



**HAL**  
open science

# Adaptations respiratoires des invertébrés inféodés aux sources hydrothermales profondes

François Lallier

► **To cite this version:**

François Lallier. Adaptations respiratoires des invertébrés inféodés aux sources hydrothermales profondes . Zoologie des invertébrés. Université Pierre et Marie Curie, 2001. tel-01169931

**HAL Id: tel-01169931**

**<https://theses.hal.science/tel-01169931>**

Submitted on 30 Jun 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.

***Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)***

**François H. LALLIER**

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme d'  
**Habilitation à Diriger des Recherches**

**Décembre 2000**

**Equipe Ecophysiologie  
Observatoire Océanologique de Roscoff  
UPMC - CNRS UPR 9042 - INSU  
Station Biologique, Roscoff, France**



# Remerciements

---

Enfin, la voici, cette habilitation ! Cela fait bien deux ou trois ans qu'on en parle, mais que voulez-vous, quand on dirige une équipe de recherche sans y être habilité, on ne saurait posséder toutes les qualités d'organisation requises pour arriver à rédiger un tel mémoire dans les petits intervalles de temps qui subsistent entre un rapport urgent, une thèse à relire, une demande de financement ou une campagne dans le Pacifique.... Sans compter l'espoir déçu que les coups de pied d'un ministre dans la fourmilière ne dégagent ce diplôme en touche.

Mais ce n'est sûrement pas moi le plus à plaindre dans l'affaire : ma famille en a souffert plus que moi et c'est à eux que je dédie ce travail. Marie, Laura, Lucie et Robin, voici un petit volume qui raconte peu ou prou ce que fait votre mari et père quand il n'est pas à la maison....Je ne peux malheureusement pas vous promettre que l'HDR me permettra d'y être plus souvent.

Ma seconde pensée sera pour mes mentors, Jean-Paul Truchot et André Toulmond, qui ont réussi à transformer ma vocation de jeune homme en carrière scientifique. Les leçons de Jean-Paul et la confiance d'André, ces « vieux sages » que j'ai tenté d'imiter, sont pour beaucoup dans ce que je suis devenu aujourd'hui.

Quant à ces dernières années, les plus « productives » de ma (jeune) carrière, je ne serais pas honnête si je m'en attribuais tout le mérite : ce sont les étudiants de l'équipe Ecophysiologie qui ont fait « presque » tout le boulot. Merci Franck, Stéphane, Lionel, Fabienne, Xavier et Marie-Cécile, mais ne le dites pas à tout le monde quand même.

Comme je ne saurai citer ici tous ceux qui ont croisé ma route, je terminerai en remerciant chaleureusement ceux auxquels j'ai pensé confier l'évaluation de ce mémoire :, Roy, Chuck, et Daniel,

Ah si ! J'oubliais : une dernière pensée à tous ceux qui, de par le monde, ont la curiosité de s'intéresser aussi à LA grande question : la vie, l'univers et le reste....<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Douglas Adams, 1978. Si vous n'êtes pas un « routard galactique », ne cherchez pas à comprendre...



# Sommaire

---

<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>ACTIVITE DE RECHERCHE .....</b>	<b>23</b>
<b>RIFTIA PACHYPTILA, ADAPTATIONS RESPIRATOIRES D'UN ANIMAL</b>	
<b>AUTOTROPHE .....</b>	<b>26</b>
UN ORGANISME HORS DU COMMUN .....	26
TRANSPORT DU H <sub>2</sub> S: UN MODELE POUR D'AUTRES ESPECES ?.....	27
<i>Articles relatifs à l'étude du transport des sulfures chez Riftia pachyptila. ....</i>	<i>31</i>
TRANSPORT DU CO <sub>2</sub> : UN SCHEMA EN MIROIR .....	31
<i>Articles relatifs à l'étude du transport du CO<sub>2</sub> chez Riftia pachyptila. ....</i>	<i>36</i>
<b>ADAPTATIONS RESPIRATOIRES DES CRUSTACES INFEODES AUX SOURCES</b>	
<b>HYDROTHERMALES PROFONDES .....</b>	<b>37</b>
LA PLACE DES CRUSTACES DANS LA FAUNE HYDROTHERMALE.....	37
STRUCTURE ET FONCTION DES HEMOCYANINES .....	39
HYPERCAPNIE ET EQUILIBRE ACIDE-BASE.....	42
<i>Articles relatifs à la physiologie comparée des crustacés hydrothermaux.....</i>	<i>46</i>
<b>CONCLUSION : DE L'INTERET DE L'ETUDE DES SOURCES HYDROTHERMALES</b>	
<b>PROFONDES EN BIOLOGIE.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>50</b>
<b>ANNEXES : COPIE DES ARTICLES MENTIONNES.....</b>	<b>51</b>

# Curriculum Vitae

---

## François H. LALLIER

Né le 17 Novembre 1959 à Paris 14<sup>ème</sup>

Marié, trois enfants

Adresse professionnelle

Station Biologique BP74  
F-29682 Roscoff Cedex  
+33 2 9829 2311 Fax – 2324  
E-mail: lallier@sb-roscoff.fr

Adresse personnelle

30, rue Corre  
F-29250 St-Pol-de-Léon  
+33 2 9869 2675

## DIPLOMES UNIVERSITAIRES

- 1988 ..... **Doctorat** de l'Université de Bordeaux I en Physiologie Animale (Novembre); mention Très Honorable. Jury composé de MM. C.R. Bridges, A. Girardie, L. Laubier, M. Moulins, A. Toulmond, J.P. Truchot.
- 1985 ..... **Diplôme d'Études Approfondies** en Biologie et Physiologie Animales (Bordeaux I, Juin, Bien).
- 1984 ..... **Maîtrise** de Physiologie (Paris VI, Septembre, Bien).
- 1983 ..... **Maîtrise** de Biologie des Organismes et des Populations (Paris VI, Septembre, Assez Bien).
- 1982 ..... **Licence** de Biologie des Organismes (Paris VI, Juin, Assez Bien).
- 1981 ..... **DEUG B**, Sciences de la Vie (Paris VI, Juin).

## FONCTIONS

- 1995 ..... **Maître de Conférences 1<sup>ère</sup> classe** à l'Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)
- 1993-95 .... **Maître de Conférences 2<sup>ème</sup> classe** à l'Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6). Titularisé en Octobre 1994.
- 1991-93 .... **Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche** à l'Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)
- 1989-90 .... **Post-Doctoral Fellow** at the Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences, University of Miami, Florida
- 1985-88 .... **Doctorant** au Laboratoire de Neurobiologie et Physiologie Comparées à Arcachon. Contrat de Formation Doctorale avec l'IFREMER

## DISTINCTION SCIENTIFIQUE

- 1988 ..... Lauréat du Prix Georges Kohn, attribué par le comité de Perfectionnement de l'Institut Océanographique de Monaco

## ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

Depuis Octobre 1991 j'exerce les fonctions d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche, et depuis Octobre 1993 celles de Maître de Conférences, à la Station Biologique de Roscoff (UFR 937 de l'Université Paris 6). À ce titre j'ai participé à

l'organisation et à l'encadrement de divers enseignements de biologie marine. Ces enseignements comprennent à la fois des exposés magistraux, des travaux pratiques et des sorties-travaux dirigés à la mer ou à la grève. Conformément à l'usage de la Station Biologique de Roscoff, l'attribution des différents cours de zoologie et d'écologie marine se fait chaque année parmi les enseignants de la Station. J'ai indiqué pour chaque enseignement le volume horaire moyen en heures – équivalent TD.

### ***Stage Pratique du DEA d'Océanologie Biologique (10 h)***

Deux semaines en Septembre ou Novembre, sanctionné par un examen de Travaux Pratiques en fin de stage. Le programme des enseignements comprend:

- Positionnements horizontaux et verticaux (marées et navigation)
- Biocoenotique appliquée aux étagements littoraux
- Approche pratique de l'effort d'échantillonnage
- Séminaires de Biologie Marine et d'Océanographie.

### ***Stage du DEA Biodiversité (15 h)***

Stage d'une semaine destiné à mettre les étudiants en contact d'une façon pragmatique avec la biodiversité des organismes marins:

- Diversité des plans d'organisation
- Diversité des milieux de vie et convergences

### ***Stage pratique du module d'Océanologie Biologique (32 h)***

Deux semaines de stage de terrain fonctionnant en ateliers, destiné à illustrer les cours du module, dont :

- Analyse coenotique des peuplements intertidaux
- Variations nycthémérales des conditions de vie en milieu intertidal

### ***Module de Biologie des Organismes Marins (45 h)***

Quatre semaines à Pâques, le BOM est un module optionnel de la maîtrise de Biologie des Organismes et des Populations de l'Université de Paris 6, sanctionné par un examen écrit, pratique et oral.. Le programme en est le suivant:

- Les conditions de milieu sur les côtes mégatidales
- Phycologie
- Biologie des animaux marins littoraux et côtiers
- Éléments de biocoenotique sur le benthos de la Manche

### ***Session Interuniversitaire de Zoologie et Écologie Marines (55 h)***

Pendant quatre semaines en Août, le SIZEM reprend la partie zoologique et écologique du programme ci-dessus pour un public international, venant d'horizons plus larges. Cet enseignement possède le label "PIC ERASMUS" depuis 1993, associant les Universités européennes suivantes: Bruxelles, Ghent, Louvain, Mons (BE), Santiago de Compostela (SP), Pavia (IT), et Aveiro (PT).

### ***Atelier Adaptations à l'Environnement et Milieux Extrêmes (25 h)***

Mis en place en 2000, cet atelier de l'Ecole Doctorale Diversité du Vivant, propose l'étude de quelques fonctions biologiques telles que respiration, circulation, osmorégulation ou nutrition dans une perspective écophysiologique, en utilisant les

milieux extrêmes comme révélateurs de la diversité des adaptations mises en place par des invertébrés marins. Les séminaires illustrent quelques approches modernes de ces problèmes et les expérimentations présentent un éventail de techniques actuelles.

#### ***Autres activités d'enseignement***

Interventions ponctuelles sous forme de cours-conférence de 2-3 heures:

- Maitrise de Biologie Cellulaire et Physiologie UBO, resp. L. Nonnotte
- DEA Microbiologie UBO, resp. D. Prieur
- DEA Physiologie des Invertébrés, resp. P. Porcheron

#### ***Autres activités de diffusion des connaissances***

- Science en fête, conférences grand public, Ateliers de démonstration
- Television (Les grandes enigmes de la science, France 2)
- Ecoles Primaires : partenariat Académie Rennes / CNRS / SBR depuis 1996/97
- Conception et gestion de sites Internet,
  - pour l'équipe Ecophysiologie: <http://www.sb-roscoff.fr/Ecophy/>
  - pour le Département Enseignement: <http://www.sb-roscoff.fr/DPTENS/>

### **ACTIVITES ADMINISTRATIVES**

Depuis 1994, suite à la nomination d'André Toulmond à la direction de la Station Biologique de Roscoff, j'ai la responsabilité de l'équipe d'Ecophysiologie de l'UPR 9042 et suis membre à ce titre du Conseil Scientifique. L'équipe se compose actuellement de 7 membres titulaires et de 5 doctorants :

#### *Titulaires*

- |                     |     |                    |     |
|---------------------|-----|--------------------|-----|
| • Ann Andersen      | MC1 | • Guy Levavasseur  | CR1 |
| • Didier Jollivet   | CR1 | • André Toulmond   | PR1 |
| • François Lallier  | MC1 | • Frédérique Viard | CR2 |
| • Dominique Le Guen | TCN | • Franck Zal       | CR1 |

#### *Doctorants*

- |                        |                       |                    |            |
|------------------------|-----------------------|--------------------|------------|
| • Xavier Bailly        | Région Bretagne, 2001 | • Gaëtan Decherf   | MESR, 2003 |
| • Fabienne Chausson    | Ifremer, 2000         | • Emmanuel Mercier | CEE, 2002  |
| • Marie-Cécile De Cian | MESR, 2001            |                    |            |

En tant qu'enseignant, je suis également membre du Conseil d'Enseignement de l'Ecole Interne n°37 et je m'occupe également de la gestion financière du Département Enseignement.

Enfin, dans le cadre du Plan Quadriennal d'Etablissement de l'Université Pierre-et-Marie-Curie, une réorganisation des structures de recherches de la Station Biologique de Roscoff a été proposée. L'actuelle UPR 9042 se décomposerait en une Unité Mixte de Services (Directeur proposé André Toulmond) et une Unité Mixte de Recherche, CNRS-UPMC dont j'assurerais la direction en 2001. La création de cette dernière Unité a été jugé favorablement par la section 30 du Comité National de la Recherche Scientifique.

### **ACTIVITES LIEES A LA RECHERCHE**

Au titre de responsable d'équipe, outre la gestion normale de l'équipe au sein de la Station Biologique, je suis impliqué dans les différentes structures auxquelles nous sommes affiliés :

- Unité de Recherches Marines N°7 (IFREMER/UPMC/CNRS), "Ecologie et Ecophysiologie des Organismes Hydrothermaux Thermophiles" avec les équipes "Ecologie Abyssale" (D. Desbruyères, IFREMER, Brest) et "Biopolymères des Milieux Extrêmes" (F. Gaill, UMR 7622, CNRS-UPMC, Paris). 1997-2001. 150 kF/an
- Programme national DORSALES (resp. J. Francheteau, 1994-97; C. Mével 1998-2001).
  - Organisation d'un atelier de travail à Roscoff (1-2 Février 95, 46 participants) sur la Dynamique de l'Ecosystème Hydrothermal
  - Responsable d'un projet de l'Appel d'Offre "Structure et Phylogénie des Protéines" sur la *Structure Quaternaire des Héemocyanines des Alvinocarididae de la Dorsale Médio-Atlantique*. (ass. J. Lamy, CNRS Tours) 1996-97. 60 kF
  - Partenaire de deux autres projets en 1996/97
  - Organisation des "Journées d'Echange Biologie Hydrothermale" à Roscoff (6-8 Octobre 97, 60 participants). Edition des résumés dans Cah. Biol. Mar. 38(2).
  - Responsable du Groupe de projets "Symbioses" et organisation d'un atelier de travail à Roscoff (1-2 Février 99, 19 participants) sur les "Perspectives d'étude des modèles symbiotiques de l'écosystème hydrothermal profond"
  - Responsable d'un projet de l'Appel d'Offre « Symbioses et Microbiologie » sur *Les bactériocytes de Riftia pachyptila: modèle cellulaire d'une symbiose autotrophe. Application à l'étude du transport de carbone inorganique*. 1999-2000 : 80 kF.
  - Organisation des Journées Dorsales 2000 (Roscoff, 20-22 Sep 2000, 100 participants)
- ACR "Réponses adaptatives aux stress environnementaux: Aspects écophysiologiques, cellulaires et moléculaires" (MESR DSPT 5 et CNRS SDV), Partenaire du Réseau n°4 (resp. F. Gaill) "Adaptations des organismes aux conditions physico-chimiques de l'environnement hydrothermal". 1995-96. 300 kF
- ACC-SV Génétique et Environnement (MESR/CNRS/INSERM). Responsable du projet "Adaptation au milieu hydrothermal profond: l'exemple des hémoglobines extracellulaires" (ass. Jean Deutsch, UPMC) 1996-97. 350 kF
- Programme MAST 3 (CEE). Partenaire contractant dans le projet AMORES (resp. D. Desbruyères), Azores Mid-Oceanic Ridge Ecosystem Studies: an integrated research program on deep-sea hydrothermal transfers and fluxes. 1996-98. 600 kF
- Programme CEE-5°PCRD. Partenaire contractant dans le projet VENTOX (resp. D. Dixon, SOC, UK). "Hydrothermal vents as a natural pollution laboratory". 2000-02. 1200 kF

## **PARTICIPATION A DES CAMPAGNES OCEANOGRAPHIQUES**

- 1994 ..... DIVA2 (CdM. Desbruyères/Alayse) du 18 Juin au 4 Juillet sur la dorsale médio-Atlantique. NO/Nadir - Nautilé.
- 1994 ..... EPR 9-13 (CdM. Mullineaux/Childress/Felbeck) du 1er Novembre au 5 Décembre sur la dorsale du Pacifique oriental. RV/New Horizon et RV/Atlantis 2 - Alvin.
- 1996 ..... HOT 96 (CdM. F. Gaill pour l'URM 7) du 5 Février au 23 Mars sur la dorsale du Pacifique oriental. NO/Nadir - Nautilé et RV/Wecoma.

- 1997 ..... MARVEL (CdM. Desbruyères/Alayse) du 27 Août au 14 Septembre sur la dorsale médio-Atlantique. NO/L'Atalante - Nautille.
- 1999 ..... HOPE 99 (CdM. F. Lallier pour l'URM 7) du 9 Avril au 22 Mai sur la dorsale du Pacifique oriental. NO/L'Atalante - Nautille.

## **SOCIETES SCIENTIFIQUES**

Club de l'Hémoglobine  
 Society for Experimental Biology  
 European Society for Comparative Physiology and Biochemistry  
 Société Française de Spectrométrie de Masse  
 Société Française d'Ecophysiologie

## **EXPERTISE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES**

Cahiers de Biologie Marine, Comparative Biochemistry and Physiology, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Respiration Physiology, Physiological Zoology, Experimental Biology Online, Marine Ecology Progress Series, Journal of Crustacean Research, Journal of Experimental Biology.

## **ENCADREMENT DE STAGES DE RECHERCHE**

### **Stages de Maîtrise**

- 1993 .....BARKA S. Equilibre acide-base des liquides corporels de *Riftia pachyptila*, Vestimentifère inféodé aux sources hydrothermales profondes. Mémoire de Maîtrise Océanologie Appliquée. Univ. Perpignan. 32 pp.
- 1994 .....HOURDEZ S. Caractérisation et étude de la cinétique d'autoxydation de l'hémoglobine intracellulaire de *Glycera convoluta*. Mémoire de Maîtrise BOP. Univ. Paris VI. 21 pp

### **Participation à l'encadrement avec André Toulmond**

- 1993 .....ZAL F. Stratégie de reproduction de *Paralvinella grasslei*, Annélide Polychète des sources hydrothermales profondes. Impact de cette stratégie sur le recrutement larvaire et sur la dynamique de population de l'espèce. Rapport de DEA d'Océanologie Biologique Université P-et-M-Curie (Paris 6). 37 pp.
- 1995 .....HOURDEZ S. Ecophysiologie de la respiration en milieu hydrothermal : examen des potentialités adaptatives chez deux polynoidés commensaux. Rapport de DEA d'Océanologie Biologique. Université P-et-M-Curie (Paris 6).
- 1996 .....CAMUS L. Effets de l'hypercapnie sur l'équilibre acide-base de l'hémolymphe de crevettes : comparaison entre une espèce littorale et une espèce hydrothermale. Rapport de DEA d'Océanologie Biologique. Université P-et-M-Curie (Paris 6).
- 1997 .....CHAUSSON F. Structure et fonction de l'hémocyanine du crabe hydrothermal *Cyanograea praedator*. Rapport de DEA de Physiologie des Invertébrés. Université P-et-M-Curie (Paris 6).

- 1993-96 ....ZAL F. Structure moléculaire des hémoglobines extracellulaires d'annélides et de vestimentifères des sources hydrothermales profondes. Thèse soutenue le 27 Sep. 1996.
- 1995-00 ....HOURDEZ S. Le transport de l'oxygène en milieu hydrothermal profond : structure et fonction des hémoglobines d'annélides libres et commensales. Thèse soutenue le 13 Juin 2000.

### **Participation à l'encadrement avec Michèle Regnault**

- 1998 .....DE CIAN, M.-C. Voies du métabolisme azoté chez le vestimentifère *Riftia pachyptila* et recherche des interactions hôte-endosymbiontes, : Rapport de DEA de Physiologie des Invertébrés, *Univ. Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*, 24 p.

### **Encadrement doctoral en cours**

- 1997- .....CHAUSSON, F. Adaptation au milieu hydrothermal profond: étude comparative de l'écophysiologie respiratoire des Crustacés Décapodes des dorsales pacifique et atlantique. Physiologie des Invertébrés, ED Diversité du Vivant, *Univ. Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*, bourse Ifremer
- 1998- .....DE CIAN, M.C. Physiologie du transport de CO<sub>2</sub> chez un organisme symbiotique, le vestimentifère *Riftia pachyptila*. Physiologie des Invertébrés, ED Diversité du Vivant, *Univ. Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*, bourse MENESR.
- 1999- .....MERCIER, E. Détérioration du génome et mécanismes de réparation de l'ADN chez les organismes inféodés aux sources hydrothermales profondes. En cotutelle avec D.R. Dixon, SOC, Southampton, UK. Biodiversité ED Diversité du Vivant, *Univ. Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*, financement CEE.
- 2000 .....DECHERF, G. Adaptations physiologiques à l'hypercapnie chez les Crustacés : étude comparative entre espèces des environnements littoraux et hydrothermaux. Océanologie Biologique, ED Sciences de l'Environnement, *Univ. Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*, bourse MR.

### **JURY DE THESE**

- 1998 .....YOU, V. Structure de l'hémocyanine de la seiche *Sepia officinalis*. Thèse de l'Université de Tours.

# Liste des Publications

---

## *Thèse*

Adaptation de la fonction de transport de l'oxygène par l'hémocyanine en milieu hypoxique : étude chez la crevette *Penaeus japonicus* et chez le crabe *Carcinus maenas*. Thèse n° 258 de l'Université de Bordeaux I, Talence, France, 133 p.

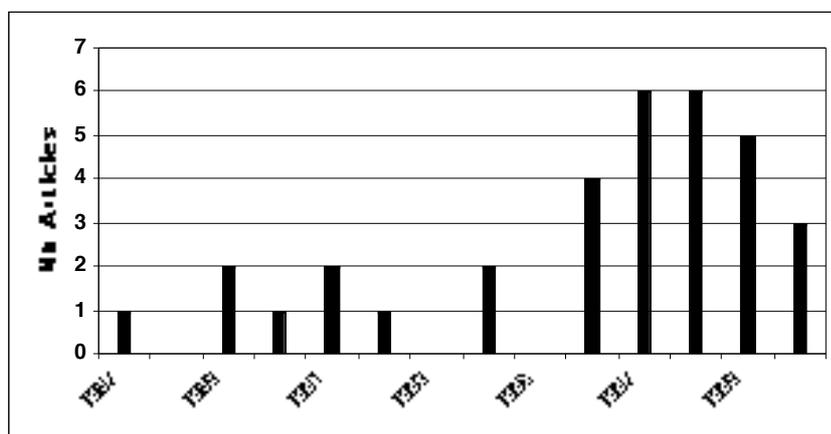
## *Articles originaux*

- O.1..... 1987 Lallier F., Boitel F. & Truchot J.P. The effect of ambient oxygen and temperature on haemolymph L-lactate and urate concentrations in the shore crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **86 A** : 255-260.
- O.2..... 1989 Lallier F. & Truchot J.P. Modulation of haemocyanin oxygen affinity by L-lactate and urate in the prawn *Penaeus japonicus* . *J.exp. Biol.* , **147** : 133-146.
- O.3..... 1989 Lallier F. & Truchot J.P. Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respir. Physiol.* **77** : 323-336.
- O.4..... 1990 Lallier F.H. & Walsh P.J. Urate does not accumulate in the haemolymph of exercised blue crabs, *Callinectes sapidus*. *J.exp. Biol.* **154** : 581-585.
- O.5..... 1991 Lallier F.H. & Walsh P.J. Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*.. *Bull. Mar. Sc.* **48**(3): 665-669.
- O.6..... 1991 Lallier F.H. & Walsh P.J. Activities of uricase, xanthine oxidase, and xanthine dehydrogenase in the hepatopancreas of aquatic and terrestrial crabs. *J. Crust. Biol.* **11**(4): 506-512.
- O.7..... 1992 Lallier F.H. & Walsh P.J. *In vitro* metabolism of isolated cells from the hepatopancreas of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in simulated exercise and hypoxic conditions. *Physiol. Zool.* **65**(4): 712-723.
- O.8..... 1994 Henry R.P., Booth, C.E., Lallier F.H. & Walsh P.J. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J. exp. Biol.* : **186**: 215-234
- O.9..... 1994 Toulmond A., Lallier F.H., de Frescheville J., Childress J.J., Sanders N.K., Lee R. & Desbruyères D. Unusual carbon dioxide-binding properties of body fluids from hydrothermal vent tubeworms *Deep Sea Res.*, **41** (10): 1447-1456..
- O.10..... 1996 Zal, F., Lallier, F.H., Wall, J.S., Vinogradov, S.N., Toulmond, A. The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: I- reexamination of the number and masses of its constituents. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8869-8874
- O.11..... 1996 Zal, F., Lallier, F.H., Green, B.N., Vinogradov, S.N. & Toulmond, A. (). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*: II. Complete polypeptide chain composition

- investigated by maximum entropy analysis of mass spectra. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8875-8881.
- O.12 ..... 1996 de Haas, F., Zal, F., Lallier, F.H., Toulmond, A. & Lamy, J.N. Three-dimensional reconstruction of the hexagonal bilayer hemoglobin of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* by cryoelectron microscopy. *Proteins*, **26**, 241-256.
- O.13 ..... 1996 de Haas F., Zal F., You V., Lallier F.H., Toulmond A. and Lamy, J.N. Three-dimensional reconstruction by cryoelectron microscopy of the giant hemoglobin of the polychaete worm *Alvinella pompejana*. *J. Mol. Biol.*, **264**, 111-120.
- O.14 ..... 1997 Zal, F., Green, B.N., Lallier, F.H., Vinogradov, S.N. & Toulmond, A. Quaternary structure of the extracellular hemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*. *Eur. J. Biochem.* **243**, 85-92.
- O.15 ..... 1997 Lallier F.H., Truchot J.P. Hemocyanin oxygen-binding properties of a deep-sea hydrothermal vent shrimp: evidence for a novel cofactor. *J. Exp. Zool.* **277**, 357-364.
- O.16 ..... 1997 Goffredi S. K., Childress J. J., Desaulniers N. T., Lee R. W., Lallier F. H., Hammond D. Inorganic carbon acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* depends upon high external Pco<sub>2</sub> and on proton elimination by the worm. *J. Exp. Biol.* , **200**: 883-896.
- O.17 ..... 1997 Zal F., Green B. N., Lallier F. H., Toulmond A. (1997). Investigation by electrospray ionisation mass spectrometry of the extracellular hemoglobin from the polychaete annelid *Alvinella pompejana* : an unusual hexagonal bilayer hemoglobin. *Biochemistry* , **36**(39): 11777-11786.
- O.18 ..... 1997 Zal F., Suzuki T., Kawasaki Y., Childress J.J., Lallier F.H., Toulmond A. Primary structure of the common polypeptide chain b from the multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: Implication on the knowledge of the sulfide binding-site. *Proteins*, **29**: 562-574.
- O.19 ..... 1997 Goffredi S. K., Childress J. J., Desaulniers N. T., Lallier F. H. (1997). Sulfide acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is via diffusion of HS<sup>-</sup> rather than H<sub>2</sub>S. *J. exp. Biol.* , **200**: 2609-2616.
- O.20 ..... 1998 Truchot, J. P. and Lallier, F. H. High CO<sub>2</sub> content in hydrothermal vent water at the Snake Pit area, Mid-Atlantic Ridge. *Cah. Biol. Mar.* **39**, 153-158.
- O.21 ..... 1998 Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. How to be the perfect host: CO<sub>2</sub> and HS<sup>-</sup> accumulation and H<sup>+</sup> elimination in the hydrothermal vent tubeworm *R. pachyptila*. *Cahiers de Biologie Marine* **39**, 297-300.
- O.22 ..... 1998 Lallier, F. H., Camus, L., Chausson, F. and Truchot, J. P. Structure and function of hydrothermal vent crustacean hemocyanin: an update. *Cah. Biol. Mar.* **39**, 313-316.

- O.23..... 1998 Gru, C., Sarradin, P.-M., Legoff, H., Narcon, S., Caprais, J.-C. and Lallier, F. H. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from *Riftia pachyptila*. *Analyst* **123**, 1289-1293.
- O.24..... 1998 Zal, F., Kuster, B., Green, B. N., Harvey, D. J. and Lallier, F. H. Partially glucose-capped oligosaccharides are found on the haemoglobins of the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila*. *Glycobiology* **8**, 663-673.
- O.25..... 1998 Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., Van Dorsselaer, A. and Childress, J. J. S-sulfohemoglobin and disulfide-exchange: the mechanisms of sulfide-binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**, 8997-9002.
- O.26..... 1999 Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. The ionic composition of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, evidence for the elimination of  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{H}^+$  and for a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  shift. *Physiol. Bioch. Zool.* **72**, 296-306.
- O.27..... 1999 Hourdez, S., Lallier, F. H., Green, B. N. and Toulmond, A. Hemoglobins from deep-sea scale-worms of the genus *Branchipolynoe* (Polychaeta, Polynoidae) : a new type of quaternary structure. *Proteins* **34**, 427-434.
- O.28..... 1999 Hourdez, S., Martin-Jézéquel, V., Lallier, F. H., Weber, R. E. and Toulmond, A. Characterization and functional properties of the extracellular coelomic hemoglobins from the deep-sea, hydrothermal vent scaleworm *Branchipolynoe symmytilida*. *Proteins* **34**, 435-442.
- O.29..... 1999 Seibel, B. A., Chausson, F., Lallier, F. H., Zal, F. and Childress, J. J. Vampire blood: respiratory physiology of the vampire squid (Cephalopoda: Vampyromorpha) in relation to the oxygen minimum layer. *Exp. Biol. Online* **4**, 1.
- O.30..... 1999. Green B.N., Bordoli R.S., Hanin L.G., Lallier F.H., Toulmond A. Vinogradov S.N. Electrospray Ionization Mass Spectrometric Determination of the Molecular Mass of the ~200-kDa Globin Dodecamer Subassemblies in Hexagonal Bilayer Hemoglobins *J Biol Chem*, **274**: 28206-28212.
- O.31..... 2000. De Cian M.-C., Regnault M. Lallier F.H. Nitrogen metabolites and related enzymatic activities in the body fluids and tissues of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* *J. Exp. Biol.*, **203**: 2907-2920.
- O.32..... 2000. Hourdez S., Lallier F.H., De Cian M.-C., Green B.N. Weber R.E. The gas transfer system in *Alvinella pompejana* (Annelida Polychaeta, Terebellida). Functional properties of intracellular and extracellular hemoglobins *Physiol. Bioch. Zool.*, **73**: 365-373.
- O.33..... 2000. Zal F., Green B.N., Martineu P., Lallier F.H., Toulmond A., Vinogradov S.N. Childress J.J. Polypeptide chain composition diversity of hexagonal-bilayer haemoglobins within a single family of annelids, the Alvinellidae *European J. Biochem.*, **267**: 5227-5236.

- O.34 ..... Chausson, F., Sarradin, P.M. and Lallier, F.H. Effects of hypercapnia on the haemolymph acid-base balance of the deep-sea hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*. . *Physiol. Biochem. Zool.* **soumis**..
- O.35 ..... Chausson, F., Bridges, C.R., Sarradin, P.M., Green, B.N., Riso, R., Caprais, J.C., Lallier, F.H. Structural and functional properties of hemocyanin from *Cyanagraea praedator*, a deep-sea hydrothermal vent crab. *Proteins*, **accepté**



### *Articles de Synthèse*

- S 1 ..... 1992 Truchot J.P. & Lallier F.H. . The modulation of the O<sub>2</sub>-carrying function of hemocyanin in the crustaceans. *News in Physiological Sciences* **7**: 49-52.
- S 2 ..... 1993 Lallier F.H. Urate in decapod crustaceans : a dual role in nitrogen excretion and oxygen transport. *Trends in Comp. Biochem. Physiol.* **1**: 501-507.
- S 3 ..... 1998 Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A.-M., Jollivet, D., Lallier, F. H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P.-M., Cosson, R., Caprais, J.-C., Arndt, C., O'Brien, J., Guezennec, J., Hourdez, S., Riso, R., Gaill, F., Laubier, L. & Toulmond, A. Biology and ecology of the Pompei worm (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller on an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-Sea Res. Part II* **45**, 383-422.
- S 4 ..... 2000 Lallier F.H., Shillito B., Zal F. The biology of the giant hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones. *C. R. Acad. Sc., Paris* (en préparation)

### *Brevet*

- B.1 ..... 2000 Zal F., Lallier F.H., Toulmond A. Utilisation comme substitut sanguin d'une hémoglobine extracellulaire de poids moléculaire élevé. Brevet CNRS INPI n° 00/07031.

### *Autres publications*

- P.1 ..... 1994 Desbruyères D., Alayse A.M., Antoine E., Barbier G., Barriga F., Biscoito M., Briand P., Brulport J.P., Comtet T., Cornec L., Crassous P., Dando P., Fabri M.C., Felbeck H., Lallier F., Fiala-Médioni A., Gonçalves J., Ménard F., Kerdoncuff J., Patching J., Saldanha L. Sarradin P.M. New informations on the ecology of deep-sea vent communities in the Azores triple junction area: Preliminary results of the Diva 2 cruise (May 31 - July 4 1994). *InterRidge News*, **3**: 18-19.
- P.2 ..... 1994 Zal F., de Frescheville J., Lallier F.H., Toulmond A. Jouin-Toulmond C. Structure moléculaire des hémoglobines extracellulaires d'Annélides et de Vestimentifères colonisant les sources hydrothermales profondes. *La Lettre DORSALES*, **1**: 11-12.
- P.3 ..... 1996 Gaill F., Felbeck H., Desbruyères D., Lallier F., Toulmond A., Alayse A.M., Briand P., Brulport J.P., Caprais J.C., Chevaldonné P., Coail J.Y., Cosson R., Crassous P., Delachambre J., Durif C., Echardour L., Hervé G., Hourdez S., Jollivet D., Kerdoncuff J., Kripounoff A., Lechaire J.P., Prusky A., Ravaux J., Sarradin P.M., Shillito B., Toullec J.Y., Arndt C., Fisher C., Lutz R. Childress J.J. Hot 96 news. *InterRidge News*, **5**: 22-24.
- P.4 ..... 1996 Gaill F., Desbruyères D., Lallier F., Toulmond A., Alayse A.M., Briand P., Brulport J.P., Caprais J.C., Chevaldonné P., Coail J.Y., Cosson R., Crassous P., Delachambre J., Durif C., Echardour L., Hervé G., Hourdez S., Jollivet D., Kerdoncuff J., Kripounoff A., Lechaire J.P., Prusky A., Ravaux J., Sarradin P.M., Shillito B., Toullec J.Y., Arndt C., Felbeck H., Fisher C., Lutz R. Childress J.J. Campagne Hot 96 : une campagne franco-américaine de biologie dans le Pacifique oriental. *La Lettre Dorsales*, **3**: 4-6.
- P.5 ..... 1996 Gaill F., Felbeck H., Desbruyères D., Lallier F., Toulmond A., Alayse A.M., Briand P., Brulport J.P., Caprais J.C., Chevaldonné P., Coail J.Y., Cosson R., Crassous P., Delachambre J., Durif C., Echardour L., Hervé G., Hourdez S., Jollivet D., Kerdoncuff J., Kripounoff A., Lechaire J.P., Prusky A., Ravaux J., Sarradin P.M., Shillito B., Toullec J.Y., Arndt C., Fisher C., Lutz R. Childress J.J. Hot 96 - 9 February 23 March 1996. *Deep-Sea Newsletter*, **25**: 16-18.
- P.6 ..... 1999 Andersen A. Lallier F.H. En plongée sur les sources hydrothermales. *Revue du Palais de la Découverte*, **27**: 17-26.
- P.7 ..... 1999 Lallier F.H., Gaill F., Desbruyères D. campagne I.e.d.p.à.I. Campagne HOPE 99 (N.O. L'Atalante et Nautille; avril-mai 99): retour sur la zone atelier 13°N EPR. *La Lettre Dorsales*, **6**: 16-20.
- P.8 ..... 1999 Lallier F.H., Gaill F., Desbruyères D., Andersen A., Birrien J.-L., Biscoito M., Bonhomme F., Boorman B., Briand P., Caprais J.C., Chausson F., Chevaldonné P., Cheynel D., Cosson R., De Cian M.-C., Dixon D.R., Edge D., Fabri M.-C., Fiala-Medioni A., Herring P.J., Hervé G., Hourdez S., Jollivet D., Khripounoff A., Lallier M., Le Bris N., Lecornu F., Ondréas H., Pradillon F., Pond D., Rodier P., Sarradin P.-M., Ségonzac M., Shillito B., Thiébaud E. Toullec J.Y. The HOPE 99 cruise: back to 13°N EPR. *InterRidge News*, **8**: 19-22. Communications

## Communications

En **gras**, les communications avec actes, en encadré, les conférences invitées.

- C.1 ..... 1986** Lallier F.H. Truchot J.P. *Association des Physiologistes, 55ème Réunion, Bordeaux (F)*, **Poster**. Rôle du L-lactate et de l'urate dans le contrôle de l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène chez le crabe. *J. Physiol. (Paris)* **82**: 9A.
- C.2..... 1987 Lallier F.H. Truchot J.P. *Society for Experimental Biology, Lancaster (UK), 28-31 Mar.* **Poster**. Cofactor modulation of hemocyanin oxygen affinity in the prawn, *Penaeus japonicus*.
- C.3 ..... 1988** Lallier F.H. *Ass. Jeunes Océanographes de France, Bordeaux (F), 3 Nov.* **Oral**. Caractéristiques respiratoires des marais saumâtres aquacoles de la côte Atlantique. *J. Rech. Oceanogr* **1-2**: 20.
- C.4..... 1989 Lallier F.H. *Society for Experimental Biology, Edinburgh (UK), 3-7 Avr.* **Démonstration sur ordinateur**. Oxygen dissociation curves : data analysis and graphic generation with a set of menu driven softwares.
- C.5..... 1989 Lallier F.H. Truchot J.P. *Society for Experimental Biology, Edinburgh (UK), 3-7 Avr.* **Poster**. Does cofactor modulation of crustacean hemocyanin function play a role in oxygen transport during hypoxia?
- C.6..... 1990 Lallier F.H. Walsh P.J. *American Physiological Society, Orlando (USA)*, **Poster**. Aspects of the energetic metabolism of isolated cells from blue crab hepatopancreas in simulated hypoxic or post-exercise conditions.
- C.7 ..... 1990** Lallier F. Walsh P.J. *American Society of Zoology, San Antonio (TX) (USA), Dec.* **Poster**. On the purineolytic pathway in aquatic and terrestrial crabs. *Amer. Zool.* **30**: 70A.
- C.8..... 1991 Henry R.P., Lallier F.H. Walsh P.J. *Society for Experimental Biology, Birmingham (UK), April.* **Oral**. Comparative physiology of exercise and post-exercise recovery in three species of crustaceans.
- C.9 ..... 1991** Henry R.P., Lallier F.H. Walsh P.J. *American Society of Zoology, Atlanta (USA), Dec.* **Poster**. Comparative aspects of lactate production and metabolism in aquatic and terrestrial crustaceans. *Amer. Zool.* **31**: 70A.
- C.10..... 1992 Truchot J.P. Lallier F.H. *Symposium on Respiration in Health and Disease : Lessons from Comparative Physiology, Bochum (D), 16-20 Août.* **Poster**. Blood oxygen transport during hypoxia in aquatic crustaceans.
- C.11..... 1993 Lallier F.H. *Table Ronde de la Société Zoologique de France, Paris (F), Janv.* **Oral, Invité**. Fonction respiratoire et adaptations de l'hémocyanine des Crustacés Décapodes.
- C.12..... 1993 Lallier F.H., Toulmond A. Loth M.M. *Society for Experimental Biology, Canterbury (U.K.), April.* **Oral**. Autoxidation and oxidation of extracellular haemoglobin from the lugworm *Arenicola marina* and the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*.

- C.13..... 1993 Toulmond A., Lallier F.H. De Frescheville J. *Society for Experimental Biology, Canterbury (U.K.), April. Oral*. Unusual carbon dioxide-combining properties of body fluids in hydrothermal vent tubeworms.
- C.14..... 1994 Lallier F.H., Toulmond A. Loth M.M. *Club de l'Hémoglobine, Paris (F), 4-5 Fev. Oral*. Quelques propriétés remarquables de l'hémoglobine extracellulaire de l'Arénicole. *Nouv. Rev. Fr. Hematol. Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **36**: 1-7.
- C.15..... 1994 Lallier F.H., Toulmond A. De Frescheville J. *7th Deep Sea Biology Symposium, Hersonissos (Crete), 29 Sep-4 Oct. Poster*. The body fluids of hydrothermal vent tubeworms exhibit unusual carbon-dioxide combining properties.
- C.16..... 1995 Lallier F.H. *Table Ronde de la Société Zoologique de France, Paris (F), 30 Jan. Oral, Invité*. Passage de la respiration aquatique à la respiration aérienne chez les crustacés Décapodes de la zone intertidale.
- C.17..... 1995 Hourdez S., Jouin-toulmond C. Lallier F.H. *99ème congrès de la Société Zoologique de France, Nantes (F), 3-5 Juil. Oral*. Échanges respiratoires chez deux Polynoidae (Annélides Polychètes) commensaux des moules hydrothermales: *Branchipolynoe seepensis* et *B. symmytilida*.
- C.18..... 1995 Toulmond A., Lallier F.H., Zal F. Jouin-Toulmond C. *99ème Congrès de la Société Zoologique de France, Nantes (F), 3-5 Jul. Oral*. Origine et transport des substances inorganiques indispensables au fonctionnement des symbioses chimiolithoautotrophes caractéristiques des sources hydrothermales profondes.
- C.19..... 1995 Zal F., Green B.N., Lallier F.H. Toulmond A. *XXIIème forum des jeunes chercheurs en Biochimie et Biologie Moléculaire, Grenoble (F), 4-7 Jul. Oral*. Etude de la structure quaternaire de l'hémoglobine extracellulaire de *Alvinella pompejana*, Annélide polychète des sources hydrothermales profondes, déterminée par spectrométrie de masse couplée à un système d'électrospray à ionisation.
- C.20..... 1995 Hourdez S., Jouin-toulmond C., De Frescheville J. Lallier F.H. *4th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Birmingham (UK), 6-11 Aug. Oral*. Characterisation of extracellular haemoglobins from two deep-sea scaleworms commensal with hydrothermal vent mussels, *Branchipolynoe seepensis* and *B. symmytilida*. (Polychaeta; Polynoidae). *Physiological Zoology* **68**: 80.
- C.21..... 1995 Lallier F.H. Toulmond A. *4th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Birmingham (UK), 6-11 Aug. Oral*. Stability properties of extracellular haemoglobins from the hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila*. : autoxidation and oxidation kinetics. *Physiological Zoology* **68**: 80.
- C.22..... 1995 Zal F., Green B.R., Vinogradov S., Lallier F.H. Toulmond A. *4th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Birmingham (UK), 6-11 Aug. Oral*. Quaternary structure of extracellular haemoglobin from the hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) determined by electrospray ionisation mass spectrometry. *Physiological Zoology* **68**: 80.

- C.23..... 1995 Zal F., Green B.N., Vinogradov S.N., Lallier F.H. Toulmond A. *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu (Hawaï, USA), 17-22 Dec.* **Oral, Invité.** Quaternary structure of the extracellular hemoglobin of *Riftia pachyptila* (Vestimentifera).
- C.24..... 1995 Zal F., Green B.N., Vinogradov S.N., Lallier F.H. Toulmond A. *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu (Hawaï, USA), 17-22 Dec.* **Poster.** Maximum entropy analysis of the heteromultimeric hemoglobin from the "Pompeii worm" *Alvinella pompejana*.
- C.25..... 1996 Andersen A.C. Lallier F.H. *Society for Experimental Biology, Lancaster (UK), 25-29 Mar.* **Poster.** Immunolocalization of a band-3 analog in the deep sea hot vent vestimentiferan, *Riftia pachyptila* (J.).
- C.26..... 1996 Lallier F.H. *International Conference on "The Biology of Crustacea", Plymouth (UK), 1-3 Avr.* **Oral.** Haemolymph composition and haemocyanin properties of deep-sea hydrothermal vent shrimps.
- C.27..... 1996 Zal F., Green B.N., Lallier F.H. Toulmond A. *Journée des Doctorants du Centre des Sciences de la Mer, Roscoff (F), 29-30 Avril.* **Poster.** L'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* revue et corrigée par spectrométrie de masse couplée à un système d'électro-nébulisation.
- C.28..... 1996 Zal F., Lallier F.H., Green B.N. Toulmond A. *2ème Atelier de Spectrométrie de Masse, Gif/Yvette (F), 20-21 Mai.* **Oral.** The extracellular hemoglobin from the hot worm *Alvinella pompejana* investigated by electrospray ionisation spectrometry.
- C.29..... 1996 Hourdez S., Jouin-Toulmond C. Lallier F.H. *Mid-Atlantic Ridge Symposium, Reykjavik (ISL), 19-22 Juin.* **Oral.** Respiration in the deep-sea mussel commensal scaleworm, *Branchiopolynoe seepensis*.
- C.30..... 1996 Lallier F.H. Truchot J.P. *Mid-Atlantic Ridge Symposium, Reykjavik (ISL), 19-22 Juin.* **Poster.** Hemocyanin structure and function in alvinocaridean shrimps.
- C.31..... 1996 Toulmond A., Zal F. Lallier F.H. *Supramolecular organization and functional regulation in Invertebrate dioxygen binding proteins, XIe International Congress, Padova (I), 30 Jun-6 Jul.* **Oral, Invité.** Extracellular hemoglobins of vestimentiferan tubeworms : structure and function.
- C.32..... 1996 Truchot J.P. Lallier F.H. *Supramolecular organization and functional regulation in Invertebrate dioxygen binding proteins, XIe International Congress, Padova (I), 30 Jun-6 Jul.* **Oral.** Functional properties of the hemocyanin of the hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*.
- C.33..... 1996 Zal F., Green B.N., Lallier F.H. Toulmond A. *Supramolecular organization and functional regulation in Invertebrate dioxygen binding proteins, XIe International Congress, Padova (I), 30 Juin-6 Juil.* **Oral.** Investigation by electrospray ionisation mass spectrometry of the extracellular hemoglobin from the Polychaete annelid *Alvinella pompejana* : an unusual hexagonal bilayer hemoglobin.
- C.34..... 1997 Zal F., Lallier F.H. Toulmond A. *Club de l'Hémoglobine, Société Française d'Hématologie, Paris, 6-8 Fev.* **Oral.** Liaisons des sulfures

par les hémoglobines extracellulaires d'annélides: un mécanisme similaire au transport du NO ?

- C.35..... 1997 Lallier F.H., Camus L. Truchot J.P. *Society for Experimental Biology, Annual meeting, Canterbury (UK), 7-11 Apr. Poster*. Comparison of haemolymph acid-base status under hypercapnia in shrimps from littoral (*Palaemon serratus*) and hydrothermal (*Chorocaris chacei*) environments.
- C.36..... 1997 Küster B., Zal F., Green B.N., Harvey D.J. Lallier F.H. *45 th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Palm Spring, California, USA, June 1-5. Poster*. MALDI-MS and ESI-MS/MS analysis of unusual N-linked glycans from the deep sea worm *Riftia pachyptila*.
- C.37..... 1997 Zal F., Green B.N., Lallier F.H., Vinogradov S.N. Toulmond A. *45 th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Palm Spring, California, USA, June 1-5. Poster*. Maximum entropy analysis of electrospray ionization mass spectra of the heteromultimeric hemoglobin of *Arenicola marina*.
- C.38..... 1997 Zal F., Suzuki T., Kawasaki Y., Childress J.J., Lallier F.H. Toulmond A. *8th Deep-Sea Biology Symposium, Monterey, California, USA, 22-27 Sep. Oral*. Phylogenetic relationship between Annelida, Vestimentifera and Pogonophora revealed by the amino acid sequence of globin chains.
- C.39..... 1997 Chausson F. Lallier F.H. *Biologie des Sources Hydrothermales Profondes, Journées d'échanges du Programme Dorsales., Roscoff, FR, 6-8 Oct. Oral*. Hemocyanin structure and function of an hydrothermal vent crab, *Cyanagraea praedator*. *Cahiers de Biologie Marine* **38**: 111-148.
- C.40..... 1997 De Cian M.-C., Regnault M. Lallier F.H. *Biologie des Sources Hydrothermales Profondes, Journées d'échanges du Programme Dorsales., Roscoff, FR, 6-8 Oct. Poster*. Nitrogenous metabolites in tissues and circulating fluids of *Riftia pachyptila*. *Cahiers de Biologie Marine* **38**: 111-148.
- C.41..... 1997 Hourdez S., Lallier F.H., Jouin-Toulmond C., Green B.N., Weber R.E. Toulmond A. *Biologie des Sources Hydrothermales Profondes, Journées d'échanges du Programme Dorsales., Roscoff, FR, 6-8 Oct. Oral*. Respiratory adaptations in the scaleworm *Branchipolynoe* spp., a Polychaete commensal with deep-sea mussels. *Cahiers de Biologie Marine* **38**: 111-148.
- C.42..... 1997 Lallier F.H. Truchot J.-P. *Biologie des Sources Hydrothermales Profondes, Journées d'échanges du Programme Dorsales., Roscoff, FR, 6-8 Oct. Poster*. Hemocyanin structure and function in alvinocaridean shrimps. *Cahiers de Biologie Marine* **38**: 111-148.
- C.43..... 1997 Toulmond A., Lallier F.H., Zal F. Hourdez S. *Biologie des Sources Hydrothermales Profondes, Journées d'échanges du Programme Dorsales., Roscoff, FR, 6-8 Oct. Oral*. Hemoglobins, key molecules for life at deep sea hydrothermal vent sites. *Cahiers de Biologie Marine* **38**: 111-148.

- C.44 ..... 1997 Truchot J.P. Lallier F.H. *Biologie des Sources Hydrothermales Profondes, Journées d'échanges du Programme Dorsales., Roscoff, FR, 6-8 Oct. Oral.* High CO<sub>2</sub> content of vent water at the mid atlantic ridge. *Cahiers de Biologie Marine* **38**: 145.
- C.45 ..... 1997 Andersen A.C., Hamraoui L. Lallier F.H. *First International Symposium on Hydrothermal Vent Biology, Funchal, Madeira, PT, 19-24 Oct. Poster.* Does *Riftia* have a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger for carbon dioxide transport processes ?
- C.46 ..... 1997 Hourdez S., Lallier F.H., Jouin-Toulmond C., Green B.N., Weber R.E. Toulmond A. *First International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology, Funchal, Madeira, PT, 19-24 Oct. Oral.* Respiratory adaptations in the scaleworm *Branchipolynoe* spp., a Polychaete commensal with deep-sea mussels.
- C.47 ..... 1997 Lallier F.H., Camus L., Chausson F. Truchot J.P. *First International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology, Funchal, Madeira, PT, 19-24 Oct. Oral.* Structure and function of hydrothermal vent crustacean hemocyanin: an update.
- C.48 ..... 1997 Lallier F.H., Goffredi S.K., Childress J.J. Desaulniers N.T. *First International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology, Funchal, Madeira, PT, 19-24 Oct. Poster.* Carbon dioxide and sulfide acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*.
- C.49 ..... 1997 Toulmond A., Lallier F.H., Zal F. Hourdez S. *First International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology, Funchal, Madeira, PT, 19-24 Oct. Oral.* Hemoglobins, key molecules for deep sea hydrothermal vent life.
- C.50 ..... 1997 Zal F., Leize E., Lallier F.H., Toulmond A. Childress J.J. *First International Symposium on Deep-Sea Hydrothermal Vent Biology, Funchal, Madeira, PT, 19-24 Oct. Oral.* Identification of one sulfide-binding site of the hemoglobin of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*.
- C.51 ..... 1997 Lallier F.H. *Colloque National du Programme DORSALES, Paris, FR, 24-25 Nov. Oral.* Physiologie des échanges respiratoires et ioniques.
- C.52 ..... 1998 Bailly X., Jollivet D., Zal F. Lallier F.H. *Extreme Marine Environments, Plymouth (UK), 30 Mar-3 Apr. Poster.* Globins cDNA sequences and the sulphide transport function of *Riftia pachyptila* haemoglobins.
- C.53 ..... 1998 Chausson F. Lallier F.H. *4th International Crustacean Congress, Amsterdam (NL), 20-24 Jul. Oral.* Structure and function of *Cyanograea praedator* hemocyanin: adaptation to the hydrothermal vent environment.
- C.54 ..... 1998 Zal F., Leize E., Lallier F.H., Toulmond A., Dorsselaer A.V. Childress J.J. *Ridge Symposium, Santa Barbara, California, USA, 24-26 Sep. Oral.* S-sulfohemoglobin and disulfide-exchange: The mechanisms of sulfide-binding by *Riftia pachyptila* hemoglobin.
- C.55 ..... 1998 Bailly X., Jollivet D., Zal F. Lallier F.H. *International Conference on Oxygen Binding and Heme Proteins, Asilomar, Pacific Grove, USA, 27*

Sep - 2 Oct. **Poster**. Globins cDNA sequences and the sulphide transport function of *Riftia pachytila* hemoglobins.

- C.56..... 1998 Hourdez S., Lallier F.H., Green B.N., Weber R.E. Toulmond A. *International Conference on Oxygen Binding and Heme Proteins, Asilomar, Pacific Grove, USA, 27 Sep - 2 Oct. Poster*. Quaternary structure and functional properties of the coelomic hemoglobins of *Branchipolynoe symmytilida*.
- C.57..... 1998 Zal F., Leize E., Lallier F.H., Toulmond A., Dorsselaer A.V. Childress J.J. *International Conference on Oxygen Binding and Heme Proteins, Asilomar, Pacific Grove, USA, 27 Sep - 2 Oct. Poster*. Identification of the sulfide-binding sites on the hemoglobin from the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachytila*.
- C.58..... 1998** Lallier F.H. *Invited seminar, Dpt of Biology, U C Santa Barbara, USA, Oct 6, 1998. Oral, Invité*. *Branchipolynoe*, the new vent model: a commensal worm with unique adaptive features for respiration and reproduction.
- C.59..... 1998 Hourdez S., Jouin-Toulmond C. Lallier F.H. *EC/MAST3 AMORES Final Meeting, Lisbonne, Portugal, 15-19 Nov. Oral*. Respiratory adaptations of the commensal scaleworm *Branchipolynoe seepensis*.
- C.60..... 1999** Hourdez S., Weber R.E., Lallier F.H. Fisher C.R. *Annual meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology, Denver, Colorado, USA, 6-10 Jan. Poster*. Adaptations to chronic hypoxia in polychaetes from deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Amer. Zool.* **38**: 555.
- C.61..... 1999 Chausson F., Sarradin P.-M., Green B.N., Truchot J.-P. Lallier F.H. *20th European Society for Comparative Biochemistry and Physiology Conference, Aarhus (DK), 27-30 Jun. Oral*. Respiratory adaptations to the hydrothermal vent environment: structure and functional properties of *Cyanagraea praedator* (Crustacea: Decapoda) haemocyanin.
- C.62..... 1999** Hourdez S., Lallier F.H., Green B.N., Weber R.E. Toulmond A. *20th European Society for Comparative Biochemistry and Physiology Conference, Aarhus (DK), 27-30 Jun. Oral, Invité*. Respiratory adaptations to the hydrothermal vent environment: gills and coelomic hemoglobins of *Branchipolynoe* (Polychaeta: Polynoidae).
- C.63..... 2000** Lallier F.H. *Invited Seminar, RSMAS, University of Miami, Feb 28. Oral, Invité*. How to be the perfect host ? Sulfide and carbon dioxide transport in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachytila*.
- C.64..... 2000 Chausson F., Sarradin P.M. Lallier F.H. *Society for Experimental Biology, Exeter, UK, Mar 27-31. Oral*. Effects of hypercapnia on haemolymph acid-base status in a deep-sea hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*.
- C.65..... 2000 Chausson F., Camus L., Lallier F.H., Sarradin P.M., Truchot J.P. Bridges C.R. *Society for Experimental Biology, Exeter, UK, Mar 27-31. Poster*. Haemocyanin function in deep-sea hydrothermal decapod crustaceans.
- C.66..... 2000 Ondréas H., Fouquet Y., Lallier F., Andersen A. HOPE E. *Rassemblement des Sciences de la Terre, Paris (FR), Apr. Poster*.

Hydrothermalisme hors-axe: cadre géologique et métallogénie des sites de l'EPR à 13°N.

- C.67..... 2000 Chausson F., Colaço A., Sarradin P.M., Desbruyères D., Dehairs F. Lallier F.H. *IXth Deep-Sea Biology Symposium, Galway, Ireland, Jun 25-30. Poster*. Some aspects of the biology of *Segonzacia mesatlantica*, an hydrothermal vent crab from the Mid-Atlantic Ridge.
- C.68..... 2000 Bailly X., Jollivet D. Lallier F.H. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Oral*. Did duplication events generate a new function of H<sub>2</sub>S binding in the multigenic globin family of *Riftia pachyptila* ?
- C.69..... 2000 Chausson F., Bridges C.R., Sarradin P.-M. Lallier F.H. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Oral*. Micro-environments and functional properties of haemocyanin: correlation or divergence? The case of two hydrothermal vent crabs.
- C.70..... 2000 Chausson F., Lallier F.H., Sarradin P.-M., Green B.N., Boisset N. Van Dorsselaer A. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Poster*. Quaternary structure of the hydrothermal vent crab, *Cyanagraea praedator*, haemocyanin.
- C.71..... 2000 Hourdez S., Weber R.E., Lallier F.H. Toulmond A. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Oral*. Gas transfer system in the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*.
- C.72..... 2000 Lallier F.H. Zal F. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Poster*. Multi-angular laser light scattering : an alternative to measure the mass of giant O<sub>2</sub> binding proteins.
- C.73..... 2000 Zal F., Bailly X., Gotoh T., Lallier F.H., Toulmond A. Childress J.J. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Oral*. Free Cystein residues: active sites for “new” functions in worm hemoglobins, sulfide carrying and/or trapping.
- C.74..... 2000 Zal F., Green B.N., Martineu P., Lallier F.H., Toulmond A., Vinogradov S.N. Childress J.J. *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Roscoff, France, Jul 23-28. Poster*. Polypeptide chain composition diversity of hexagonal-bilayer haemoglobins within a single family of Annelids, the Alvinellidae.
- C.75..... 2000 De Cian M.C., Bailly X., Andersen A.C., Shillito B. Lallier F.H. *Experimental Biology 2000, Cambridge UK, Jul 30 - Aug 3. Poster*. Carbon dioxide cellular transport in a symbiotic invertebrate, the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*.
- C.76..... 2000 Chausson F., Colaço A., Sarradin P.M., Desbruyères D., Dehairs F. Lallier F.H. *Journées DORSALES 2000, Roscoff, France, Sep 20-22. Poster*. Quelques aspects sur la biologie de *Segonzacia mesatlantica*, crabe hydrothermal de la dorsale médio-atlantique.

- C.77 ..... 2000 De Cian M.C., Bailly X., Andersen A.C., Shillito B. Lallier F.H. *Journées DORSALES 2000, Roscoff F, Sep 20-22. Oral*. Transport et conversion du dioxyde de carbone chez un invertébré symbiotique autotrophe, le vestimentifère *Riftia pachyptila*.
- C.78 ..... 2000 Hourdez S., Weber R.E., Lallier F.H. Toulmond A. *Journées DORSALES 2000, Roscoff, France, Sep 20-22. Poster*. Système de transfert gazeux chez le Polychète des sources hydrothermales *Alvinella pompejana*.
- C.79 ..... 2000 Zal F., Bouchereau A., Galichet F., Shillito B., Sarradin P.-M., Bris N.L., Caprais J.-C. Lallier F.H. *Journées DORSALES 2000, Roscoff, France, Sep 20-22. Poster*. Évolution du système IPOCAMP : Contrôle des paramètres chimiques de l'enceinte (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S, NO<sub>2</sub> et NO<sub>3</sub>) pour une expérimentation *in situ* simulée.

	<b>Oral</b>	<b>Poster</b>
<b>International</b>	<b>28</b>	<b>23</b>
<b>National</b>	<b>16</b>	<b>11</b>

## Activité de Recherche

---

Très tôt attiré par le monde marin<sup>2</sup> et par la biologie des organismes qui y vivent, j'ai concrétisé cette vocation par une double formation : Maîtrise d'Océanologie Biologique et Maîtrise de Physiologie à l'Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6). J'ai alors rejoint l'équipe du Professeur Jean-Paul Truchot à Arcachon (Université de Bordeaux I et CNRS URA 1126) pour y étudier la physiologie respiratoire des Crustacés, et plus spécifiquement la régulation de la fonction de transport de l'oxygène par l'hémocyanine via des effecteurs organiques (lactate et urate), régulation impliquée notamment dans l'adaptation à l'hypoxie (DEA en 1984 et Thèse en Biologie et Physiologie Animales en 1988). J'ai poursuivi ces travaux avec le Docteur Patrick J. Walsh (Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences, University of Miami, Florida, USA) par une approche plus biochimique visant à clarifier les voies métaboliques mises en jeu dans ces régulations, notamment en mettant au point un modèle d'expérimentation sur des cellules isolées d'hépatopancréas (Stage Post-doctoral, 1989-90).

J'ai ensuite<sup>3</sup> obtenu un poste d'ATER<sup>4</sup> à l'Université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6) en Octobre 1991. J'ai alors effectué mes recherches à Paris et à Roscoff dans l'équipe du Professeur André Toulmond, rattachée à l'Observatoire Océanologique de Roscoff (à la fois Ecole Interne 37 de l'UPMC et Unité Propre de Recherche 4601 du CNRS<sup>5</sup>), sur l'adaptation physiologique des organismes à l'environnement hydrothermal profond. C'est à cette époque que remonte ma première rencontre avec les hémoglobines extracellulaires d'annélides.

Enfin, en 1993, j'obtenais un poste de Maître de Conférences à Roscoff et, début 1994, suite à la nomination d'André Toulmond au poste de Directeur de l'Observatoire Océanologique de Roscoff, celui-ci me confiait la responsabilité de l'équipe de recherche d'Ecophysiologie. Issue du rapprochement d'un groupe de phycologie benthique et d'un groupe de physiologie comparée, cette équipe est structurée autour d'une thématique commune, **l'étude des mécanismes d'échange de métabolites et de leurs adaptations**. Ainsi, nos études portent sur des organismes vivant dans des milieux marins particulièrement contraignants, la zone intertidale en régime mégatidal et les sources hydrothermales profondes, et nous nous intéressons à des fonctions diverses, respiration et excrétion chez les animaux, respiration et photosynthèse chez les végétaux.

---

<sup>2</sup> et je profite de cette occasion pour reconnaître volontiers que, quoique l'on puisse penser du personnage, les films et ouvrages du Commandant Cousteau ne sont pas étrangers à cette vocation.

<sup>3</sup> après quelques déboires que nombre d'autres "expatriés" ont pu rencontrer lors du retour en France

<sup>4</sup>Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

<sup>5</sup> CEOBM: Centre d'Etudes d'Océanographie et de Biologie Marine

Mais, au-delà de cette diversité de modèles et de milieux d'étude, nous partageons surtout une **approche comparative et intégrée**. **Comparative**, car les problèmes biologiques que nous cherchons à comprendre sont étudiés en utilisant la variété des réponses offertes par les différentes espèces modèles que nous sélectionnons. Et **intégrée** car dans l'étude d'un problème donné nous nous efforçons d'aborder différentes échelles d'organisation biologique. Le pivot central, à la fois point de départ et objectif ultime, c'est la compréhension du **fonctionnement de l'organisme dans son milieu**, véritable définition de l'écophysiologie. Mais pour arriver à cette compréhension nous nous efforçons de décortiquer les mécanismes sous-jacents, jusqu'à l'échelle moléculaire si cela s'avère possible et nécessaire, en essayant de dégager des processus généraux à partir des relations structure-fonction particulières que nous sommes amenés à décrire. Enfin, plus récemment, nous nous sommes intéressés à la dimension évolutive de ces problèmes en travaillant à l'échelle de la population ou de l'espèce, analysant notamment nos résultats en termes de phylogénie. La double signification du terme **adaptation** prend alors tout son sens, à la fois **processus physiologique** permettant à un organisme de moduler les propriétés de tel ou tel système de façon à s'accommoder des variations du milieu dans lequel il vit, mais également le résultat d'un **processus évolutif** associant mutations et sélection naturelle et ayant abouti à l'espèce considérée. Dans l'un ou l'autre cas, je suis persuadé que l'approche comparative peut se révéler extrêmement fructueuse, surtout lorsque l'on s'intéresse à des milieux « extrêmes » dans lesquels les adaptations, qu'elles soit physiologiques ou évolutives, sont exacerbées. Cette démarche se rapproche de celle, courante dans le domaine de la recherche médicale, qui consiste à étudier des cas pathologiques (donc « anormaux ») pour en inférer des règles physiologiques « normales ».

Naturellement, une telle approche, aussi transversale, réclame un éventail de techniques très large qui dépasse largement les capacités d'un seul individu. La constitution d'une **équipe de recherche polyvalente** prend alors tout son sens et, à la suite d'André Toulmond, je m'efforce de maintenir et de développer ce potentiel au sein de l'équipe d'Ecophysiologie. Celle-ci réunit ainsi des collaborateurs aux compétences diverses ce qui nous permet de maîtriser un certain nombre des techniques nécessaires à la réalisation des projets abordés : anatomie et histologie (techniques de microscopie), biochimie fonctionnelle et structurale (enzymologie, spectroscopie), biologie moléculaire (séquençage, phylogénie), etc. Mais il n'en demeure pas moins essentiel de nous appuyer sur des **collaborations** scientifiques nationales et internationales. D'une part avec des équipes ayant une vision plus large, plus écologique, des milieux que nous étudions tout en nous offrant un accès privilégié aux campagnes océanographiques<sup>6</sup>. D'autre part, avec des

---

<sup>6</sup> Il s'agit en premier lieu de l'équipe d'Ecologie Abyssale du Département Environnement profond de l'Ifremer, équipe avec laquelle nous collaborons depuis 1993 dans le cadre d'une Unité de Recherche Marine, laboratoire "sans murs" issu d'un rapprochement Ifremer-UPMC-CNRS. Mais il s'agit également de deux

équipes ayant une approche plus pointue, plus biophysique, et maîtrisant parfaitement l'une ou l'autre des techniques qui nous sont nécessaires<sup>7</sup>.

Dans le texte qui suit, j'essaierai d'illustrer les deux approches évoquées ci-dessus, en me limitant à deux grands projets dans lesquels je suis plus particulièrement impliqué :

- l'approche intégrée pour comprendre les mécanismes de transport du dioxyde de carbone et de l'hydrogène sulfuré chez le vestimentifère *Riftia pachyptila*;
- l'approche comparative de l'équilibre acide-base et du transport de l'oxygène chez les crustacés hydrothermaux.

A la suite de chacune des présentations rédigées en français, on trouvera une copie des articles originaux correspondants.

Mes autres travaux concernent l'étude du transport de l'oxygène chez deux annélides polychètes inféodées au milieu hydrothermal: *Alvinella pompejana*, le ver de Pompéï qui colonise les cheminées, et *Branchiopolynoe*, polynoidé commensal des modioles. Ces travaux ont fait l'objet de la thèse de Stéphane Hourdez et des articles qui en sont issus.

Enfin, je conclurai en essayant de répondre à une question qui m'est souvent posée : pourquoi diable aller chercher des modèles biologiques aussi loin que sur les sources hydrothermales profondes ?

---

"équipes" américaines, celle de Jim Childress à l'Université de Californie, Santa Barbara, et celle de Chuck Fisher, à Penn State University, avec lesquelles nous entretenons des rapports privilégiés. Je mentionnerai notamment les stages de recherches effectués dans ces laboratoires par Franck Zal et Stéphane Hourdez.

<sup>7</sup> C'est ici qu'intervient la troisième composante de l'URM, l'équipe de Françoise Gaill, et en particulier l'apport récent de l'enceinte pressurisée IPOCAMP, développée par Bruce Shillito. Je pense également au formidable bond en avant que nous a procuré l'utilisation de la spectrométrie de masse dans la compréhension de la structure de nos molécules d'hémoglobine et d'hémocyanine, technique dont nous avons pu bénéficier jusqu'à présent au travers d'une collaboration étroite avec Brian Green, ingénieur chez Micromass, collaboration liée à celle que nous entretenons avec Serge Vinogradov (Wayne State University). Sans oublier le laboratoire des Protéines Complexes, dirigé par J. Lamy à Tours, grâce auquel nous pouvons visualiser nos molécules dans les 3 dimensions.

# ***Riftia pachyptila*, adaptations respiratoires d'un animal autotrophe**

---

## **UN ORGANISME HORS DU COMMUN**

Lors de mon arrivée dans le laboratoire d'André Toulmond en 1991, une nouvelle campagne sur les sources hydrothermales du Pacifique oriental se préparait. Cela faisait déjà 14 ans que les premières sources hydrothermales avaient été découvertes au large des Galapagos (Corliss et al. 1979; Lonsdale 1977) et que *Riftia pachyptila* avait, bien évidemment attiré l'attention: de grands tubes blancs avec un panache rouge sur fond de basalte noir... Quelques équipes américaines, regroupant anatomistes, microbiologistes, biochimistes et physiologistes, avaient alors concentré leurs efforts sur cet organisme et l'essentiel des découvertes majeures faites à cette époque était publié dans un numéro de Science ((Arp and Childress 1981; Cavanaugh et al. 1981; Felbeck 1981; Jones 1981; Rau 1981; Wittenberg et al. 1981b) ). On savait donc dès cette époque que *Riftia* était un ver tubicole dépourvu de bouche, de tube digestif et d'anus, mais pourvu d'un grand panache branchial et d'un organe interne, le trophosome, dont les cellules contenaient des bactéries (Jones 1981). Ces bactéries avaient la morphologie (Cavanaugh et al. 1981) et les activités enzymatiques (Felbeck 1981) compatibles avec un métabolisme sulfo-oxydant. L'autotrophie de *Riftia* et de ses symbiotes bactériens fut par la suite largement démontrée (voir les synthèses de (Childress and Fischer 1992; Nelson and Fisher 1995)). L'énorme quantité de sang et de liquide coelomique que contient un individu, ces deux fluides contenant eux-mêmes de fortes concentrations en hémoglobine, ne pouvait manquer d'attirer l'attention et deux articles étaient consacrés aux propriétés oxyphoriques du sang de *Riftia* (Arp and Childress 1981; Wittenberg et al. 1981a). Mais ce n'est que quelques années plus tard que le rôle de l'hémoglobine dans le transport des sulfures est d'abord fortement suspecté (Arp and Childress 1983), puis finalement établi (Arp et al. 1987), alors que les propriétés fonctionnelles de liaison de l'oxygène sont enfin affinées en 1990 (Arp et al. 1990). On sait donc, en 1991, que *Riftia* possède deux hémoglobines différentes, l'une de haut poids moléculaire dans le sang vasculaire, l'autre de plus petite masse dans le sang et le liquide coelomique; que ces deux hémoglobines ont des propriétés d'oxygénation différentes, la coelomique ayant une affinité légèrement plus élevée que la vasculaire; et enfin, que ces deux hémoglobines sont capables de lier spécifiquement et réversiblement le sulfure d'hydrogène. Un bilan provisoire des connaissances qui laissait deux grandes questions en suspens:

1. par quel(s) mécanisme(s) une hémoglobine peut-elle assurer conjointement le transport de l'oxygène et des sulfures, quand on sait que ces derniers sont toxiques et rendent l'hémoglobine de vertébré rapidement non-fonctionnelle ?

2. l'apport d'énergie étant assuré ( $O_2 + H_2S$ ), par quel moyen l'hôte *Riftia* assure-t-il l'approvisionnement en carbone inorganique de ses symbiotes, ou en d'autres termes, quels sont les mécanismes de transport de  $CO_2$  ?

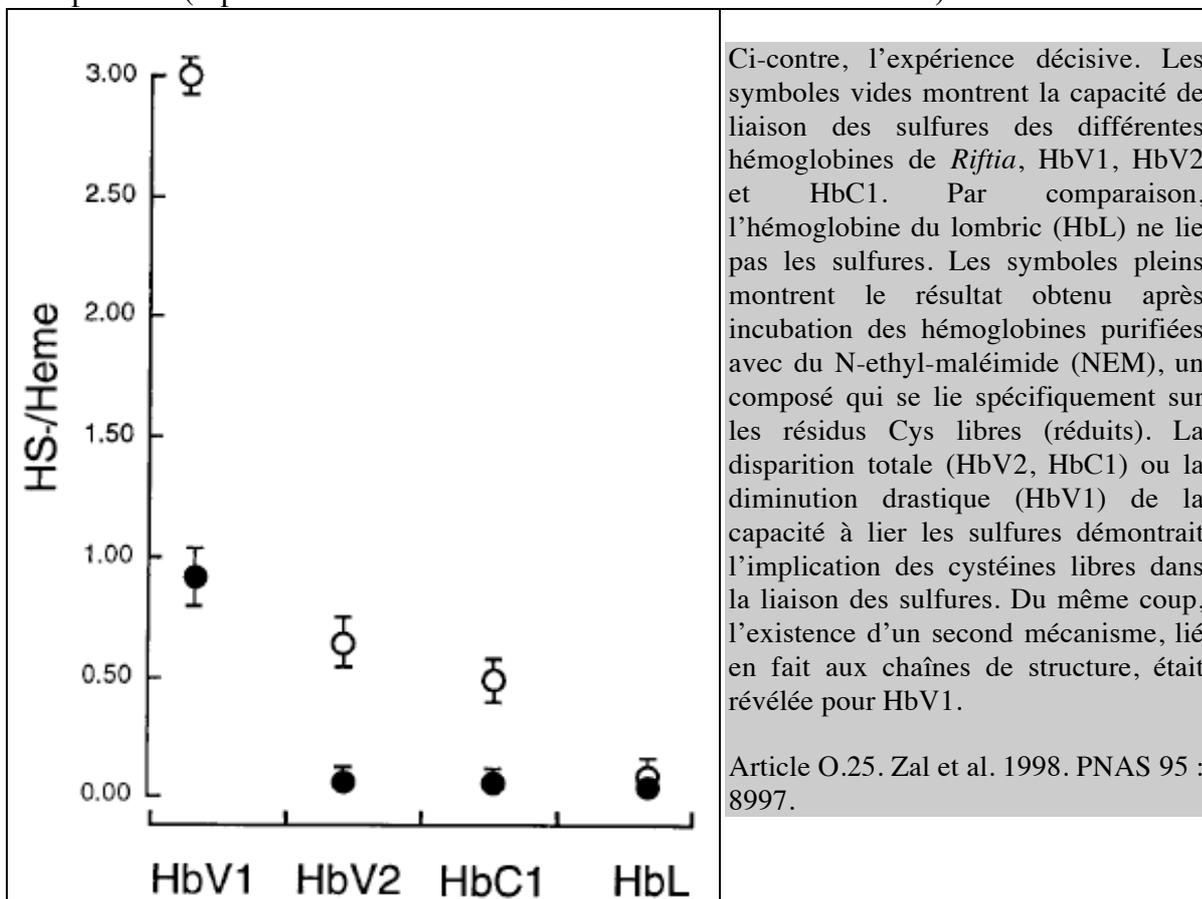
## **TRANSPORT DU $H_2S$ : UN MODELE POUR D'AUTRES ESPECES ?**

A l'évidence, pour pouvoir découvrir les mécanismes de liaison de  $H_2S$ , il fallait en connaître un peu plus sur la structure des hémoglobines de *Riftia*. Ce fut l'objet de la thèse de Franck Zal, aujourd'hui en poste dans l'équipe. Après quelques tentatives en interne, il nous apparut rapidement que nous avons besoin de techniques très pointues pour lever les ambiguïtés inhérentes à l'étude de ces molécules géantes et complexes. C'est par l'intermédiaire de Serge Vinogradov, expert travaillant sur le sujet depuis près de 25 ans, que nous avons pu aborder cette étude en utilisant la spectrométrie de masse par nébulisation électrique (ESI-MS), et ce avec l'un des concepteurs de cette technique, Brian Green de la société Micromass. A partir de là, les progrès furent rapides.

### ***Hémoglobines et sulfures***

Tout d'abord, l'hémoglobine vasculaire de *Riftia* est bien une molécule du même type que les "hexagonal bilayer hemoglobins" (HBL Hbs) des autres annélides, avec une structure caractéristique en double couche hexagonale, confirmée par une étude en cryomicroscopie (O12), et un poids moléculaire de 3500 kDa, obtenu par diffraction laser (O10), ce qui lève ainsi les quelques doutes subsistant dans la littérature (Terwilliger et al. 1980). Par contre, ce n'est pas une, mais deux hémoglobines de taille moyenne qui co-existent chez *Riftia*, l'une dans le sang, l'autre dans le liquide coelomique. En effet malgré une taille similaire, 433 et 380 kDa (O10), la composition en chaînes polypeptidiques de ces deux hémoglobines est différente, une des chaînes de globine étant absente de l'hémoglobine coelomique (O11). La précision des mesures de masse en spectrométrie est telle ( $< 0.01\%$ ) qu'il devient possible d'établir formellement la différence entre deux globines, distinctes ne serait-ce que d'un atome d'hydrogène. Au-delà de la composition très précise des hémoglobines de *Riftia* (Tableau 1 dans O11), il est possible d'analyser certaines caractéristiques de ces molécules, comme par exemple leur composition en résidus Cystéine et l'implication de ceux-ci dans des ponts disulfures qui participent à l'élaboration de l'organisation supramoléculaire de ces grandes molécules. C'est ainsi que nous avons établi que, si toutes les globines de *Riftia* possèdent des cystéines impliquées dans des ponts disulfures intra- ou inter-chaînes, deux des globines possèdent en outre des résidus cystéines libres.

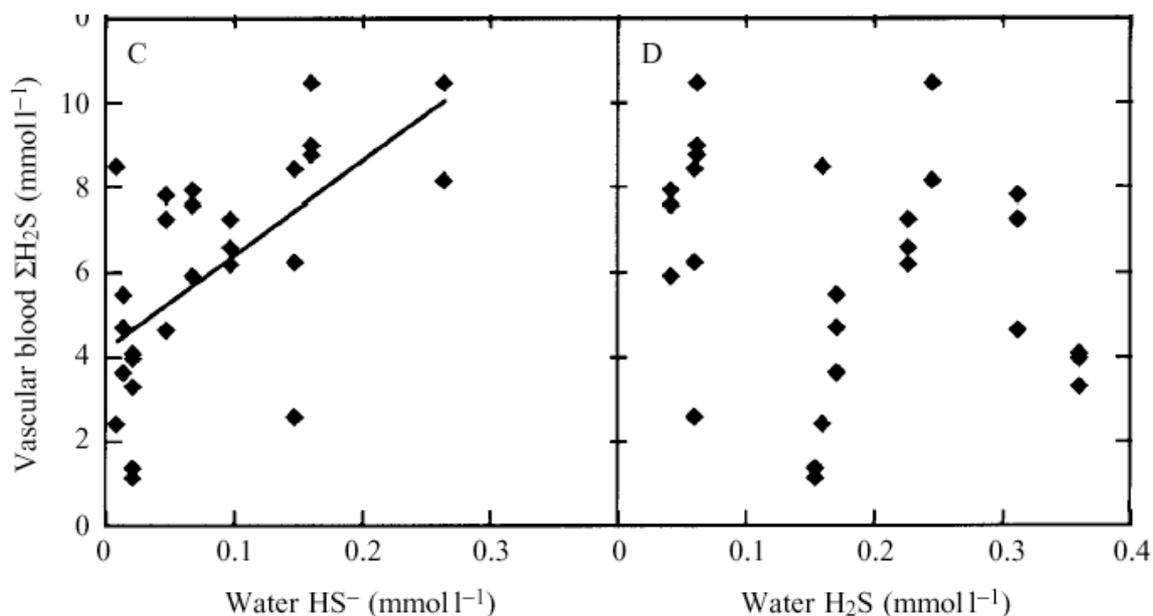
A la même époque paraissait dans la revue Nature un article relatant le rôle probable de Cys  $\beta$ 93 (résidu cystéine libre de la globine  $\beta$  humaine) dans la liaison réversible du groupement thionitrosyl, SNO<sup>-</sup>, formant ainsi de la S-nitrosoHb (Jia et al. 1996). Par analogie, et reprenant une idée avancée précédemment par Suzuki (Suzuki et al. 1990), nous formulons l'hypothèse d'une liaison des groupements HS<sup>-</sup> sur les cystéines libres des globines de *Riftia*, formant ainsi la S-sulfoHb. L'obtention de la séquence primaire d'une des globines et la comparaison des capacités de fixation des sulfures avec le nombre de sites potentiels est venue conforter cette hypothèse (O18), confirmée ensuite à la fois par la spectrométrie de masse et par des mesures de liaison d'H<sub>2</sub>S par les hémoglobines purifiées (O.25 et figure ci-dessous). Mais ces études montraient également que l'HBL Hb vasculaire liait beaucoup plus d'H<sub>2</sub>S que ce que lui permettait le seul mécanisme globine-dépendant. Les chaînes de soutien ("linkers"), qui entrent spécifiquement dans la composition des HBL Hbs, devaient donc également lier les sulfures. C'est effectivement le cas mais par un autre mécanisme qui implique l'ouverture de ponts disulfures et la formation de groupement persulfures (O.25). Un travail important reste à faire pour comprendre cet aspect car, pourquoi les linkers de *Riftia* lieraient-ils les sulfures et pas ceux du lombric ? Bien sûr la séquence primaire devra être obtenue pour pouvoir progresser, mais également des études poussées sur la "solidité" des ponts disulfures (réduction partielle et analyse par ESI-MS) en utilisant une approche comparative (espèces vivant ou non dans des milieux riches en sulfures).



Le fait que d'autres hémoglobines d'annélides vivant dans des milieux potentiellement riches en H<sub>2</sub>S (*Arenicola marina* dans la zone intertidale et *Alvinella pompejana* près des sources hydrothermales) possèdent également des résidus cystéines libre sur certaines de leurs globines (O14, O17) et que ces hémoglobines soient effectivement capables de lier H<sub>2</sub>S nous mène aujourd'hui à considérer cette fonction de liaison de l'hydrogène sulfuré sous l'angle de l'évolution. L'hypothèse sur laquelle nous travaillons est celle de l'ancestralité de la fonction de liaison de H<sub>2</sub>S des globines d'annélides, fonction servant initialement à immobiliser ce composé toxique (liaison irréversible) et qui persisterait chez des espèces comme *Arenicola* ou *Alvinella*. L'évolution d'un mode de vie symbiotique avec des bactéries sulfo-oxydantes chez les Pogonophores et Vestimentifères (considérés à présent comme une branche des Annélides) aurait amené soit la modification de cette fonction, soit l'apparition d'une nouvelle fonction pour assurer le transport de H<sub>2</sub>S (liaison réversible). C'est sur cette hypothèse que travaille Xavier Bailly pour sa thèse; lui est incombée la lourde tâche de séquencer les différentes globines de *Riftia* (ce qui est sur le point d'être achevé) et celles d'*Arenicola*. D'ores et déjà, la position des cystéines libres sur les deux globines de *Riftia* qui en possèdent est différente: l'une est à 1 résidu de distance de l'histidine proximale (C+1), l'autre à 11 résidus de distance (C+11). Reste à établir une différence fonctionnelle corrélée à cette différence structurale, et à analyser ce qui se passe chez l'Arénicole.

### ***Acquisition des sulfures***

Bien que les mécanismes de transport de H<sub>2</sub>S dans le sang soient loin d'être complètement résolus, il reste également à comprendre comment H<sub>2</sub>S parvient jusqu'au sang depuis le milieu extérieur, et jusqu'aux bactéries depuis le sang. Nous avons abordé cet aspect du problème par une approche de physiologie à l'échelle de l'organisme, en collaboration avec Jim Childress. Travaillant à bord, lors des campagnes océanographiques, sur des individus maintenus sous pression (250 atm) dans des enceintes spéciales il est possible de manipuler le milieu extérieur de *Riftia* et d'observer les effets qui en résultent sur son milieu intérieur. Ainsi, mettant à profit la dissociation dans l'eau de mer de H<sub>2</sub>S en HS<sup>-</sup> et H<sup>+</sup> en fonction du pH (pK de 7 à 5°C), nous avons pu constater que c'était préférentiellement la forme ionisée, HS<sup>-</sup>, qui pénétrait dans le sang et le liquide coelomique de *Riftia* au travers de la paroi branchiale (O19). Ce résultat, est d'autant plus surprenant que l'oxygène et le CO<sub>2</sub> doivent entrer librement par diffusion (cf. O16 et ci-dessous) et que H<sub>2</sub>S pénètre effectivement par diffusion chez des espèces comme l'Arénicole ou l'échiurien *Urechis caupo* (Arp et al. 1995; Grieshaber and Völkel 1998; Visman 1991). Mais il faut souligner une fois encore la profonde originalité de *Riftia*: ses bactéries symbiotiques n'acceptent que les sulfures comme substrat énergétique, et pas le thiosulfate (Wilmot and Vetter 1990), forme moins toxique et voie principale de détoxification des sulfures chez les autres espèces [Grieshaber, 1998 #383].



L'accumulation importante de H<sub>2</sub>S total dans le sang, permise essentiellement par la présence des hémoglobines, est corrélée à la concentration en ions HS<sup>-</sup> dans l'eau environnante (C :  $y=4.2+22.2x$ ,  $r=0.63$ ,  $P=0.0004$ ) et pas à celle de la forme non ionisée, H<sub>2</sub>S (D :  $y=7.1+5.6x$ ,  $r=0.23$ ,  $P=1$ ). Ces expériences ont été réalisées sur des *Riftia* maintenus en enceintes pressurisées dans lesquelles le pH (5,6-7,2) et la concentration totale en H<sub>2</sub>S (63-511 μM) étaient fixés.

Article O.19. Goffredi et al. 1997. JEB 200 : 2609.

L'interprétation de nos résultats pourrait impliquer l'existence d'un transporteur membranaire d'HS<sup>-</sup>, encore inconnu à ce jour. La communauté française s'est récemment dotée d'un équipement de repressurisation (IPOCAMP, développé par Bruce Shillito avec le soutien du Programme DORSALES et de l'UPMC), inauguré avec succès lors de la campagne HOPE 99, et qui devrait nous permettre, à l'avenir, de développer ce type d'approche physiologique sur des organismes *in vivo*. Un mécanisme de transport d'H<sub>2</sub>S similaire doit également exister dans les membranes des bactériocytes afin de faire pénétrer les sulfures mis à disposition par l'hémoglobine. Le développement d'une préparation cellulaire de bactériocytes devrait nous permettre d'aborder ces problèmes de transport membranaires à l'échelle de la cellule. Nous avons entrepris cette approche pour étudier les transferts de CO<sub>2</sub> (cf ci-dessous) mais elle pourra être utilisée également pour étudier plus précisément les mécanismes cellulaires de transport des sulfures.

Enfin, le métabolisme des sulfures est certainement plus complexe que le simple transport de la forme réduite, HS<sup>-</sup>. Ainsi, la mise en réserve d'une certaine proportion de sulfures sous forme d'acides aminés soufrés tels que la thiotaurine, existant en abondance dans le trophosome de *Riftia*, pourrait permettre à celui-ci d'accroître son autonomie au-delà des capacités de liaison de ses hémoglobines (Pruski 1998). Par ailleurs, la découverte des sources hydrothermales a relancé les recherches sur le thiobios, aboutissant à la

(re)découverte de l'importance de la chimioautotrophie même dans le milieu littoral (cas des bivalves Lucinidae, (Distel and Felbeck 1987)), et tout récemment, à la mise en évidence d'une utilisation des sulfures comme substrat énergétique par les mitochondries d'espèces du thiobios comme l'Arénicole (Volkel and Grieshaber 1996). Je reviendrai sur les implications de ces découvertes dans ma conclusion.

### **Articles relatifs à l'étude du transport des sulfures chez *Riftia pachyptila*.**

- O.10 ..... 1996 Zal, F., Lallier, F.H., Wall, J.S., Vinogradov, S.N., Toulmond, A. The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: I- reexamination of the number and masses of its constituents. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8869-8874
- O.11 ..... 1996 Zal, F., Lallier, F.H., Green, B.N., Vinogradov, S.N. & Toulmond, A. (). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*: II. Complete polypeptide chain composition investigated by maximum entropy analysis of mass spectra. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8875-8881.
- O.12 ..... 1996 de Haas, F., Zal, F., Lallier, F.H., Toulmond, A. & Lamy, J.N. Three-dimensional reconstruction of the hexagonal bilayer hemoglobin of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* by cryoelectron microscopy. *Proteins*, **26**, 241-256.
- O.18 ..... 1997 Zal F., Suzuki T., Kawasaki Y., Childress J.J., Lallier F.H., Toulmond A. Primary structure of the common polypeptide chain b from the multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: Implication on the knowledge of the sulfide binding-site. *Proteins*, **29**: 562-574.
- O.19 ..... 1997 Goffredi S. K., Childress J. J., Desaulniers N. T., Lallier F. H. Sulfide acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is via diffusion of HS<sup>-</sup> rather than H<sub>2</sub>S. *J. exp. Biol.* , **200**: 2609-2616.
- O.21 ..... 1998 Gru, C., Sarradin, P.-M., Legoff, H., Narcon, S., Caprais, J.-C. and Lallier, F. H. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from *Riftia pachyptila*. *Analyst* **123**, 1289-1293.
- O.25 ..... 1998 Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., Van Dorsselaer, A. and Childress, J. J. S-sulfohemoglobin and disulfide-exchange: the mechanisms of sulfide-binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**, 8997-9002.

## **TRANSPORT DU CO<sub>2</sub>: UN SCHEMA EN MIROIR**

Je reviens maintenant à la seconde grande question concernant la physiologie de *Riftia*: l'apport d'énergie étant assuré (O<sub>2</sub> +H<sub>2</sub>S), par quel moyen l'hôte *Riftia* assure-t-il à ses symbiotes l'approvisionnement en matière, le carbone inorganique ?

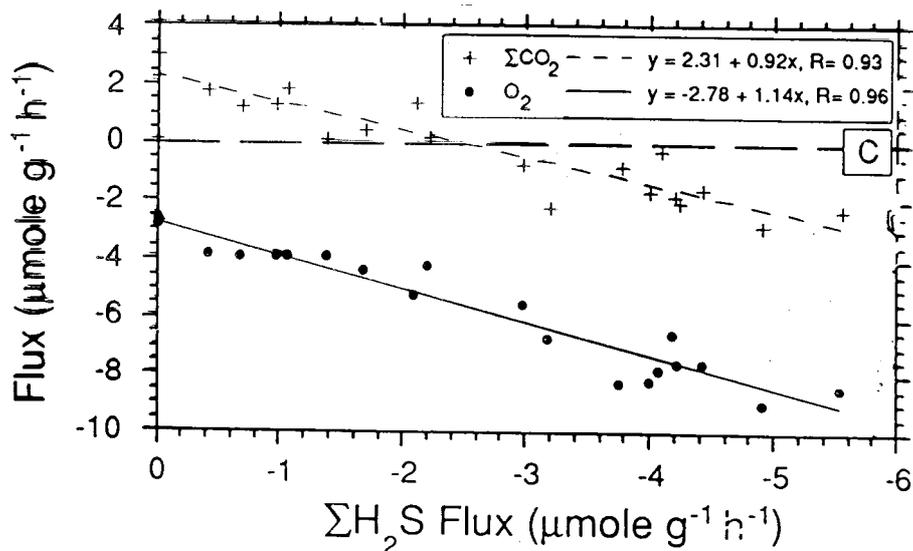


Figure extraite de Childress et al 1991. Biol. Bull.

L'une des plus belles preuves expérimentales de "l'autotrophie" de *Riftia*, et incidemment la démonstration de l'existence d'un flux entrant de  $\text{CO}_2$ , est celle réalisée par Jim Childress et ses collaborateurs (Childress et al. 1991). Lorsque des individus recomprimés sont baignés par une eau dépourvue de sulfures, ils "respirent" tout à fait normalement, rejetant à peu près autant de  $\text{CO}_2$  qu'ils consomment d'oxygène. Mais, à mesure que l'on augmente la concentration en sulfure dans l'eau, la consommation d'oxygène augmente et, proportionnellement, le flux de  $\text{CO}_2$  s'annule puis s'inverse, démontrant une consommation nette de  $\text{CO}_2$ .

### ***Transport du $\text{CO}_2$ dans le sang***

Nos premiers travaux en collaboration avec Jim Childress se sont engagés à cette époque, lors des campagnes HERO 91 et 92, autour de problématiques sur l'équilibre acide-base. André Toulmond, puis moi-même par la suite, avons en effet l'expertise et l'équipement nécessaire pour réaliser des mesures de pH extrêmement précises sur de petits volumes d'échantillons (Blood Micro System, BMS2, Radiometer Copenhagen). Les premiers travaux firent apparaître à la fois le taux élevé de  $\text{CO}_2$  dans le mélange fluide hydrothermal/eau de fond environnant les bouquets de *Riftia*, et l'extraordinaire capacité de ceux-ci à l'accumuler dans leurs fluides corporels avec une modification minimale de leur pH extracellulaire (Childress et al. 1993). L'idée d'une implication des hémoglobines, si abondantes chez cette espèce, dans cette accumulation de  $\text{CO}_2$  germa rapidement et j'engageai, dès mon arrivée dans le laboratoire, des expériences visant à mesurer la capacité capniphorique des différentes fractions du sang et du liquide coelomique. Les résultats (O 9) furent déroutants: si la fraction protéique (les hémoglobines à 99%) retenait bien une part du  $\text{CO}_2$  (5-30%), l'essentiel de la capacité capniphorique apparaissait liée à une ou deux fractions de faible poids moléculaire. Cela est d'autant plus manifeste en ce

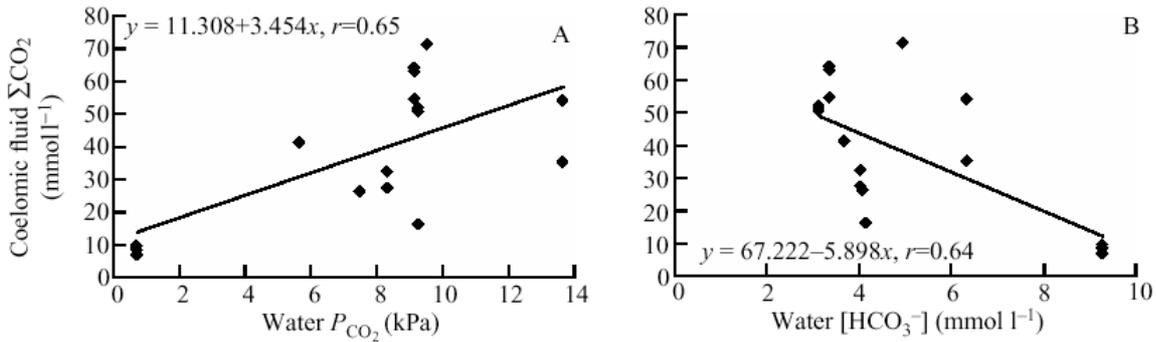
qui concerne le liquide coelomique : bien qu'ayant une concentration en hémoglobine deux fois moindre, sa capacité capniphorique est égale, voire supérieure, à celle du sang. Compte-tenu du pH relativement neutre et extrêmement bien régulé de ces deux liquides circulants, la majorité du carbone inorganique transporté se trouve donc sous la forme bicarbonate,  $\text{HCO}_3^-$ . Mais quelle est la nature des cations qui doivent être mobilisés pour neutraliser ces bicarbonates ? C'est une question importante sur laquelle nous allons reprendre le travail, non seulement pour son intérêt fondamental dans la physiologie de *Riftia*, mais également parce que le pouvoir tampon de cette substance pourrait avoir des applications bien plus étendues.

Une fois établie l'ampleur et la nature de l'accumulation de carbone inorganique dans les liquides corporels, un double problème se pose : celui de l'**acquisition** de ce carbone inorganique à partir du milieu extérieur et de son transfert vers le sang, et celui de son **utilisation** par les bactéries au niveau des bactériocytes du trophosome.

### *Acquisition du $\text{CO}_2$*

Pour démontrer le mécanisme d'acquisition du dioxyde de carbone, nous avons utilisé une approche physiologique sur l'organisme *in vivo*. Naturellement ces expériences ne peuvent avoir lieu qu'à bord, durant les campagnes, et elles n'auraient pas pu être réalisées sans la collaboration de Jim Childress, et notamment de son étudiante Shana Goffredi. En effet, tout repose sur la manipulation du milieu extérieur, reconstitué dans des enceintes pressurisées (250 atm) à l'intérieur desquelles on peut maintenir quelques individus en bonnes conditions physiologiques pendant plusieurs jours. En jouant sur le pH de l'eau et sur son contenu total en  $\text{CO}_2$ , on peut aboutir à une gamme de concentrations en bicarbonate ou en  $\text{CO}_2$  dissous, et étudier la relation liant ces deux espèces chimiques de  $\text{CO}_2$  à l'accumulation de  $\text{CO}_2$  dans les liquides circulants de *Riftia*.

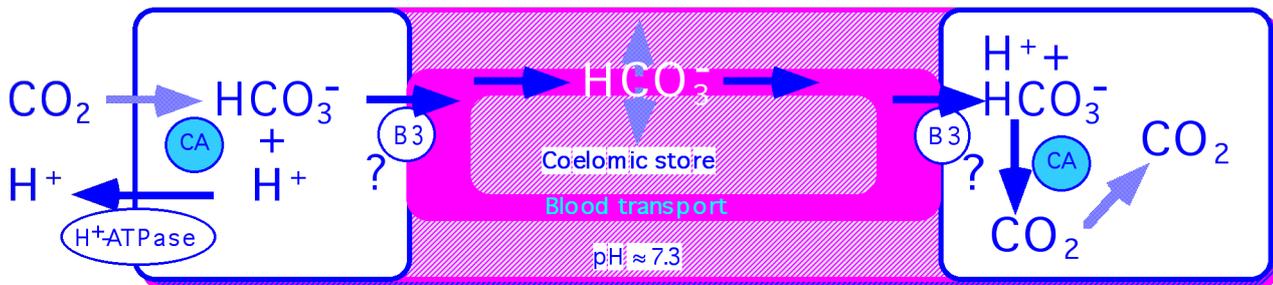
Les résultats sont assez probants : si l'on exprime la quantité de  $\text{CO}_2$  accumulée dans le sang par rapport soit à la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous soit à la concentration en bicarbonate, il apparaît clairement une relation proportionnelle entre l'accumulation de  $\text{CO}_2$  dans les liquides circulant et la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu, alors que la relation est inversement proportionnelle avec la concentration en bicarbonate (O16). Il s'ensuit que le principal mécanisme d'entrée du  $\text{CO}_2$  est la diffusion à travers l'épithélium branchial. Mais cette diffusion n'est possible que si le gradient de pression partielle est maintenu. Si *Riftia* bénéficie d'un environnement particulièrement riche en  $\text{CO}_2$ , le maintien du gradient dépend en grande partie du maintien du pH extra-cellulaire. Quand on diminue ce dernier, par exemple en inhibant la pompe à protons ( $\text{H}^+$ -ATPase) par le N-ethyl maléimide, on observe une forte diminution de la quantité totale de  $\text{CO}_2$  accumulée dans le sang.



En plaçant des individus dans des conditions variables de  $\text{CO}_2$  total (5,6-10,2 mM) et de pH (5,6-6,6) on peut mettre en relation la concentration de  $\text{CO}_2$  total dans le liquide coelomique avec la  $P_{\text{CO}_2}$  ou la concentration en bicarbonates de l'eau. Il apparaît clairement que l'accumulation de  $\text{CO}_2$  dans le liquide coelomique est proportionnelle à la  $P_{\text{CO}_2}$  de l'eau, un argument en faveur d'une acquisition par diffusion de  $\text{CO}_2$  dissous.

Article O.16. Goffredi et al. 1997. JEB 200 : 883.

L'ensemble de ces constatations, ainsi que la démonstration de l'existence d'anhydrase carbonique dans le panache branchial et le trophosome (Kochevar et al. 1993), nous ont conduit à élaborer un modèle de travail retraçant l'ensemble du transport de  $\text{CO}_2$  chez *Riftia*. On a vu que le  $\text{CO}_2$  pénétrait essentiellement par diffusion à travers l'épithélium branchial. L'existence d'anhydrase carbonique (CA) dans ce tissu suggère que le  $\text{CO}_2$  est converti en bicarbonate avant d'être transféré dans le sang et/ou le liquide coelomique. Le transport de ces ions nécessite l'existence d'un transporteur d'anions (AE).



$\text{pH} \approx 6$

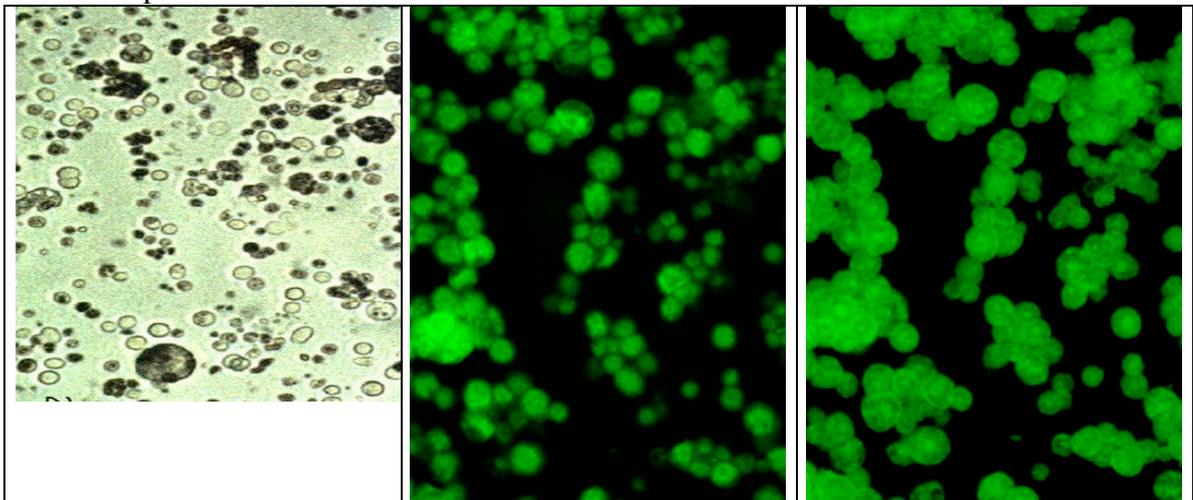
### Utilisation du $\text{CO}_2$

Véritables unités physiologiques que l'on peut comparer aux lobules hépatiques ou pancréatiques, les lobules du trophosome sont baignés par le liquide coelomique et abondamment perfusés par le sang. Chaque lobule est entouré de vaisseaux afférents périphériques, pénétré par des capillaires, et un vaisseau axial efférent draine le sang vers le vaisseau dorsal. Les bactériocytes ont ainsi une source importante de  $\text{CO}_2$  à proximité, mais celui-ci est principalement sous forme de bicarbonate. Une re-conversion de ce dernier en  $\text{CO}_2$  moléculaire est indispensable. On sait en effet que les symbiotes de *Riftia* ne peuvent "fixer" le carbone qu'à partir de sa forme moléculaire,  $\text{CO}_2$ , et non ionisée.

(Scott et al. 1999; Scott et al. 1994). Le CO<sub>2</sub> dissous est de fait le seul substrat accepté par la ribulose biphosphate carboxylase, ou RuBisCo, l'enzyme clé de la fixation du carbone que ce soit chez les organismes photosynthétiques ou chez les organismes chimiosynthétiques. Dans le cas des bactéries symbiotiques de *Riftia*, seule la forme II de la RuBisCo est exprimée, et elles sont dépourvues de carboxysomes ce qui les rend inaptes à utiliser par elles-mêmes le bicarbonate (Robinson et al. 1998).

Là encore, le transport du CO<sub>2</sub> pourrait faire intervenir un échangeur anionique (AE) et une anhydrase carbonique (CA) dont on connaît l'existence mais pas la localisation. Pour progresser dans la compréhension des mécanismes de transport de CO<sub>2</sub>, l'approche *in toto* sur l'organisme entier paraît cette fois insuffisante, de même que celle, trop réductrice, qui ne s'intéresse qu'à la physiologie bactérienne des symbiotes. D'où l'idée de développer une approche de physiologie cellulaire en mettant au point une préparation de bactériocytes, isolés du trophosome de *Riftia* et maintenus en suspension. Parallèlement, la caractérisation et la localisation des enzymes et transporteurs impliqués devaient être entreprises en combinant plusieurs approches: immunohistochimie, biologie moléculaire et hybridation *in situ*.

J'ai confié ce difficile projet de thèse à Marie-Cécile De Cian qui, avec l'aide d'Ann Andersen, a réussi à mettre au point un protocole permettant d'obtenir des suspensions viables et relativement homogènes de bactériocytes au cours de la mission HOPE 99. Une seconde campagne, américaine, en 2000 a permis de débiter l'exploitation de ces suspensions.



On voit à gauche une suspension de bactériocytes, isolés du trophosome de *Riftia pachyptila*. Au centre les cellules sont marquées au DAPI ce qui permet de visualiser les noyaux, et à droite elles sont marquées à l'aide d'une sonde nucléotidique spécifique des  $\gamma$ -proteo bactéries. Le cytoplasme est bien marqué, confirmant que les suspensions obtenues sont bien composées essentiellement de bactériocytes.

Travail de M.C. De Cian, en préparation

Des mesures de pH intra- et extracellulaire dans différentes conditions acide-base et en présence d'inhibiteurs de CA (acetazolamide, benzolamide) ou de la Na-K ATPase (amiloride) ont confirmé l'implication physiologique de ces enzymes dans les processus de transport de CO<sub>2</sub> et de protons. Par contre, l'implication d'un analogue de la bande-3 comme échangeur d'anion échappe pour l'instant à nos recherches, que ce soit par des approches physiologiques ou immunologiques. Il est fort possible que cet échangeur, abondant dans les globules rouges de vertébrés, n'existe pas chez les invertébrés. Mais nous soupçonnons l'existence d'une forme membranaire de CA qui pourrait alors catalyser la conversion du bicarbonate sanguin au contact de la cellule et permettre la diffusion de CO<sub>2</sub>.

Les travaux de recherche et de séquençage des différentes formes de CA chez *Riftia* sont en cours. Une première séquence complète a été obtenue à partir d'ADNc de la branchie et a déjà permis de dessiner une sonde ARN spécifique, utilisée avec succès en hybridation *in situ* sur le trophosome. Ces travaux se poursuivent : recherche et séquençage des isoformes du trophosome, marquage fluorescent de CA par le DNSA, conception d'anticorps à partir de la séquence protéique, etc.

### ***Articles relatifs à l'étude du transport du CO<sub>2</sub> chez Riftia pachyptila.***

- O.9..... 1994 Toulmond A., Lallier F.H., de Frescheville J., Childress J.J., Sanders N.K., Lee R. & Desbruyères D. Unusual carbon dioxide-binding properties of body fluids from hydrothermal vent tubeworms *Deep Sea Res.*, **41** (10): 1447-1456..
- O.16..... 1997 Goffredi S. K., Childress J. J., Desaulniers N. T., Lee R. W., Lallier F. H., Hammond D. Inorganic carbon acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* depends upon high external P<sub>CO<sub>2</sub></sub> and on proton elimination by the worm. *J. Exp. Biol.*, **200**: 883-896.
- O.20..... 1998 Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. How to be the perfect host: CO<sub>2</sub> and HS<sup>-</sup> accumulation and H<sup>+</sup> elimination in the hydrothermal vent tubeworm *R. pachyptila*. *Cahiers de Biologie Marine* **39**, 297-300.
- O.26..... 1999 Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. The ionic composition of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, evidence for the elimination of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and H<sup>+</sup> and for a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> shift. *Physiol. Bioch. Zool.* **72**, 296-306.

## Adaptations respiratoires des crustacés inféodés aux sources hydrothermales profondes

---

C'est bien d'un "retour aux sources" dont il s'agit ici, puisque je retrouve dans ce thème de recherche celui de mon travail de thèse. Ce dernier se concluait en quelque sorte par un article de synthèse, co-signé avec Jean-Paul Truchot (S 1) dans lequel nous insistions sur la plasticité fonctionnelle de l'hémocyanine des crustacés. En dehors de l'hémoglobine des vertébrés, modulée par les phosphates organiques, c'est en effet le seul pigment respiratoire connu d'invertébré dont les propriétés fonctionnelles sont en grande partie déterminées par des modulateurs organiques comme le L-lactate, l'urate, ou la dopamine. Lorsque je me suis trouvé confronté aux espèces des sources hydrothermales profondes, la grande abondance des crustacés ne pouvait me laisser indifférent. Mais j'étais également frappé par le peu d'études physiologiques qui leur étaient consacrées : les modèles symbiotiques et les espèces extrémophiles avaient tout naturellement accaparé l'attention. Comment pouvais-je résister à la tentation d'examiner les adaptations dont ces crabes et ces crevettes étaient forcément pourvus pour avoir su coloniser les environs des sources hydrothermales profondes ?

### LA PLACE DES CRUSTACES DANS LA FAUNE HYDROTHERMALE

Dans la diversité des taxons représentés au sein de la faune endémique des sources hydrothermales on note une grande abondance de crustacés: petits copépodes et amphipodes, mais aussi et parfois surtout des décapodes. Une famille de crabes, les Bythograeidae, et une famille de crevettes, les Alvinocarididae, sont particulièrement bien représentés et ce sur la majeure partie des sites actuellement connus.

Répartition des principales espèces de crabes Bythograeidae et de crevettes Alvinocarididae sur trois grandes zones hydrothermales. En gras les espèces étudiées.

SITE	BYTHOGRAEIDAE	ALVINOCARIDIDAE
East Pacific Rise	<i><b>Bythograea therydron</b></i>	<i>Alvinocaris lusca</i>
	<i><b>Cyanograea praedator</b></i>	
Back Arc Basin	<i>Austinograea alayseae</i>	<i>Chorocaris vandoverae</i>
Mid Atlantic Ridge	<i><b>Segonzacia mesatlantica</b></i>	<i><b>Rimicaris exoculata</b></i>
		<i><b>Chorocaris chacei</b></i>
		<i>Mirocaris fortunata</i>
		<i>Alvinocaris markensis</i>

Afin de déterminer plus précisément l'environnement physico-chimique que les différentes espèces de crustacés décapodes peuvent rencontrer autour des sources hydrothermales, j'ai mis à profit les relations existant avec l'équipe DRO/EP de l'IFREMER au sein de l'URM en proposant un sujet de thèse co-dirigée avec Pierre-Marie Sarradin, sur l'écophysiologie des crustacés. C'est Fabienne Chausson qui a entrepris ce travail, mêlant une approche biochimique et physiologique des adaptations respiratoires à une approche écologique de la répartition des espèces autour des sources. Cette dernière consistait essentiellement à mettre en relation les différentes mesures de paramètres chimiques effectuées par les chimistes de l'Ifremer avec une analyse détaillée de l'occurrence des espèces cibles, sur les enregistrements vidéo des plongées du Nautilé réalisés pendant les campagnes MARVEL (1997) et PICO (1998) sur l'Atlantique, HOT (1996) et HOPE (1999) sur le Pacifique Est.

*Segonzacia mesatlantica*, crabe endémique des sites hydrothermaux atlantiques, présente une très large distribution. La pression ne semble pas être un facteur limitant puisqu'on le trouve à Menez Gwen (800m), Lucky Strike (1700m), Rainbow (2500m) et même Snake Pit (3500m). Sa large répartition autour des cheminées laisse supposer qu'il peut supporter de grandes variations des paramètres physico-chimiques de son environnement. S'il est parfois observé entre les sites, c'est en association avec les modioles que sa densité est la plus élevée (40 à 50 individus/m<sup>2</sup> à Lucky Strike). A partir de mesures ponctuelles de température on peut estimer que la gamme possible pour *Segonzacia* va de 3,8°C parmi les modioles jusqu'à 50°C à la sortie des diffuseurs.

Absente de Menez Gwen, rare à Lucky Strike, la crevette *Rimicaris exoculata* est par contre abondante sur les sites profonds, Snake Pit et Rainbow, où la densité dans les essaims peut atteindre 3000 individus/m<sup>2</sup>. Des analyses du fluide prélevé dans les essaims de *Rimicaris* à Rainbow indiquent une température entre 8 et 24°C. Mais on observe fréquemment des individus avec l'extrémité des pattes ou des antennes brûlés, ce qui laisse supposer des températures plus élevées au contact des parois des fumeurs. L'anatomie de *Rimicaris* est aussi la plus originale : absence d'yeux pédonculés, tache oculaire dorsale, hypertrophie de la chambre branchiale, du scaphognathite et de l'épipodite de pmx1, recouverts de bactéries épibiotiques.

*Chorocaris chacei* est présente sur tous les sites connus de la ride Médio-Atlantique. Sur Lucky Strike, les individus de *C. chacei* sont principalement observés au niveau des moulières, à proximité des émissions diffuses. La température maximale enregistrée au niveau de ces crevettes est de 16°C. Il apparaît donc que *C. chacei* et *R. exoculata* n'occupent pas les mêmes biotopes sur les cheminées. *C. chacei* vit dans des zones plus froides et donc dans un environnement moins contraignant compte tenu de la

rapide diminution de la température et de la "toxicité" du fluide dès qu'on s'éloigne de la source.

*Bythograea thermydron* est une espèce abondante autour des sources de la Dorsale Pacifique Est. On le rencontre aussi bien parmi les modioles, les vestimentifères et les alvinellidés de fumeurs blancs. Les conditions qu'il peut rencontrer sont donc très variables, du pôle froid au pôle chaud.

*Cyanagraea praedator*, espèce de plus grande taille que *Bythograea*, semble beaucoup plus limité dans sa répartition : on le rencontre essentiellement sur la paroi des fumeurs noirs, colonisés par *Alvinella*. Il serait donc capable de supporter un milieu plus contraignant.

D'une manière générale, les crustacés résistent assez bien à la décompression qu'ils subissent lors de la remontée du sous-marin ce qui permet d'obtenir des données physiologiques sur les organismes vivants. De plus, l'hémocyanine est un pigment respiratoire dissous dans l'hémolymphe et qui présente une remarquable plasticité adaptative. L'étude des adaptations respiratoires de ces espèces devrait donc permettre de mieux comprendre par exemple la répartition différentielle des espèces le long de multiples gradients (température, pH, oxygène, dioxyde de carbone) qui se développent autour d'une source hydrothermale. L'éventail des espèces disponibles devrait aboutir à des comparaisons intéressantes à 3 points de vue:

- zoologique, entre Caridés et Brachyours
- géographique, entre dorsale lente (Atlantique) et dorsale rapide (Pacifique)
- écologique, entre pôle chaud (*Rimicaris*, *Cyanagraea*) et pôle tiède (*Bythograea*, *Chorocaris*)

## **STRUCTURE ET FONCTION DES HEMOCYANINES**

### ***Structure***

L'unité de base de l'hémocyanine des Arthropodes est un polypeptide monomérique d'environ 75 kDa, avec deux atomes de cuivre liés à des histidines et capables de fixer réversiblement une molécule d'oxygène. Chez les crustacés, ces monomères s'assemblent en hexamères et en dodécamères. Les techniques classiques pour étudier ces polymères, chromatographie d'exclusion de taille (FPLC) et électrophorèse en conditions native ou dénaturante (PAGE et SDS-PAGE), n'ont pas révélé jusqu'à présent de particularité structurale chez les espèces hydrothermales comparées aux espèces côtières dont l'hémocyanine avait été étudiée auparavant. On retrouve bien des dodécamères et des hexamères, formés par l'association de 5 à 7 monomères distincts dont certains sont spécifiques aux dodécamères et dont les poids moléculaires, estimés par

SDS-PAGE, sont compris entre 70 et 85 kDa (O.22, O.35). En fait, la structure quaternaire semble essentiellement corrélée à la taxonomie des espèces étudiées : les Caridés montrent une prédominance de la forme hexamérique, alors que les Brachyours ont une proportion plus importante de dodécamères.

Fort de notre expérience avec les hémoglobines d'annélides, nous avons commencé à appliquer aux hémocyanines de crustacés des techniques plus précises pour déterminer la masse des molécules natives (MALLS) et leur composition en chaînes polypeptidiques (ESI-MS). Ainsi, chez *Cyanograea praedator*, l'analyse en spectrométrie de masse des hexamères et dodécamères purifiés a permis de préciser le nombre et la masse des différentes sous-unités : 8 monomères dont 2 spécifiques aux dodécamères et un spécifique aux monomères, dont les masses se répartissent entre 75008 Da et 75627 Da, une gamme sensiblement plus restreinte que celle estimée par électrophorèse (O.35). Une analyse récente utilisant les nouvelles possibilités instrumentales (Q-ToF, conditions natives et extension de la gamme de masse) ont même révélé l'existence possible d'agrégats supérieurs aux dodécamères (18-mères) chez *Bythograea*. Ces études nous amèneront probablement à réviser nos connaissances sur la structure des hémocyanines de crustacés.

### ***Fonction***

Les propriétés d'oxygénation intrinsèques de l'hémocyanine, affinité et coopérativité, peuvent être largement modulées par des facteurs tels que le pH et la température, deux paramètres particulièrement intéressants à étudier dans le contexte de l'environnement hydrothermal. L'effet spécifique du lactate, principal produit du métabolisme anaérobie chez les Crustacés, pouvait également se révéler intéressant pour des espèces évoluant dans un milieu potentiellement anoxique. Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des données obtenues jusqu'à présent sur les espèces hydrothermales. Contrairement aux structures quaternaires, les propriétés fonctionnelles des hémocyanines semblent en relation avec l'habitat respectif des espèces considérées.

Affinité ( $P_{50}$ ) et coopérativité ( $n_{50}$ ) de l'hémocyanine pour l'oxygène, mesurées à pH 7,5 et à 15°C sur l'hémolymphe native de 5 espèces de décapodes hydrothermaux. L'effet des protons (effet Bohr,  $\Delta\log P_{50}/\Delta\text{pH}$ ) est mesuré à 15°C pour une gamme de pH de 7,2 à 7,8. L'effet de la température (chaleur apparente d'oxygénation,  $\Delta H$ ) est mesuré à pH 7,5 entre 5/15°C et 25/35°C. L'effet du lactate ( $\Delta\log P_{50}/\Delta\log[\text{Lac}]$ ) est mesuré à 15°C pour une variation du lactate de 0 à 10 mM env. Les données sont issues de O.15, O.22, O.35 et de la thèse de F. Chausson.

Espèce	$P_{50}$ Torr	$n_{50}$	Effet Bohr	$\Delta H$ kJ.mol <sup>-1</sup>	Effet lactate
<i>Rimicaris exoculata</i>	6,8	1,2	-1,8	-1,23 (15-35°C)	-0,12
<i>Chorocaris chacei</i>	1,2	1,2	-1,7	-13,96 (15-35°C)	-0,16
<i>Segonzacia mesatlantica</i>	2,1	1,5	-2,7	+17,19 (15-25°C)	
<i>Bythograea thermydron</i>	3,4	2,0	-1,8	+29,88 (5-35°C)	+0,03
<i>Cyanagraea praedator</i>	7,8	2,3	-1,6	+1,16 (5-35°C)	-0,03

Ainsi, pour toutes ces espèces, l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène est élevée :  $P_{50}$  varie entre 1,2 et 7,8 Torr, alors qu'elle est généralement supérieure à 10 Torr chez les espèces littorales. L'effet Bohr est également fortement marqué et la combinaison de ces deux propriétés peut être considérée comme un caractère adaptatif : une affinité élevée permet en effet une meilleure extraction de l'oxygène dans un milieu qui en est potentiellement dépourvu, alors qu'un effet Bohr important favorise la libération de l'oxygène à proximité des tissus actifs où le pH extracellulaire est localement diminué. La coopérativité de la liaison de l'oxygène est en revanche relativement faible mais il est possible que cela soit dû à un artefact lié à la congélation des échantillons, obligatoire pour ces espèces, et qui, on le sait, diminue la coopérativité.

L'effet de la température est beaucoup plus intéressant. Généralement une augmentation de température se traduit par une diminution d'affinité, avec des valeurs de chaleur d'oxygénation apparente ( $\Delta H$ ) fortement négatives, inférieure à -30/-50 kJ.mol<sup>-1</sup>. Or, chez les espèces hydrothermales, on observe des valeurs faibles (*Chorocaris*), nulles (*Rimicaris*, *Cyanagraea*), et même positives (*Bythograea*, *Segonzacia*). Il faut se souvenir que dans l'environnement hydrothermal, température et oxygène sont inversement corrélés ; l'absence d'effet direct de la température sur l'affinité de l'hémocyanine, voire l'augmentation de celle-ci, peut donc être considéré comme un caractère adaptatif. Il faut noter que les deux espèces *Bythograea* et *Segonzacia* sont celles qui semblent occuper la

niche écologique la plus large, et rencontrent donc les températures les plus variées, du pôle froid au pôle chaud.

Le caractère adaptatif de l'effet spécifique des ions lactate sur l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène a été démontré dans deux situations : l'exercice musculaire (Booth et al. 1982) et l'hypoxie environnementale (O.3). Unique produit du métabolisme anaérobie chez les Crustacés, le lactate contribue à maintenir une oxygénation correcte de l'hémolymphe et on pouvait s'attendre à observer un fort effet lactate chez les espèces hydrothermales. Pourtant, si un effet modéré existe bien chez les deux espèces de crevettes testées, il est quasiment absent chez *Bythograea* et *Cyanagraea*.

Mais la découverte la plus intéressante à ce jour concernant les propriétés des hémocyanines de crustacés hydrothermaux, c'est l'effet de la dialyse. Pour tenir compte des effets des ions inorganiques et organiques sur les propriétés des hémocyanines de Crustacés, il est d'usage d'étudier celles-ci sur des échantillons dialysés. Chez la quasi-totalité des espèces étudiées, la dialyse entraîne une diminution d'affinité due à l'élimination de facteurs qui augmentent cette dernière, comme le lactate. C'est bien le cas chez *Chorocaris* et *Bythograea*, mais pas chez les deux espèces les plus thermophiles, *Cyanagraea* et *Rimicaris*. Chez celles-ci la dialyse de l'hémolymphe entraîne une augmentation d'affinité, que l'on peut interpréter en supposant que la dialyse a éliminé un facteur dialysable qui, dans l'hémolymphe native, diminuait l'affinité intrinsèque de l'hémocyanine. Cet effet est réversible, l'addition d'ultrafiltrat à l'hémolymphe dialysée rétablissant ses propriétés initiales (O.15, O.22).

L'étude des espèces de crustacés inféodées aux sources hydrothermales confirme donc l'importante plasticité fonctionnelle des hémocyanines, en ajoutant même un nouveau facteur, encore inconnu, à la panoplie existante. Mais ce qui nous manque actuellement pour pouvoir interpréter correctement nos résultats *in vitro*, ce sont des expérimentations *in vivo* qui permettraient de mesurer les variations de ces différents paramètres (pH, lactate, facteur X, etc) chez des animaux placés dans différentes situations écophysiologiques. Les réponses physiologiques aux variations de température, à l'hypoxie/anoxie, à l'exercice restent à décrire, et si possible en replaçant les animaux à leur pression habituelle, ce qui ne va pas sans poser de nombreux problèmes expérimentaux. Nous avons entrepris cette approche physiologique dans une situation bien particulière à l'environnement hydrothermal, l'hypercapnie.

## **HYPERCAPNIE ET EQUILIBRE ACIDE-BASE**

Parallèlement à mon intérêt pour le transport du CO<sub>2</sub> chez *Riftia pachyptila*, et réalisant le caractère hypercapnique de l'environnement hydrothermal par trop négligé

auparavant , je formai rapidement le projet d'étudier la physiologie de l'équilibre acide-base des crustacés hydrothermaux.

L'impact d'une élévation de la pression partielle de CO<sub>2</sub> dans l'environnement (hypercapnie) sur la physiologie des organismes marins n'a été étudié que dans un petit nombre d'espèces, vivant dans des milieux présentant des variations naturelles de la teneur en CO<sub>2</sub>. C'est le cas, par exemple, de zones confinées comme les cuvettes rocheuses de la zone intertidale, où une respiration excessive des organismes présents conduit à une accumulation de CO<sub>2</sub>, liée à une diminution de l'oxygène (Truchot and Duhamel-Jouve 1980). C'est également le cas lorsqu'une émission de CO<sub>2</sub> se produit, comme au niveau des sources hydrothermales profondes ((Childress et al. 1993; Von Damm 1995); O.23). Autour des sources, le CO<sub>2</sub> total varie de valeurs normales (2 mM) à des valeurs extrêmement élevées (30 mM,(Childress et al. 1993)), avec des variations concomitantes du pH (de 8 à 4), et ce de façon chaotique, en fonction du mélange turbulent du fluide hydrothermal avec l'eau de fond environnante. Par ailleurs, l'hypercapnie expérimentale a été utilisée en physiologie comparée pour provoquer des déséquilibres de l'état acide-base, dans le but d'identifier les mécanismes de transport ionique mis en jeu dans la régulation acide-base (voir revue dans (Truchot 1987)).

En outre, il faut savoir que des projets à grande échelle visant à se débarrasser des excès de production de CO<sub>2</sub> atmosphérique par injection dans l'océan profond se développent actuellement. Au cours d'un récent colloque européen (Bergen, Février 1998), le besoin urgent de recherches fondamentales concernant les effets du CO<sub>2</sub> sur la vie marine a été souligné, de façon à pouvoir comprendre et évaluer l'impact d'injection massives de CO<sub>2</sub> en eau profonde comme option pour réduire l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère.

L'approche expérimentale consiste à examiner les effets d'une exposition hypercapnique, et de la récupération ultérieure, sur l'équilibre acide-base de l'hémolymphe chez les crustacés décapodes. Comparés aux crustacés littoraux, soumis exceptionnellement à de telles conditions dans leur milieu naturel, les espèces endémiques des sources hydrothermales profondes ont du s'adapter à des épisodes hypercapniques fréquents pour coloniser ce milieu. Ils constituent ainsi un excellent modèle pour étudier les effets à long terme d'une exposition hypercapnique.

De façon générale, l'hypercapnie n'affecte pas seulement la régulation de l'équilibre acide-base, mais également les échanges respiratoires et ioniques, le transport de l'oxygène dans le sang et le mode de métabolisme (aérobie/anaérobie) (Pörtner and Reipschläger 1996). À de fortes concentrations, l'excès de CO<sub>2</sub> peut aussi provoquer la dissolution des structures calcifiées, et peut donc provoquer des perturbations chez les crustacés (carapace et mue). L'étude des organismes hydrothermaux peut ainsi conduire à

formuler de nouveaux concepts concernant les effets physiologiques de l'hypercapnie et les capacités de régulation ionique.

### ***Premiers pas : Chorocaris chacei***

Les premières études sur les propriétés de l'hémolymphe de *Rimicaris exoculata*, entreprises avec Jean-Paul Truchot lors de la campagne MAR en 1993 sur le site Snake Pit, avaient montré l'importance de l'effet du pH sur l'oxygénation de l'hémocyanine (effet Bohr, O.15). Notre intérêt pour les effets du CO<sub>2</sub> était renforcé par les mesures que nous avons pu effectuer sur l'eau environnant les essaims de crevettes (O.23). Mais, sans doute à cause de la profondeur de ce site (3500 m) et du temps nécessaire à la remontée, les crevettes arrivaient à bord dans un état moribond, inexploitable pour des expérimentations physiologiques. En 1994 je repartis explorer un site nouvellement découvert, Lucky Strike (Campagne DIVA 2). Malheureusement *Rimicaris* est presque complètement absente de ce site moins profond (1700m) et j'ai dû me contenter d'individus de l'espèce *Chorocaris chacei*, plus petits et donc moins propices aux expérimentations physiologiques. Cependant, même s'il n'était pas possible de mesurer le pH in vivo, et donc de décrire correctement les variations de l'équilibre acide-base, l'étude du contenu en bicarbonate de l'hémolymphe suite à des expositions hypercapniques (DEA de L. Camus) donnait de claires indications de possibilités de récupération hors du commun.

### ***Confirmation : Rimicaris exoculata***

En 1997, dans le cadre du programme européen AMORES, une nouvelle campagne avait lieu sur le site Lucky Strike, mais également sur un site plus profond, Rainbow (2400 m), découvert par les géologues et sur lequel *Rimicaris* était présente en abondance. Mais des incidents techniques et les aléas de la météorologie écourtèrent la campagne et ce n'est qu'en 1998 (campagne PICO) que de véritables expérimentations en hypercapnie sur *Rimicaris* ont pu être réalisées par Fabienne Chausson.

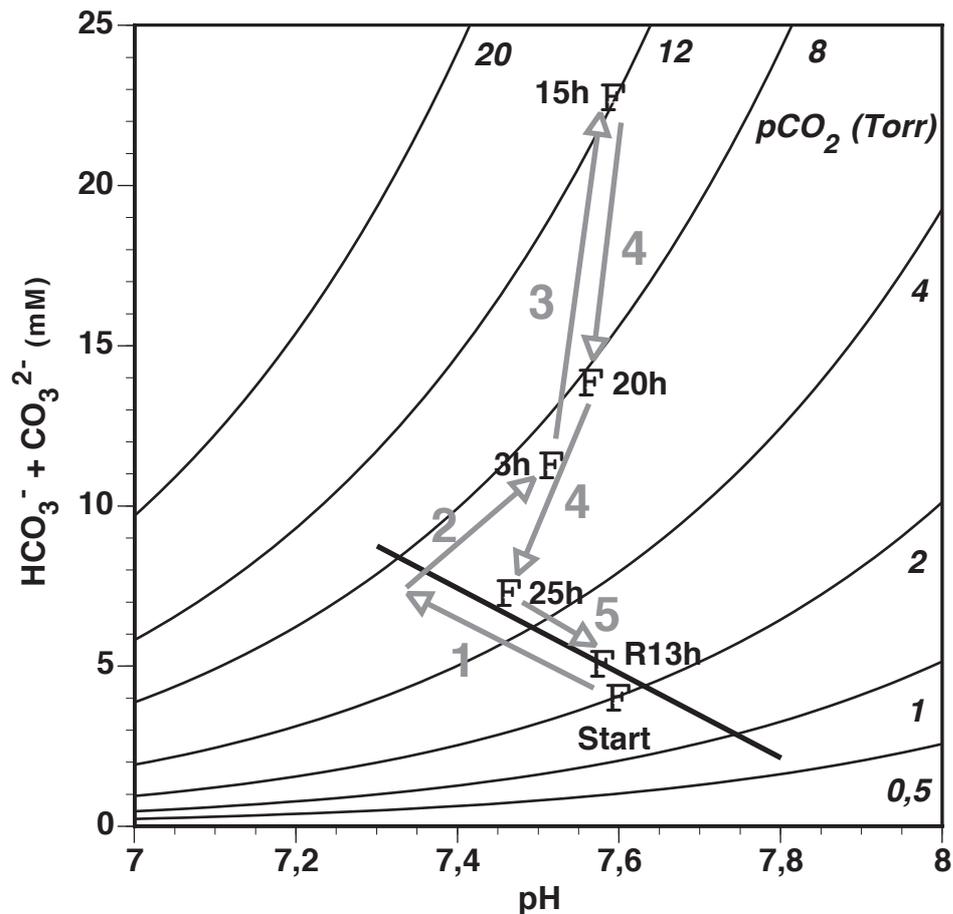


Diagramme de Davenport représentant l'interprétation des variations de l'équilibre acide-base dans l'hémolymphe de *Rimicaris exoculata* au cours d'une exposition hypercapnique. Le point de départ (Start) représente une situation normocapnique déduite d'expériences en normocapnie. Sous conditions hypercapniques (1%CO<sub>2</sub>, 15°C soit P<sub>w</sub>CO<sub>2</sub>=7,5 Torr) la perturbation initiale serait bien une acidose respiratoire (1) mais très rapidement compensée (2), l'accumulation de bicarbonate, ou alcalose métabolique (3), permettant un retour au pH initial en une quinzaine d'heures. Après cela, des mécanismes inconnus entraînent une diminution de la PCO<sub>2</sub> et du bicarbonate sans altération trop forte du pH(4). La récupération en normocapnie (5) permet de retrouver une situation très proche du point de départ.

Article O.34 Chausson et al. PBZ, soumis.

Les résultats obtenus quoique préliminaires sont encourageants : il y a bien un phénomène d'adaptation chez ces crevettes hydrothermales. En effet après une probable acidose respiratoire initiale, le pH retrouve une valeur normale en moins de 15heures. Plus surprenant encore, les crevettes sont apparemment capables de réduire la charge en CO<sub>2</sub> total sans affecter notablement le pH, et ce en étant toujours en conditions hypercapniques. Il faut savoir que chez *Carcinus maenas*, crabe littoral, la compensation, toujours partielle, intervient après environ 24h, et la charge en CO<sub>2</sub> total ne disparaît qu'après plusieurs heures de récupération en normocapnie (Truchot, 1978). A l'évidence, des mécanismes d'échanges ioniques très puissants sont à l'oeuvre.

Toutefois, les conditions d'expérimentation n'étaient pas idéales: ne sachant combien de temps les animaux survivraient, les expériences ont été réalisées dès la récupération de ceux-ci à la remontée du submersible. Or, nous avons pu constater, d'après la charge lactique du sang, qu'il fallait une douzaine d'heures pour que les animaux atteignent un état stationnaire. De plus, toutes ces expériences ont été réalisées à pression atmosphérique et connaissant l'effet de la décompression sur la fluidité membranaire, on est en droit de penser que ces conditions affectent notablement les échanges ioniques.

Lors de la prochaine campagne sur les sites Atlantique (ATOS, 2001) nous disposerons de deux enceintes presurisées développées en France, d'abord dans le cadre du programme Dorsales puis du programme européen Ventox. Nous espérons donc préciser la dynamique de réponse à l'hypercapnie chez la crevette *Rimicaris* et le crabe *Segonzacia*, avant d'appliquer ces protocoles sur les espèces Pacifique dans l'avenir.

Parallèlement, fort de notre expérience sur *Riftia*, nous pourrions rechercher les mécanismes cellulaires à l'oeuvre, en identifiant, caractérisant et localisant les acteurs impliqués : enzymes (anhydrase carbonique) et transporteurs (H<sup>+</sup> ATPase, Na-K ATPase, canaux chlore, ...).

### ***Articles relatifs à la physiologie comparée des crustacés hydrothermaux***

- S 1 ..... 1992 Truchot J.P. & Lallier F.H. . The modulation of the O<sub>2</sub>-carrying function of hemocyanin in the crustaceans. *News in Physiological Sciences* **7**: 49-52.
- O.15..... 1997 Lallier F.H., Truchot J.P. Hemocyanin oxygen-binding properties of a deep-sea hydrothermal vent shrimp: evidence for a novel cofactor. *J. Exp. Zool.* **277**, 357-364.
- O.22..... 1998 Lallier, F. H., Camus, L., Chausson, F. and Truchot, J. P. Structure and function of hydrothermal vent crustacean hemocyanin: an update. *Cah. Biol. Mar.* **39**, 313-316.
- O.23..... 1998 Truchot, J. P. and Lallier, F. H. High CO<sub>2</sub> content in hydrothermal vent water at the Snake Pit area, Mid-Atlantic Ridge. *Cah. Biol. Mar.* **39**, 153-158.
- O.34..... Chausson, F., Sarradin, P.M. and Lallier, F.H. Effects of hypercapnia on the haemolymph acid-base balance of the deep-sea hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*. . *Physiol. Biochem. Zool.* **soumis**..
- O.35..... Chausson, F., Bridges, C.R., Sarradin, P.M., Green, B.N., Riso, R., Caprais, J.C., Lallier, F.H. Structural and functional properties of hemocyanin from *Cyanograea praedator*, a deep-sea hydrothermal vent crab. *Proteins*, **soumis**

## **Conclusion :** **de l'intérêt de l'étude des sources** **hydrothermales profondes en biologie.**

---

Je conclurai ce mémoire en essayant de répondre à une question qui m'est souvent posée : pourquoi diable aller chercher des modèles biologiques aussi loin que sur les sources hydrothermales profondes ?

Le premier moteur est sans aucun doute la curiosité, la fascination de la découverte. Et les grands fonds océaniques, au même titre que l'espace, sont sans doute une des grandes frontières qui restent à explorer. La découverte fortuite de la faune hydrothermale profonde est une preuve éclatante des surprises que peuvent receler ces zones inconnues. Cette motivation est souvent assez mal considérée dans les cercles scientifiques, et pourtant elle répond en partie à ce que l'on désigne de nos jours sous le terme de « demande sociétale », si prisée dans la politique scientifique européenne<sup>8</sup>, à condition de porter ces découvertes à la connaissance du public. Et celui-ci est demandeur : le thème des sources hydrothermales profondes a régulièrement les honneurs de la presse scientifique « tous publics » (de La Recherche à Science et Vie Junior) mais également de la presse généraliste (quotidiens, hebdomadaires ou mensuels). Il faut bien avouer que *Riftia* est très photogénique ! J'attache personnellement une grande importance à valoriser nos résultats en ce sens, par le biais de conférences grand public, ou de participation à des événements médiatiques. Le dernier en date fut la participation à une exposition thématique à la Cité des Sciences (« Oser le Savoir », Février 2000).

De façon plus pragmatique, c'est vrai que ce milieu est difficile d'accès : il mobilise une part importante de notre temps et de nos ressources financières. Une campagne océanographique de plongées en submersible demande une préparation et une logistique considérables. On est alors en droit de se demander quelles sont les justifications de ce type de recherches et les perspectives qu'elles ouvrent dans d'autres domaines. Au-delà de l'originalité intrinsèque des organismes des sources que nous essayons de comprendre, les portes qu'elles peuvent permettre d'ouvrir sont nombreuses, que ce soit les origines de la vie, l'exobiologie ou la recherche de nouvelles molécules d'intérêt.

---

<sup>8</sup> ne sommes nous pas, comme le dit Alain Souchon, « ...une foule sentimentale, attirée par les étoiles, les voiles, que des choses pas commerciales » ?

En termes écologiques, les écosystèmes des sources hydrothermales profondes sont extrêmement originaux, basés sur une production primaire bactérienne chimiosynthétique. Une des conséquences de cette originalité est le fort taux d'endémisme des espèces qui colonisent les sites explorés à ce jour [Tunnicliffe, 1991 #4345; Tunnicliffe, 1996 #2839], et pour le physiologiste, la diversité des adaptations qu'ont développées ces organismes pour s'installer durablement dans cet environnement. Mais ces découvertes récentes ont également suscité un regain d'intérêt pour d'autres écosystèmes, plus discrets bien qu'étant connus depuis longtemps, et apporté un éclairage nouveau propice à une meilleure compréhension de ceux-ci. Dans pratiquement tous les sédiments marins littoraux, à quelques millimètres de l'interface, le sulfure d'hydrogène s'accumule dans l'eau interstitielle, en même temps que l'oxygène disparaît. Le thiobios, communauté animale colonisant ces sédiments réduits, est surtout composé de micro- et méiofaune peu propices à des études physiologiques. Mais nombre d'invertébrés fouisseurs interagissent également avec les microorganismes chimiosynthétiques qui s'y développent, directement en les consommant ou par le développement d'associations symbiotiques (cas des bivalves Lucinidae et autres), ou indirectement en développant des mécanismes de protection vis-à-vis des sulfures (cas de l'Arénicole par exemple). Ainsi, les découvertes issues de l'étude d'organismes aussi lointains que ceux des sources hydrothermales profondes peuvent permettre de comprendre les stratégies d'adaptation d'organismes beaucoup plus courants et plus proches de nous. En conservant un intérêt marqué pour les organismes littoraux, notamment intertidaux, nous maintiendrons à la fois une base de référence pour nos études comparatives et une ouverture vers une application « littorale » de nos recherches.

Il est également important d'ancrer nos recherches concernant les adaptations des organismes (qu'elles soient morphologiques, physiologiques ou biochimiques) dans un solide contexte évolutif. L'environnement hydrothermal profond constitue à cet égard un milieu particulièrement intéressant, compte tenu de son isolement et de son caractère contraignant, où l'influence des processus sélectifs dans l'évolution des espèces est sans doute exacerbée. Les « nouvelles » structures ou fonctions que nous pouvons décrire doivent ainsi être mises en perspective avec la phylogénie du groupe taxonomique considéré. Il en va ainsi pour la fonction de liaison des sulfures par l'hémoglobine de *Riftia* (O.18), dont il convenait de rechercher des analogues chez d'autres annélides (O.14, O.17) et dont l'homologie reste à établir sur des bases évolutives saines (X. Bailly, thèse en cours). Ou encore pour ce nouveau type structural d'hémoglobine mis en évidence chez *Branchiopolynoe* (O.27), un annélide Polynoidae, et dont les « cousins » littoraux sont dépourvus.

On a souvent associé la faune hydrothermale aux origines de la vie sur Terre. C'est sans doute possible en ce qui concerne certains groupes de microorganismes, mais certainement pas pour les métazoaires qui ont apparemment colonisé ces zones par vagues

successives et indépendantes selon les taxons considérés. Par contre, l'abondance, la taille et la diversité des symbioses invertébré-bactérie chimioautotrophes rendent ces modèles particulièrement attractifs pour étudier les aspects évolutifs de telles symbioses. Les *Eucaryotes thiotrophes* constitueraient ainsi un nouveau groupe trophique d'Eucaryotes, aux côtés des Eucaryotes phototrophes et des Eucaryotes hétérotrophes, ayant acquis la capacité d'utiliser l'énergie chimique des sulfures pour fixer le carbone inorganique par symbiose avec une lignée de procaryotes thiotrophes [Vetter, 1991 #396]. Dans cette perspective, l'étude des interactions hôte-bactérie prend tout son sens que ce soit en termes de physiologie ou de génétique. Les modèles hydrothermaux présentent en effet des degrés divers d'intégration : *Riftia*, par exemple, démontre une haute intégration physiologique (transport de H<sub>2</sub>S et de CO<sub>2</sub> pour les symbiotes) mais le mode de transmission des symbiotes, supposé horizontal (chaque génération doit acquérir *de novo* ses bactéries symbiotes), exclut *a priori* des échanges au niveau génomique. Si l'on considère que le processus d'évolution vers l'intégration d'organelles nouvelles est en cours, l'intérêt de ces modèles pour comprendre certaines phases des origines de la vie devient évident. Le développement des approches cellulaires que nous commençons à mettre en place (M.C. De Cian, thèse en cours) vont dans ce sens, et s'ouvriront à terme sur des études de relation hôte-symbiote, voire des approches de génomique (contrôle et régulation de la symbiose) sans doute par le biais de collaborations.

Dans une perspective plus appliquée, l'hémoglobine des annélides, polymère fonctionnant naturellement dans le compartiment extra-cellulaire, pourrait bien se révéler un modèle pour concevoir des substituts sanguins. Plusieurs aspects fonctionnels, comme leur affinité pour l'oxygène ou leur résistance à l'autoxydation, sont conformes au cahier des charges établi par la recherche pharmaceutique pour mettre au point un tel substitut injectable. Curieusement, la capacité de liaison des sulfures, découverte et explorée chez *Riftia*, non seulement se retrouve pour l'hémoglobine d'espèces vivant en milieu réduit comme l'Arénicole, mais est fonctionnellement comparable à la liaison de dérivés du NO par l'hémoglobine humaine, fonction ayant un rôle dans la vasodilatation. Raison de plus pour continuer à explorer la validité du modèle hémoglobine d'annélide comme substitut sanguin. Cette voie de recherche, pilotée par Franck Zal, a déjà fait l'objet d'un dépôt de brevet (B.1) et d'une demande de programme européen.

## Références

---

- Arp AJ, Childress JJ (1981) Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm. *Science* 213:342-344
- Arp AJ, Childress JJ (1983) Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science* 219:295-297
- Arp AJ, Childress JJ, Vetter RD (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
- Arp AJ, Doyle ML, Di Cera E, Gill SJ (1990) Oxygenation properties of the two co-occurring hemoglobins of the tube worm *Riftia pachyptila*. *Respir. Physiol.* 80:323-334
- Arp AJ, Menon JG, Julian D (1995) Multiple mechanisms provide tolerance to environmental sulfide in *Urechis caupo*. *Amer. Zool.* 35:132-144
- Booth CE, McMahon BR, Pinder AW (1982) Oxygen uptake and the potentiating effects of increased haemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Comp. Physiol. B* 148:111-121.
- Cavanaugh CM, Gardiner SL, Jones ML, Jannasch HW, Waterbury JB (1981) Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213:340-342
- Childress JJ, Fischer CR (1992) The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbioses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 30:337-441
- Childress JJ, Fischer CR, Favuzzi JA, Kochevar R, Sanders NK, Alayse AM (1991) Sulfide-driven autotrophic balance in the bacterial symbiont-containing hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones. *Biol. Bull.* 180:135-153
- Childress JJ, Lee RW, Sanders NK, Felbeck H, Oros DR, Toulmond A, Desbruyères D, Kennicut II MC, Brooks J (1993) Inorganic carbon uptake in hydrothermal vent tubeworms facilitated by high environmental PCO<sub>2</sub>. *Nature* 362:147-149
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Herzen RPY, Ballard RD, Green K, Williams D, Bainbridge A, Crane K, van Andel TH (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos rift. *Science* 203:1073-1083
- Distel DL, Felbeck H (1987) Endosymbiosis in the lucinid clams *Lucinoma aequizonata*, *Lucinoma annulata* and *Lucina floridana*: a reexamination of the functional morphology of the gills as bacteria-bearing organs. *Mar. Biol.* 96:79-86
- Felbeck H (1981) Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213:336-338

- Grieshaber MK, Völkel S (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu. Rev. Physiol.* 60:33-53
- Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226
- Jones ML (1981) *Riftia pachyptila* Jones: observations on the Vestimentiferan worm from the Galapagos rift. *Science* 213:333-336
- Kochevar RE, Govind NS, Childress JJ (1993) Identification and characterization of two carbonic anhydrases from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* Jones. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.* 2:10-19
- Lonsdale P (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Research* 24:857-863
- Nelson DC, Fisher CR (1995) Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps. In: Karl DM (ed) *Microbiology of Deep - Sea Hydrothermal Vents*. CRC Press Inc, 2000 Corporate Blvd NW, Boca Raton, FL 33431, p 125-167
- Pörtner HO, Reipschläger A (1996) Ocean disposal of anthropogenic CO<sub>2</sub>: Physiological effects on tolerant and intolerant animals Ocean storage of carbon dioxide: Workshop 2 - Environmental Impact. IEA Greenhouse Gas R&D Programme, Cheltenham, p 57-82
- Pruski AM (1998) Participation des acides aminés au transport et à la détoxification des substrats énergétiques (sulfures) chez les associations symbiotiques dépendantes de la chimiosynthèse Laboratoire Arago. Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, p 209
- Rau GH (1981) Hydrothermal vent clam and tubeworm <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C: further evidence of nonphotosynthetic food sources. *Science* 213:338-340
- Robinson JJ, Stein JL, Cavanaugh CM (1998) Cloning and sequencing of a Form II ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) in chemoautotrophic symbioses: implications for the interpretation of stable carbon isotope ratios. *Limology and Oceanography* 40:1496-1502
- Scott KM, Bright M, Macko SA, Fisher CR (1999) Carbon dioxide use by chemoautotrophic endosymbionts of hydrothermal vent vestimentiferans: affinities for carbon dioxide, absence of carboxysomes, and δ<sup>13</sup>C values. *Marine Biology* 135:25-34
- Scott KM, Fisher CR, Vodenichar JS, Nix ER, Minnich E (1994) Inorganic carbon and temperature requirements for autotrophic carbon fixation by the chemoautotrophic symbionts of the giant hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*. *Physiological Zoology* 67:617-638
- Suzuki T, Takagi T, Ohta S (1990) Primary structure of a constituent polypeptide chain (AIII) of the giant haemoglobin from the deep-sea tube worm *Lamellibrachia*: a possible H<sub>2</sub>S-binding site. *Biochem. J.* 266:221-225

- Terwilliger RC, Terwilliger NB, Schabtach E (1980) The structure of hemoglobin from an unusual deep sea worm (Vestimentifera). *Comp. Biochem. Physiol.* 65B:531-535
- Truchot J-P (1987) *Comparative Aspects of Extracellular Acid-Base Balance*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Truchot J-P, Duhamel-Jouve A (1980) Oxygen and carbon dioxide In the marine intertidal environment : diurnal and tidal changes in rockpools. *Respir. Physiol.* 39:241-254
- Visman B (1991) Sulfide tolerance : physiological mechanisms and ecological implications. *Ophelia* 34:1-27
- Volkel S, Grieshaber MK (1996) Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina* - Evidence for alternative electron pathways. *Eur J Biochem* 235:231-237
- Von Damm KL (1995) Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. In: Humpries SE, Zierenberg RA, Mullineaux LS, Thomson RE (eds) *Seafloor hydrothermal systems. Physical, chemical, biological, and geological interactions*. American Geophysical Union, p 222-247
- Wilmot DRJ, Vetter RD (1990) The bacterial symbiont from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is a sulfide specialist. *Mar. Biol.* 106:273-283
- Wittenberg JB, Morris RJ, Gibson QH, Jones ML (1981a) Hemoglobin kinetics of the Galapagos Rift vent worm *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophora: Vestimentifera). *Science* 213:344-346
- Wittenberg JB, Morris RJ, Gibson QH, Jones ML (1981b) Oxygen binding by hemoglobin of the Galapagos Rift vent worm *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophora: Vestimentifera). *Biochim. Biophys. Acta* 670:255-259

## Annexe

### Copiedes articles mentionnés

---

#### ETUDE DU TRANSPORT DES SULFURES CHEZ *RIFTIA PACHYPTILA*.

- O.10 ..... 1996 Zal, F., Lallier, F.H., Wall, J.S., Vinogradov, S.N., Toulmond, A. The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: I- reexamination of the number and masses of its constituents. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8869-8874
- O.11 ..... 1996 Zal, F., Lallier, F.H., Green, B.N., Vinogradov, S.N. & Toulmond, A. (). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*: II. Complete polypeptide chain composition investigated by maximum entropy analysis of mass spectra. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8875-8881.
- O.12 ..... 1996 de Haas, F., Zal, F., Lallier, F.H., Toulmond, A. & Lamy, J.N. Three-dimensional reconstruction of the hexagonal bilayer hemoglobin of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* by cryoelectron microscopy. *Proteins*, **26**, 241-256.
- O.18 ..... 1997 Zal F., Suzuki T., Kawasaki Y., Childress J.J., Lallier F.H., Toulmond A. Primary structure of the common polypeptide chain b from the multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: Implication on the knowledge of the sulfide binding-site. *Proteins*, **29**: 562-574.
- O.19 ..... 1997 Goffredi S. K., Childress J. J., Desaulniers N. T., Lallier F. H. Sulfide acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is via diffusion of HS<sup>-</sup> rather than H<sub>2</sub>S. *J. exp. Biol.* , **200**: 2609-2616.
- O.25 ..... 1998 Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., Van Dorsselaer, A. and Childress, J. J. S-sulfohemoglobin and disulfide-exchange: the mechanisms of sulfide-binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**, 8997-9002.

#### ETUDE DU TRANSPORT DU CO<sub>2</sub> CHEZ *RIFTIA PACHYPTILA*.

- O.9 ..... 1994 Toulmond A., Lallier F.H., de Frescheville J., Childress J.J., Sanders N.K., Lee R. & Desbruyères D. Unusual carbon dioxide-binding properties of body fluids from hydrothermal vent tubeworms *Deep Sea Res.*, **41** (10): 1447-1456..
- O.16 ..... 1997 Goffredi S. K., Childress J. J., Desaulniers N. T., Lee R. W., Lallier F. H., Hammond D. Inorganic carbon acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* depends upon high external P<sub>CO2</sub> and on proton elimination by the worm. *J. Exp. Biol.* , **200**: 883-896.
- O.20 ..... 1998 Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. How to be the perfect host: CO<sub>2</sub> and HS<sup>-</sup> accumulation and H<sup>+</sup>

elimination in the hydrothermal vent tubeworm *R. pachyptila*. *Cahiers de Biologie Marine* **39**, 297-300.

- O.26..... 1999 Goffredi, S. K., Childress, J. J., Lallier, F. H. and Desaulniers, N. T. The ionic composition of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, evidence for the elimination of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and H<sup>+</sup> and for a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> shift. *Physiol. Bioch. Zool.* **72**, 296-306.

## PHYSIOLOGIE COMPAREE DES CRUSTACES HYDROTHERMAUX

- S 1 ..... 1992 Truchot J.P. & Lallier F.H. . The modulation of the O<sub>2</sub>-carrying function of hemocyanin in the crustaceans. *News in Physiological Sciences* **7**: 49-52.
- O.15..... 1997 Lallier F.H., Truchot J.P. Hemocyanin oxygen-binding properties of a deep-sea hydrothermal vent shrimp: evidence for a novel cofactor. *J. Exp. Zool.* **277**, 357-364.
- O.22..... 1998 Lallier, F. H., Camus, L., Chausson, F. and Truchot, J. P. Structure and function of hydrothermal vent crustacean hemocyanin: an update. *Cah. Biol. Mar.* **39**, 313-316.
- O.23..... 1998 Truchot, J. P. and Lallier, F. H. High CO<sub>2</sub> content in hydrothermal vent water at the Snake Pit area, Mid-Atlantic Ridge. *Cah. Biol. Mar.* **39**, 153-158.
- O.34..... Chausson, F., Sarradin, P.M. and Lallier, F.H. Effects of hypercapnia on the haemolymph acid-base balance of the deep-sea hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*. . *Physiol. Biochem. Zool.* **soumis..**
- O.35..... Chausson, F., Bridges, C.R., Sarradin, P.M., Green, B.N., Riso, R., Caprais, J.C., Lallier, F.H. Structural and functional properties of hemocyanin from *Cyanograea praedator*, a deep-sea hydrothermal vent crab. *Proteins*, **soumis**