

Introduction

La température est un paramètre de l'environnement bien connu pour jouer un rôle important dans la répartition géographique des espèces. Au niveau des sources hydrothermales profondes, le gradient de température, dû au mélange chaotique entre l'eau de mer de fond (environ 4° C) et le fluide hydrothermal (entre 200 et 400° C) est particulièrement marqué dans l'espace et fluctuant dans le temps. Parmi les différentes espèces endémiques des sources hydrothermales de la dorsale Est Pacifique (EPR), les annélides polychètes de la famille des Alvinellidae présentent la caractéristique de coloniser les différentes « niches thermiques ». Est-il possible de mettre en évidence au niveau moléculaire une adaptation différentielle à la température entre espèces colonisant le « pôle chaud » vs. le « pôle froid » des sources hydrothermales ? La gamme de variation est-elle aussi un paramètre important ? Pour répondre à ces questions, nous avons choisi de comparer les propriétés fonctionnelles et structurales d'une globine intracellulaire provenant d'*Alvinella pompejana*, représentant du « pôle chaud » (très variable), avec son orthologue provenant de *Paralvinella grasslei*, représentant du « pôle froid » (moins variable). Les globines ont été exprimées sous formes de protéines recombinantes. Après purification, leurs propriétés de fixation de l'oxygène ainsi que leur stabilité conformationnelle ont été déterminées. L'analyse de leur structure 3D, obtenues par modélisation, doit nous permettre de rendre compte au niveau moléculaire des différences fonctionnelles et de stabilité observées.

Résultats 1 : Stabilité conformationnelle

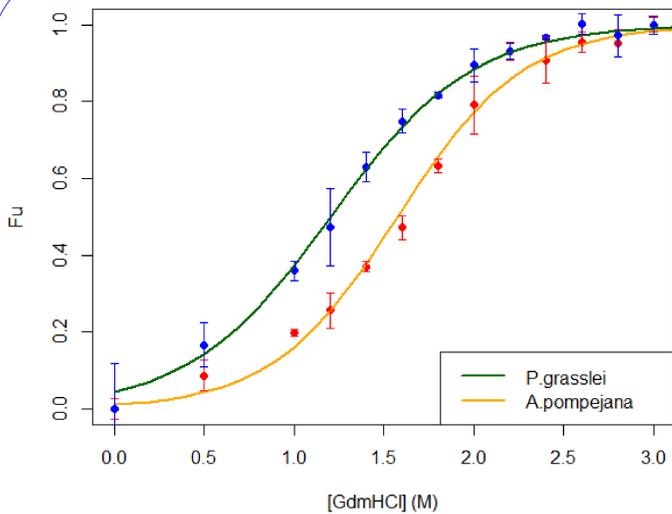


Figure 1: Fraction de protéines dénaturées en fonction de la concentration de chlorure de guanidinium, à 30° C

Après expression et purification, la stabilité conformationnelle des globines orthologues de *Paralvinella grasslei* et *Alvinella pompejana* a été déterminée. Pour ceci, la variation d'absorption de l'hème en fonction de la concentration de chlorure de guanidinium (GdmHCl) a été suivie à 409 nm et pour chaque [GdmHCl], la fraction de protéine dénaturée déterminée (cf. figure 1). Enfin, sur les points expérimentaux, nous avons ajusté une courbe d'équation (1), correspondant à un modèle de dénaturation réversible à deux états:

$$(1) f_u = \frac{\exp(-m \times (C_m/m - C)/RT)}{1 + \exp(-m \times (C_m/m - C)/RT)}$$

Les valeurs de C_m (concentration d'agent dénaturant pour obtenir 50% de forme dénaturée) et de m déduites permettent de calculer l'enthalpie libre de dénaturation en absence d'agent dénaturant ($\Delta G^{\circ}_{H_2O} = C_m \times m$) pour chacune des globines. Ces expériences ont été menées à 20, 25 et 30° C. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	20°C		25°C		30°C	
	C_m (M)	$\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ (kJ.mol ⁻¹)	C_m (M)	$\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ (kJ.mol ⁻¹)	C_m (M)	$\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ (kJ.mol ⁻¹)
<i>P. grasslei</i>	1,44 ± 0,02	11,17 ± 0,57	1,27 ± 0,01	8,74 ± 0,34	1,21 ± 0,02	8,10 ± 0,09
<i>A. pompejana</i>	1,64 ± 0,03	13,26 ± 0,26	1,49 ± 0,03	12,22 ± 1,16	1,57 ± 0,02	11,47 ± 0,13

Aux trois températures testées, 20, 25 et 30° C, la globine d'*A. pompejana* présente une stabilité conformationnelle plus importante que la globine de *P. grasslei*.

Résultats 2 : Liaison de l'oxygène

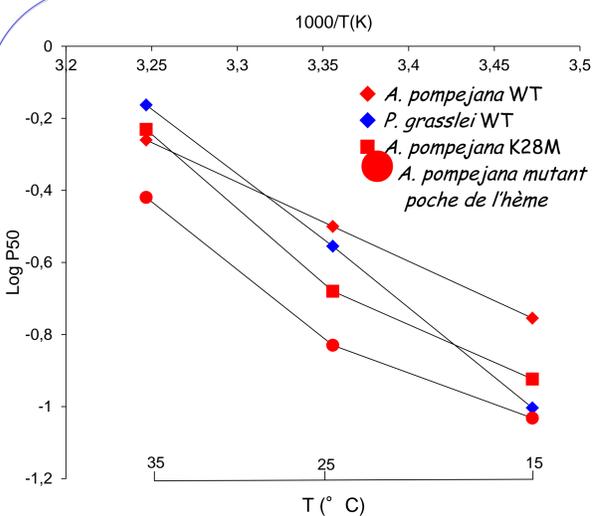


Figure 2: Représentation de Van't Hoff de l'effet de la température sur la P_{50} de globines d'*A. pompejana* (WT et mutants) et *P. grasslei*

Nous avons étudié l'affinité de l'oxygène pour chacune des globines et l'effet de la température sur cette affinité en déterminant la P_{50} , pression partielle d'oxygène pour atteindre 50% de saturation (figure 2). Ces globines ne sont pas coopératives ($n_{50} = 1$) et ne présentent pas d'effet Bohr ($\Phi = 0$). Dans ces conditions, l'enthalpie observée (ΔH_{obs}), selon la représentation de Van't Hoff (équation ci-dessous) correspond à la somme de l'enthalpie intrinsèque de liaison de l'oxygène à l'hème et de l'enthalpie de solubilisation de l'oxygène ($\Delta H_{sol,O_2} = -13$ kJ.mol⁻¹). La sensibilité à la température de la globine d'*A. pompejana* ($\Delta H = -42,8$ kJ.mol⁻¹) est très réduite par rapport à la gamme classiquement rencontrée pour les vertébrés et la plupart des autres annélides (cf. figure 3), y compris *P. grasslei*.

$$\Delta H_{obs} = 2,303R \frac{\Delta \log P_{50}}{(1/T_1 - 1/T_2)}$$

Alvinella pompejana $\Delta H_{obs} = -42,8$ kJ.mol⁻¹
Paralvinella grasslei $\Delta H_{obs} = -72,2$ kJ.mol⁻¹

La liaison de l'oxygène est plus sensible aux variations de température pour la globine de *P. grasslei* que pour celle d'*A. pompejana*

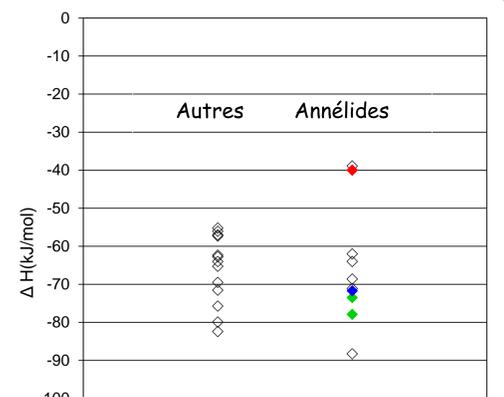


Figure 3: Enthalpie observée pour la fixation de l'oxygène aux globines, sans coopérativité et sans effet Bohr. Rouge: *A. pompejana*, Bleu: *P. grasslei*, Vert: Autres espèces d'annélides hydrothermaux.

Hypothèses structurales

Pour établir une base structurale aux différences observées (stabilité conformationnelle et liaison de l'oxygène), nous avons modélisé chacune des globines (figure 4) et identifié des remplacements de résidus potentiellement importants. Nous avons ensuite testé ces hypothèses par mutagenèse dirigée. Deux mutants de *A. pompejana* ont été réalisés : un mutant simple K28M, permettant l'élimination d'une potentielle liaison électrostatique, et un tétra mutant (I66V, V83I, L128V, et L132V) modifiant l'environnement proche de l'hème. Ces mutants ont été testés pour leur propriété de liaison de l'oxygène (cf. figure 2 & 3). Ils n'ont pas changé le comportement de la globine d'*A. pompejana* entre 15° C et 25° C mais l'enthalpie au delà de 25° C, retrouve une valeur classique pour une globine (figure 3). Ceci pourrait indiquer que nous avons bien perturbé la structure mais pas suffisamment cependant pour annihiler l'enthalpie réduite aux températures inférieures à 25° C. La stabilité conformationnelle de ces mutants doit encore être déterminée.

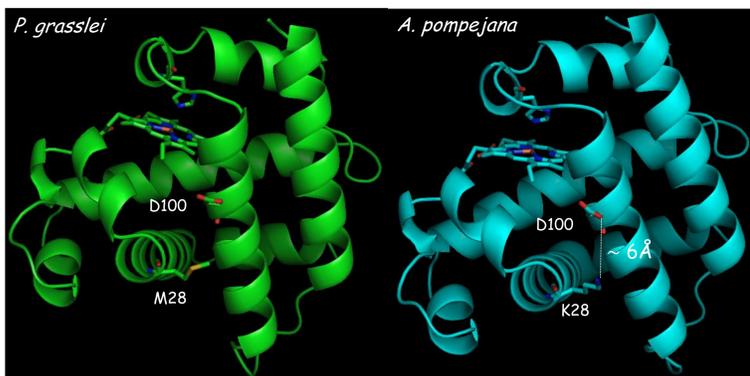


Figure 4: Modèles structuraux des globines de *P. grasslei* et *A. pompejana* (Logiciel Modeller, template déhaloperoxydase d'*Amphitrite ornata*, 1ew6, 1.78Å, identité 28%)

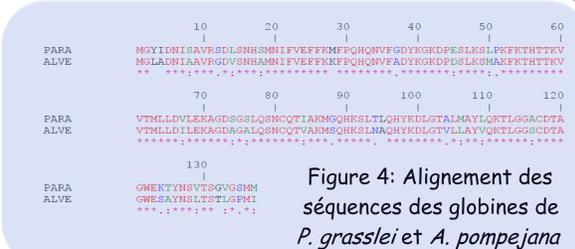


Figure 4: Alignement des séquences des globines de *P. grasslei* et *A. pompejana*

Conclusions et perspectives

Nous avons montré que la globine d'*Alvinella pompejana* présentait une stabilité conformationnelle plus élevée que son homologue chez *Paralvinella grasslei* ($\Delta \Delta G^{\circ}_{H_2O} \sim 3$ kJ.mol⁻¹). D'autre part, la liaison de l'oxygène sur la globine d'*A. pompejana* apparaît moins sensible aux variations de température que sur la globine de *P. grasslei*, i.e. $\Delta H_{obs}(Ap) < \Delta H_{obs}(Pg)$. Ces données expérimentales valident notre hypothèse : l'espèce colonisant le « pôle chaud » des sources hydrothermales, *A. pompejana*, présente au niveau de ses protéines une adaptation à la température, comparativement aux protéines orthologues de l'espèce colonisant le « pôle froid », *P. grasslei*. Il nous reste à identifier les résidus impliqués dans cette stabilité conformationnelle accrue. Concernant la liaison de l'oxygène sur la globine d'*A. pompejana*, la diminution de sensibilité thermique pourrait être due à la formation de dimères, sans toutefois engendrer de coopérativité. Nous allons créer un nouveau mutant qui affectera cette fois-ci un groupe d'acides aminés situés en surface de la globine et tester si l'enthalpie de la molécule résultante est dans la gamme normale pour une globine.