

APPROCHE GÉNOMIQUE DE L'ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE DE L'ANÉMONE TEMPÉRÉE *ANEMONIA VIRIDIS*

D. Allemand^{1,2}, C. Ferrier-Pagès¹, E. Kulhanek^{1,2}, D. Zoccola¹, C. Sabourault², E. Tambutté¹, S. Tambutté^{1*}, D. Zoccola¹

¹ Centre Scientifique de Monaco, Monaco - * stambutte@centrescientifique.mc

² UMR 1112 UNSA-INRA, Faculté des sciences, Parc Valrose, Nice, France

Résumé

La plupart des Cnidaires possèdent des symbiotes intracellulaires photosynthétiques les obligeant à vivre dans la zone côtière où ils sont soumis aux radiations solaires et aux influences anthropiques. Une approche génomique de la régulation de l'expression des gènes d'*Anemonia viridis*, nous a permis de déterminer les mécanismes d'adaptation de cet organisme aux conditions hypoxiques nocturnes. Une banque soustractive d'ARNm (nuit-jour) et une puce ont été réalisées. Les résultats de l'hybridation entre la puce et des populations d'ADNc exprimés le jour ou la nuit permettent d'envisager d'utiliser cet outil pour l'étude de la réaction de ces organismes aux différents stress environnementaux.

Mots clés : génomique – hypoxie – cnidaire – adaptation

Introduction

Les Cnidaires constituent un embranchement important d'animaux marins, appartenant aux Radiaires et considérés comme les premiers Métazoaires (Eumétazoaires, diploblastes) apparus il y a environ 600 millions d'années. Leur étude présente donc un grand intérêt du point de vue de l'évolution et de la biologie du développement. De plus, la plupart de ces organismes vivent en symbiose avec des algues intracellulaires, qui en réalisant la photosynthèse produisent de grandes quantités d'oxygène durant la journée (60 % de saturation en O₂ des tissus après seulement 20 minutes d'éclairement). Au contraire, durant la nuit, la respiration combinée des deux partenaires conduit à une situation d'hypoxie voire d'anoxie (1). La présence des symbiotes photosynthétiques oblige ces organismes à vivre dans la zone côtière, les soumettant ainsi à la fois aux radiations solaires et aux influences anthropiques.

La grande résistance des Cnidaires aux variations d'oxygène et leur simplicité d'organisation par rapport aux mammifères en font un bon modèle d'étude afin de mieux comprendre les phénomènes d'adaptation des tissus aux variations d'oxygène. Pour connaître les gènes impliqués dans la résistance des Cnidaires aux stress oxygènes, nous avons réalisé, sur l'anémone de mer méditerranéenne *Anemonia viridis*, une banque soustractive entre les ARNm exprimés la nuit et ceux exprimés le jour. Nous présentons les résultats préliminaires obtenus à partir de l'exploitation de cette banque.

Matériel et méthodes

Modèle biologique

Notre modèle d'étude, *Anemonia viridis*, est élevé en aquarium, dans nos laboratoires, à une température de 17°C ± 0,5. Cette anémone de mer est la plus commune en Méditerranée. Cet Actiniaire, pouvant atteindre 15 cm de hauteur, vit sur les fonds rocheux des zones bien éclairées. La paroi de l'animal est composée de 2 feuillets épithéliaux, l'ectoderme et l'endoderme, séparés par une couche acellulaire, la mésoglée. C'est au niveau de l'endoderme que sont localisées les zooxanthelles, symbiotes photosynthétiques et intracellulaires, à l'origine des variations journalières de la concentration en O₂ au sein des tissus.

Construction d'une banque soustractive

Les anémones sont soumises à un cycle nuit/jour de 12 heures à l'aide de lampes HQI-TS 400 W (Philips) fournissant une intensité lumineuse de 250 mmol m⁻² s⁻¹. Deux populations d'ARNs ont été extraites, soit à l'obscurité (ARNs Nuit) soit à la lumière (ARNs Jour). La banque soustractive a ensuite été réalisée en suivant les instructions du fournisseur (Clontech PCR-select™ cDNA subtraction kit). L'efficacité de la soustraction est analysée par l'amplification d'un fragment du gène d'actine. La PCR est réalisée soit sur ADNc total, soit après soustraction et ceci après 18, 23, 28 ou 35 cycles d'amplification.

Résultats

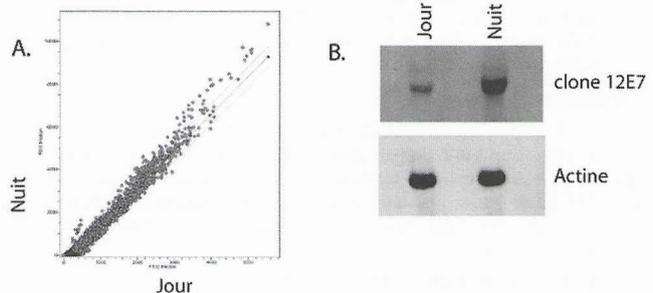
Préparation et hybridation d'une puce ADN

Environ 1000 fragments d'ADNc issus de cette banque ont été isolés, amplifiés et déposés sur lames de verre. Un contrôle de la qualité du dépôt a été réalisé par coloration des lames au Vistagreen (Molecular Probes). Les puces ont ensuite été hybridées en utilisant comme

sondes des populations d'ADNc de nuit et de jour marquées avec deux fluorochromes différents (CyScribe First-Strand cDNA labelling kit). Chaque clone de la banque a été déposé en duplicat sur trois blocs différents de la même lame. Un swap (inversion des marquages) permet de corréler l'expression de chaque clone en s'affranchissant de la qualité du marquage.

Sélection des clones d'intérêt

Une des lames hybridées avec des sondes d'ADNc de jour marquées au Cy3 et de nuit marquées au Cy5 a été analysée. Le graphique représente l'intensité d'hybridation de chaque clone, mesurée à 635 nm (Nuit) en fonction de celle mesurée à 532 nm (Jour) (Figure 1A). Ainsi, des clones situés au-dessus de la droite [Nuit=Jour] sont surexprimés la nuit. Certains de ces clones sont ensuite utilisés comme sonde sur northern blot pour valider la surexpression des gènes ainsi sélectionnés. Par exemple le clone 12E7 est 3,2 fois plus exprimé la nuit que le jour alors que le contrôle actine est exprimé de la même façon (logiciel NIH image) (Figure 1B).



Conclusion

La compréhension des mécanismes d'adaptation des organismes aux variations d'oxygène est un enjeu fondamental et appliqué important tant en ce qui concerne l'hypoxie que l'hyperoxie (traitement à l'oxygène, ischémie - reperfusion, cancérologie...). L'étude d'organismes simples a souvent été le point de départ vers la découverte de nouveaux mécanismes, de voies métaboliques ou régulatrices originales, de protéines ou de gènes non encore caractérisés chez les Vertébrés (œuf d'oursin, *C. elegans*...). L'étude des Cnidaires, qui constituent les premiers véritables Métazoaires (Eumétazoaires), est incontournable. Ici, nous avons utilisé la particularité que présentent ces organismes à résister de façon naturelle à l'hypoxie et aux variations hypoxie / hyperoxie. Les résultats obtenus démontrent la faisabilité d'utiliser ces organismes pour étudier le transcriptome au cours d'épisode hypoxique naturel. Cette approche expérimentale facilite considérablement l'étude d'un organisme dont le génome est encore quasiment inconnu. Ces résultats constituent une première application de la génomique sur un organisme marin, et permettent d'envisager d'utiliser cet outil pour l'étude de la réaction de ces organismes aux différents stress environnementaux.

Références

1 - Richier S., Merle P. L., Furla P., Pigozzi D., Sola F. and Allemand D., 2003. Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1621: 84-91.