coli*, purification and some properties of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *European Journal of Biochemistry* **244**, 755-760.
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1991-1995.
- Common, R. H.** (1941). The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct. *J. Agricult. Sci.* **31**, 412.
- Corliss, J. B. and Ballard, R. D.** (1977). Oases of life in the cold abyss. *Natl. Geogr.* **152**, 441-454.
- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., Herzen, R. P. V., Ballard, R. D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K. et al.** (1979). Submarine thermal springs on the Galapagos rift. *Science* **203**, 1073-1083.
- Costlow, J. D.** (1959). Effects of carbonic anhydrase inhibitors on shell development and growth of *Balanus improvisus* Darwin. *Physiol. Zool.* **32**, 177-189.
- Counillon, L., Scholz, W., Lang, H. and Pouyssegur, J.** (1993). Pharmacological characterization of stably transfected Na⁺/H⁺ antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol. Pharmacol.* **44**, 1041-1045.
- Crandall, E. and O'Brasky, J.** (1978). Direct evidence for participation of rat lung carbonic anhydrase in CO₂ reactions. *J. Clin. Invest.* **62**, 618-622.
- Cronk, J. D., Endrizzi, J. A., Cronk, M. R., JW, O. N. and Zhang, K. Y. J.** (2001). Crystal structure of *E. coli* beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein Science* **10**, 911-922.
- Cuervo, L. A., Pita, J. C. and Howell, D. S.** (1971). Ultramicroanalysis of the pH, pCO₂ and carbonic anhydrase activity at calcifying sites in cartilage. *Calcif. Tissue Res.* **7**, 220-231.
- De Cian, M. C., Regnault, M. and Lallier, F. H.** (2000). Nitrogen metabolites and related enzymatic activities in the body fluids and tissues of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachytila*. *J Exp Biol* **203**, 2907-2920.
- Dermietzel, R., Leibstein, A., Siffert, W., Zamboglou, A. and Gros, G.** (1985). A fast screening method for histochemical localization of carbonic anhydrase. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 93-98.
- Desbruyères, D. and Laubier, L.** (1982). *Paralvinella grasslei*, new genus, new species of Alvinellidae (Polychaeta: Ampharetidae) from the galapagos Rift geothermal vents. *Proc. Biol. Soc. Wash.* **95**, 484-494.
- Dodgson, S. J. and Forster, R. E.** (1986). Inhibition of carbonic anhydrase V decreases glucose synthesis from pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 198-204.
- Dodgson, S. J., Forster, R. E., Schwed, D. A. and Strorey, B. T.** (1983). Contribution of matrix carbonic anhydrase to citrulline synthesis in isolated guinea pig liver mitochondria. *J Biol Chem* **258**, 7696-7701.

Drescher, D. G. (1978). Purification of blood carbonic anhydrases and specific detection of carbonic anhydrase isoenzymes on polyacrylamide gels with 5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonamide (DNSA). *Analytical Biochemistry* **90**, 349-358.

Duda, D., Tu, C. K., Qian, M. Z., Laipis, P., Agbandje McKenna, M., Silverman, D. N. and McKenna, R. (2001). Structural and kinetic analysis of the chemical rescue of the proton transfer function of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **40**, 1741-1748.

Egée, S. (1998). Mise en évidence des voies de conductance dans les érythrocytes nucléés de poissons (*Oncorhynchus mykiss*) : implication dans la régulation du volume cellulaire. pp. 277: Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Ehrenfeld, J. and Klein, U. (1997). The key role of the H⁺-ATPase in acid-base balance and Na⁺ transport processes in frog skin. *J. Exp. Biol.* **200**, 247-256.

Ewart, H. S. and Klip, A. (1995). Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* **269**, C295-C311.

Felbeck, H. (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* **213**, 336-338.

Felbeck, H. (1985). CO₂ fixation in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* (Jones). *Physiol. Zool.* **58**, 272-281.

Felbeck, H. and Jarchow, J. (1998). Carbon release from purified chemoautotrophic bacterial symbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Physiol Zool* **71**, 294-302.

Feldman, R. A., Black, M. B., Cary, C. S., Lutz, R. A. and Vrijenhoek, R. C. (1997). Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. *Molec Mar Biol Biotechnol* **6**, 268-277.

Felsenstein, J. (1989). Phylip. Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.

Fiala-Médioni, A. (1984). Mise en évidence par microscopie électronique à transmission de l'abondance de bactéries symbiotiques dans la branchie de mollusques bivalves de sources hydrothermales profondes. *C. R. Acad. Sci. Paris, sér. III* **298**, 487-491.

Fisher, C. R., Childress, J. J. and Minnich, E. (1989). Autotrophic carbon fixation by the chemoautotrophic symbionts of *Riftia pachyptila*. *Biol. Bull.* **177**, 372-385.

Fisher, C. R., Childress, J. J. and Sanders, N. K. (1988). The role of vestimentiferan hemoglobin in providing an environment suitable for chemoautotrophic sulfide-oxidizing endosymbionts. *Symbiosis* **5**, 229-246.

Fisher, M., Gokhman, I., Pick, V. and Zamir, A. (1996). A salt resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem.* **271**, 17718-17723.

Fouquet, Y., Wafik, A., Cambon, P., Mevel, C., Meyer, G. and Gente, P. (1993). Tectonic setting and mineralogical and geochemical zonation in the Snake Pit sulfide deposit (Mid-Atlantic Ridge at 23°N). *Econ. Geol.* **88**, 2018-2036.

Fukuzawa, H., Tsuzuki, M. and Miyachi, S. (2000). Algal carbonic anhydrase. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 535-546.

Fustec, A., Desbruyères, D. and Juniper, S. K. (1987). Deep-sea hydrothermal vent communities at 13° N on the East Pacific Rise: microdistribution and temporal variations. *Biol. Océanogr.* **4**, 121-164.

Gaill, F. and Hunt, S. (1986). Tube of deep-sea hydrothermal vent worms *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) and *Alvinella pompejana* (annelida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **34**, 267-274.

Gardiner, S. L. and Jones, M. L. (1993). Vestimentifera. *Microscopic Anatomy of Invertebrates. 12: Onychophora, Chilopoda, and lesser Protostomata.* Wiley-Liss, Inc., 371-460.

Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. and Pace, N. R. (1988). Phylogenetic group specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bact.* **170**, 720-726.

Giraud, M. M. (1981). Carbonic anhydrase activity in the integument of the crab *Carcinus maenas* during the intermolt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* **69A**, 381-387.

Giraud-Guille, M. M. (1984). Calcification initiation sites in the crab cuticle: the interprismatic septa. *Cell Tissue Research* **236**, 413-420.

Girguis, P. R., Lee, R. W., Desaulniers, N., Childress, J. J., Pospesel, M., Felbeck, H. and Zal, F. (2000). Fate of nitrate acquired by the tubeworm *Riftia pachyptila*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2783-2790.

Goffredi, S. K., Childress, J. J., Desaulniers, N. T. and Lallier, F. H. (1997a). Sulfide acquisition by the vent worm *Riftia pachyptila* appears to be via uptake of HS⁻, rather than H₂S. *J Exp Biol* **200**, 2609-2616.

Goffredi, S. K., Childress, J. J., Desaulniers, N. T., Lee, R. W., Lallier, F. H. and Hammond, D. (1997b). Inorganic carbon acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* depends upon high external P-CO₂ and upon proton-equivalent ion transport by the worm. *J Exp Biol* **200**, 883-896.

Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. (1998). How to be the perfect host: CO₂ and HS⁻ accumulation and H⁺ elimination in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Cah Biol Mar* **39**, 297-300.

Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. (1999). The ionic composition of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: Evidence for the elimination of SO₄²⁻ and H⁺ and for a Cl⁻/HCO₃⁻ shift. *Physiol Biochem Zool* **72**, 296-306.

Goffredi, S. K. and Childress, J. J. (2001). Activity and inhibitor sensitivity of ATPases in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*: a comparative approach. *Marine Biology* **138**, 259-265.

Gros, O., Duplessis, M. R. and Felbeck, H. (1999). Embryonic development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia : Lucinidae). *Invertebr Reprod Dev* **36**, 93-103.

- Gros, O., Darrasse, A., Durand, P., Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical Lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2324-2330.
- Gros, O., Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1998). Gill filament differentiation and experimental colonization by symbiotic bacteria in aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Reproduction and Development* **34**, 219-231...
- Grosell, M., Brauner, C. J., Kelly, S. P., McGeer, J. C., Bianchini, A. and Wood, C. M.** (2002). Physiological responses to acute silver exposure in the freshwater crayfish (*Cambarus diogenes*) - A model invertebrate? *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 369-374.
- Guilloton, M. B., Korte, J. J., Lamblin, A. F., Fuchs, J. A. and Anderson, P. M.** (1992). Carbonic anhydrase in *E. coli*: a product of the *cyn* operon. *J. Biol. Chem.* **267**, 3731-3734.
- Hakansson, K. and Wehnert, A.** (1992). Structure of cobalt carbonic anhydrase complexed with bicarbonate. *J. Mol. Biol.* **228**, 1212-1218.
- Hand, S. C.** (1987). Trophosome ultrastructure and the characterization of isolated bacteriocytes from invertebrate-sulfur bacteria symbioses. *Biol. Bull* **173**, 260-276.
- Hansson, H. P. F.** (1967). Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. *Histochemie* **1**, 29.
- Harvey, B. J.** (1992). Energization of sodium absorption by the H⁺-ATPase pump in mitochondria-rich cells of frog skin. *J. Exp. Biol.* **172**, 289-309.
- Haussinger, D. and Gerok, W.** (1985). Hepatic urea synthesis and pH regulation: role of CO₂, HCO₃⁻ and the activity of carbonic anhydrase. *European Journal of Biochemistry* **152**, 381-386.
- Henry, R. P.** (1984). The role of carbonic anhydrase in blood ion and acid base regulation. *American Zoologist* **24**, 241-253.
- Henry, R. P.** (1987). Membrane-associated carbonic anhydrase in gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Am. J. Physiol.* **252**, R966-R971.
- Henry, R. P.** (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu Rev Physiol* **58**, 523-38.
- Henry, R. P. and Kormanik, G. A.** (1985). Carbonic anhydrase activity and calcium deposition during the molt cycle of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of crustacean Biology* **5**, 234-241.
- Hentschel, U. and Felbeck, H.** (1993). Nitrate Respiration in the Hydrothermal Vent Tubeworm *Riftia pachyptila*. *Nature* **366**, 338-340.
- Hewett Emmett, D.** (2000). Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 29-76.
- Hewett-Emmett, D. and Tashian, R. E.** (1996). Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the a-, b-, and g-carbonic anhydrase gene family. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**, 50-77.

Hoffmann, E. K. and Ussing, H. H. (1992). Membrane mechanisms in volume regulation in vertebrate cells and epithelia. In *Membrane transport in biology*, eds G. H. Giebisch J. A. Schafer H. H. Ussing and P. Kristensen), pp. 317-399. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Itada, N. and Forster, R. E. (1977). Carbonic anhydrase activity in intact red blood cells measured with ^{18}O exchange. *J Biol Chem* **252**, 3881-3890.

Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M.-H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J. and Lerman, M.-I. (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12596-12601.

Jacobs, M. K. and Stewart, D. R. (1942). The role of carbonic anhydrase in certain ionic exchanges involving the erythrocyte. *J. Gen. Physiol.* **25**, 539-552.

Johnson, K. S., Childress, J. J. and Beehler, C. L. (1988a). Short-term temperature variability in the Rose Garden hydrothermal vent field, Galapagos spreading center. *Deep-Sea Res.* **35**, 1723-1744.

Johnson, K. S., Childress, J. J., Hessler, R. R., Sakamoto-Arnold, C. M. and Beehler, C. L. (1988b). Chemical and biological interactions in the Rose Garden hydrothermal vent field, Galapagos spreading center. *Deep-Sea Res.* **35**, 1723-1744.

Jones, M. L. (1981). *Riftia pachyptila* Jones: Observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos rift. *Science* **213**, 333-336.

Jones, M. L. (1988). The Vestimentifera, their biology, systematic and evolutionary patterns. *Oceanol. Acta* **8**, 69-82.

Jorgensen, P. L. (2001). Aspects of gene structure and functional regulation of the isozymes of Na,K-ATPase. *Cellular and Molecular Biology* **47**, 231-238.

Julian, D., Gail, F., Wood, E., Arp, A. J. and Fisher, C. R. (1999). Roots as a site of hydrogen sulfide uptake in the hydrocarbon seep vestimentiferan *Lamellibrachia sp.* *J Exp Biol* **202**, 2245-2257.

Karhumaa, P., Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Tapanainen, J. and Rajaniemi, H. (2001). The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11604-11608.

Karl, D. M., Wirsén, C. O. and Jannasch, H. W. (1980). Deep-sea primary productivity at the Galapagos hydrothermal vents. *Science* **207**, 1345-1347.

Khalifah, R. G. (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. Stop flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* **246**, 2561-2573.

Kimber, M. S. and Pai, E. F. (2000). The active site architecture of *Pisum sativum* beta-carbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. *Embo J* **19**, 1407-1418.

Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G. and Mees, D. C. (1996). A left-hand beta helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J.* **15**, 2323-2330.

- Klein, U., Timme, M., Zeiske, W. and Ehrenfeld, J.** (1997). The H⁺ pump in frog skin (*Rana esculenta*): identification and localization of a V-ATPase. *J. Membrane Biol.* **157**, 117-126.
- Kochevar, R. E., Govind, N. S. and Childress, J. J.** (1993). Identification and characterization of two carbonic anhydrases from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachytila* Jones. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**, 10-19.
- Kozliak, E. I., Guilloton, M. B., Fuchs, J. A. and Anderson, P. M.** (2000). Bacterial carbonic anhydrases. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 547-565.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lalou, C., Brichet, E. and Hekinian, R.** (1985). Age dating of sulfide deposits from axial and off-axial structures on the East Pacific near 12°50'N. *Earth Planet. Sci. Lett.* **75**, 59-71.
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völki, H., Waldegger, S., Gublines, E. and Haussinger, D.** (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247-306.
- Laue, B. E. and Nelson, D. C.** (1997). Sulfur-oxidizing symbionts have not co-evolved with their hydrothermal Vent tube worm hosts: an RFLP analysis. *Molec Mar Biol Biotechnol* **6**, 180-188.
- Lebovitz, R. M., Takeyasu, K. and Fambrough, D. M.** (1989). Molecular characterization and expression of the (Na-K)-ATPase α -subunit in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **8**, 193-202.
- Lee, R. W. and Childress, J. J.** (1994). Assimilation of inorganic nitrogen by marine invertebrates and their chemoautotrophic and methanotrophic symbionts. *Appl. Environment. Microbiol.* **60**, 1852-1858.
- Lee, R. W., Robinson, J. J. and Cavanaugh, C. M.** (1999). Pathways of inorganic nitrogen assimilation in chemoautotrophic bacteria-marine invertebrate symbioses: Expression of host and symbiont glutamine synthetase. *J Exp Biol* **202**, 289-300.
- Lehenkari, P. P., Hentunen, T. A., Laitala-Leinonen, T., Tuukkanen, J. and Vaananen, H. K.** (1998). Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca²⁺. *Exp. Cell Res.* **242**, 128-137.
- Lindskog, S.** (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* **74**, 1-20.
- Lonsdale, P. F.** (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Res.* **24**, 857-863.
- Lucas, J. M. and Knapp, L. W.** (1996). Biochemical characterization of purified carbonic anhydrase from the octocoral *Leptogorgia virgulata*. *Marine Biology* **126**, 471-477.
- Lucu, C.** (1989). Evidence for Cl⁻ exchangers in perfused *Carcinus* gills. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A**, 415-420.

Lutz, R. A., Shank, T. M., Fornari, D. J., Haymon, R. M., Lilley, M. D., Von Damm, K. L. and Desbruyeres, D. (1994). Rapid growth at deep-sea vents. *Nature* **371**, 663-664.

Magenheim, A. J. and Gieskes, J. M. (1992). Hydrothermal discharge and alteration in near-surface sediments from the Guaymas basin, gulf of California. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**, 2329-2338.

Manchenko, G. P. (1994). Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. London: CRC Press.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probe for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *System Appl Microbiol* **15**, 593-600.

Maren, T. H. (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.* **47**, 595-781.

Maren, T. H. and Ellison, A. C. (1967). A study of renal carbonic anhydrase. *Mol. Pharmacol.* **3**, 503-508.

Maren, T. H., Friedland, B. and Rittmaster, R. (1980). Kinetic properties of primitive vertebrate carbonic anhydrase. *Comp. Biochem. Physiol.* **67**, 69-74.

Marsh, A. G., Mullineaux, L. S., Young, C. M. and Manahan, D. T. (2001). Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **411**, 77-80.

Massoth, G. J., Butterfield, D. A., Lupton, J. E., Mc Duff, R. E., Lilley, M. D. and Jonasson, I. R. (1989). Submarine venting of phase-separated hydrothermal fluids at Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge. *Nature (London)* **340**, 702-705.

Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. W. (1933). Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *J. Physiol. (Lond)* **80**, 113-142.

Mickel, T. J. and Childress, J. J. (1982a). Effects of pressure and pressure acclimation on activity and oxygen consumption in the bathypelagic mysid *Gnathopausia ingens*. *Deep-Sea Res.* **29**, 1293-1301.

Mickel, T. J. and Childress, J. J. (1982b). Effects of temperature, pressure and oxygen concentration on the oxygen consumption rate of the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydron* (Brachyura). *Physiol. Zool.* **55**, 199-207.

Miller, A. G., Espie, G. S. and Canvin, D. T. (1991). Active CO₂ transport in cyanobacteria. *Can. J. Botany* **69**, 925-935.

Minic, Z., Simon, V., Penverne, B., Gaill, F. and Herve, G. (2001). Contribution of the bacterial endosymbiont to the biosynthesis of pyrimidine nucleotides in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*. *J Biol Chem* **276**, 23777-23784.

Minkin, C. and Jennings, J. M. (1972). Carbonic anhydrase and bone remodeling: sulfonamide inhibition of bone resorption in organ culture. *Science* **176**, 1031-1033.

Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S. and Tsukihara, T. (2000). X-ray structure of beta-carbonic

anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J Biol Chem* **275**, 5521-5526.

Mitsunaga, K., Akasaka, K., Shimada, H., Fujino, Y., Yasumasu, I. and Nuamoni, H. (1986). Carbonic anhydrase activity in developing sea urchin embryos with special reference to calcification of spicule. *Cell Differentiation* **18**, 257-262.

Montgomery, J. C., Venta, P. J., Eddy, R. L., Fukushima, Y. S., Shows, T. B. and Tashian, R. E. (1991). Characterization of the human gene for a newly discovered carbonic anhydrase, CA VII, and its localization to chromosome 16. *Genomics* **11**, 835-848.

Moran, N. A. and Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Curr Opin Microbiol* **3**, 270-275.

Nafi, B. M., Miles, R. J., Butler, L. O., Carter, N. D., Kelly, C. and Jeffery, S. (1990). Expression of carbonic anhydrase in *Neisseriae* and other heterotrophic bacteria. *J. Med. Microbiol.* **32**, 1-7.

Nelson, K. and Fisher, C. R. (2000). Absence of cospeciation in deep-sea vestimentiferan tube worms and their bacterial endosymbionts. *Symbiosis* **28**, 1-15.

Nelson, N. (1992). The vacuolar H⁺-ATPase - one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. Exp. Biol.* **204**, 25-37.

Nelson, N., Perzov, N., Cohen, A., Hagai, K., Padler, V. and Nelson, H. (2000). The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **203**, 89-95.

Parkes, J. L. and Coleman, P. S. (1989). Enhancement of carbonic anhydrase activity by erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 459-468.

Pearse, V., Pearse, J., Buchsbaum, M. and Buchsbaum, R. (1987). *Living Invertebrates: Blackwell Scientific Publications and Boxwood Press, Pacific Grove, CA, USA.* 843p.

Pochhammer, C., Dietsch, P. and Siegmund, P. R. (1979). Histochemical detection of carbonic anhydrase with diethylamino-naphthalene-5-sulfonamide. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 1103.

Pörtner, H. O., Boutilier, R. G., Tang, Y. and Toews, D. P. (1990). Determination of intracellular pH and PCO₂ after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respiration Physiology* **81**, 255-274.

Powell, M. A. and Somero, G. N. (1983). Blood components prevent sulfide poisoning of respiration of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Science* **219**, 297-299.

Pradillon, F., Shillito, B., Young, C. M. and Gaill, F. (2001). Deep-sea ecology - Developmental arrest in vent worm embryos. *Nature* **413**, 698-699.

Price, G. D. and Badger, M. R. (1991). Evidence for the role of carboxysomes in the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism. *Can. J. Botany* **69**, 963-973.

Prieur, D., Benbouzid-Rolet, N., Chamroux, S., Durand, P., Erauso, G., Jacq, E., Jeanthon, C., Mével, G. and Vincent, P. (1989). Distribution de divers types métaboliques bactériens sur un site hydrothermal profond (dorsale du Pacifique oriental à 13°N). *Cah. Biol. Mar.* **30**, 515-530.

Pruski, A. M., FialaMedioni, A., Boulegue, J. and Colomines, J. C. (1998). Sulphur-amino acids in symbiotic species from hydrothermal vents and cold seeps. *Cah Biol Mar* **39**, 321-324.

Puceat, M. (1999). pH(I) regulatory ion transporters: an update on structure, regulation and cell function. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1216-1229.

Rau, G. H. (1981). Low $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in hydrothermal vent animals: ecological implications. *Nature* **289**, 484-485.

Ravaux, J., Gay, L., Voss-Foucart, M. F. and Gaill, F. (1998). Tube growth process in the deep-sea hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila* (Vestimentifera): synthesis and degradation of chitin. *Cah Biol Mar* **39**, 99-107.

Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C. and al., e. (2001). Open reading frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17300 genes in *C. elegans*. *Nature Genetics* **27**, 332-336.

Ridderstrale, Y., Wistrand, P. J. and Tashian, R. E. (1992). Membrane-associated carbonic anhydrase activity in the kidney of CA II-deficient mice. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1665-1673.

Riestenpatt, S., Onken, H. and Siebers, D. (1996). Active absorption of Na^+ and Cl^- across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion-fluxes studies. *J. Exp. Biol.* **199**, 1545-1554.

Rouse, G. W. (2001). A cladistic analysis of Siboglinidae Caullery, 1914 (Polychaeta, Annelida): formerly the phyla Pogonophora and Vestimentifera. *Zoological Journal of the Linnean Society* **132**, 55-80

Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Haukipuro, K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kairaluoma, M. I. and Karttunen, T. J. (1998). Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* **153**, 279-285.

Sauer, G. R., Genge, B. R., Wu, L. N. and Donachy, J. E. (1994). a facilitative role of carbonic anhydrase activity in matrix vesicle mineralization. *Bone Miner.* **26**, 69-79.

Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, W. and Amann, R. (1999). In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1259-1267.

Schwartz, G. J., Olson, J., Kittelberger, A. M., Matsumoto, T., Waheed, A. and Sly, W. S. (1999). Postnatal development of carbonic anhydrase IV expression in rabbit kidney. *Amer J Physiol Renal Physiol* **45**, F510-F520.

Scott, K. M., Bright, M., Macko, S. A. and Fisher, C. R. (1999). Carbon dioxide use by chemoautotrophic endosymbionts of hydrothermal vent vestimentiferans: affinities for carbon dioxide, absence of carboxysomes, and delta C-13 values. *Mar Biol* **135**, 25-34.

Scott, K. M. and Cavanaugh, C. M. (2001). CO_2 acquisition and fixation by chemoautotrophic bacteria from hydrothermal vents and other marine habitats. In *Second International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology*, (ed. D. E. Ifremer, Brest). 8-12th October, Brest, France.

Shank, T. M., Fornari, D. J., Von Damm, K. L., Lilley, M. D., Haymon, R. M. and Lutz, R. A. (1998). Temporal and spatial patterns of biological community development at nascent deep-sea hydrothermal vents (9 degree 50'N, East Pacific Rise). *Deep-Sea Research (Part 2, Topical Studies in Oceanography)* **45**, 465-515.

Shchelkunov, S. N., Blinov, V. M., Totmenium, A. V., Marennikova, S. S., Kolykhalov, A. A. et al. (1993). Nucleotide sequence analysis of variole virus Hind III M, L, genome fragment. *Virus Research* **27**, 25-35.

Sheltar, R. E. and Towle, D. W. (1989). Electrogenic sodium-proton exchange in membrane vesicles from crab (*Carcinus maenas*) gill. *Am. J. Physiol.* **257**, R924-R931.

Shillito, B. (1994). Morphogénèse de la chitine du tube de *Riftia pachyptila*. Université Paris VI.

Shillito, B., Jollivet, D., Sarradin, P. M., Rodier, P., Lallier, F., Desbruyeres, D. and Gaill, F. (2001). Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker walls. *Marine Ecology Progress Series* **216**, 141-149.

Shively, J. M. and English, R. S. (1991). The carboxysome, a prokaryotic organelle: a mini review. *Can. J. Botany* **69**, 957-962.

Shively, J. M., van Keulen, G. and Meijer, W. G. (1998). Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *A. Rev. Microbiol.* **52**, 191-230.

Simkiss, K. and Wilbur, K. M. (1989). Biomineralization, cell biology and mineral deposition. New York: Academic Press.

Simon, V., Purcarea, C., Sun, K., Joseph, J., Frebourg, G., Lechaire, J. P., Gaill, F. and Herve, G. (2000). The enzymes involved in synthesis and utilization of carbamylphosphate in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*. *Mar Biol* **136**, 115-127.

Sly, W. and Peiyi, Y. H. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 675-401.

Somero, G. N., Siebenaller, J. F. and Hochachka, P. W. (1983). Biochemical and physiological adaptations of deep-sea animals. In *Deep-sea Biology*, (ed. G. T. Rowe), pp. 261-330. New York: John Wiley.

Southward, E. C. (1988). Development of the gut and segmentation of newly settled stages of *Ridgea* (Vestimentifera): implications for relationship between vestimentifera and pogonophora. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **68**, 465-487.

Stams, T. and Christianson, D. W. (2000). X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 159-174.

Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G. and Rees, D. C. (2001). Crystal structure of the "cab"-type beta class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem* **276**, 10299-10305.

Sugai, N. and Ito, M. (1980). carbonic anhydrase, ultrastructural localization in the mouse gastric mucosa and improvements in the technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **28**, 511-525.

Sun, B. H., Xu, P. Z., Wang, W. Y. and Salvaterra, P. M. (2001). In vivo modification of Na⁺,K⁺-ATPase activity in *Drosophila*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology* **130**, 521-536.

Swenson, E. R. (1991). Distribution and functions of carbonic anhydrase in the gastrointestinal tract. In *The Carbonic Anhydrases: cellular physiology and molecular genetics*, (ed. S. J. Dogson, Tashian, R.E., Gros, G., Carter, N.D.). New York: Plenum Press.

Swenson, E. R. (2000). Respiratory and renal roles of carbonic anhydrase in gas exchange and acid-base regulation. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 281-341.

Tashian, R. E., Hewett Emmett, D., Carter, N. and Bergenheim, N. C. H. (2000). Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. *Carbonic Anhydrases New Horizons* **90**, 105-120.

Taylor, E. W., Whiteley, N. M. and Wheatly, M. G. (1991). Respiratory gas exchange and the regulation of acid-base status in decapodan crustaceans. In *Physiological strategies for gas exchange and metabolism*, vol. 41 SEB Seminar Series (ed. M. K. G. A.J. Woakes, C.R. Bridges), pp. 79-104: Cambridge University Press.

Teicher, B. A., Liu, S. D., Liu, J. T., Holden, S. A. and Herman, T. S. (1993). A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. *Anticancer Res.* **13**, 1549-1556.

Thomas, R. C. (1989). Intracellular pH regulation and the effects of external acidification. In *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, vol. 34 SEB Seminar Series (ed. E. W. T. R. Morris, D.J.A Brown and J.A. Brown), pp. 113-124: Cambridge University Press.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-82.

Toullec, J. Y., Crozat, Y., Patrois, J. and Porcheron, P. (1996). Development of primary cell cultures from the penaeid shrimps *Penaeus vannamei* and *P.indicus*. *Journal of crustacean Biology* **16**, 643-649.

Toulmond, A., Lallier, F. H., De Frescheville, J., Desbruyères, D., Childress, J. J., Lee, R. and Sanders, N. K. (1994). Unusual carbon dioxide-combining properties of body fluids in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Deep-Sea Res.* **41**, 1447-1456.

Towle, D. W., Rushton, M. E., Heidysch, D., Magnani, J. J., Rose, M. J., Amstutz, A., Jordan, M. K., Shearer, D. W. and Wu, W.-S. (1997). Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. *Journal of Experimental Biology* **200**, 1003-1014.

Towle, D. W. and Weihrauch, D. (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *American Zoologist* **41**, 770-780.

Tunnicliffe, V. (1991). The biology of hydrothermal vents: Ecology and evolution. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **29**, 319-407.

Tunncliffe, V., McArthur, A. G. and McHugh, D. (1998). A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna. In *Advances In Marine Biology*, V, vol. 34 eds J. H. S. Blaxter A. J. Southward and P. A. Tyler), pp. 353-442. 24-28 Oval Road, London, England NW1 7DX: Academic Press Ltd.

Tureci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A. K., Shah, G. N., Grubb, J. H., Pfreundschuh, M. et al. (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7608-7613.

Ussing, H. H. (1960). Active and passive transport of the alkali metal ions. In *The Alkali Metal Ion in Biology*, eds H. H. Ussing P. Kruhoffer J. Hess and N. A. Thom), pp. 45-143. Berlin: Springer-Verlag.

Vince, J. W. and Reithmeier, R. A. F. (1998). Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger. *J Biol Chem* **273**, 28430-28437.

Vince, J. W. and Reithmeier, R. A. F. (2000). Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anion exchanger AE1. *Biochemistry Usa* **39**, 5527-5533.

Von Damm, K. L. (1990). Seafloor hydrothermal activity: black smoker chemistry and chimneys. *Ann. Rev. Earth. Planet. Sci.* **18**, 173-204.

Vrijenhoek, R. C. (2001). Molecular evolutionary studies of hydrothermal vent and cold-seep organisms. In *Second International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology*, (ed. D. E. Ifremer, Brest). 8-12th October, Brest, France.

Waheed, A., Zhu, X. L. and Sly, W. S. (1992). Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung. *J Biol Chem* **267**, 3308-3311.

Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D. and Towle, D. W. (2001). Molecular characterization of V-type H^+ -ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J Exp Biol* **204**, 25-37.

Weis, V. M., Smith, G. J. and Muscatine, L. (1989). A "CO₂ supply" mechanism in zooxanthellate cnidarians: role of carbonic anhydrase. *Marine Biology* **100**, 195-202.

Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W. R., Huss, M., Merzendorfer, H. and Zeiske, W. (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 127-135.

Wilbur, K. M. and Jodrey, L. H. (1955). Studies on shell formation. The inhibition of shell formation by carbonic anhydrase inhibitors. *Biological Bulletin* **108**, 359-365.

Wilmot, D. R. J. and Vetter, R. D. (1990). The bacterial symbiont from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is a sulfide specialist. *Mar. Biol.* **106**, 273-283.

Wistrand, P. J., Carter, N. D., Conroy, C. W. and Mahieu, I. (1999). Carbonic anhydrase IV activity is localized on the exterior surface of human erythrocytes. *Acta Physiol Scand* **165**, 211-218.

Wu, Q., Pierce, W. M. and Delamere, N. A. (1998). Cytoplasmic pH responses to carbonic anhydrase inhibitors in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium. *J Membrane Biol* **162**, 31-38.

Yancey, P. H. (2001). Water stress, osmolytes and proteins. *American Zoologist* **41**, 699-709

Yin, M., Palmer, H. R., Fyfe Johnson, A. L., Bedford, J. J., Smith, R. A. J. and Yancey, P. H. (2000). Hypotaurine, N-methyltaurine, taurine, and glycine betaine as dominant osmolytes of vestimentiferan tubeworms from hydrothermal vents and cold seeps. *Physiol Biochem Zool* **73**, 629-637.

Young, C. M., Vazquez, E., Metaxas, A. and Tyler, P. A. (1996). Embryology of vestimentiferan tube worms from deep-sea methane/sulphide seeps. *Nature* **381**, 514-516.

Yu, J., Price, G. D. and Badger, M. R. (1994). Characterization of CO₂ and HCO₃⁻ uptake during steady-state photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Pl. Physiol.* **100**, 794-800.

Zal, F., Lallier, F. H., Green, B. N., Vinogradov, S. N. and Toulmond, A. (1996a). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* .2. Complete polypeptide chain composition investigated by maximum entropy analysis of mass spectra. *J Biol Chem* **271**, 8875-8881.

Zal, F., Lallier, F. H., Wall, J. S., Vinogradov, S. N. and Toulmond, A. (1996b). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* .1. Reexamination of the number and masses of its constituents. *J Biol Chem* **271**, 8869-8874.

Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., Van Dorsselaer, A. and Childress, J. J. (1998). S-sulfohemoglobin and disulfide-exchange: The mechanisms of sulfide-binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8997-9002.

Zhao, J., Hogan, E. M., Bevensee, M. O. and Boron, W. F. (1995). Out-of-equilibrium CO₂/HCO₃⁻ solutions and their role in characterizing a new K/HCO₃⁻ co-transporter. *Nature* **374**, 636-639.

Zhu, X. L. and Sly, W. S. (1990). Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. *J. Biol. Chem.* **265**, 8795-8801.

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I : *Riftia pachyptila*, CO₂ et anhydrase carbonique

Figure 1.	Planisphère des rifts océaniques	14
Figure 2.	Cartographie des sites EPR 9°N et 13°N	15
Figure 3.	Schéma de fonctionnement des sources hydrothermales	16
<u>Tableau I.</u>	Caractéristiques physico-chimiques du fluide	17
Figure 4.	Photos National Geographics de bouquets de <i>Riftia</i>	21
Figure 5.	Schéma d'anatomie fonctionnelle de <i>Riftia</i>	22
Figure 6.	Phylogénie comparée des bactéries symbiotiques et de leur hôte	25
Figure 7.	Développement larvaire précoce de <i>Riftia pachyptila</i>	26
Figure 8.	Fonctionnement des lobules du trophosome	28
Figure 9.	Flux métaboliques d'O ₂ et CO ₂ en fonction des concentration en H ₂ S	32
Figure 10.	Utilisation du carbone par les symbiontes de <i>Riftia</i>	36
Figure 11.	Modèle physiologique de conversion du CO ₂ chez <i>Riftia</i>	38
<u>Tableau II.</u>	Expression tissulaire des gènes d' -anhydrase carbonique	42
<u>Tableau III.</u>	Alignement Clustal X des séquences d' -CA	43
Figure 12.	Structure tridimensionnelle de CA-II	43
Figure 13.	Environnement moléculaire de la poche catalytique de CA-II	44
Figure 14.	Mécanisme de transfert des protons sur le site actif de CA-II	44
Figure 15.	Comparaison des sites actifs des -CA et des -CA	46
<u>Tableau IV.</u>	Processus physiologiques impliquant l'anhydrase carbonique	48
Figure 16.	Schéma des échanges gazeux muscles-sang-poumons	49
Figure 17.	Réactions enzymatiques de carboxylation et CA	52
Figure 18.	Processus de néoglucogénèse et uréogénèse et CA	53
Figure 19.	Modèle de régulation de l'équilibre dynamique cellulaire	58
Figure 20.	Schéma des processus de diffusion et transports actifs	59
Figure 21.	Transporteurs ioniques et pH intracellulaire	60
<u>Tableau V.</u>	Inhibiteurs des transporteurs membranaires	61
Figure 22.	Structure de l'antiport Na ⁺ -H ⁺	62
Figure 23.	Modèle structural de la V-H ⁺ ATPase	62
Figure 24.	Structure d'échangeurs anioniques Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	65
<u>Tableau VI.</u>	Liste des transporteurs membranaires de HCO ₃ ⁻	65

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes d'étude

Figure 25.	Submersibles utilisés en campagnes à la mer	68
Figure 26.	Organisation du travail à bord	69
Tableau VII.	Composition chimique des milieux de culture	71
Tableau VIII.	Liste des inhibiteurs de CA et d'échangeurs ioniques	72
Figure 27.	Protocole de dissociation mécanique des bactériocytes	73
Figure 28.	Test d'inhibition sur bactériocytes et mesures ions et pH	74
Tableau IX.	Séquences des sondes ADN 16S et 18S utilisés en FISH	76
Tableau X.	Descriptif des protocoles de fixations testés à bord	77
Tableau XI.	Séquences de amorces dégénérées utilisées pour cloner la sonde CA225pb	77
Figure 29.	Protocole de marquage DIG des sondes ARN (Boehringer)	78
Figure 30.	Protocole d'extraction protéique à partir des tissus de <i>Riftia</i>	83
Figure 31.	Schéma de fonctionnement du MALDI-TOF MS	90
Tableau XII.	Séquences de amorces dégénérées utilisées en PCR	92

CHAPITRE VI : Conclusions et perspectives

Figure 32.	Arbre phylogénétique des isoformes de CA et hypothèses sur la forme ancestrale	203
Figure 33.	Ultrastructure du trophosome de <i>Riftia</i>	205
Figure 34.	Schéma du transport du CO ₂ à travers la membrane du bactériocyte	206
Figure 35.	Mécanismes d'action de AZ et BZ sur le transport du CO ₂	207
Figure 36.	Cibles membranaires du NPPB dans les bactériocytes	209
Figure 37.	Cibles membranaires de l'amiloride et effets sur le pH intracellulaire	211
Figure 38.	Modèle physiologique du transport du CO ₂ chez <i>Riftia</i>	213

ABSTRACT

The hydrothermal vent vestimentiferan tubeworm *Riftia pachyptila* consists on a very particular symbiosis model. Indeed, vestimentiferan are the only animals known to rely entirely on intracellular CO₂-assimilating and sulfo-oxidizing symbionts, remotely located from the surrounding medium, to sustain their metabolism. This suggest a complete subordination of the symbionts through their host regarding oxygen, sulfide, nitrogen and carbon, and at the opposite, the host loses its entire digestive tract and any way to ingest food, once the symbiosis becomes effective.

We investigated specifically the cellular mechanisms responsible for carbon dioxide transport and conversion needed for bacterial metabolism, at the level of the plume and the trophosome tissues in *Riftia*. Our work combined physiological and pharmacological approaches on isolated bacteriocyte suspensions with *in situ* hybridization, immunolocalization, biochemical and molecular caractérisation.

We showed that two isoforms of carbonic anhydrases (CA), related to the α -CA multigenic family, are expressed in *Riftia*. In the trophosome, both the cytosolic and the membrane-bound isoforms have been evidenced. They were co-localized with a V-H⁺-ATPase in all the symbiotic cells whereas Na⁺K⁺-ATPase occurrence were restricted to peripheric cells of the lobules. We also evidenced the responsiveness of bacteriocytes to amiloride and NPPB, inhibitors specific for sodium and chloride exchanges respectively. In the branchial plume, epithelial cells expressed only the cytosolic CA isoform, the cDNA and corresponding protein exhibiting characteristics slightly different from the trophosome cytosolic CA. The epithelial cells appeared to drive orientated ion fluxes, with a V-H⁺-ATPase on their apical side, in contact with the surrounding environment, and a Na⁺K⁺-ATPase on their basolateral side.

These results are of interest in terms of understanding the carbon-related metabolism in *Riftia pachyptila* toward the carbonic anhydrase key enzyme. They also point out the multiple interactions between ion exchanges and carbonic anhydrase activity, and provide further insights in characterization of peculiar transporters, that could be modified from those generally described in heterotrophic systems, because of the symbiotic mode of life of Vestimentiferan and their specific needs for nitrate, sulfide and carbon dioxide.

RESUME

Le vestimentifère des source hydrothermales *Riftia pachyptila* constitue un modèle de symbiose particulièrement original et quasiment unique dans le monde animal. *Riftia* est en effet à ce jour le seul organisme connu ayant développé une symbiose obligatoire avec une bactérie intracellulaire, sulfo-oxydante utilisant le CO₂ moléculaire comme source de carbone, et localisée dans un organe interne isolé de tout contact direct avec le milieu environnant. Cet état de fait suggère la dépendance totale de la bactérie symbiotique vis-à-vis de son hôte, que ce soit pour une source d'oxygène, d'énergie (H₂S), d'azote (NO₃⁻) ou de carbone (CO₂), et l'inverse est également vrai puisqu'une fois la symbiose établie, l'hôte perd toute capacité d'ingérer quelque nourriture que ce soit.

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à approfondir spécifiquement les mécanismes cellulaires liés au transport et à la conversion du CO₂ mis en place dans la branchie et le trophosome de *Riftia*, et nécessaires au métabolisme des symbiotes. Pour cela, nous avons combiné une approche cellulaire et pharmacologique sur des suspensions de bactériocytes isolés à des techniques d'hybridation in-situ, d'immunolocalisation, de biochimie et de biologie moléculaire.

Nous avons pu déterminer que *Riftia* exprime certainement deux isoformes d'anhydrases carboniques (CA) apparentées aux α -CA. Dans les lobules du trophosome, une isoforme cytoplasmique et une isoforme membranaire ont pu être mises en évidence. Un transporteur de type V-H⁺-ATPase a été co-localisé avec l'anhydrase carbonique dans toutes les cellules symbiotiques, alors que la présence de Na⁺K⁺-ATPase apparaît restreinte aux cellules les plus périphériques du lobule. Nous avons également pu mettre en évidence la sensibilité des bactériocytes à l'amiloride et au NPPB, deux inhibiteurs des échanges d'ions sodiums et chlorures respectivement. Dans l'épithélium branchial, une seule isoforme de CA cytoplasmique a pu être mise en évidence, présentant des caractéristiques légèrement différentes de celles du trophosome. L'épithélium branchial joue un rôle manifeste dans le transport orienté des ions: une V-H⁺-ATPase a été immunolocalisée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, en contact avec le milieu environnant, et une Na⁺K⁺-ATPase au niveau basolatéral.

Nos travaux ont permis d'apporter de nouvelles données sur le métabolisme du carbone chez *Riftia pachyptila* au travers d'une enzyme clé, l'anhydrase carbonique, mais également d'élargir les perspectives d'étude à la caractérisation potentielle de nouveaux transporteurs membranaires, impliqués dans des échanges ioniques particuliers liés au mode de vie symbiotique de *Riftia*.

(English version of this abstract on the inside back cover).