

Les pigments respiratoires de la faune inféodée à l'hydrothermalisme océanique profond

Pigments respiratoires
Hydrothermalisme profond
Alvinella pompejana
Calyptogena magnifica
Riftia pachyptila

Respiratory pigments
Deep hydrothermalism
Alvinella pompejana
Calyptogena magnifica
Riftia pachyptila

André TOULMOND ^a, Jacques de FRESCHVILLE ^b, Marie-Hélène FRISCH ^b,
Claude JOUIN ^b

^a Laboratoire de Biologie et de Physiologie Marines, Université Pierre et Marie Curie, 4
place Jussieu, 75252 Paris Cedex 5, France

^b Station biologique de Roscoff, Centre d'Océanographie et Biologie Marine (CNRS),
29211 Roscoff, France.

RÉSUMÉ

Des représentants des deux principales classes de pigments respiratoires circulants (pigments héminiques et hémocyanines) ont été mis en évidence chez quatre espèces caractéristiques des biocénoses liées à l'hydrothermalisme océanique profond. Il s'agit de l'hémoglobine du bivalve *Calyptogena*, des érythrocrurines de l'annélide polychète *Alvinella* et du vestimentifère *Riftia*, de l'hémocyanine du crabe *Bythograea*. Cet article résume l'ensemble des données actuellement disponibles concernant la structure moléculaire de ces pigments et leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles (fixation et transport de l'oxygène, des sulfures et du dioxyde de carbone). Les érythrocrurines de *Riftia* apparaissent comme les plus originaux de ces pigments. Il semble en effet qu'elles soient capables de véhiculer en même temps, fixés en deux sites distincts de leur molécule, l'oxygène et les sulfures nécessaires au métabolisme des bactéries symbiotes contenues dans le trophosome de l'animal.

Oceanol. Acta, 1988. Actes du Colloque Hydrothermalisme, Biologie et Écologie, Paris, 4-7 novembre 1985, 195-202.

ABSTRACT

Respiratory pigments from hydrothermal vent animals

Examples of the two main classes of circulating respiratory pigments (heme pigments and hemocyanins) have been found in four typical members of the deep-sea hydrothermal vent communities. The studies now in progress concern the hemoglobin of the clam *Calyptogena*; the erythrocrurins of the polychaete annelid *Alvinella* and of the vestimentiferan tube worm *Riftia*; and the hemocyanin of the crab *Bythograea*. This paper summarizes the available data of the molecular structure of these pigments and on the functional properties allowing some of them to fix and transport oxygen, sulphide and carbon dioxide. The erythrocrurins of *Riftia* are the most conspicuous of these respiratory proteins since they seem to be able to carry oxygen and sulphide simultaneously, these substances being fixed at two different sites of the pigment molecule.

Oceanol. Acta, 1988. Hydrothermal, Biology and Ecology Symposium, Paris, 4-7 November 1985, Proceedings, 195-202.

INTRODUCTION

Des biocénoses inattendues, remarquables par leur richesse et leur complexité, ont été découvertes récemment, vers 2500 m de profondeur, autour des sources hydrothermales de la dorsale océanique (Corliss *et al.*, 1979). L'étude de

ces écosystèmes a permis de montrer qu'ils tirent leur énergie, par l'intermédiaire de bactéries chimiautotrophes, de l'oxydation des sulfures dissous dans l'eau des sources (Hochachka, Somero, 1984; Grassle, 1985; Jannasch, Mottl, 1985).

Plusieurs des animaux constituant ces biocénoses possè-

dent des pigments respiratoires qui doivent fonctionner dans des conditions d'environnement assez exceptionnelles: pression hydrostatique et concentration en sulfures élevées; pH, teneur en oxygène et température variables; concentration en monoxyde de carbone non négligeable. Cet article résume l'ensemble des données actuellement disponibles décrivant la structure moléculaire et les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de ces pigments peu accessibles, de récolte difficile et qui, malgré leur abondance *in situ*, ne sont généralement disponibles qu'en très petites quantités. Nous évoquerons à cette occasion quelques-uns des résultats obtenus dans notre laboratoire.

DISTRIBUTION, LOCALISATION, STRUCTURE

Tous les pigments respiratoires analysés jusqu'à présent sont des pigments dits circulants, contenus dans l'un ou l'autre des compartiments liquidiens de quatre espèces qui sont parmi les plus caractéristiques des biocénoses hydrothermales. Il s'agit du bivalve *Calypptogena magnifica*, de l'annélide polychète *Alvinella pompejana*, du vestimentifère *Riftia pachyptila* et du crustacé décapode *Bythograea thermhydrion*.

L'hémoglobine de *Calypptogena*

Le pigment respiratoire de *Calypptogena* est une hémoglobine au sens strict (pigment héminique intracellulaire, de faible masse relative, M_r : voir Toulmond, 1985), contenue dans des érythrocytes en suspension dans l'hémolymphe (Boss, Turner, 1980). Ses propriétés spectrales sont pratiquement inconnues. On sait cependant que le rapport A_α / A_β (absorbance au pic α / absorbance au pic β) est inférieur à l'unité (Arp *et al.*, 1984). La molécule native est tétramérique ($M_r = 68000$) et se dissocie assez facilement en dimères sous l'effet de la dilution, de la congélation ou de l'oxydation (transformation en méthémoglobine). L'électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) conduit à identifier un protomère de $M_r = 14200$ et deux protomères de masse relative identique ($M_r = 13400$), que l'on peut cependant séparer par chromatographie. Ces protomères α , β et γ semblent s'associer pour former des tétramères de type $\alpha 2\beta 2$, $\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\gamma 2$ et $\gamma 4$ (Terwilliger *et al.*, 1983).

Les pigments respiratoires sont peu répandus chez les lamellibranches (voir Nagel, 1985). Des érythrocrurines (pigments héminiques extracellulaires de M_r élevée comprise ici entre 8×10^6 et 12×10^6) sont connues chez quelques bivalves hétérodontes appartenant aux familles des Astartidae et des Carditidae, alors que des hémoglobines ont été mises en évidence chez certains genres de bivalves taxodontes: *Nætia*, *Scapharca*, *Anadara*, *Barbatia*. La présence d'une hémoglobine chez *Calypptogena*, hétérodonte appartenant à la famille des Vesicomidae (Boss, Turner, 1980) semble donc constituer une exception. En fait, l'analyse de la composition en acides aminés de l'hémoglobine de *Calypptogena* montre que ce pigment est, de ce point de vue, très différent de celui des taxodontes (Terwilliger *et al.*, 1983). Ces auteurs considèrent que l'hémoglobine de *Calypptogena* témoigne, soit d'une évolution distincte des hémoglobines des Vesicomidae, soit de la survivance d'un caractère primitif chez ces bivalves évolués.

L'érythrocrurine d'*Alvinella*

Le compartiment circulatoire de cette annélide tubicole, primitivement classée par Desbruyères et Laubier (1980) dans la famille des Ampharetidae et pour laquelle a été créée récemment la famille des Alvinellidae (Desbruyères, Laubier, 1985), contient en solution une érythrocrurine de $M_r = 3-4 \times 10^6$. La molécule native présente en microscopie électronique l'aspect caractéristique des érythrocrurines d'annélides (Terwilliger, Terwilliger, 1984; fig. 1). Elle est constituée de 2 x 6 sous-unités disposées aux angles de deux hexagones superposés, inscrits dans un cercle d'environ 25 nm de diamètre. Les propriétés spectrales sont celles des érythrocrurines d'annélides. Les pics α et β sont situés respectivement à 574 et 541 nm pour le pigment oxygéné. Le rapport A_α / A_β est compris entre 0,88 et 0,92 (fig. 2). Les pics α et β du pigment carboxylé ont la même position que les pics correspondants de l'hémoglobine humaine, à 568 et 537 nm respectivement. Comme dans les autres érythrocrurines et chlorocrurines d'annélides, une masse moyenne de protéines élevée de l'ordre de 23400 g est associée à chaque site actif. L'électrophorèse en présence de SDS et de

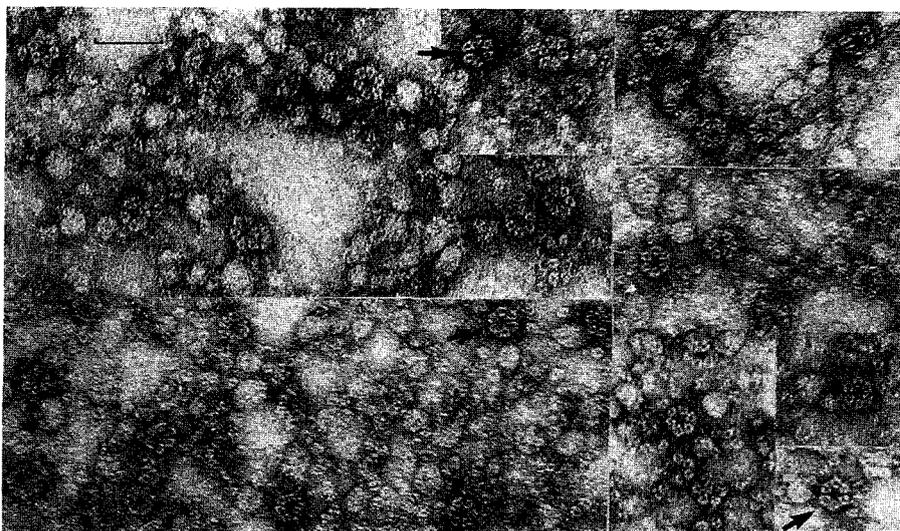


Figure 1
Molécules d'érythrocrurine d'*Alvinella pompejana* vues de face, microscope électronique à transmission. Coloration négative au molybdate d'ammonium 3 %. Barre d'échelle : 50 nm.

Electron micrograph of Alvinella pompejana erythrocrurin molecules negatively stained with ammonium molybdate 3 %. Scale bar : 50 nm.

mercapto-éthanol montre que les sous-unités sont constituées de l'assemblage d'au moins six chaînes polypeptidiques différentes de $M_r = 36\ 500, 30\ 000, 16\ 500, 15\ 000, 14\ 200$ et $13\ 900$ (Terwilliger, Terwilliger, 1984). Nos résultats sont légèrement différents, avec seulement 5 chaînes de M_r compris entre 30 000 et 15 000 (fig. 3).

Les érythrocrurines de Riftia

Ce vestimentifère possède deux érythrocrurines, l'une en solution dans le sang, l'autre dans le liquide coelomique. Ces pigments présentent des caractéristiques structurales voisines de celles des érythrocrurines d'annélides (Terwilliger *et al.*, 1980; Terwilliger, Terwilliger, 1981). Les similitudes concernent : 1) la forme hexagonale et les

dimensions de la molécule native ; 2) les propriétés spectrales, et en particulier le rapport A_{α} / A_{β} pour le pigment oxygéné, inférieur à l'unité (fig. 2) ; 3) l'hétérogénéité des sous-unités, constituées d'au moins neuf chaînes polypeptidiques différentes de M_r compris entre 14 000 et 41 500; 4) un poids moyen de protéines par site actif voisin de 23 000 g; 5) la composition en acides aminés. Ces similitudes renforcent la thèse selon laquelle les vestimentifères (et les pogonophores) seraient phylogénétiquement proches des annélides. On doit noter cependant : 1) que les fluides physiologiques de *Riftia* contiennent des proportions variables de deux formes moléculaires stables du pigment, de $M_r = 400\ 000$ et $1,7 \times 10^6$ (Terwilliger *et al.*, 1980), au lieu d'une forme unique de $M_r = 3-4 \times 10^6$ chez les annélides ; 2) qu'en dissociant les pigments de *Riftia* en présence de SDS et de mercapto-éthanol, nous n'avons jamais trouvé plus de deux types de chaînes polypeptidiques, une diversité beaucoup plus faible que celle qui est observée dans les érythrocrurines d'annélides (fig. 3) ; qu'à partir des échantillons congelés mis à notre disposition, nous n'avons jamais pu observer en microscopie électronique les structures hexagonales caractéristiques des érythrocrurines d'annélides, ce qui semble indiquer que la stabilité des molécules natives des pigments de *Riftia* est inférieure à celle des molécules de pigments d'annélides.

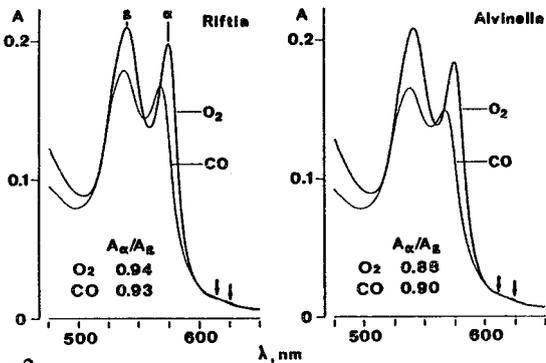


Figure 2 Spectres d'absorption optique de l'érythrocrurine oxygénée (O₂) et carboxylée (CO) de *Riftia* et d'*Alvinella*. Le sang, dilué dans l'eau distillée, a été traité de manière à éliminer toute trace de métérythrocrurine. La présence de traces de sulférythrocrurine se manifeste par un faible pic d'absorption à 625 nm lorsque le pigment est oxygénée, décalé à 618 nm lorsque le pigment est carboxylé (flèches). [Hème] = 7 µmol/L. Température : 20° C.

Optical absorption spectra of oxygenated (O₂) and carboxylated (CO) erythrocrurins of *Riftia* and *Alvinella*. The blood was diluted in distilled water and was treated in order to eliminate all the meterythrocrurin. Very small absorption peaks at 625 nm (oxygenated pigment) and at 618 nm (carboxylated pigment) reveal the presence of traces of sulferythrocrurin (arrows). [Heme] = 7 µmol/L. Temperature : 20° C.

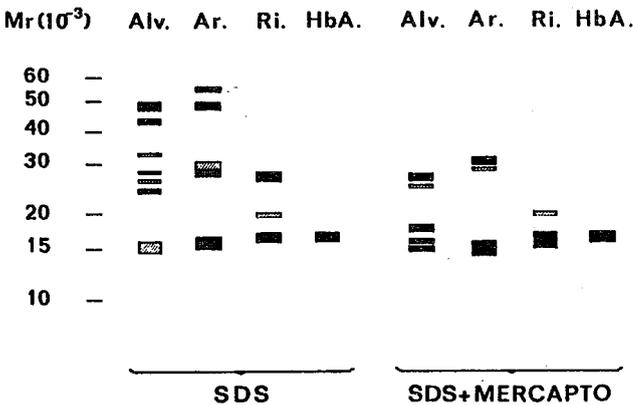


Figure 3 Dissociation des érythrocrurines d'*Alvinella* (Alv), *Arenicola* (Ar) et *Riftia* (Ri), et de l'hémoglobine humaine (Hb A). Schéma électrophorétique en gel de polyacrylamide, à pH alcalin. A gauche, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) seul ; à droite, en présence de SDS et de mercaptoéthanol. Les masses relatives correspondantes (M_r) sont indiquées à l'extrême gauche.

Dissociation of *Alvinella* (Alv), *Arenicola* (Ar) and *Riftia* (Ri) erythrocrurins and of human hemoglobin (Hb A). Electrophoretic pattern in polyacrylamid gel, at alkaline pH. Left : in presence of sodium dodecylsulfate (SDS); right : in presence of SDS + mercaptoethanol. Corresponding relative mass (M_r) on the extreme left.

L'hémocyanine de Bythograea

La seule indication structurale concernant ce pigment est celle donnée par Arp et Childress (1981 b), indiquant que le spectre du sang dilué, établi entre 320 et 760 nm, montre à 340 nm le pic d'absorption caractéristique des hémocyanines de crustacés.

PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES

Fixation et transport de l'oxygène

La propriété fondamentale d'un pigment respiratoire est de pouvoir se lier réversiblement à l'oxygène moléculaire. Dans le cas d'un pigment circulant, les conditions dans lesquelles s'effectue cette liaison doivent être telles qu'elles permettent le transport, en quantités suffisantes, de l'oxygène du milieu extérieur vers les tissus utilisateurs. En termes d'économie de débit du fluide vecteur, l'efficacité de ce transfert dépend en premier lieu de la concentration des sites actifs dans ce fluide, concentration qui détermine celle de l'oxygène présent à l'état combiné lorsque tous les sites sont saturés (capacité oxyphorique, $C^{max} \times O_2$). Elle dépend en outre de la possibilité effective de charge et de décharge du pigment au niveau, respectivement, de l'organe d'échange externe et des tissus. Cette possibilité est fonction : 1) de l'existence entre les différents sites actifs de la molécule d'interactions homotropes de facilitation dont l'importance est quantifiée empiriquement par la valeur du coefficient n de Hill, lequel reflète la forme, plus ou moins sigmoïde de la courbe de saturation du pigment par l'oxygène; 2) de l'affinité du pigment pour l'oxygène, quantifiée de façon pratique par la valeur de P_{50} , pression partielle d'oxygène pour laquelle 50 % des sites actifs sont oxygénés. Cette affinité dépend de la constitution intrinsèque de la molécule, de la température

Tableau
Propriétés structurales et fonctionnelles des pigments respiratoires circulants de *Calyptogena*, *Alvinella*, *Riftia* et *Bythograea*.
Molecular and oxygen-binding properties of circulating respiratory pigments from Calyptogena, Alvinella, Riftia and Bythograea

	Calyptogena (1)	Alvinella (2)	Riftia (3)	Bythograea (4)
Localisation	Hémolymphe IC (b)	Sang EC (c)	Sang et LC (a) EC	Hémolymphe EC
Nature	Hémoglobine	Erythrocrurine	Erythrocrurine	Hémocyanine
Mr (Masse moléculaire relative)	68 000	3-4 000 000	1 700 000 400 000	n.d. (d)
Masse de protéines par site actif	17 000	23 400	23 000	n.d.
Capacité oxyphorique (mmol O ₂ /L)	1,9	5,1	3,8 (sang) 2,5 (LC)	2,0
n de Hill	1,2	1,9	2,8 (sang) 2,4 (LC)	2,8
P ₅₀ (Torr)	7,6 (e) (pH = 6,8; 10,1° C) 3,8 (f) (pH = 7,0; 8° C)	0,7 (20° C) 2,8 (40° C)	4,5 (sang et LC non dilués) (pH = 6,4; 25° C)	6,6 (pH = 7,5; 2,6° C)
Coefficient de Bohr	n.d.	0 (pH 7 à 8)	- 0,12 (sang)	- 0,34 (pH 6,5 à 8,1)
Δ H, kcal/mol	faible (de 2 à 10° C)	- 14 (de 20 à 40° C)	- 8,5 (sang) (de 3 à 14° C)	0 (de 2 à 30° C)

(a) LC : liquide coelomique; (b) IC : intracellulaire; (c) EC : extracellulaire; (d) non déterminé;
(e) sang entier; (f) pigment en solution
(1) Terwilliger *et al.*, 1983; Arp *et al.*, 1984
(2) Terwilliger et Terwilliger, 1984
(3) Terwilliger *et al.*, 1980; Arp et Childress, 1981 a; Childress *et al.*, 1984
(4) Arp et Childress, 1981 b

(par l'intermédiaire de la chaleur d'oxygénation du pigment, Δ H), et peut être modulée du fait de l'existence d'interactions stériques hétérotropes entre les sites fixateurs d'oxygène et divers autres sites de la molécule susceptibles de fixer réversiblement des ions minéraux ou organiques (par exemple les protons, responsables de l'effet Bohr). Le tableau résume, de ce point de vue, l'essentiel des caractéristiques fonctionnelles des pigments étudiés.

La capacité oxyphorique, exprimée en mmol d'oxygène combiné par litre de fluide, est toujours remarquablement élevée. Chez *Calyptogena* et chez *Bythograea* en particulier, les valeurs de $C^{max} \times O_2$ sont parmi les plus fortes que l'on puisse trouver dans la littérature concernant les bivalves et les crustacés décapodes (voir Toulmond, 1985).

Le coefficient *n* de Hill est voisin de l'unité chez *Calyptogena* dont le pigment doit avoir une courbe d'équilibration proche de l'hyperbole, caractère peu favorable au transport de l'oxygène. *n* est élevé chez les autres espèces, les courbes d'équilibration des pigments concernés sont des sigmoïdes, ce qui permet de penser qu'ils jouent un rôle efficace dans le transport de l'oxygène.

Il est plus difficile de conclure quant à la signification des valeurs de P₅₀, mesure de l'affinité des pigments pour l'oxygène. Les données existantes sont trop peu nombreuses et obtenues dans des conditions de température et surtout de pH trop diverses pour qu'il soit possible de tenter une comparaison. On peut tout au plus noter l'affinité particulièrement élevée du pigment d'*Alvinella*.

Dans tous les cas l'effet Bohr, quantifié par le coefficient

de Bohr $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$, est nul ou faible, traduisant le peu d'effet du pH sur l'affinité des pigments pour l'oxygène. Cette absence d'effet Bohr est en principe défavorable en ce qui concerne le transport de l'oxygène. On peut y voir une adaptation permettant au pigment de fonctionner dans des conditions de pH fluctuant. On ne sait pas si un effet Bohr existe chez *Calyptogena*.

La chaleur d'oxygénation, ΔH , est faible ou nulle chez *Calyptogena* et chez *Bythograea*, ce qui est cohérent avec le fait que ces organismes vivent dans un milieu de température variable (voir Toulmond, 1985). Les valeurs élevées de ΔH trouvées chez *Riftia* et chez *Alvinella* contredisent néanmoins cette interprétation, surtout dans le cas d'*Alvinella* qui est soumis aux fluctuations de température les plus considérables (Desbruyères *et al.*, 1982).

Fixation et transport des sulfures

L'existence, chez *Calyptogena* et *Riftia*, d'une symbiose avec des bactéries chimiautotrophes tirant leur énergie de l'oxydation des sulfures, pose le problème du mécanisme permettant le transport simultané de l'oxygène et des sulfures du milieu extérieur vers les organes hébergeant ces bactéries : branchie chez *Calyptogena* et trophosome chez *Riftia* (Karl *et al.*, 1980; Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981; Felbeck *et al.*, 1981; Childress, Mickel, 1982; Cavanaugh, 1983; Bosch, Grassé, 1984 *a* et *b*; Fiala-Medioni, 1984). Les sulfures sont de puissants inhibiteurs du système de la cytochrome c oxydase (Hand, Somero, 1983; Powell, Somero, 1983). Par ailleurs, ils sont très facilement oxydés en présence d'oxygène. Ils ne peuvent donc exister dans les liquides physiologiques que sous une forme combinée stable autorisant leur transport à l'abri de l'oxydation, tout en les empêchant d'agir sur les chaînes d'oxydo-réduction.

Chez *Calyptogena*, le pigment respiratoire ne semble pas jouer de rôle dans le transport des sulfures. L'hémolymphe contient bien une substance capable de les fixer réversiblement mais cette substance n'est pas contenue dans les érythrocytes, n'est pas liée à la fraction protéique de l'hémolymphe et serait de nature peptidique ou lipidique (Arp *et al.*, 1984). Le cas est différent chez *Riftia* dont le sang et le liquide coelomique dialysés contre une solution diluée de sulfures sont capables de fixer jusqu'à 3 mmol/L d'équivalent H_2S . Cette fixation est réversible, pH dépendante et liée à l'existence de la fraction protéique du fluide. Le fait que la quantité de sulfure fixée soit toujours proportionnelle à la concentration en hème du sang ou du liquide coelomique (en moyenne 1,27 mol de sulfure par mol d'hème) semble indiquer que l'érythrocyte de *Riftia* constitue la protéine responsable de la fixation et du transport des sulfures (Arp, Childress, 1981 *a*; 1982; 1983; Childress *et al.*, 1984).

Le mode de fixation des sulfures sur la molécule de pigment est pour l'instant inconnu. Il est exclu qu'ils se fixent sur l'atome de fer de l'hème, le pigment ayant à transporter simultanément l'oxygène. Childress *et al.* (1984) ont d'ailleurs montré que la présence de sulfures n'affecte pas la fixation de ce gaz. La formation de sulférythrocytine par fixation d'un ion sulfure sur l'un des noyaux pyrroliques de l'hème (Anderson *et al.*, 1984),

est peu probable compte tenu : 1) de la difficulté à obtenir cette réaction (Carrico *et al.*, 1978); 2) du taux négligeable de sulférythrocytine contenu dans le sang natif de *Riftia* (fig. 2); 3) de la nécessité, pour obtenir la sulférythrocytine, de passer par la métérythrocytine après oxydation du fer de l'hème : l'expérience montre que l'érythrocytine de *Riftia*, comme celle d'*Alvinella* et d'*Arenicola*, est particulièrement résistante aux processus d'oxydation (fig. 4). La seule possibilité est celle d'une fixation sur la chaîne polypeptidique sous forme, compte tenu des valeurs de pH physiologique, d'anion HS^- (pK = 6,96). Ceci suppose : 1) que la position du site de fixation soit telle qu'elle ne permette pas l'oxydation du sulfure par la molécule d'oxygène fixée sur l'hème; 2) que l'affinité du pigment pour O_2 et HS^- soit maximale pour la même

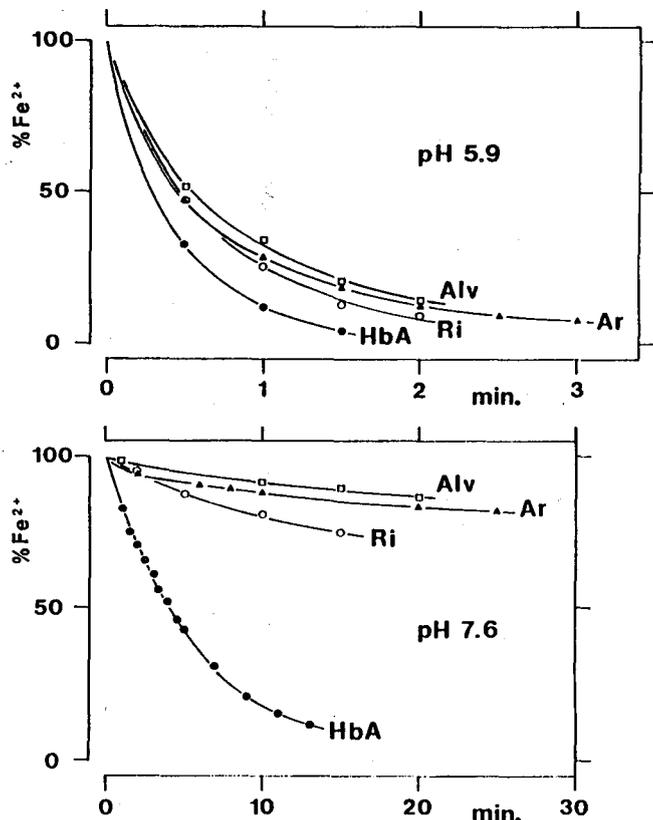


Figure 4
 Cinétique d'oxydation de l'hème des érythrocytines d'*Alvinella* (Alv), *Arenicola* (Ar) et *Riftia* (Ri), et de l'hémoglobine humaine (Hb A). La formation du mét-pigment (oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+}) a été suivie en mesurant en fonction du temps l'augmentation d'absorbance, à 500 nm, de solutions diluées des pigments carboxylés ($[\text{Hème}] = 6 \mu\text{mol/L}$; tampon HEPES-NaOH 0,05 M, 25°C), après addition d'un excès de ferricyanure de potassium au temps zéro (100 % Fe^{2+} , 0 % Fe^{3+}). Quel que soit le pH, la vitesse d'oxydation de l'hème des érythrocytines (extracellulaires) est toujours plus faible que celle de l'hémoglobine humaine (intracellulaire).

Kinetics of heme oxidation in the erythrocytins of Alvinella (Alv), Arenicola (Ar) and Riftia (Ri) and in human hemoglobin (Hb A). Formation of the met-pigment (oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+}) was checked by measuring as a function of time the increase of absorbance, at 500 nm, of diluted solutions of the carboxylated pigments ($[\text{Heme}] = 6 \mu\text{mol/L}$, HEPES-NaOH buffer 0.05 M, 25°C), after addition of potassium ferricyanide in excess at time zero (100 % Fe^{2+} , 0 % Fe^{3+}). Irrespective of the pH, the oxidation speed of the heme is always lower in the extracellular erythrocytins than in the intracellular human hemoglobin.

configuration stérique de la molécule (forme R du modèle de Monod, Wyman et Changeux).

Dans ces conditions, l'anion HS^- pourrait agir comme un effecteur allostérique, sa fixation par le pigment favorisant en même temps celle de l'oxygène. Il n'existe pour le moment aucune indication concernant la nature du ou des sites susceptibles de fixer HS^- .

Fixation et transport du dioxyde de carbone

Les modalités du transport du CO_2 sont mal connues et n'ont commencé à être étudiées que chez *Calypptogena* et *Riftia*, c'est-à-dire chez les deux espèces dont on peut dire avec certitude qu'elles hébergent, dans certains de leurs tissus, des bactéries symbiotes chimiautotrophes. Dans les deux cas, le transport doit permettre l'excrétion du CO_2 métabolique et satisfaire les besoins en CO_2 des bactéries symbiotes.

Chez *Calypptogena*, l'hémolymphe totale contient de 1,29 à 2,44 mmol/L de CO_2 pour des valeurs de pH comprises entre 5,93 et 7,05. Une proportion non négligeable de CO_2 (30 à 35 %) est contenue dans les érythrocytes, ce qui permet de penser que l'hémoglobine joue un rôle direct ou indirect dans le transport de ce gaz (Arp *et al.*, 1984). On ignore cependant si le CO_2 se fixe directement sur la molécule de pigment, par formation de composés carbaminés. Quoiqu'il en soit, l'hémoglobine doit jouer le rôle d'accepteur de protons, permettant la formation d'ions bicarbonates et la régulation de l'équilibre acide-base de l'hémolymphe. On ignore si les érythrocytes contiennent l'anhydrase carbonique qui favorise ce processus chez les vertébrés.

Chez *Riftia*, le sang et le liquide cœlomique contiennent des quantités comparables et élevées de CO_2 total, comprises entre 2 et 8 mmol/L pour des valeurs de pH comprises entre 6,2 et 8,0. Ces valeurs ont été trouvées chez des animaux maintenus en élevage à 8° C et sous une pression de 100 atmosphères pendant 48 h (Childress *et al.*, 1984). Comme chez *Calypptogena*, on ignore si une partie du CO_2 est directement combinée au pigment. Aux valeurs de pH mesurées et compte tenu de la forte concentration des pigments respiratoires, l'essentiel du gaz doit se trouver sous forme de bicarbonates. On ne sait pas si l'anhydrase carbonique est présente dans les fluides, comme c'est le cas par exemple dans le sang de l'arénicole (voir Wells, 1973). Il a été montré récemment que des bicarbonates marqués étaient absorbés au niveau du panache branchial et transportés jusqu'au trophosome sous forme de malate et de succinate (Felbeck, 1985).

CONCLUSIONS

Malgré l'importance du travail déjà réalisé, on peut considérer que l'étude de la structure et des propriétés des pigments respiratoires de la faune inféodée à

l'hydrothermalisme océanique profond en est encore à ses débuts. Bien que ces pigments n'aient été étudiés jusqu'à présent que chez quatre espèces, on sait qu'ils existent chez d'autres représentants de cette faune si riche et si spéciale, en particulier chez les annélides et les poissons. Du simple point de vue de l'inventaire des pigments respiratoires, circulants ou non, un vaste champ reste donc à prospecter. En ce qui concerne les pigments déjà étudiés, on peut observer que leurs concentrations dans les fluides physiologiques sont toujours élevées. Le phénomène n'est vraisemblablement pas dû au hasard de l'échantillonnage, mais doit plutôt correspondre à une nécessité liée aux caractéristiques du biotope colonisé (présence de concentrations élevées de sulfures). A cet égard, il est tentant d'établir un parallèle entre la faune des sources hydrothermales et celle, plus banale, vivant dans des milieux réducteurs également riches en sulfures (cas par exemple des nombreuses espèces d'annélides vivant dans les sables et les vases riches en matière organique de la zone intertidale).

La structure et les propriétés des pigments étudiés jusqu'à présent ne présentent rien de particulièrement original, sauf en ce qui concerne la possibilité, pour les érythrocytes de *Riftia*, de fixer et de transporter l'anion HS^- , qui agirait alors comme un effecteur allostérique favorisant la fixation de l'oxygène par ces pigments. Cette possibilité constitue une réelle nouveauté. Pour ce qui est des autres propriétés, l'étude systématique et approfondie de l'action des effecteurs classiques doit être poursuivie. Il faut noter que, pour l'instant, toutes les études ont été réalisées à la pression atmosphérique, alors que ces pigments fonctionnent sous une pression hydrostatique d'environ 250 atmosphères et que l'on ignore pratiquement tout des effets de la pression sur le fonctionnement des pigments respiratoires. Remarquons à ce propos que ces recherches ne prendront tout leur sens que si l'on acquiert une connaissance plus précise des conditions dans lesquelles fonctionnent les pigments. On se heurte là au problème le plus difficile, compte tenu de l'accessibilité réduite des écosystèmes hydrothermaux profonds et des difficultés rencontrées dès que l'on souhaite expérimenter, *in situ*.

Remerciements

Nous remercions Messieurs D. Desbruyères et L. Laubier, de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) qui ont bien voulu nous confier les échantillons des liquides physiologiques qu'ils ont prélevés chez *Riftia* et chez *Alvinella*, au cours des campagnes *Biocytherm* (1982) et *Biocyarise* (1984). Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'IFREMER (contrat CNEXO-COB n° 83/7265).

RÉFÉRENCES

- Anderson L.A., Loehr T.M., Lim A.R., Mauk A.G., 1984. Sulfmyoglobin. Resonance Raman spectroscopic evidence for an iron-chlorin prosthetic group, *J. Biol. Chem.*, **259**, 15340-15349.
- Arp A.J., Childress J.J., 1981 a. Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm, *Science*, **213**, 342-344.
- Arp A.J., Childress J.J., 1981 b. Functional characteristics of the blood of the deep-sea hydrothermal vent brachyuran crab, *Science*, **214**, 559-561.
- Arp A.J., Childress J.J., 1982. Sulfide transport in the blood of the vestimentiferan tube worm *Riftia pachyptila* Jones, in : *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins*, edited by E.J., Wood, Harwood, London, Life Chem. Rep., Suppl. 1, 393-395.
- Arp A.J., Childress J.J., 1983. Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*, *Science*, **219**, 295-297.
- Arp A.J., Childress J.J., Fischer C.R., 1984. Metabolic and blood gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*, *Physiol. Zool.*, **57**, 648-662.
- Bosch C., Grassé P.P., 1984 a. Cycle partiel des bactéries chimiautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (pogonophores vestimentifères). I. Le trophosome et les bactériocytes, *CR Acad. Sci. Paris*, **299**, 371-376.
- Bosch C., Grassé P.P., 1984 b. Cycle partiel des bactéries chimiautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (pogonophores vestimentifères). II : L'évolution des bactéries symbiotiques et des bactériocytes, *CR Acad. Sci. Paris*, **299**, 413-419.
- Boss K.J., Turner R.D., 1980. The giant white clam from the Galapagos Rift, *Calyptogena magnifica* sp. nov., *Malacologia*, **20**, 161-194.
- Carrico R.J., Peisach J., Alben J.O., 1978. The preparation and some physical properties of sulfhemoglobin, *J. Biol. Chem.*, **253**, 2386-2391.
- Cavanaugh C.M., 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats, *Nature*, **302**, 58-61.
- Cavanaugh C.M., Gardiner S.L., Jones M.L., Jannasch H.W., Waterbury J.B., 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones : possible chemoautotrophic symbionts, *Science*, **213**, 340-342.
- Childress J.J., Mickel T.J., 1982. Oxygen and sulfide consumption rates of the vent clam *Calyptogena magnifica*, *Mar. Biol. Lett.*, **3**, 73-79.
- Childress J.J., Arp A.J., Fisher C.R., 1984. Metabolic and blood characteristics of the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila*, *Mar. Biol.*, **83**, 109-124.
- Cortliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., Von Herzen R.P., Ballard R.D., Green K., Williams D., Balndridge A., Crane K., Van Andel T.H., 1979. Submarine thermal springs on the Galapagos Rift, *Science*, **203**, 1073-1083.
- Desbruyères D., Laubier L., 1980. *Alvinella pompejana* gen. sp. nov., Ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride Est-Pacifique, *Oceanol. Acta*, **3**, 267-274.
- Desbruyères D., Laubier L., 1985. Les Alvinellidae, famille nouvelle d'annélides polychètes inféodées aux sources hydrothermales sous-marines : systématique, biologie et écologie, *Can. J. Zool.*, **64**, 10, 2227-2245.
- Desbruyères D., Crassous P., Grassle J., Khripounoff A., Reyss D., Rio M., Van Praët M., 1982. Données écologiques sur un nouveau site d'hydrothermalisme actif de la ride du Pacifique oriental, *CR Acad. Sci. Paris*, **295**, 489-494.
- Felbeck H., 1981. Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *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., Childress J.J., Somero G.N., 1981. Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats, *Nature*, **293**, 291-293.
- Fiala-Medioni 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, *CR Acad. Sci. Paris*, **298**, 487-492.
- Grassle J.F., 1985. Hydrothermal vent animals : distribution and biology, *Science*, **229**, 713-717.
- Hand S.C., Somero G.N., 1983. Energy metabolism pathways of hydrothermal vent animals : adaptations to a food-rich and sulfide-rich deep-sea environment, *Biol. Bull.*, **165**, 167-181.
- Hochachka P.W., Somero G.N., 1984. *Biochemical adaptation*, University Press, Princeton, 537 p.
- Jannasch H.W., Mottl M.J., 1985. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents, *Science*, **229**, 717-725.
- Karl D.M., Wirsen C.O., Jannasch H.W., 1980. Deep-sea primary production at the Galapagos hydrothermal vents, *Science*, **207**, 1345-1347.
- Nagel R.L., 1985. Molluscan hemoglobins, in : *Blood cells of marine invertebrates : experimental systems in cell biology and comparative physiology*, edited by Alan R. Liss, New-York, 227-247.
- Powell M.A., Somero G.N., 1983. Blood components prevent sulfide poisoning of respiration of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*, *Science*, **219**, 297-299.
- Terwilliger N.B., Terwilliger R.C., 1981. Structural similarity between extracellular hemoglobins from a deep-sea vestimentifera and annelids, in : *Invertebrate oxygen-binding proteins : structure, active site and function*, edited by J. Lamy and J. Lamy, Marcel Dekker, New-York, 369-371.
- Terwilliger N.B., Terwilliger R.C., 1984. Hemoglobin from the "Pompeii worm", *Alvinella pompejana*, an annelid from a deep-sea hot hydrothermal vent environment, *Mar. Biol. Lett.*, **5**, 191-201.
- Terwilliger R.C., Terwilliger N.B., Schabtach E., 1980. The structure of hemoglobin from an unusual deep sea worm (Vestimentifera), *Comp. Biochem. Physiol.*, **65 B**, 531-535.
- Terwilliger R.C., Terwilliger N.B., Arp A.J., 1983. Thermal vent clam (*Calyptogena magnifica*) hemoglobin, *Science*, **219**, 981-983.
- Toulmond A., 1985. Circulating respiratory pigments in marine animals, in : *Physiological adaptations of marine animals*, edited by M.S. Laverack, University Press, Cambridge, *Soc. Exp. Biol. Symp. Ser.* **39**, 163-206.
- Wells R.M.G., 1973. Carbonic anhydrase activity in *Arenicola marina* L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **46 A**, 325-331.