

Biologie et pathologie animale/ animal biology and pathology

Acide diaminopimélique libre des bivalves symbiotiques

Free diaminopimelic acid in symbiotic bivalves

Patrick Albéric, Laboratoire de Géochimie organique (CNRS, URA 724 & FR 09),  
Université d'Orléans, 45067 Orléans cedex 2, France.

téléphone: 38 41 73 10

télécopie: 38 41 73 08

Aline Fiala-Médioni, Observatoire océanologique de Banyuls (CNRS, URA 117),  
Université P&M Curie, 66650 Banyuls-sur-mer, France.

Jacques Boulègue, Laboratoire de Géochimie et Métallogénie (CNRS, URA 1762),  
Université P&M Curie, 75005 Paris, France.

titre courant: Acide aminé bactérien des bivalves symbiotiques

## RESUME

L'analyse de la composition en acides aminés libres des tissus de plusieurs bivalves symbiotiques provenant des sites hydrothermaux sous-marins des Galapagos, de la fosse du Japon ou du prisme d'accrétion de la Barbade montre la présence de quantités parfois très importantes d'acide diaminopimélique. Ce composé d'origine bactérienne témoigne de la présence des bactéries symbiotes et des échanges entre l'hôte et les bactéries. Les différences notées entre les espèces de bivalves peuvent refléter à la fois la variation taxinomique entre les souches bactériennes, et la nature ou l'intensité différente des échanges bactéries-hôte. La variation entre les individus peut refléter les différences micro-environnementales affectant l'état physiologique des bivalves.

Mots clés: acide diaminopimélique, bivalves symbiotiques.

## ABSTRACT

Free amino acids were analyzed in tissues of symbiotic bivalves from hydrothermal vent sites at Galapagos Rift, and cold-seeps in Japan trench and Barbados subduction area. Diaminopimelic acid (a fragment of the bacterial cell wall mureid complex) is, in some cases, one of the most abundant compounds. Its presence in the tissues of the bivalves is related to exchanges between host and symbionts. Diaminopimelate concentration differences among species may correspond to both taxonomic bacterial differences and different carbon translocation processes from bacteria to host. Variation among individuals may correspond to fluctuation of micro-environmental conditions.

Key words: diaminopimelic acid, symbiotic bivalves.

Note présentée par Lucien Laubier

Note remise le 12 juillet 1995, acceptée après révision le 11 septembre 1995

L'importance des relations symbiotiques entre bactéries chimiolithotrophes et invertébrés est une caractéristique essentielle des écosystèmes marins liés aux émergences hydrothermales ou aux suintements froids [1, 2]. Une place importante y est souvent occupée par des bivalves de grande taille [3, 4], chez qui les endosymbiontes bactériens sont localisés dans les branchies [5- 7]. Des composés aminés très singuliers (soufrés ou phosphorylés), probablement en relation avec l'état symbiotique des bivalves, ont été signalés dans les tissus de Calypogena [8]. Le pool d'acides aminés libres extrait des tissus révèle également la présence d'un composé typiquement bactérien (l'acide diaminopimélique) dont la teneur chez plusieurs espèces du genre Calypogena et chez Bathymodiolus thermophilus fait l'objet de cette note.

## **Matériels et méthodes**

Les spécimens de C. magnifica et B. thermophilus ont été récoltés sur deux sites hydrothermaux des Galapagos : "Rose Garden" et "Mussel Bed" entre 2450 et 2500 m de profondeur. Les spécimens de C. phaseoliformis ont été récoltés par 4000 m de profondeur dans le fosse du Japon (programme Kaiko) et ceux de C. sp. au niveau du prisme d'accrétion de la Barbade. Les tissus ont été disséqués et congelés à bord puis lyophilisés.

### **Acides aminés libres dans les tissus**

La fraction soluble dans l'éthanol à 70% a été extraite au broyeur de Potter à 0°C, à partir d'environ 10 mg de tissus. L'extrait est ensuite successivement filtré, porté à sec, repris par 1 ml de tampon (citrate de Na) à pH 2 et filtré à nouveau avant d'être analysé (autoanalyseur Beckman 118 BL, détection à la ninhydrine à 570 et 440 nm). Pour l'acide diaminopimélique (élution entre valine et méthionine), le rapport des absorbances à 570 et 440 nm (4 pour ce composé et normalement 10 pour la plupart des autres acides aminés) permet de conforter la détermination qui ordinairement repose sur la comparaison des temps de rétention avec ceux des témoins. Cependant, compte-tenu de l'abondance des composés peu communs déjà rencontrés dans ce type d'extrait [8] et des informations spécifiques pouvant être attachées à la présence de

l'acide diaminopimélique, la détermination a été confirmée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS) de la fraction correspondante, recueillie en sortie de la colonne de l'analyseur d'acides aminés. Après élimination du citrate de sodium (par passage sur une résine échangeuse de cations Dowex 50 W, forme H<sup>+</sup>, et élution par de l'ammoniaque 1,5 N), le di-méthyl ester, di-N-diméthyleaminométhylène du composé recherché a été formé et étudié selon Thenot et Horning [9] (Fig. 1).

## Résultats

### Acides aminés libres totaux

La teneur totale en "acides aminés libres" (ensemble des composés extraits réagissant à la ninhydrine) des tissus des spécimens étudiés varie entre 230 et 1200  $\mu$ moles/g (Tableau 1). Bien que l'analyse de l'ensemble des acides aminés individuels présents dans les extraits des tissus sorte du cadre de cette note et ne soit pas présentée en détail, les observations générales suivantes peuvent être rapportées. Chez *Calypptogena*, certains composés représentent à eux seuls une part très importante du total. C'est le cas de la glycine, de composés aminés soufrés (thiotaurine et taurine) et de composés phosphorylés qui, ensemble, représentent couramment près de 75% du total. La variation des teneurs totales étant pour une large part due aux variations de ces seuls composés. Chez *B. thermophilus*, certains des composés déjà cités, plus d'autres non déterminés, dominent également l'ensemble des composés aminés, mais dans une moindre proportion.

### Acide diaminopimélique

Chez *C. magnifica* l'acide diaminopimélique représente une fraction importante de la totalité des composés aminés extraits (jusqu'à 17% dans les branchies, voir tableau). Le spectre de masse (Figure 1) obtenu à partir du dérivé du composé isolé des branchies confirme ce résultat. L'acide diaminopimélique n'est cependant pas confiné aux branchies, même si chez le spécimen étudié en totalité, les teneurs y sont plus fortes que dans les autres tissus, en particulier par rapport aux gonades. Pour l'espèce provenant de la Barbade, les teneurs en acides aminés sont globalement plus faibles. Le diaminopimélate ne représente que 1 ou 2% du total dans les

branchies, les teneurs les plus élevées s'observent au niveau du pied et des viscères, où elles peuvent représenter 9% du total.

Chez *C. phaseoliformis*, le diaminopimélate est présent seulement en faibles quantités ( $< 0,1 \mu\text{moles/g}$ ), réparties dans l'ensemble des tissus.

Chez *Bathymodiolus thermophilus*, le composé n'a pas été détecté.

## Discussion

Si la présence d'acide diaminopimélique paraît bien démontrée, l'interprétation des variations selon les espèces, les spécimens ou les organes considérés est difficile car encore trop d'inconnues régissent ces associations symbiotiques. Dans le cadre de cette brève étude comparative, la discussion peut porter sur la taxinomie générale des bactéries, leur activité et le niveau des échanges avec les bivalves. Dans cette perspective, il peut être utile de rappeler les points suivants.

L'acide diaminopimélique est un composé spécifique de la paroi de nombreux procaryotes et en particulier de la quasi totalité des bactéries à Gram négatif [10]. Il entre dans la composition du polymère rigide de la paroi - le peptidoglycane - constitué de chaînes polyosidiques liées par des ponts peptidiques. Plusieurs structures du peptidoglycane (différentes par le type de pontage et la composition en acides aminés) ont été décrites chez les divers groupes taxinomiques bactériens [10, 11]. Un polymère d'un type donné comprend cependant divers fragments (muropeptides) qui se distinguent par le nombre d'acides aminés et le nombre de ponts. La teneur de la paroi en peptidoglycane ainsi que la proportion des différents fragments peut varier en fonction de la vitesse de croissance des organismes [12, 13]. Le diaminopimélate libre contenu dans le pool intracellulaire des bactéries constitue un précurseur des muropeptides de la paroi, sa teneur sous forme libre peut varier en fonction des souches, du milieu et des conditions de croissance des bactéries [14]. La libération de fragments muropeptidiques dans le milieu peut également accompagner la croissance bactérienne, une certaine capacité de recyclage des fragments existant chez les bactéries à Gram négatif [15].

De ce qui précède, il ressort que bien qu'une information relative aux biomasses bactériennes ne puisse être déduite de nos analyses, le diaminopimélate libre dans le pool intracellulaire ou le milieu extérieur n'en reste pas moins un précurseur (ou un produit de lyse) des muropeptides de la paroi et peut, en revanche, renseigner sur l'activité des bactéries et sur les modalités des échanges avec le bivalve. En ce qui

concerne le groupe des bactéries auquel semblent appartenir tous les symbiontes des invertébrés hydrothermaux étudiés [16, 17, 18], une grande uniformité dans la composition du peptidoglycane est rapportée [10, 11]. Les différences observées entre les bivalves ne peuvent donc probablement pas relever de types de peptidoglycan fondamentalement différents. Certaines différences génétiques, capables d'altérer l'incorporation et le recyclage du diaminopimélate sont cependant connues pour entraîner des variations de concentration dans le milieu de culture [14, 19]. Toutes les études ont jusqu'à présent montré la spécificité des associations symbiotiques et le caractère invariant des symbiontes pour une espèce donnée de bivalves [16, 20]. Les différences observées entre les différentes espèces de bivalves pourraient ainsi correspondre à des variations portant sur le recyclage des fragments mucopeptidiques par des souches bactériennes différentes.

Chez Calyptogena, la présence du diaminopimélate dans les branchies et les autres tissus (dépourvus de bactéries) illustre, à l'évidence, l'importance des échanges entre les bactéries et l'hôte. Les écarts observés entre les espèces dépassent largement les différences entre individus et peuvent correspondre à des différences réelles concernant l'activité des bactéries ou le niveau des échanges trophiques, comme par exemple les différences d'adaptation structurale du tube digestif peuvent le suggérer [21]. Des différences portant sur les capacités de dégradation du composé par l'hôte peuvent également être envisagées.

Chez B. thermophilus (et chez d'autres espèces du même genre [22]), l'absence du composé dans les tissus pourrait être liée aux différences d'adaptations structurales caractérisant les deux familles de bivalves [23]. Une forte activité lysosomique rapportée aux potentialités de digestion des bactéries symbiontes est cependant observée dans les deux cas [24].

Compte tenu du nombre limité de spécimens étudiés par espèce (et par site), l'hypothèse d'une relation entre la teneur en diaminopimélate des individus et leur conditions de vie ne peut être qu'évoquée. Un grand nombre de paramètres caractéristiques des conditions physiologiques des individus (en particulier l'abondance des symbiontes) et de leur habitat serait nécessaire pour poursuivre ce type d'étude [25]. On peut cependant noter que la faible variation du diaminopimélate observée chez les spécimens des Galapagos concorde avec les conclusions de l'étude de Fisher et al. [25] concernant la variation chez C. magnifica, tandis que la variation plus importante chez les spécimens de la Barbade pourrait correspondre à des micro-environnements plus variables (traduits par exemple par la variation importante des

teneurs des tissus en soufre et en phosphore, ainsi qu'en taurines et en composés phosphorylés, résultats non figurés).

## Conclusion

Bien que présentant toutes un degré élevé d'association symbiotique avec des bactéries, les différentes espèces de bivalves étudiées présentent des teneurs très variables en diaminopimélate. Dans l'état actuel de la connaissance de ces associations symbiotiques, plusieurs hypothèses peuvent être invoquées. S'il est confirmé que les symbiontes bactériens appartiennent bien tous au même groupe taxinomique général, les différences pourraient résulter: de variations entre souches concernant la synthèse de la paroi, de capacités différentes des bivalves concernant la dégradation du composé, ou de manière plus générale, des caractéristiques régissant les relations trophiques de chaque association symbiotique.

En ce qui concerne la variation entre spécimens d'une même espèce, il pourrait être intéressant d'analyser les relations entre la teneur en diaminopimélate des tissus et les variations de l'état physiologique des individus en rapport avec les microvariations de leur habitat.

Remerciements : les échantillons prélevés aux Galapagos ont été obtenus grâce à J. J. Childress et C. Fisher à bord de l'Atlantis II et de l'Alvin (mission GALAPAGOS 88).

## ABRIDGED VERSION

Bivalve molluscs are pre-eminent inhabitants of deep-sea hydrothermal or cold seep ecosystems. They are known to rely on symbiotic associations with chemoautotrophic or methanotrophic bacteria housed in their gills. Dissolved compounds in cells or tissues like free amino acids may inform about the functioning of the association.

Ninhydrine reactive compounds were analyzed in cold ethanol extracts of ice-dried tissues of specimens of the genus Calypptogena collected from the Galapagos hydrothermal vent site and the subduction areas of Japan and Barbados, plus specimens of Bathymodiolus thermophilus from Galapagos. Total amino compound concentrations range between 300 and 1200  $\mu$ moles/g. Concentrations up to 80  $\mu$ moles diaminopimelic acid/g were found in the gills of C. magnifica. Confirmation of the determination of diaminopimelic acid was made by gas chromatography-mass spectrometry of the N-dimethylaminomethylene methyl ester (N-DMAM-ME) derivative. Nearly equal values were recorded in the other body parts, with the

smaller found in gonads. The species from Barbados has less diaminopimelate (maximum value: 4  $\mu$ moles/g in the foot) and larger variation among individuals. Only trace amounts were observed in C. phaseoliformis and the compound was not detected in B. thermophilus. Diaminopimelic acid is a fragment of the peptidoglycan of the bacterial cell wall. Types of peptidoglycan are known to have taxonomic implications, all Gram-negative Eubacteria belonging to a unique group. Since, so far studied vent invertebrate-bacterial endosymbionts (although species specific) belong to a closed subdivision of Proteobacteria (which includes most of common Gram-negatives), differences in diaminopimelate concentrations among bivalve species would not likely result from fundamentally different types of bacterial peptidoglycan. On the other hand, differences in concentration may depend on variation of diaminopimelic acid uptake and recycling by the different symbiont strains or may result from different ways of host-bacteria trophic exchanges. Similarity of lysosomic digestion is however observed, despite differences in structural adaptations of the digestive tract or location of bacteria in the gills.

Variation among specimens of the same species may correspond to different physiological status thrived by contrasted micro-environments. For C. magnifica on the Galapagos Rift, little variation was noticed for most parameters as for diaminopimelic acid. On the contrary, variation (including S and P contents of the tissues, results not shown) seems more important for Barbados specimens.

In conclusion, by pointing out differences among species and among individuals, diaminopimelic acid may be a master compound for the study of the relationships between bacterial symbionts and host.



## RÉFÉRENCES

1. Jannasch H. W, Mottl M. J. 1985. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. Science 229: 717-725.
2. Fiala-Médioni A., Felbeck H. 1990. Autotrophic processes in invertebrates nutrition: bacterial symbiosis in bivalve molluscs. In: Mellinger J., ed. Animal Nutrition and Transport Processes. 1. Nutrition in Wild and Domestic Animals, In: Kine R. K. H., Kinne-Saffran E., Beyenbach K. W., eds. Comparative Physiology. Basel: Karger, 5:49-69.
3. Hessler R. R., Smithey Jr W. M. 1983. The distribution and community structure and megafauna at the Galapagos Rift hydrothermal vents. In: Hydrothermal Processes at Seafloor Spreading Centers, P. A. Rona, K. Bostrom, L. Laubier, K. L. Smith Jr, Eds. New-York: Plenum Press, 735-770.
4. Sibuet M., Juniper S. K., Pautot G. 1988. Cold-seep benthic communities in the Japan subduction zones: geological control of community development. J. Mar. Res. 46: 333-348.
5. Cavanaugh C. M. 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. Nature 302: 58-61.
6. 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. 298: 487-92.
7. Boulègue J., Benedetti E. L., Dron D., Mariotti A., Letolle R. 1987. Geochemical and biogeochemical observations on the biological communities associated with fluid venting in Nankai Trough and Japan Trench subduction zones. Earth Planet. Sci. Lett. 83: 343-355.
8. Albéric P., Boulègue J. 1990. Unusual amino compounds in the tissues of Calyptogena phaseoliformis (Japan Trench): possible link to symbiosis. Prog. Oceanog. 24:89-101.

9. Thenot J. P., Horning E. C. 1972. Amino acid N-dimethylaminomethylene alkyl esters. New derivatives for GC and GC-MS studies. Analytical Letters 5: 519-529.
10. Schleifer K. H., Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36: 407-477.
11. Kandler O. 1982. Cell wall structures and their phylogenic implications. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3: 149-160.
12. Mengin-Lecreulx D., van Heijenoort J. 1985. Effect of growth conditions on peptidoglycan content and cytoplasmic steps of its biosynthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 163: 208-212.
13. Tuomanen E., Cozens R. 1987. Changes in peptidoglycan composition and penicillin-binding proteins in slowly growing Escherichia coli. J. Bacteriol. 169: 5308-5310.
14. Wientjes F. B., Pas E., Taschner P. E. M., Woldringh C. L. 1985. Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different Escherichia coli strains. J. Bacteriol. 164: 331-337.
15. Goodell E. W. 1985. Recycling of murein by Escherichia coli. J. Bacteriol. 163: 305-310.
16. Distel D. L., Lane D. J., Olsen G. J., Giovannoni S. J., Pace B., Pace N. R., Stahl D. A., Felbeck H. 1988. Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. J. Bacteriol. 170: 2506-2510.
17. Lane D. J., Harrison A. P. Jr, Stahl D., Pace B., Giovannoni S. J., Olsen G. J., Pace N. R. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. J. Bacteriol. 174: 269-278.
18. Distel D. L., Cavanaugh C. M. 1994. Independant phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. J. Bacteriol. 176, 1932-1938.
19. Prats R., de Pedro M. A. 1989. Normal growth and division of Escherichia coli with a reduced amount of murein. J. Bacteriol. 171: 3740-3745.

20. Distel D. L., Felbeck H., Cavanaugh C. M. 1994. Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbionts and their bivalves hosts. J. Mol. Evol. 38: 523-542.
21. Le Pennec M., Fiala-Médioni A. 1988. The role of the digestive tract of Calyptogena laubieri and Calyptogena phaseoliformis, vesicomid bivalves of the subduction zones of Japan. Oceanol. Acta 11: 193-199.
22. Pranal V., Fiala-Médioni A., Colomines J. C. 1995. Amino acid related compound composition in two symbiotic mytilid species from hydrothermal vents. Mar. Ecol. Prog. Ser. 119: 155-166.
23. Fiala-Médioni A., Le Pennec M. 1987. Trophic structural adaptations in relation to the bacterial association of bivalve molluscs from hydrothermal vents and subduction zones. Symbiosis 4: 63-74.
24. Fiala-Médioni A., Michalski J.-C., Jollès J., Alonso C., Montreuil J. 1994. Lysosomic and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. C. R. Acad. Sci. Paris 317: 239-44.
25. Fisher C. R., Childress J. J., Arp A. J., Brooks J. M., Distel D. L. Dugan J. A., Felbeck H., Fritz L. W., Hessler R. R., Johnson K. S., Kennicutt II M. C., Lutz R. A., Macko S. A., Newton A., Powell M. A., Somero G. N., Soto T. 1988. Variation in the hydrothermal vent clam, Calyptogena Magnifica, at the Rose garden on the Galapagos spreading center. Deep-Sea Res. 35: 1811-1831.

Légende de la figure:

Figure 1. Chromatogramme (détecteur à piégeage d'ions, masse 328) du composé isolé des branchies de C. magnifica (fraction correspondant à l'acide diaminopimélique à l'autoanalyseur d'acides aminés) après réaction avec le mélange 1:1 diméthylformamide diméthylacétal (Pierce Methyl-8® Concentrate): acétonitrile. Colonne capillaire CP Sil 5 CB, 30 m, température initiale 130° C, gradient 3°/minute. Encadré : spectres de masse des composés élués vers 37 minutes dans le cas de l'extrait de branchies (haut) et du standard (Calbiochem®) (bas). Le pic de base apparaît à m/z 128, l'ion moléculaire à m/z 328 correspond au di-méthyll ester, di-N-diméthylaminométhylène de l'acide diaminopimélique.

Figure 1. Chromatogram (ion-trap detector, mass 328) of diaminopimelic acid-di-N-DMAM-diME formed by reaction of the 1:1 mixture dimethylformamide dimethylacetal:acetonitrile with the compound extracted from C. magnifica (gill) and preliminary isolated by ion-exchange with the amino acid autoanalyser. Capillary column CP Sil 5 CB, 130°C-3°/min. Inset: mass spectrums of the compounds eluted at 37 minutes for the gill extract (top) and the standard (foot). Base peak is at m/z 128 and parent ion at 328.

Tableau 1

Teneurs des tissus en composés aminés extractibles (somme des composés détectés par réaction à la ninhydrine) et en diaminopimélate libre ( $\mu\text{moles/g}$ ; poids sec).

Free diaminopimelic acid and total amino compounds in ethanol extracts (dry weight).

	Diaminopimélate ( $\mu\text{moles/g}$ )	Total des composés aminés ( $\mu\text{moles/g}$ )
<u>Calyptogena magnifica</u> (Galapagos)		
branchies (n=4)	74* (10)**	714* (195)**
gonade	31	1208
manteau	56	777
reste	74	907
<u>Calyptogena sp</u> (Barbade)		
branchies (n=4)	0,7* (0,7)**	439* (231)**
pied (n=4)	2,4* (1,5)**	429* (131)**
muscle	1,4	583
manteau	0,8	299
viscères	3,0	337
<u>C. phaseoliformis</u> (fosse du Japon)		
branchies	tr	491
pied	tr	1258
manteau	tr	702
viscères	tr	1103
<u>Bathymodiolus thermophilus</u> (Galapagos)		
branchies		
manteau	nd	759
reste	nd	563
	nd	529

tr : traces, nd : non détecté, \* : moyenne, \*\* : écart type ( $\sigma$ ).

