



HAL
open science

Adaptation au milieu hydrothermal profond : étude comparative de l'écophysiologie respiratoire des crustacés décapodes des dorsales Pacifique et Atlantique

Fabienne Chausson

► To cite this version:

Fabienne Chausson. Adaptation au milieu hydrothermal profond : étude comparative de l'écophysiologie respiratoire des crustacés décapodes des dorsales Pacifique et Atlantique. Ecosystèmes. Paris 6, 2001. Français. NNT: . tel-01115031

HAL Id: tel-01115031

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115031>

Submitted on 11 Feb 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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité
Physiologie Intégrée des Invertébrés

Présentée par Mlle **Fabienne CHAUSSON**

Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de thèse :

**ADAPTATION AU MILIEU HYDROTHERMAL
PROFOND :
ETUDE COMPARATIVE DE
L'ECOPHYSIOLOGIE RESPIRATOIRE DES
CRUSTACES DECAPODES DES DORSALES
PACIFIQUE ET ATLANTIQUE**

Soutenue le 27 Mars 2001 devant le jury composé de :

Mr P. PORCHERON	Professeur, Université Paris 6, Paris	(Président)
Mr C. R. BRIDGES	Professeur, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Allemagne	(Rapporteur)
Mr D. DESBRYUERES	Directeur de Recherche, IFREMER DRO/EP, Brest	(Rapporteur)
Mr F. H. LALLIER	Maître de Conférence, Station Biologique, Roscoff	(Directeur de thèse)
Mr P.-M. SARRADIN	Cadre de Recherche, IFREMER DRO/EP, Brest	(Responsable scientifique)

INTRODUCTION GENERALE	1
I/ CONTEXTE GENERAL.....	1
II/ OBJECTIF DE CE TRAVAIL.....	3
III/ PLAN DU TRAVAIL.....	4
I - MILIEU ET MODELES BIOLOGIQUES	5
I-1/ HISTORIQUE.....	5
I-2/ CONTEXTE GEOLOGIQUE.....	9
I-3/ CONTEXTE BIOLOGIQUE	11
I-4/ LA DORSALE DU PACIFIQUE ORIENTAL (EPR).....	13
I-4-1: LA FAUNE ASSOCIEE A LA RIDE DU PACIFIQUE ORIENTAL	13
I-4-2: LE SEGMENT 13°N.....	15
I-4-2-1/ <i>Le champ hydrothermal Genesis (12°48'N, 103°56'W)</i>	18
I-4-2-2/ <i>Le champ hydrothermal Elsa (12°48'N, 103°56'W)</i>	18
I-4-3 : LE SEGMENT 9°N.....	18
I-4-2-1/ <i>Le champ hydrothermal M-Vent (9°50'79N, 104°17'59W)</i>	19
I-4-2-2/ <i>Le champ hydrothermal Bio-Vent (9°50'96N, 104°17'66W)</i>	19
I-5/ LA DORSALE MEDIO-ATLANTIQUE (MAR).....	20
I-5-1 : LA FAUNE ASSOCIEE A LA RIDE MEDIO-ATLANTIQUE.....	22
I-5-2 : LE POINT TRIPLE DES AÇORES (ATJ)	25
I-5-2-1/ <i>Le champ hydrothermal Rainbow (36°13,44'N, 33°54,10'W)</i>	27
I-5-2-2/ <i>Le champ hydrothermal Lucky Strike (37°17,29'N, 32°16,45'W)</i>	28
I-5-2-3/ <i>Le champ hydrothermal Menez Gwen (37°51,60'N, 31°31,30'W)</i>	31
I-5-2-4/ <i>La faune associée au niveau de l'ATJ</i>	32
I-6/ LES MODÈLES BIOLOGIQUES	33
I-6-1 : <i>BYTHOGRAEA THERMYDRON</i> (EPR)	33
I-6-2 : <i>CYANAGRAEA PRAEDATOR</i> (EPR)	34
I-6-3 : <i>SEGONZACIA MESATLANTICA</i> (MAR)	34
I-6-4 : <i>RIMICARIS EXOCULATA</i> (MAR)	35
I-6-5 : <i>CHOROCARIS CHACEI</i> (MAR)	36

I-6-6 : <i>MIROCARIS FORTUNATA</i> (MAR).....	36
I-6-7 : <i>CHACEON AFFINIS</i> (MAR).....	37
I-7/ ENGINES ET APPAREILS DE PRELEVEMENTS.....	37
I-7-1 : LES NAVIRES OCEANOGRAPHIQUES, NADIR ET L'ATALANTE	37
I-7-2 : LE SUBMERSIBLE NAUTILE.....	38
I-7-3 : LES SYSTEMES DE PRELEVEMENTS	39
I-8/ LES MISSIONS	40
I-8-1 : MISSIONS SUR LA DORSALE DU PACIFIQUE ORIENTAL.....	41
I-8-2 : MISSIONS SUR LA RIDE MEDIO –ATLANTIQUE.....	41

II – LOCALISATION DES ESPECES ET MICRO-ENVIRONNEMENTS	43
II-1/ MATERIEL ET METHODES.....	43
II-1-1 : ANALYSES VIDEO	43
II-1-2 : CARACTERISATION DE CHAQUE TYPE D'ENVIRONNEMENT	44
II-1-2-1/ <i>Mesure de la température</i>	44
II-1-2-2/ <i>Prélèvements discrets</i>	44
II-1-2-3/ <i>Mesures in situ à l'aide d'ALCHIMIST</i>	45
II-2/ RESULTATS.....	46
II-2-1 : PACIFIQUE.....	46
II-2-1-1/ <i>Localisation des espèces</i>	46
II-2-1-2/ <i>Description de l'environnement chimique</i>	51
II-2-2 : ATLANTIQUE	54
II-2-2-1/ <i>Localisation des espèces</i>	54
II-2-2-2/ <i>Description de l'environnement chimique</i>	60
II-3/ DISCUSSION.....	62
II-4/ CONCLUSION.....	65
III - STRUCTURE DES BRANCHIES.....	67
III-1/ MATERIEL ET METHODES.....	67
III-1-1 : PRELEVEMENT DES BRANCHIES.....	67
III-1-2 : ETUDES DES FORMULES BRANCHIALES	68
III-1-3 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)	69
III-1-4 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)	69
III-2/ RESULTATS.....	70
III-2-1 : FORMULES BRANCHIALES OBSERVEES	70
III-2-2 : MORPHOLOGIE DES BRANCHIES	71
III-2-3 : MORPHOLOGIE DES SOIES	74
III-3/ DISCUSSION.....	79
III-4/ CONCLUSION	81
IV – RESPIRATION ET PIGMENTS RESPIRATOIRES.....	83
IV-1/ LA RESPIRATION.....	84

IV-1-1 : GENERALITES	84
IV-1-2 : LE PROCESSUS RESPIRATOIRE	84
IV-2/ LES PIGMENTS RESPIRATOIRES.....	85
IV-2-1 : SITE ACTIF	88
IV-2-2 : STRUCTURE QUATERNAIRE	88
IV-3/ LES HEMOCYANINES (HC).....	89
IV-3-1 : LES HEMOCYANINES DE MOLLUSQUES	90
<i>IV-3-1-1/ Structure moléculaire</i>	90
<i>IV-3-1-2/ Propriétés fonctionnelles</i>	91
IV-3-2 : LES HEMOCYANINES D'ARTHROPODES	92
<i>IV-3-2-1/ Structure moléculaire</i>	92
<i>IV-3-2-2/ Propriétés fonctionnelles</i>	98
<i>IV-3-2-3/ Biosynthèse</i>	101
IV-4/ CONCLUSION	102
V – COMPOSITION DE L'HEMOLYMPHE.....	104
V-1/ MATERIEL ET METHODES.....	104
V-1-1 : PRELEVEMENT DE L'HEMOLYMPHE	104
V-1-2 : TECHNIQUES COLORIMETRIQUES.....	105
V-1-3 : COULOMETRIE.....	107
V-1-4 : PHOTOMETRIE DE FLAMME	107
V-1-5 : CHROMATOGRAPHIE IONIQUE	108
V-1-6 :POTENTIOMETRIE.....	108
V-1-7 : DOSAGE DES COMPOSES SOUFRES PAR HPLC EN PHASE INVERSE	108
V-1-8 : ETUDE DE L'EVOLUTION DES TENEURS EN LACTATE	109
<i>V-1-8-1/ Etude chez Cyanograea praedator</i>	109
<i>V-1-8-2/ Etude chez Bythograea thermydron</i>	109
V-2/ RESULTATS.....	110
V-2-1 : COMPOSITION EN IONS MAJEURS DE L'HEMOLYMPHE	111
V-2-2 : TENEURS EN COMPOSES ORGANIQUES.....	113
V-2-3 : TENEURS EN COMPOSES SOUFRES	114

V-2-4 : EVOLUTION DES TENEURS EN LACTATE.....	115
V-2-4-1/ <i>Cyanograea praedator</i>	115
V-2-4-2/ <i>Evolution chez Bythograea thermydron</i>	116
V-3/ DISCUSSION.....	117
V-3-1 : IONS MAJEURS DE L'HEMOLYMPHE	117
V-3-2 : COMPOSES ORGANIQUES.....	121
V-3-3 : TENEURS EN COMPOSES SOUFRES	122
V-3-4 : ÉVOLUTION DES TENEURS EN LACTATE.....	123
V-3-4-1/ <i>Évolution à pression atmosphérique et en milieu ouvert</i>	123
V-3-4-2/ <i>Évolution en milieu confiné</i>	123
V-4/ CONCLUSION.....	124
VI - STRUCTURE QUATERNAIRE DES HEMOCYANINES	125
VI-1/ MATERIEL ET METHODES	125
VI-1-1 : PRELEVEMENTS DE L'HEMOLYMPHE.....	125
VI-1-2 : MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)	125
VI-1-3 : PURIFICATION DES DIFFERENTS ASSEMBLAGES D'HEMOCYANINE	126
VI-1-3-1/ <i>Purification</i>	126
VI-1-3-2/ <i>Estimation de la masse des différents assemblages</i>	126
VI-1-3-3/ <i>Etude de la stabilité thermique</i>	127
VI-1-4 : ELECTROPHORESE	127
VI-1-4-1/ <i>Sodium Dodecyl Sulfate-PAGE (SDS-PAGE)</i>	127
VI-1-4-2/ <i>PAGE après dissociation des polymères d'hémocyanine en monomères</i>	128
VI-1-4-3/ <i>Coloration des gels</i>	128
VI-1-5 : SPECTROMETRIE DE MASSE.....	128
VI-1-5-1/ <i>Définition d'un spectre de masse</i>	129
VI-1-5-2 : <i>Intérêt de l'ESI-MS dans l'analyse protéique</i>	129
VI-1-5-3 : <i>Analyse de l'Hc par ESI-MS de type Q-ToF : conditions natives</i>	130
VI-1-5-4 : <i>Analyse de l'Hc par ESI-MS de type quadripôle : conditions dénaturantes</i>	131
VI-2/ RESULTATS	132
VI-2-1 : MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)	132

VI-2-2 : FPLC - ÉTUDE DES MOLECULES NATIVES	133
VI-2-3 : ELECTROPHORESES – ÉTUDE DE LA COMPOSITION EN SOUS-UNITES	135
VI-2-4 : SPECTROMETRIE DE MASSE – ÉTUDE DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE	138
<i>VI-2-4-1/ Masses moléculaires des hémocyanines natives.....</i>	<i>138</i>
<i>VI-2-4-2/ Masses moléculaires des différents monomères d'hémocyanine.....</i>	<i>139</i>
VI-3/ DISCUSSION	141
VI-4/ CONCLUSION	145
VII - PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HEMOCYANINES.....	147
VII-1/ MATERIEL ET METHODES.....	148
VII-1-1: RECOLTE DES ANIMAUX ET PRELEVEMENTS DE L'HEMOLYMPHE	148
VII-1-2 : COURBES DE DISSOCIATION.....	148
VII-2-3 : TRAITEMENT DES RESULTATS.....	151
VII-1-4 : COURBES DE DISSOCIATION REALISEES	152
VII-1-5 : TRAITEMENTS STATISTIQUES	154
VII-2/ RESULTATS.....	154
VII-2-1 : AFFINITE, COOPERATIVITE, EFFET BOHR	154
VII-2-2 : EFFET DU LACTATE	155
VII-2-3 : EFFET DE LA DIALYSE.....	157
VII-2-4 : EFFET DE LA TEMPERATURE	159
VII-3/ DISCUSSION	161
VII-4/ CONCLUSION	167
VIII – ADAPTATIONS A L'HYPERCAPNIE	168
VIII-1/ MATERIEL ET METHODES.....	169
VIII-1-1 : RECOLTES ET PRELEVEMENTS D'HEMOLYMPHE	169
VIII-1-2 : RECOLTE DES ANIMAUX ET ACCLIMATATION <i>IN VIVO</i> DE <i>RIMICARIS EXOCULATA</i>	169
VIII-1-3 : ANALYSE DE L'EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE.....	169
VIII-1-4 : MESURE DES CONCENTRATIONS EN LACTATE	170
VIII-1-5 : ANALYSES STATISTIQUES.....	170
VIII-2/ RESULTATS.....	171

VIII-2-1 : POUVOIRS TAMPONS CHEZ LES DIFFERENTES ESPECES	171
VIII-2-2: ACCLIMATATION <i>IN VIVO</i> DE <i>RIMICARIS EXOCULATA</i> A L'HYPERCAPNIE	172
VIII-3/ DISCUSSION.....	175
VIII-3-1 : POUVOIRS TAMPONS CHEZ LES DIFFERENTES ESPECES	175
VIII-3-2 : ACCLIMATATION <i>IN VIVO</i> DE <i>RIMICARIS EXOCULATA</i> A L'HYPERCAPNIE	176
VIII-4/ CONCLUSION.....	179
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	186
LISTE DES FIGURES	215

INTRODUCTION GENERALE

I/ Contexte général

En 1977, un nouvel écosystème marin était découvert par 2 600 mètres de profondeur sur la ride des Galápagos (Lonsdale 1977). Toute une nouvelle communauté animale y était observée avec une biomasse considérable, une majorité d'espèces inconnues des biologistes et une chaîne alimentaire basée sur la chimiosynthèse et non sur la photosynthèse (Corliss *et al.*, 1979). Cette découverte redynamisa l'étude de l'océan profond, en particulier au niveau des dorsales. Dans les années qui suivirent, de nouveaux sites furent découverts le long de la dorsale du Pacifique oriental. Les biologistes se sont bien évidemment penchés en priorité sur les espèces les plus abondantes, qui se sont avérées fonctionner sous forme d'endosymbioses entre un métazoaire et des bactéries chimioautotrophes. Ainsi, le vestimentifère *Riftia pachyptila* est dépourvu de tube digestif et sa croissance exceptionnelle est assurée grâce à des bactéries endosymbiotiques localisées dans un organe particulier, le trophosome (Jones, 1981 ; Cavanaugh *et al.*, 1981 ; Felbeck, 1981). C'est également le cas du bivalve *Calyptogena magnifica* qui abrite ses symbiontes bactériens dans ses branchies et qui parvient à exploiter des zones de diffusion très faible en captant les sulfures par son pied inséré dans les fissures du basalte (Boss et Turner, 1980 ; Arp *et al.*, 1984 ; Fiala-Médioni et Métivier, 1986). Les modioles du genre *Bathymodiolus* constituent également un modèle d'endosymbiose très étudié (Childress et Fisher, 1992) car elles présentent un régime alimentaire plus souple en pouvant alterner entre symbiose et filtration. Les espèces thermophiles, en particulier les alvinellidés, métazoaires supposés les plus thermophiles, qui vivent dans la partie supérieure des cheminées, ont également fait l'objet d'études sur leur écologie et leur physiologie (revue dans Desbruyères *et al.*, 1998). Cependant, malgré leur densité relativement importante, les crustacés décapodes hydrothermaux n'ont fait l'objet que d'un petit nombre de travaux. Mis à part les quelques études de physiologie publiées sur le crabe *Bythograea thermydron* (Mickel et Childress, 1982a, b ; Sanders *et al.*, 1988, Airries et Childress 1994), en particulier des travaux sur l'effet de la pression, seules des données de taxinomie sont disponibles pour les crustacés hydrothermaux de la dorsale du Pacifique oriental (Guinot, 1988).

En 1986, de nouveaux sites hydrothermaux furent découverts sur la dorsale médio-

Atlantique. Autour des fumeurs, par 3 500m de fond, la faune du site Snake Pit est dominée par deux espèces : des modioles avec une espèce proche de celle des sites Pacifique, et des crevettes formant des essaims mouvants autour des diffuseurs en forme de ruche (Segonzac *et al.*, 1993). Cette crevette, *Rimicaris exoculata*, est l'espèce dominante sur beaucoup de sites hydrothermaux de l'Atlantique, en particulier sur le site Rainbow, découvert en 1997, où elle forme des agrégats très denses pouvant atteindre plus de 2 500 individus/m². Deux autres espèces de crevettes (*Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata*) et une espèce de crabes (*Segonzacia mesatlantica*) sont endémiques des sites de la dorsale médio-Atlantique. *R. exoculata* représente l'espèce la plus étudiée, en particulier en ce qui concerne son régime trophique, encore débattu (Van Dover *et al.*, 1988 ; Segonzac *et al.*, 1993 ; Polz *et al.*, 1998 ; Rieley *et al.*, 1999) et son organe « visuel » dorsal qui jouerait un rôle dans la perception des radiations émises par les fumeurs (Van Dover *et al.*, 1989). Quelques études concernant la reproduction des trois espèces de crevettes de l'Atlantique ont aussi été publiées (Ramirez Llodra *et al.*, 2000).

Compte-tenu des contraintes environnementales particulières du milieu hydrothermal profond, il est étonnant que la physiologie respiratoire de ces crustacés n'ait pas été étudiée de façon plus approfondie jusqu'à maintenant. La zone de mélange entre fluide hydrothermal et eau de fond, où se retrouvent les espèces endémiques des sources, est le siège de gradients physico-chimiques important, résultant d'un mélange turbulent. La température, l'oxygénation, les caractéristiques acido-basiques de l'eau y sont variables à très petite échelle d'espace et de temps. Les espèces endémiques sont donc *a fortiori* adaptées à l'anoxie, à l'hypercapnie ou à la présence de sulfures ou de métaux lourds.

Par ailleurs, les systèmes respiratoire et circulatoire des crustacés décapodes sont suffisamment complexes pour présenter une large gamme d'adaptations morphologiques et physiologiques. Ils sont notamment dotés d'un pigment respiratoire, l'hémocyanine, circulant dans l'hémolymphe et assurant le transport de l'oxygène. Cette molécule polymérique se caractérise par une grande plasticité adaptative, aussi bien au niveau structural que fonctionnel. En effet, la composition des différents polymères d'hémocyanine peut varier en fonction des facteurs environnementaux (Mangum et Rainer, 1988) et un certain nombre de cofacteurs est connu pour affecter les propriétés de liaison de l'oxygène à l'hémocyanine (Truchot et Lallier, 1992). L'équipe Ecophysiologie de la Station Biologique de Roscoff a commencé à étudier les propriétés de l'hémocyanine de *Rimicaris exoculata* en 1993 suite à

la campagne MAR (Lallier et Truchot, 1997) et les premières expérimentations *in vivo* avec l'espèce *Chorocaris chacei* récoltées au site Lucky Strike ont été menées durant la campagne DIVA 2 en 1994.

II/ Objectif de ce travail

L'objectif de ce travail est de comprendre les mécanismes de transfert de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre le milieu extérieur et les tissus des invertébrés, en étudiant deux groupes de crustacés endémiques pris comme « modèles biologiques » : les crabes Bythograeidae et les crevettes Alvinocarididae. Des représentants de ces deux familles sont présents au niveau de la ride du Pacifique oriental (EPR) et de la dorsale médio-Atlantique (MAR). Au cours de notre étude, nous avons travaillé sur trois espèces de Bythograeidae, *Bythograea thermydron* (EPR), *Cyanograea praedator* (EPR) et *Segonzacia mesatlantica* (MAR), et trois espèces d'Alvinocarididae *Rimicaris exoculata* (MAR), *Chorocaris chacei* (MAR) et *Mirocaris fortunata* (MAR). Un crabe bathyal, *Chaceon affinis*, parfois présent sur l'un des sites de la MAR, a également fait l'objet de quelques études. Une attention toute particulière a été portée sur le micro-environnement de chacune des espèces étudiées, condition *sine qua non* d'une véritable approche écophysiological. L'étude comparative entre ces différentes espèces a pour but de permettre des rapprochements sur le plan :

- zoologique, entre Caridés et Brachyours,
- géographique, entre les dorsales du Pacifique et de l'Atlantique,
- écologique, entre pôle chaud et pôle tiède.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le contexte d'un programme européen d'étude des sources hydrothermales profondes de l'Atlantique, AMORES (Atlantic Mid Ocean Ridge Ecosystem Studies) (MAST 3, 1996-1999, coordinateur D. Desbruyères), qui développait une approche interdisciplinaire des interactions géologie/biologie. Ce travail renforce également la collaboration entre deux équipes de l'Unité de Recherche Marine 7 (IFREMER / CNRS / UPMC – Écologie et écophysiological des organismes hydrothermaux thermophiles – 1994-2001).

III/ Plan du travail

Pour atteindre nos objectifs, une approche pluridisciplinaire était indispensable : intégrer les résultats décrivant l'environnement chimique avec la répartition écologique des espèces, relier expérimentations physiologiques et analyses biochimiques. La présentation de ce mémoire est une conséquence directe de cette pluridisciplinarité.

Après une présentation du milieu hydrothermal et des espèces étudiées (Chapitre I), nous détaillons la localisation des différentes espèces sur les cheminées et la caractérisation de leur micro-environnement respectif (Chapitre II). Les branchies constituant l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, nous avons commencé l'étude de leur anatomie chez les différentes espèces de brachyours (Chapitre III).

Le chapitre IV constitue une revue bibliographique sur la respiration et les pigments respiratoires, plus particulièrement l'hémocyanine. L'hémolymphe est le reflet de l'état physiologique des crustacés d'où l'intérêt d'étudier sa composition pour les ions majeurs, les concentrations en protéines, hémocyanine, lactate et urate chez les crustacés décapodes hydrothermaux et bathyal (Chapitre V). L'hémocyanine, pigment respiratoire des crustacés décapodes, présente une grande plasticité structurale et fonctionnelle. L'étude de la structure quaternaire (Chapitre VI) et des propriétés fonctionnelles (Chapitre VII) des hémocyanines chez les différentes espèces nous permettra, en les comparant avec celles des espèces littorales, de mettre en évidence des adaptations liées à l'environnement hydrothermal. Enfin, le pouvoir tampon de l'hémolymphe des différentes espèces étudiées et les variations de l'état acido-basique de l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata* lorsque celle-ci est soumise à une hypercapnie à pression atmosphérique ont été analysés afin de mettre en évidence des mécanismes particuliers pour résister aux fortes concentrations en dioxyde de carbone mesurées au niveau de sources hydrothermales (Chapitre VIII).

Une courte synthèse des résultats obtenus nous permettra finalement de dégager les perspectives ouvertes par ce travail.

I - MILIEU ET MODELES BIOLOGIQUES

I-1/ Historique

Les océans constituent plus de 66 % de la surface de la Terre et les 9/10^{èmes} d'entre eux ont une profondeur supérieure à 1 000 mètres. Leur profondeur moyenne se situe à 3 800 mètres, avec une température moyenne de fond de 2°C. A partir de 100 - 200 mètres de profondeur, l'obscurité est totale, à l'exception de rares éclairs émis par des organismes bioluminescents. Du fait de l'absence de photosynthèse, on a pu croire il y a longtemps qu'aucune vie n'était présente dans cette partie obscure de la biosphère. Cependant, l'expédition océanographique du *Challenger* (1872-1876) et bien d'autres campagnes ont permis de reculer la profondeur limite de l'observation de la vie océanique. En 1950-52, l'expédition danoise de la *Galathea* démontrait la présence de vie jusqu'aux plus grandes profondeurs océaniques (Fosse des Mariannes, 10 900 mètres). En l'absence de lumière, la chaîne alimentaire des zones profondes repose entièrement sur le carbone organique photosynthétique produit dans la couche de surface. La quasi-totalité de la matière organique produite en surface est recyclée, tandis qu'une petite partie sédimente. Lors de leur descente, les déjections et cadavres d'organismes planctoniques sont dissociés et dégradés par des micro-organismes. Seule une petite fraction atteint le fond de l'océan, et nourrit des animaux détritivores et filtreurs. Par conséquent, la biomasse benthique décroît avec la profondeur et l'éloignement des côtes. Elle est plus faible dans les régions océaniques stratifiées (système oligotrophe comme les eaux tropicales) que dans les régions à transferts verticaux rapides (système eutrophe comme les zones d'upwelling). Malgré une relative pauvreté et une dynamique généralement lente, les fonds abyssaux comportent des peuplements opportunistes abondants capables de se mobiliser pour exploiter une ressource organique dont l'apport est imprévisible et discontinu, comme l'arrivée sur le fond d'un cadavre de requin (Feldman *et al.*, 1998 ; Distel *et al.*, 2000)

La découverte des sources hydrothermales :

Les biologistes pensaient connaître l'essentiel du fonctionnement des écosystèmes des grands fonds océaniques jusqu'à la découverte, attendue, des sources hydrothermales et celle, fortuite, de la faune qui leur était associée. Cette découverte redynamisa l'exploration de

l'océan profond et remet en cause la connaissance des cycles biogéochimiques et des voies de transfert, non seulement dans les abysses mais aussi dans l'ensemble du milieu marin.

Les premiers indices de l'existence des communautés d'organismes liées à l'hydrothermalisme furent obtenus en 1976 par des géophysiciens, lors de la campagne américaine *Pleiades*, sur la zone axiale de la dorsale des Galápagos, dans le Pacifique oriental. L'objectif était la localisation d'anomalies thermiques dues à d'éventuelles sorties de fluides hydrothermaux dans les zones de formation de la croûte océanique à l'aide de l'*Angus*, un châssis porteur de caméras et de thermistances. Par 2 600 mètres de profondeur, de « curieux » objets blancs, de grande taille, toujours associés à de légères anomalies thermiques furent observés sur certaines photos (Lonsdale, 1977). Les biologistes attribuèrent ces formes à des bivalves géants. La première mission de biologie eut lieu au printemps 1977, avec le submersible américain *Alvin* sur la ride des Galápagos. Les scientifiques observèrent des communautés biologiques exubérantes, constituées d'animaux géants, pour la plupart inconnue, se développant autour d'évents d'où sortait un fluide tiède (entre 15 et 20°C) (Corliss et Ballard, 1977). Les premiers sites découverts furent appelés : Garden of Eden, Clambake ou encore Rose Garden (Corliss *et al.*, 1979).

L'exploration des dorsales :

Entre 1979 et 1982, l'exploration systématique des dorsales océaniques s'engagea dans les zones où les vitesses moyennes de séparation des plaques océaniques étaient les plus grandes (17 centimètres par an au niveau de la dorsale du Pacifique oriental). En se fondant sur des anomalies thermiques et chimiques telles que des concentrations plus élevées en hélium, en méthane ou en manganèse de l'eau, les océanographes ont localisé de nouveaux sites, explorés en submersibles par les équipes françaises et américaines, le long de la dorsale du Pacifique oriental. Ces nombreuses découvertes ont montré que l'hydrothermalisme est un phénomène fréquent.

L'exploration des rides du Nord-Est Pacifique (rides de Gorda, de Juan de Fuca et de l'Explorer) (Figure I-1) a été effectuée pour la première fois en 1983 par des submersibles américains. Les peuplements diffèrent de ceux de la ride du Pacifique oriental, sans doute en raison de l'isolement géographique dû à la discontinuité de la ride du Pacifique, lors du déplacement vers l'ouest de la plaque continentale américaine, il y a environ 25 millions d'années.

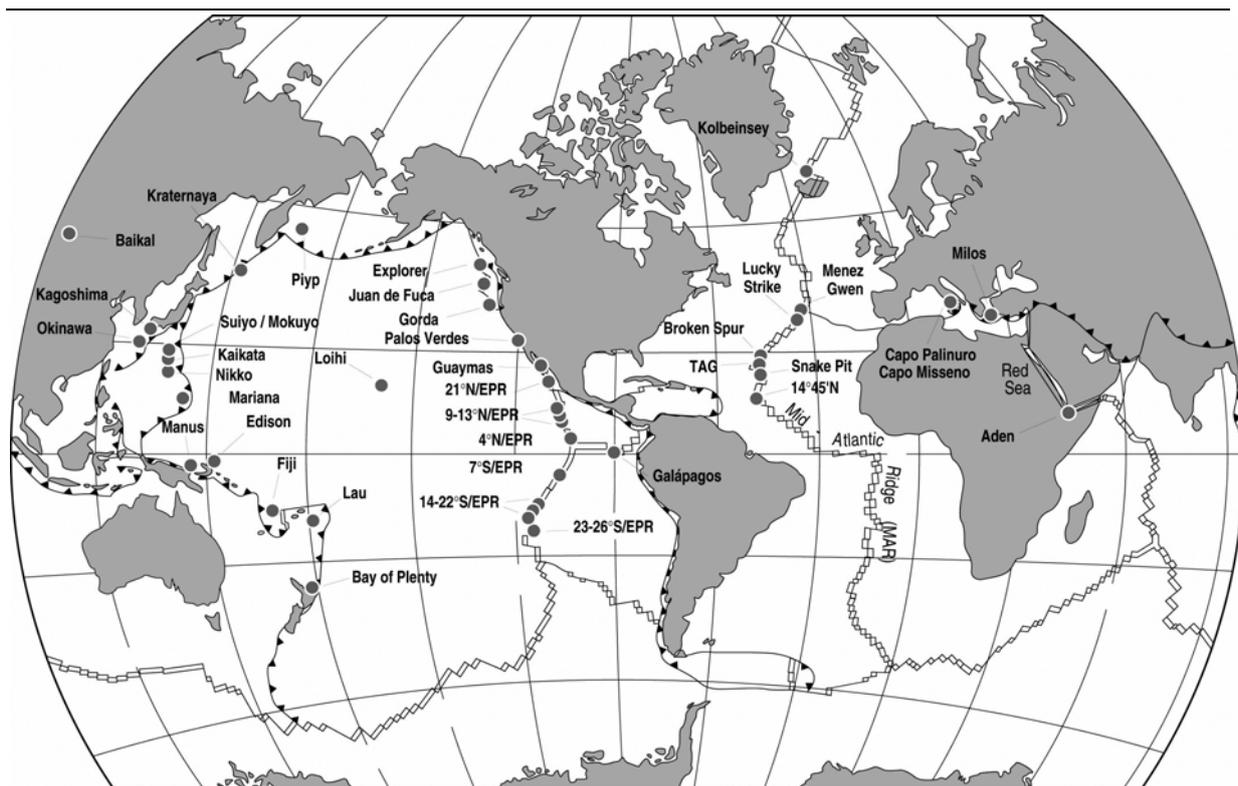


Figure I-1: Répartition des zones hydrothermales présentant une faune associée. D'après Desbruyères et Segonzac (1997).

Les bassins arrière arc du Pacifique occidental (bassins de Manus, des Mariannes, des Fidji, de Lau), situés en arrière des zones de subduction, possèdent également des zones d'accrétion où l'hydrothermalisme est actif.

L'exploration de l'Atlantique est plus récente. Longtemps, les océanographes ont pensé que cette dorsale lente ne pouvait être le siège d'un hydrothermalisme contemporain. Pourtant, en 1985, Peter Rona mit en évidence des cheminées actives sur la zone TAG (Trans-Atlantique Geotransverse), par 26°N (Rona *et al.*, 1986). Un an après, lors d'un forage scientifique par 23°N, la caméra détectait un site actif, dénommé SnakePit, en raison de l'abondance de poissons anguilliformes. Depuis cette date, plusieurs autres sites ont été découverts tout le long de la dorsale médio-Atlantique.

La mer Rouge a été également l'objet d'études car c'est un bassin océanique récemment ouvert. La croûte océanique qui s'est formée avant l'ouverture est chargée en sels, et l'eau de mer qui percole au fond du bassin se transforme en une saumure chaude (60°C), sursalée, qui peut transporter des métaux. Les risques d'endommagement des submersibles ont découragé les explorations, et seul le golfe d'Aden a été exploré par le submersible *Cyana*. L'hydrothermalisme détecté entre 1 400 et 1 600 mètres de profondeur y est diffus et

aucune communauté animale équivalente à celle du Pacifique n'a été détectée. Cependant, une riche faune composée de crevettes, d'anémones et de galathées est présente en périphérie sur les basaltes.

La dorsale de l'océan Indien, dorsale très lente (7 à 8 mm par an), n'a été que très récemment explorée, à partir de 1990. Les premières plongées en submersible ont eu lieu fin 1998 lors d'une campagne japonaise avec le submersible *Shinkai 6500*. Une deuxième mission d'exploration a eu lieu avec le submersible français *Nautilus* en mai 2000. A ce jour, aucune activité hydrothermale n'a été détectée, à l'exception de sites éteints au niveau du point triple de Rodriguez (19°S), avec la présence de coquilles du bivalve *Calyptogena*.

Il reste à explorer la partie sud de la dorsale médio-Atlantique ainsi que toute la dorsale circum Antarctique et trans-Arctique. Il semble malgré tout que le phénomène hydrothermal soit un phénomène universel, bien que des communautés animales n'aient pas encore été trouvées à l'heure actuelle au niveau de toutes les dorsales océaniques.

I-2/ Contexte géologique

Le phénomène hydrothermal est une conséquence indirecte de la dérive des continents. La Terre est une « gigantesque machine thermique » et la chaleur produite doit s'évacuer vers l'extérieur du globe par de grands mouvements de convection à l'intérieur du manteau. Le matériau chaud remonte au plus près de la surface au niveau des zones d'accrétion, forme la lithosphère océanique, qui s'éloigne en se refroidissant, pour retourner au manteau au niveau des zones de subduction. Le système des dorsales océaniques est le principal lieu où énergie et matière s'échangent entre l'intérieur de la planète et ses enveloppes (lithosphère, biosphère, hydrosphère et asthénosphère). La dorsale océanique est unique, jalonnant les océans sur plus de 60 000 km (Figure I-1). La surface du globe est divisée en 7 plaques principales rigides et en une série de plaques plus petites, qui se déplacent les unes par rapport aux autres (Le Pichon, 1968). Ces plaques sont séparées par la dorsale, divisée en multiples segments séparés par des zones de fracture. La vitesse d'expansion des segments de dorsale varie de 7 à 28 mm par an (dorsale de l'océan Indien) à 17 cm par an (dorsale du Pacifique oriental : 17°S). Les plaques se forment à l'axe des dorsales et sont constituées d'une croûte légère et de matériaux refroidis provenant du manteau. Cet ensemble forme la lithosphère, épaisse d'une centaine de kilomètres, qui se déplace sur le manteau plus chaud et visqueux. En vieillissant, la lithosphère océanique se refroidit et s'alourdit, comme en témoigne l'approfondissement progressif des fonds océaniques : de 2 500 m à l'axe des dorsales à 5 500 m environ pour les bassins les plus anciens (180 millions d'années). La lithosphère océanique s'enfonce sous la lithosphère continentale au niveau des zones de subduction.

La vallée axiale est caractérisée par un fossé d'effondrement (graben) constitué de coulées de lave fracturées qui sont le siège des principales manifestations hydrothermales. La vallée axiale de la dorsale médio-Atlantique est mieux marquée que celle du Pacifique, sa profondeur dépasse 1 500 m, au lieu des 50 m du Pacifique. L'eau de mer s'infiltré dans la croûte océanique (Figure I-2) par les fissurations du plancher basaltique (zone de charge) et entre en contact avec la roche en fusion (zone de réaction). Cette eau atteint des températures très élevées (plus de 350°C), mais reste généralement en phase liquide du fait des fortes pressions hydrostatiques qui règnent à ces profondeurs (jusqu'à 350 atmosphères). L'eau devient aussi anoxique, hypercapnique, acide (pH variant de 2 à 5,9) et riche en composés réduits tels que H₂S, CH₄, NH₄⁺ ainsi qu'en éléments métalliques tels que Mn²⁺, Fe²⁺, Li⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ (Edmond *et al.*, 1979 ; Edmond et Van Damm, 1985 ; Michard *et al.*, 1984

; Campbell *et al.*, 1988). A l'inverse, elle est dépourvue de Mg^{2+} et de SO_4^{2-} . Lorsque le fluide ne subit pas de dilution (zone de décharge), sa vitesse à l'émission est élevée et son mélange avec l'eau de mer froide est brutal. Il conduit à la précipitation de sulfures polymétalliques et de sulfates de calcium anhydres, à l'origine des « fumeurs » qui constituent progressivement les cheminées hydrothermales pouvant dépasser 10 m de hauteur (Edmond *et al.*, 1982 ; Fustec *et al.*, 1987). Le fluide émis atteint alors des températures de 350-400°C. Lorsque le fluide qui remonte se mélange avec de l'eau de mer sous la surface, il précipite partiellement dans le réseau de fissures et s'en échappe lentement à des températures plus faibles (5 à 30°C), formant des zones de diffusion.

Les sources hydrothermales sont éphémères. La durée de vie d'un site hydrothermal, généralement inférieur à la centaine d'années, est similaire sur les rides lentes et rapides (Lalou *et al.*, 1985). En revanche, la durée de vie d'un champ est différente. Sur une dorsale rapide, l'activité se déplace le long de la vallée axiale par bonds successifs (Lalou *et al.*, 1993a), entraînant l'extinction et la formation de nouveaux champs, alors que, sur une dorsale lente, l'activité est beaucoup plus stable et focalisée à long terme, ce qui résulte en l'existence de dépôts hydrothermaux massifs subissant une alternance de périodes d'activité et d'extinction (Fouquet *et al.*, Soumis ; Fouquet *et al.*, 1993 ; Lalou *et al.*, 1993a,b), sans déplacement de l'activité. Par exemple, le champ TAG a connu plusieurs épisodes d'activité sur une période de 140 000 ans (Lalou *et al.*, 1993b).

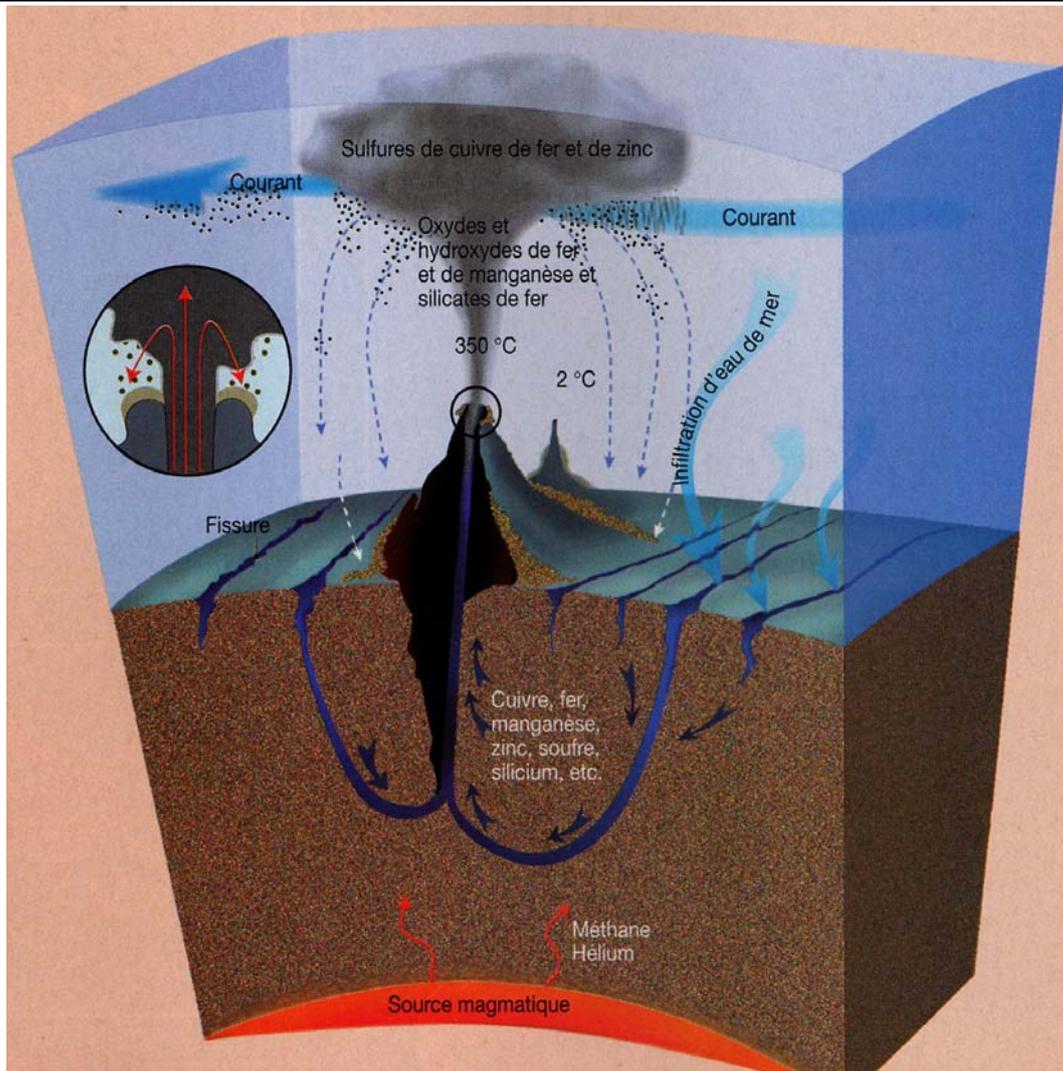


Figure I-2 : Représentation schématique des processus de formation des fluides hydrothermaux (Rouat, 1999).

I-3/ Contexte biologique

Dans les zones de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, les caractéristiques physico-chimiques présentent une très grande variabilité spatio-temporelle (Chevaldonné *et al.*, 1991). Pourtant, la vie hydrothermale se développe précisément au niveau de cette zone de mélange hyper-variable entre eau de mer et fluide hydrothermal. Les animaux se répartissent en « ceintures » autour des cheminées en fonction de leurs capacités à supporter la toxicité des composés présents dans le fluide (Figure I-3). L'étude des biocénoses a montré que plus de 80 % des espèces présentes dans ces zones de mélange sont endémiques aux sources hydrothermales (Newman, 1985 ; Grassle, 1986 ; Tunnicliffe, 1991). Et plus de 75 % des espèces hydrothermales sont présentes sur seulement un site et aucune espèce n'a été observée sur tous les sites (Tunnicliffe *et al.*, 1998).

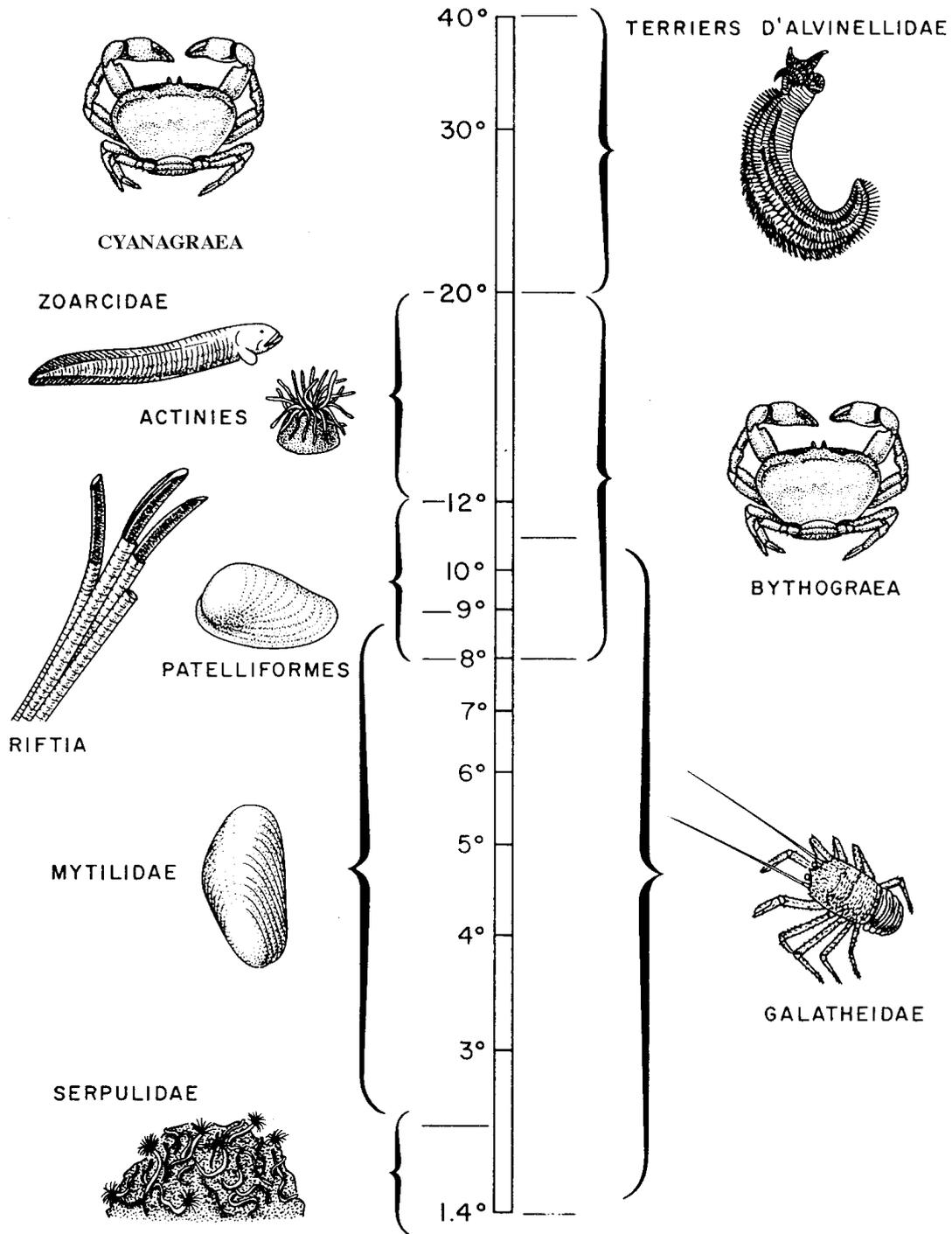


Figure I-3: Répartition des principales espèce inféodées à l'hydrothermalisme océanique de la ride du Pacifique oriental en fonction de la température. D'après Desbruyères *et al.*, 1982.

La découverte de cette faune luxuriante a donné naissance à de nombreuses interrogations. Par exemple, comment de tels peuplements pouvaient se développer dans un monde sans lumière et où, a priori, les apports externes en nourriture (cadavres et particules

provenant des couches supérieures de l'océan) étaient relativement faibles (Enright *et al.*, 1981 ; Laubier, 1993) ? Très rapidement, un élément de réponse a été apporté par la découverte de bactéries chimio-autotrophes, libres ou associées de façon plus ou moins étroite à certains organismes (Corliss *et al.*, 1979 ; revues dans Childress et Fisher, 1992 ; Nelson et Fisher, 1995). Cette chimio-autotrophie est réalisée à partir de divers composés présents dans l'eau environnante tels que les sulfures (bactéries sulfo-oxydantes) ou le méthane (bactéries méthanotrophes). Ces bactéries constituent ainsi une production primaire abondante (Karl *et al.*, 1980). En-dehors des brouteurs tels que les alvinelles et les crevettes *Rimicaris exoculata*, la majorité des consommateurs primaires est constitué d'organismes symbiotiques tels que le vestimentifère *Riftia pachyptila* et les bivalves. L'ensemble de ces consommateurs primaires représente une biomasse très importante qui génère à son tour une production secondaire. Les prédateurs et nécrophages, dont fait partie la plupart des crustacés, sont également abondants.

En résumé, l'écosystème hydrothermal, basé sur la chimiosynthèse, montre une production élevée de biomasse. Les caractéristiques physico-chimiques rencontrées par les organismes colonisant la zone de mélange sont très variables dans le temps et dans l'espace et sont considérées comme extrêmes. Les sources hydrothermales, isolées les unes des autres par une distance pouvant atteindre plusieurs kilomètres, apparaissent comme des oasis de l'océan profond.

Les sources hydrothermales les plus étudiées se situent au niveau des dorsales du Pacifique oriental (EPR = East Pacific Rise) et de la ride médio-Atlantique (MAR = Mid-Atlantic Ridge) et constituent les zones ateliers de la communauté scientifique française.

I-4/ La dorsale du Pacifique oriental (EPR)

Nous allons présenter, dans un premier temps, la faune associée aux sources hydrothermales de l'EPR, puis détailler deux sites des segments 13°N et 9°N qui constituent les zones de notre étude.

I-4-1: La faune associée à la ride du Pacifique oriental

Comme nous l'avons mentionnée, la faune associée aux sources hydrothermales présente un fort taux d'endémisme (Newman, 1985 ; Grassle, 1986 ; Tunnicliffe, 1991). La

faune de l'EPR présente sur les basaltes frais est clairsemée lorsqu'on progresse dans l'axe de la vallée en direction de sources hydrothermales. Elle est essentiellement constituée de spongiaires et d'actiniaux qui sont installés sur les hauteurs des reliefs, où la vitesse des courants de fond favorise le comportement filtreur. Les crustacés (*Munidopsis*, *Bythograea*) et les poissons Zoarcidae sont les premiers animaux observés à l'approche d'un site. Environ 330 espèces (Tunnickliffe *et al.*, 1998 ; Daniel Desbruyères, communication personnelle) ont été dénombrées au niveau de la ride du Pacifique, regroupées en trois associations faunistiques (Fustec *et al.*, 1987):

- **les espèces du « pôle froid »** : présentes dans les zones périphériques, elles sont dominées par les annélides qui appartiennent à la famille des Serpulidae. De nombreuses galathées de l'espèce *Munidopsis subsquamosa* sont également observées à ce niveau.

- **les espèces du « pôle tiède »** : elles sont dominées par les vestimentifères et les bivalves. Parmi les vestimentifères, *Riftia pachyptila* est sans doute l'espèce la plus remarquable et la plus abondante des peuplements hydrothermaux de l'EPR. Espèce autotrophe, *Riftia* est dépourvue de tube digestif et tire son énergie de bactéries endosymbiontes sulfo-oxydantes situées dans un organe particulier, le trophosome (Cavanaugh *et al.*, 1981). Les deux espèces de bivalves dominantes sont les *clams* *Calyptogena magnifica* (Boss et Turner, 1980) et les modioles *Bathymodiolus thermophilus* (Kenk et Wilson, 1985). Les *clams* enfouissent leur pied profondément dans les failles du basalte pour pomper les sulfures nécessaires à leurs bactéries symbiotes. Les *clams* ont presque perdu l'utilisation de leur tube digestif et dépendent, pour leur subsistance, des bactéries vivant dans leurs cellules branchiales. En revanche, les modioles ont un régime plus souple et peuvent alterner entre symbiose et filtration, ce qui leur permet d'occuper une niche écologique plus large (Page *et al.*, 1991). Le crabe prédateur et nécrophage, *Bythograea thermydron*, est présent à la fois parmi les vestimentifères et les modioles. On note aussi la présence de poissons zoarcidés, en particulier *Thermarces cerberus* (Rosenblatt et Cohen, 1986). De densité importante, ils se nourrissent des branchies de *Riftia*, d'amphipodes et de patelles (Geistdoerfer, 1996).

- **les espèces du « pôle chaud »** : elles sont dominées par les annélides appartenant à la famille des Alvinellidae. Les espèces les plus abondantes sont le ver de Pompéi *Alvinella pompejana* (Desbruyères et Laubier, 1980) et l'espèce sympatrique *A. caudata* (Desbruyères et Laubier, 1986). Ces deux espèces apparaissent être les constructeurs principaux, de par

leurs tubes, des édifices biogéniques associés aux diffuseurs à haute et moyenne températures. *A. pompejana* est probablement le métazoaire le plus thermotolérant connu à l'heure actuelle bien que la température de son environnement soit encore débattue (Chevaldonné *et al.*, 1992 ; Fustec *et al.*, 1987 ; Cary *et al.*, 1998 ; Chevaldonné *et al.*, 2000). Plusieurs autres espèces sont également présentes au niveau du pôle chaud, et en particulier le crabe des fumeurs *Cyanagraea praedator*.

Les trois types d'habitats présentés sont en proportions variables selon les sites considérés. Nous allons maintenant décrire plus précisément les segments 13°N et 9°N qui constituent les deux zones de notre étude.

I-4-2: Le segment 13°N

Le segment nommé 13°N (Figure I-4) de la dorsale du Pacifique oriental est compris entre 12°38'N et 12°54'N de latitude et 103°50'W et 104°01'W de longitude (Fustec *et al.*, 1987). Ce segment rectiligne est approximativement orienté dans le sens NO/SE. L'activité hydrothermale se répartit sur plus de 100 km à l'intérieur d'un graben axial, large d'environ 250 m et dont la profondeur moyenne atteint 2 630 m. La vallée axiale est encadrée par deux crêtes parallèles qui culminent à une profondeur de 2 600 m (Hékinian *et al.*, 1983). Le relief dominant du graben est constitué par des coulées de laves « fraîches » drapées ou lobées, principalement creuses, ou par des laves en tubes, qui sont dépourvues de couverture sédimentaire. Lorsque les coulées de lave se désagrègent progressivement, elles forment d'importants lacs effondrés sur l'axe de la dorsale (Fustec *et al.*, 1987). Les sites d'activité sont localisés à l'intérieur des lacs ou à leur périphérie, au niveau de laves lobées fracturées. Les zones actives sont caractérisées par trois principaux types d'émissions, décrits par Fustec *et al.* (1987) :

- **les émissions ponctuelles** : elles forment des dépôts hydrothermaux qui sont construits par les précipitations de sulfures polymétalliques. Ces dernières sont issues du mélange entre le fluide hydrothermal chaud (350°C) et l'eau de mer froide (2,5°C) (Edmond *et al.*, 1982). Leur porosité et leur composition varient en fonction du degré de dilution du fluide et évoluent au cours du temps (Fouquet *et al.*, 1988) ;

- **les émissions diffuses** : elles sont localisées sur de vastes étendues dans les zones de fissuration et d'éboulis et ne forment pas de dépôts hydrothermaux en surface. Leur température varie de 5 à 30°C. Ces émissions résultent d'un mélange fluide - eau de mer en

sub-surface et présentent une charge particulaire inférieure aux émissions ponctuelles (Hékinian *et al.*, 1985 ; Fustec *et al.*, 1987) ;

- **les eaux moirées** : elles correspondent à des émissions translucides, dues à un mélange de deux eaux de températures différentes. Elles sont souvent observées à la périphérie des sites actifs ou sur les sites en cours d'extinction. Le mélange fluide - eau de mer résiduel transporté hors du site par les courants de fond est à l'origine de ce type d'émission.

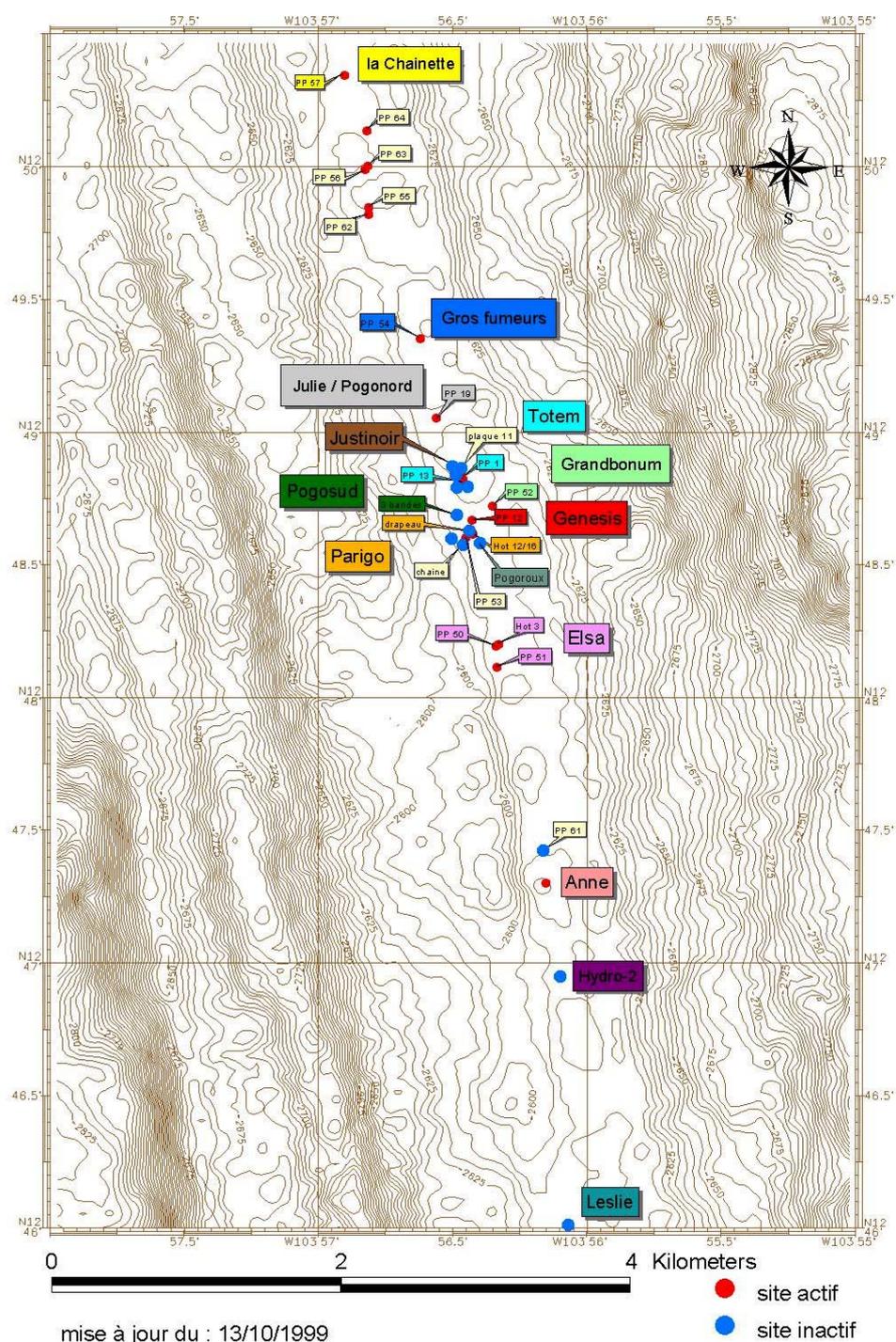


Figure I-4: Carte de localisation des sites sur le segment 13°N (générée à partir du logiciel ADÉLIE-IFREMER lors de la campagne HOPE'99). Les lignes marron représentent des isobathes.

I-4-2-1/ Le champ hydrothermal Genesis (12°48'N, 103°56'W)

Le site Genesis a été découvert au cours de la campagne BIOCYARISE (Mars 1984, chef de mission : D. Desbruyères) par les équipes françaises qui exploraient les segments 11°N et 13°N à l'aide du submersible français Cyana. Genesis est devenu le site de la ride de l'EPR le plus étudié par la communauté française (zone atelier retenue par le programme national Dorsales). Il est actuellement constitué d'un fumeur noir de 9 mètres de hauteur, émettant un fluide clair chaud (262 à 269°C), couvert de *Riftia* à sa base et d'alvinelles dans sa partie supérieure. Ce fumeur, construit sur un mur de 5 m de haut, orienté NO/SE, a sa partie supérieure située au-dessus du plateau. Les basaltes environnants sont peuplés de polychètes serpulidés. Trois autres fumeurs sont observés au sud-est de cette cheminée principale. Plus petits, ils émettent un fluide également translucide, très chaud et sont recouverts d'alvinelles. Sarradin *et al.* (1998) ont décrit les conditions chimiques et thermiques de l'environnement des communautés biologiques (*Riftia* et *Alvinella*) de la cheminée principale du site. La distribution et l'évolution des alvinellidés associées à ce site ont été étudiées par Didier Jollivet (Jollivet, 1993).

I-4-2-2/ Le champ hydrothermal Elsa (12°48'N, 103°56'W)

Le site Elsa est constitué de deux cheminées hydrothermales alignées dans l'axe N/S. Sa profondeur est d'environ 2 630 m. Les deux cheminées se caractérisent par l'émission d'un fluide translucide et des émissions diffuses. La plus grande cheminée est couverte d'*Alvinella* et de *Paralvinella*, alors que la deuxième est couverte uniquement de *Riftia pachyptila*. De nombreuses galathées sont présentes autour de ce champ. Deux autres cheminées couvertes de *Riftia* se situent également à l'ouest des deux précédentes.

I-4-3 : Le segment 9°N

Le segment nommé 9°N (Figure I-5) de la dorsale du Pacifique oriental est compris entre 9°45'N et 9°52'N de latitude et 104°17'W et 104°18'W de longitude (Shank *et al.*, 1998). C'est la zone la plus étudiée par les scientifiques américains (1 à 2 campagnes par an sur cette zone). Les sites hydrothermaux présents sur ce segment ont été observés en avril 1991 juste après une éruption volcanique. Cette nouvelle éruption a permis d'étudier l'évolution des communautés animales sur une période de 4 ans (Shank *et al.*, 1998).

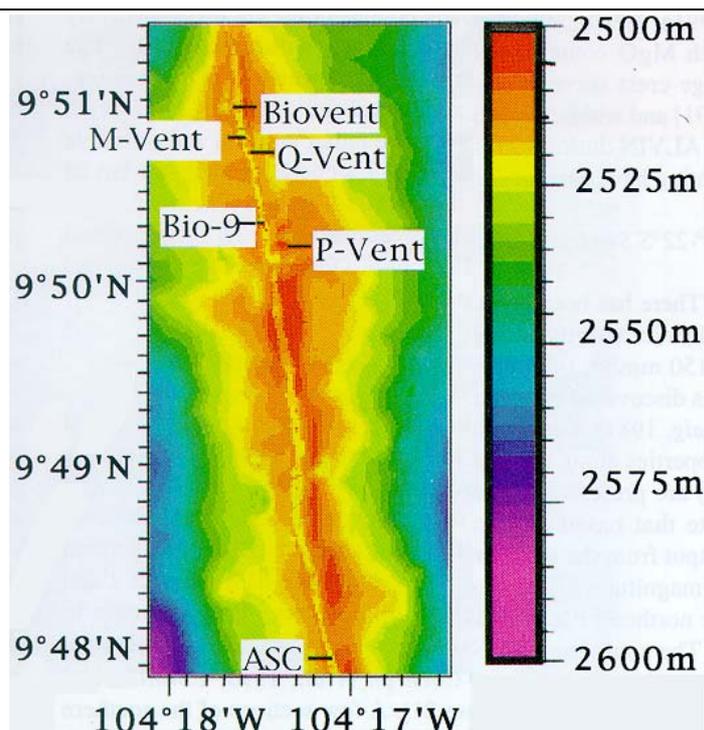


Figure I-5: Carte de localisation des sites sur le segment 9°N.

I-4-2-1/ Le champ hydrothermal M-Vent (9°50'79N, 104°17'59W)

Le nom M-Vent provient de la géographie de ce champ hydrothermal : trois cheminées alignées en haut d'un mur orienté dans le sens NO/SE, avec la plus petite située au milieu. Ces cheminées émettent un fluide translucide, chaud et sont couvertes d'alvinelles. Quelques *Riftia* sont observés à la base de l'une des cheminées, en une sorte de coulée vers le bas du graben.

I-4-2-2/ Le champ hydrothermal Bio-Vent (9°50'96N, 104°17'66W)

Le site BioVent est relativement étendu et possède plusieurs petites cheminées qui émettent un fluide translucide. De nombreuses zones de diffusion sont présentes. Le champ BioVent se caractérise par l'abondance de modioles, parmi lesquelles se développent quelques individus de *Riftia pachyptila*, au niveau des zones de diffusion. En revanche, loin des émissions, seules les modioles et quelques *clams* se développent. Les prédateurs, crabes *Bythograea thermydron* et poissons *Thermarces sp.* sont présents à tous les niveaux.

Les quatre sites des segments 13°N et 9°N de la dorsale du Pacifique oriental étant

décrits, nous allons maintenant présenter la dorsale médio-Atlantique, en nous intéressant au contexte géologique, à la faune associée, et à trois champs hydrothermaux du point triple des Açores (ATJ = Azores triple Junction).

I-5/ La dorsale médio-Atlantique (MAR)

La dorsale médio-Atlantique a été la première dorsale explorée par submersible lors du programme franco-américain FAMOUS en 1974. Cependant, à cette époque, aucun signe d'activité hydrothermale n'a été détecté à l'exception de quelques traces de sédiments hydrothermaux anciens. C'est en 1986 que les Américains ont découvert les premiers sites hydrothermaux associés à cette dorsale à faible taux d'expansion (environ 2,5 cm par an) (Rona *et al.*, 1986 ; Murton *et al.*, 1994). Depuis lors, de nombreux autres sites ont été découverts tout le long de la dorsale par des équipes françaises, américaines, anglaises, russes et japonaises (Figure I-6).

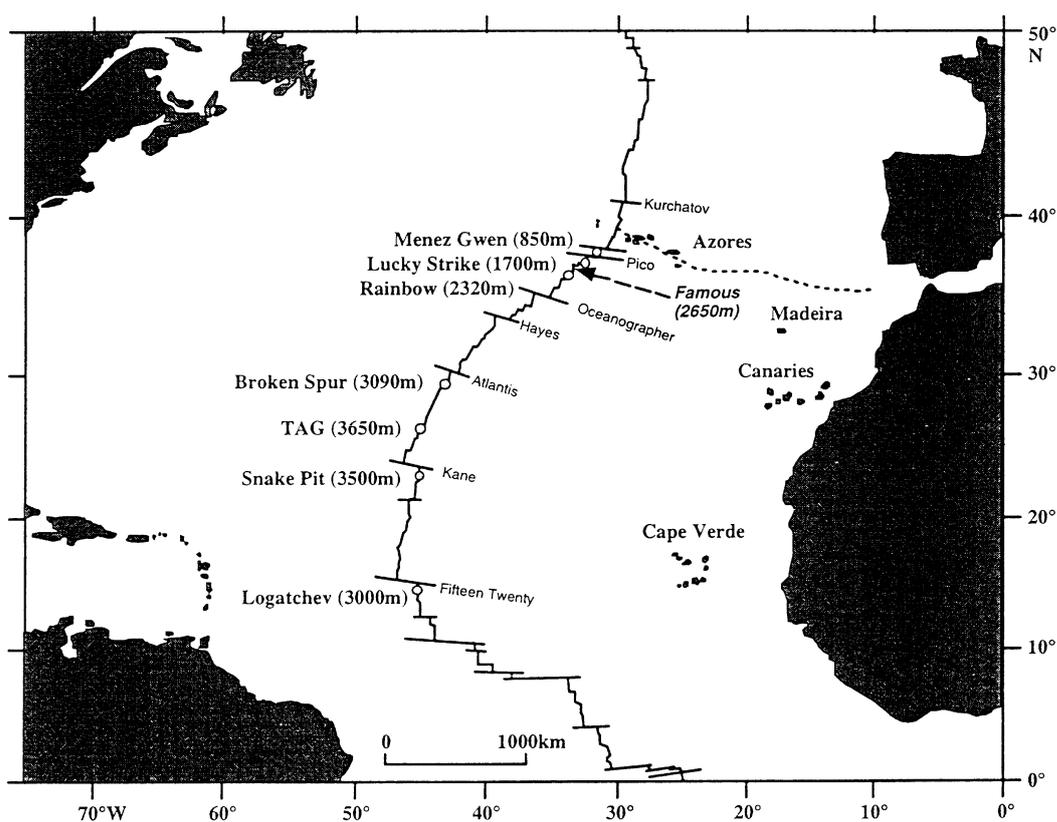


Figure I-6: Distribution des champs hydrothermaux et des failles transformantes le long de la ride médio-Atlantique.

Les zones actives se situent au sein des segments de la dorsale séparés par de

nombreuses failles transformantes qui induisent un décalage de l'axe de la dorsale pouvant atteindre plusieurs centaines de kilomètres (Sempéré *et al.*, 1990). Cette importante segmentation constitue l'un des facteurs de contrôle de la distribution des zones actives, en association avec les processus volcaniques (German *et al.*, 1996). German et Parson (1998) ont estimé la fréquence des événements à au moins un site tous les 110 km entre 12° et 26°N et à un site tous les 25-30 km le long de l'axe entre 36 et 38°N. Ces estimations de la distance moyenne entre deux champs hydrothermaux (25-110 km) sont similaires à celles effectuées par Chevalloné *et al.* (1997) pour deux régions de la ride ouest Pacifique (7-14°N et 13°30'-23°33'S). Cependant, la distribution des sites est différente entre l'EPR et la MAR puisqu'ils sont moins nombreux mais de plus grande taille et plus stables dans le temps au niveau de la MAR (Cann *et al.*, 1994). Les estimations de la fréquence des sites sont basées sur des anomalies majeures d'éléments traces et ne tiennent pas compte des phénomènes de petite taille comme les diffuseurs à faible température. En fait, certains champs hydrothermaux manifestes (e.g. Menez Gwen) sont situés dans des zones sans signal hydrothermal significatif dans la colonne d'eau à cause de la composition spéciale du fluide rencontré, riche en méthane (Desbruyères *et al.*, sous presse).

Le premier site découvert, en 1985, est le site TAG (Trans-Atlantic Geotraverse) à 26°08'N et 44°49'W et 3 630 m de profondeur (Rona *et al.*, 1986). Ce site ancien présente une activité géologique intermittente qui s'est manifestée depuis plus de 120 000 ans (Lalou *et al.*, 1993b), les fumeurs actuellement actifs s'étant formés il y a 40 à 50 000 ans.

A 307 km plus au sud, un nouveau site, Snake-Pit ou MARK (Mid-Atlantic Ridge Kane) (23°22'N et 44°57'W, 3 500 mètres de profondeur) a été découvert un an plus tard. Site plus récent de 4 000 ans avec des fumeurs noirs actifs âgés d'environ 12 ans (Lalou *et al.*, 1990), il est séparé du site TAG par la zone de fracture Kane. La composition géochimique du fluide de ces deux sites est similaire à celle des fluides émis au niveau de la ride du Pacifique oriental (Campbell *et al.*, 1988).

Depuis ces premières découvertes, de nombreuses missions ont permis de découvrir les sites suivants :

- Lucky Strike (37°18'N 32°16'W, 1 700 m de profondeur) en 1992 (Langmuir *et al.*, 1993) ;
- Broken Spur (29°10'N 43°10'W, 3 300 m de profondeur) en juin 1993 (Murton *et al.*,

1995) ;

- Logatchev (14°45'N 44°58'W, 3 100 m de profondeur) en 1994 (Batuyev *et al.*, 1994) ;
- Menez Gwen (37°50'N 31°31'W, 850 m de profondeur) en 1994 (Fouquet *et al.*, 1994) ;
- Rainbow (36°13'N 33°54'W, 2 300 m de profondeur) en 1997, durant la campagne FLORES ;
- Saldanha (FAMOUS) (36°33'N, 33°28'W, 2 650 m de profondeur) fut découvert en 1998 durant la campagne SALDANHA et n'a été exploré que superficiellement. Il ne présente qu'une diffusion faible dont l'impact sur l'écosystème est confus avec la présence d'une faune bathyale non spécialisée.

Les zones situées au sud de 14°N et au nord de 38°N sont inconnues à l'exception des sites à faible profondeur, localisés à proximité de l'Islande. Sur la dorsale de Reykjanes, au sud de l'Islande, le site de Steinahóll (63°06'N) a été découvert en 1993 (German *et al.*, 1993) par 250–350 m de profondeur. Au nord de l'Islande, un site, Kolbeinsey (67°05'N 18°42'W) a également été découvert, en 1987, sur la dorsale de Jan Mayen entre 100 et 106 m de profondeur (Fricke *et al.*, 1989).

I-5-1 : La faune associée à la ride médio-Atlantique

Les communautés animales observées autour des sources hydrothermales profondes de la ride médio-Atlantique sont dominées :

- soit par des bivalves Mytilidae du genre *Bathymodiolus* (*B. azoricus* au niveau du point triple des Açores et *B. puteoserpentis* au niveau des sites plus au sud (Von Cosel *et al.*, 1999),
- soit par des essaims très denses de crevettes Alvinocarididae (*Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* et *Mirocaris fortunata*).

Les deux taxons dominants sont associés à des bactéries :

- *Bathymodiolus* est un animal sessile contenant comme endosymbiontes des bactéries méthanotrophes et chimio-autotrophes sulfo-oxydantes (Cavanaugh *et al.*, 1992 ; Fiala-Médioni *et al.*, 1996). Même ancrées par un byssus, les modioles sont capables de migrer le

long d'un gradient de sulfures (Paul Dando, communication personnelle). Malgré ses symbiotes, *Bathymodiolus spp.* se comporte encore comme un organisme filtreur nécessitant un flux constant d'eau.

- *Rimicaris exoculata* est une espèce nageuse pour qui la source de nourriture est encore débattue (Segonzac *et al.*, 1993 ; Polz *et al.*, 1998 ; Rieley *et al.*, 1999), peut être en relation avec les bactéries épibiontes vivant dans leur chambre branchiale et dans leur microflore intestinale. *Rimicaris* pourrait également brouter les bactéries présentes sur le substrat.

Un cline à partir de peuplements dominés par *Rimicaris* jusqu'aux peuplements dominés par *Bathymodiolus* a été mis en évidence par Daniel Desbruyères (Desbruyères *et al.*, 2000) apparaît lorsqu'on met en relation toutes les variations existant dans les communautés hydrothermales de la MAR. La figure I-7 montre le passage d'un type de peuplement à l'autre. Les populations hydrothermales connues sont comprises entre les assemblages de TAG et de Menez Gwen avec une évolution progressive d'un type vers l'autre : TAG ↔ Snake Pit ↔ Rainbow ↔ Broken Spur ↔ Logatchev ↔ Lucky Strike ↔ Menez Gwen. En comparaison des autres sites, Broken Spur apparaît beaucoup plus pauvre en terme d'abondance des animaux.

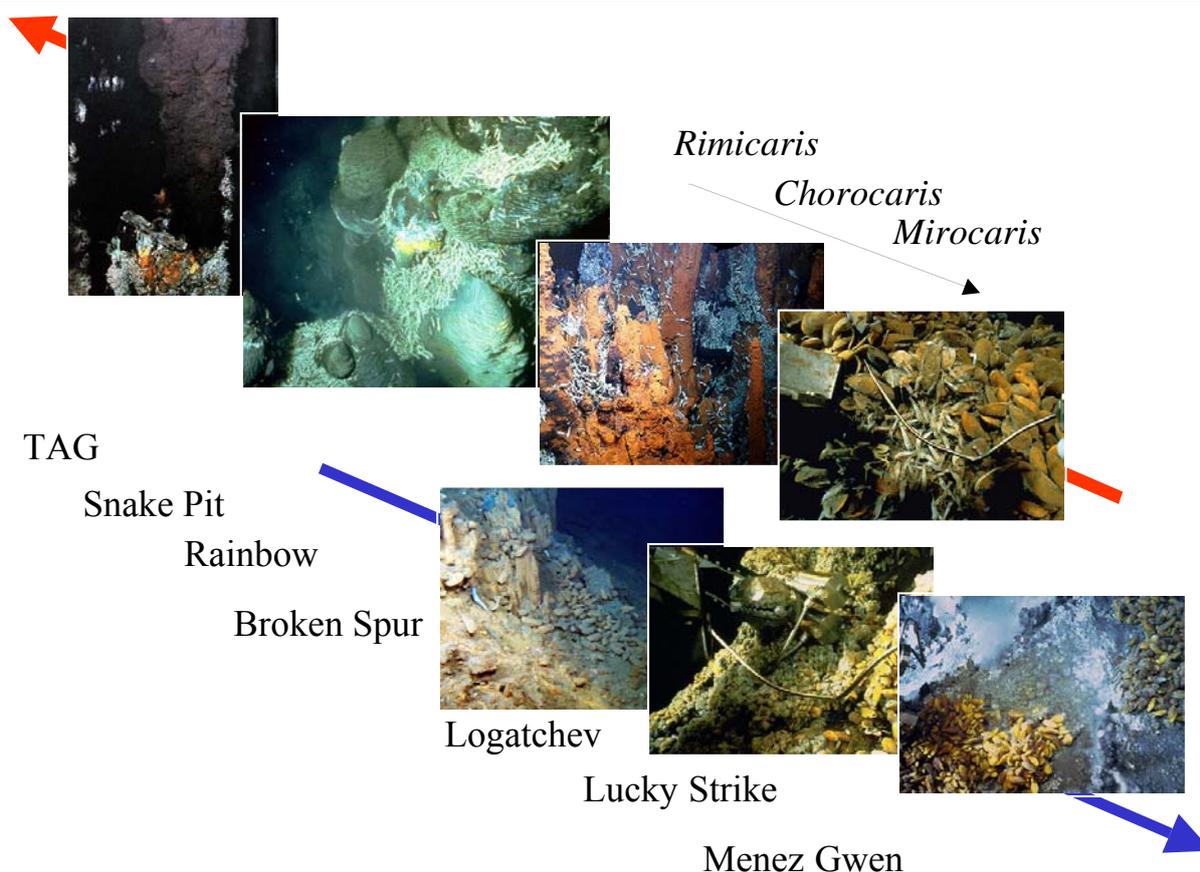


Figure I-7 : Cline des communautés animales des sources hydrothermales de la ride médio-Atlantique. Réalisé par Daniel Desbruyères.

Le cline entre les deux peuplements ne peut pas être relié aux distances géographiques, ni à une zonation bathymétrique évidente. Toutefois, on observe une relation entre l'environnement chimique et les caractéristiques des peuplements. En effet, une forte teneur en métaux et une chlorinité élevée du fluide sont associées aux communautés dominées par *Rimicaris* alors que de faibles teneurs correspondent aux communautés dominées par *Bathymodiolus*. Par ailleurs, en considérant les données de flux de particules minérales, obtenues sur quatre sites hydrothermaux, on constate que les peuplements dominés par *Rimicaris* sont caractéristiques de flux de particules minérales élevés alors que les communautés dominées par *Bathymodiolus* sont caractéristiques de fluides appauvris en particules minérales (Desbruyères *et al.*, 2001). La très forte production de particules minérales aux sites TAG et Rainbow pourrait affecter la filtration des moules.

La faune hydrothermale comprend aussi le crustacé décapode Bythograeidae *Segonzacia mesatlantica*, espèce carnivore et nécrophage, et les poissons *Pachycara thermophilum* (Zoarcidae) (Geistdoerfer, 1994), *Ilyophis saldanhai* (Synphobranchidae)

(Karmovskaya et Parin, 1999) et *Pachycara sp. nov.* (M. Biscoito, communication personnelle) ainsi que plusieurs espèces de gastéropodes dont un représentant du genre *Phymorhynchus*. Les échinodermes (ophiures et oursins) sont peu abondants. Plusieurs espèces de poissons (Chimaeridae, Bythitidae) des zones abyssales non hydrothermales sont présentes sur les sites et se nourrissent de crevettes et de mollusques (Saldanha, 1994). Mis à part les poissons, la faune périphérique est peu développée, ce qui rend la limite de la zone active très abrupte. Elle comporte des espèces de céphalopodes, cnidaires et spongiaires.

Soixante-sept espèces endémiques aux sources hydrothermales ont été décrites au niveau de la ride médio-Atlantique. Cent cinq espèces, appelées espèces pénétrantes, communes à l'environnement profond, ont également été observées sur les sites hydrothermaux. Au niveau des sites les plus profonds, ce sont les espèces endémiques des sources hydrothermales qui dominent alors que dans les sites les moins profonds ce sont les espèces pénétrantes (Figure I-8). Au niveau de Menez Gwen, les espèces hydrothermales ne représentent plus que 28 % de la communauté animale (Desbruyères *et al.*, 2000).

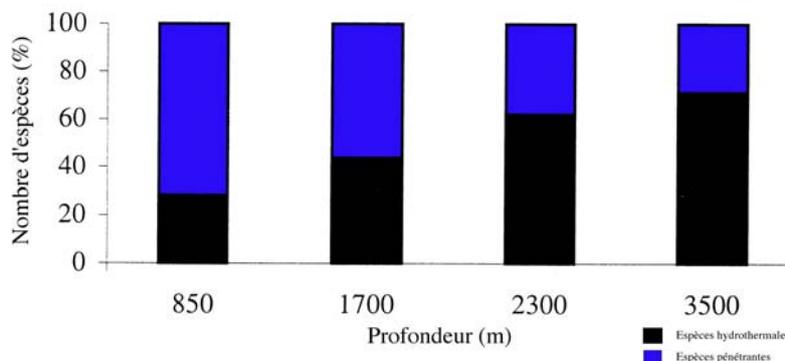


Figure I-8: Nombres relatifs d'espèces hydrothermales et d'espèces pénétrantes en fonction de la profondeur dans les zones soumises à l'activité hydrothermale (d'après Desbruyères *et al.*, 2000).

I-5-2 : Le point triple des Açores (ATJ)

Depuis 1993, l'ATJ est devenue une des zones les plus étudiées de l'océan mondial. Sur une période de quatre ans, dans le cadre du programme européen MAST3-AMORES, 52 plongées avec le submersible français Nautilus ainsi que plusieurs plongées des ROV Jason et Victor ont eu lieu au point triple des Açores. Les Américains, avec le submersible Alvin, ont également plongé sur cette zone. Le programme MOMAR (MONitoring on the Mid-Atlantic

Ridge), initié depuis 1998, a pour objectif de promouvoir une coopération internationale pour établir un suivi multidisciplinaire à long terme de la ride médio-Atlantique, avec une attention toute particulière pour la région des Açores.

Au niveau de l'ATJ, plus on s'approche du plateau des Açores, c'est-à-dire du point chaud, plus la profondeur diminue. Elle passe d'environ 2 400 m (Rainbow) à 1 700 m (Lucky Strike) puis à 850 m (Menez Gwen). Cette variation de profondeur induit un changement progressif de la pression et, par conséquent, des propriétés du fluide dues à la séparation de phase (Figure I-9) (Fouquet *et al.*, soumis). La composition chimique des fluides dépend des conditions de température et de pression rencontrées sur son trajet, mais aussi de la nature de la roche traversée (Figure I-10) (Fouquet *et al.*, soumis). Les émissions de fluide à travers des roches ultrabasiqes (péridotites serpentinisées) (Rainbow, Logatchev) se distinguent de celles qui traversent des roches basaltiques (Lucky Strike, Menez Gwen) par un enrichissement important en méthane dû à la serpentinisation et de hautes teneurs en métaux (fer, cuivre et manganèse) (Desbruyères *et al.*, 2000). Seulement trois segments, Rainbow, Lucky Strike et Menez Gwen, présentent une activité hydrothermale intense au niveau de la zone ATJ.

Figure I-9: Séparation de phases en fonction de la température, de la pression hydrostatique et de la profondeur (d'après Fouquet *et al.*, Soumis)

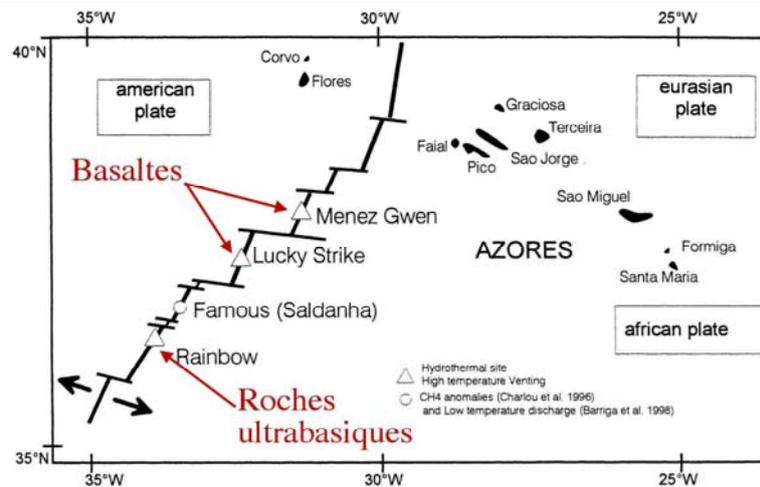


Figure I-10: Nature des roches du plancher océanique au niveau du point triple des Açores (d'après Fouquet *et al.*, Soumis).

I-5-2-1/ Le champ hydrothermal Rainbow (36°13,44'N, 33°54,10'W)

Le champ hydrothermal Rainbow est situé dans le sud de la discontinuité axiale du segment AMAR (Figure I-11). C'est le champ le plus profond de la zone ATJ, sa profondeur variant entre 2 270 et 2 320 m. Sa zone active couvre une surface de 250 m sur 60 m (Fouquet, 1997) et est localisée à l'intersection de la dorsale et d'une faille non-transformante. Les affleurements sont constitués de roches ultrabasiques et seule une veine basaltique, située à un kilomètre à l'est du champ, a été observée. Cet environnement de roches ultrabasiques et le processus de séparation de phase provoquent un enrichissement des dépôts en cuivre et en zinc, une chlorinité élevée ($>750 \text{ mmol.kg}^{-1}$), des émissions de fluide chaud (360°C), associées à un faible pH (<3) et de hautes teneurs en gaz (CH_4 jusqu'à $2,2 \text{ mmol.kg}^{-1}$). En revanche, ces fluides présentent une faible teneur en sulfures ($<2,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$). Trente sites actifs ont été observés dans la zone explorée. Ils présentent une grande variabilité morphologique, avec de petits fumeurs noirs très actifs (jusqu'à un mètre de hauteur) et d'autres très développés avec plusieurs cheminées (jusqu'à 8 mètres de hauteur), accompagnés de fumeurs en forme de ruche et de diffuseurs (Desbruyères *et al.*, 2001).

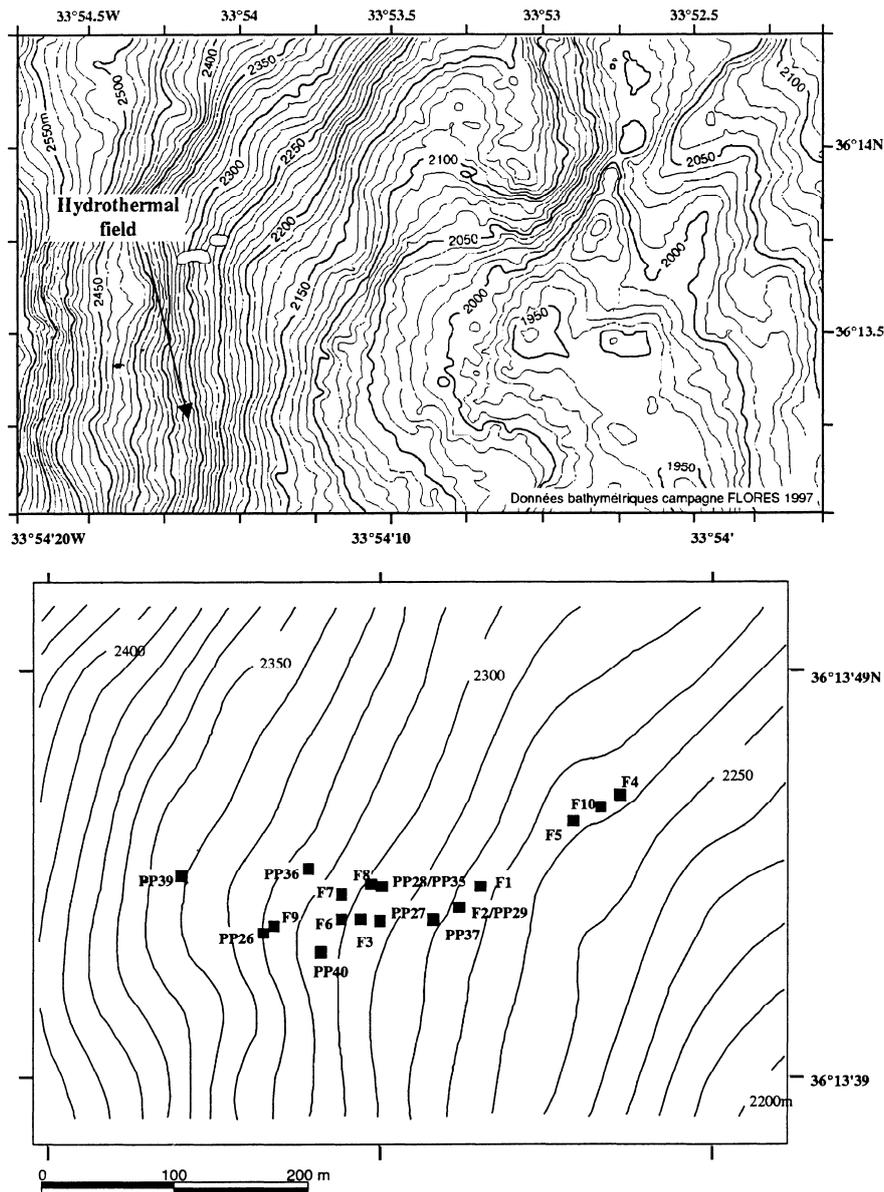


Figure I-11 : Localisation du champ hydrothermal Rainbow (en haut) et des sites actifs de ce champ hydrothermal (en bas) (Desbruyères *et al.*, 2001). Les lignes noires représentent des isobathes.

I-5-2-2/ Le champ hydrothermal Lucky Strike (37°17,29'N, 32°16,45'W)

Sur le segment Lucky Strike (37°N – 37°35'N), la vallée axiale est large (environ 15 km) et profonde (*ca.* 950 m). Au centre de la vallée, un volcan composite forme une hauteur topographique d'environ 400 m d'altitude et couvre une zone de 13 km de long et 7 km de large. Ce volcan est divisé en deux parties par une vallée axiale orientée N/S. La partie ouest est composée des 3 cônes volcaniques entourant un lac de lave d'environ 300 m de diamètre et présentant une lave très fraîche. Les sites actifs s'organisent autour de ce lac de lave (Figure

I-12) et forment le champ hydrothermal de Lucky Strike.

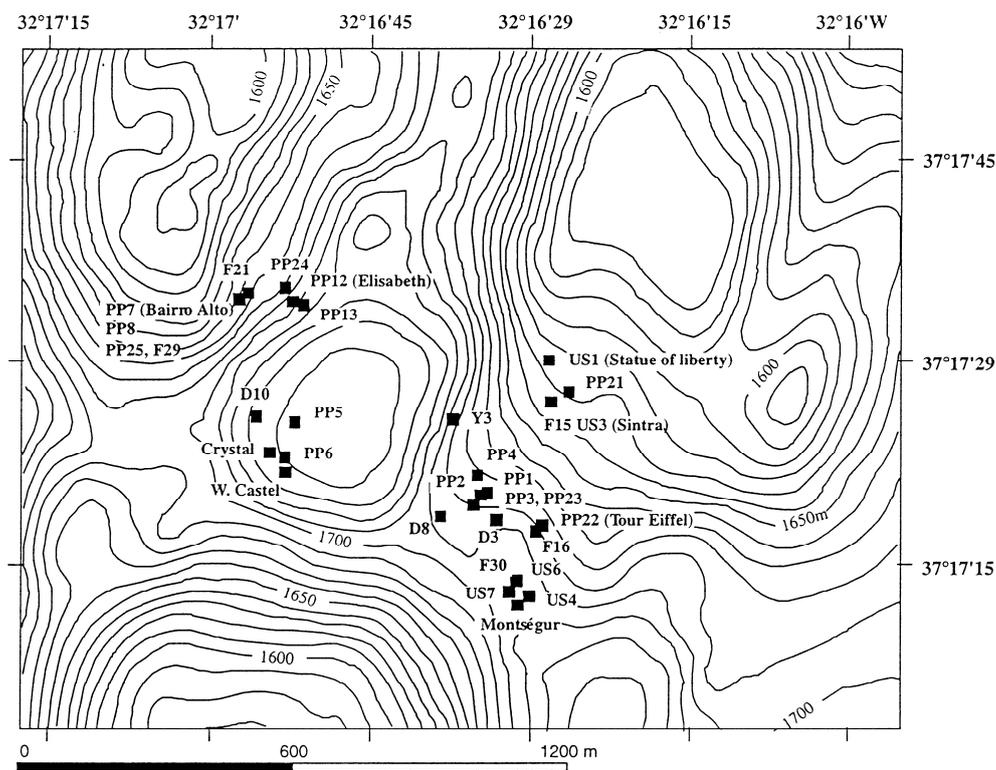


Figure I-12: Localisation du champ hydrothermal Lucky Strike (Desbruyères *et al.*, 2001). Les lignes noires représentent des isobathes.

Ce champ hydrothermal est l'un des plus grands connus dans l'océan. La profondeur relativement faible de ce champ (*ca.* 1 700 m) et le contrôle de l'activité hydrothermale par le lac de lave sont les caractéristiques majeures de ce site (Fouquet *et al.*, 1995 ; Charlou *et al.*, soumis). L'activité hydrothermale de Lucky Strike se manifeste à la fois sous la forme de cheminées individuelles permettant une émission très localisée d'un fluide à haute température (environ 300°C) et de zones de diffusion d'un fluide de faible température (Langmuir *et al.*, 1997). Sur certains sites, les édifices hydrothermaux présentent des surplombs piégeant le fluide (température proche de 200°C) (Figure I-13).

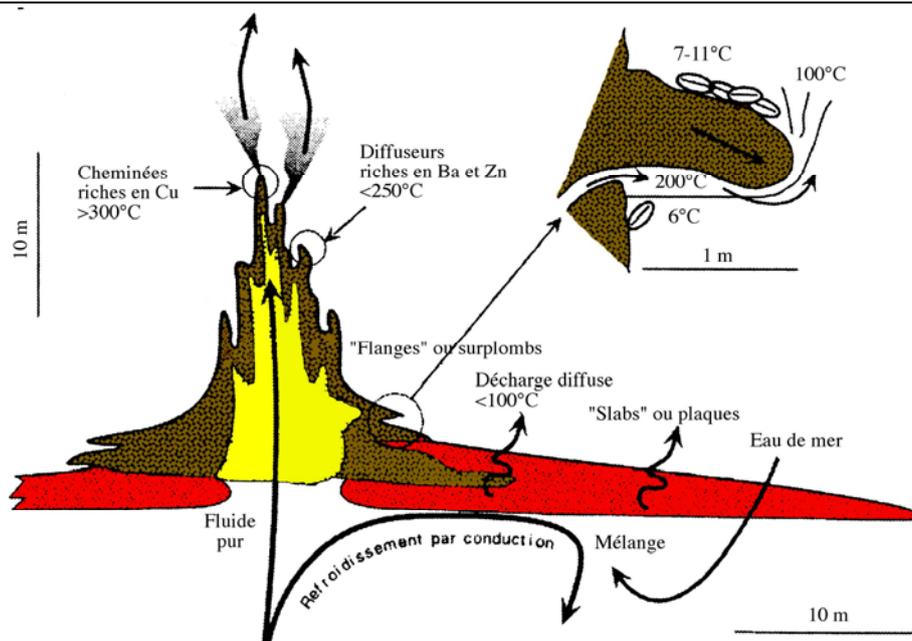


Figure I-13: Coupe schématique d'une cheminée hydrothermale montrant les différents types de structure observés (modifié d'après Desbruyères *et al.*, Sous presse ; Fouquet *et al.*, soumis).

La partie la plus active du champ se situe à l'est du lac de lave. Les sites actifs ont un diamètre de quelques dizaines de mètres et une hauteur pouvant atteindre 20 mètres. Les parties inactives sont formées par des dépôts massifs de sulfures de fer et de cuivre, et par un nouveau type de dépôt qualifié de « slab », très répandu à Lucky Strike. Les slabs se présentent sous forme de plaques disposées en couches de quelques centimètres d'épaisseur et sont interrompues de crevasses, par lesquelles diffuse un fluide présentant des températures inférieures à 100°C (Figure I-13).

Le fluide hydrothermal est caractérisé par des températures comprises entre 170°C et 324°C, de faibles teneurs en métaux (notamment fer et manganèse) et en sulfures ($< 3 \text{ mmol.kg}^{-1}$), une chlorinité similaire à l'eau de mer, et de fortes teneurs en gaz telles que le dioxyde de carbone et le méthane (la concentration en CH_4 peut atteindre $0,85 \text{ mmol.kg}^{-1}$) (Langmuir *et al.*, 1997). Le méthane est issu d'un dégazage du manteau et du processus de serpentinisation. La composition de ces fluides semble résulter du processus de séparation de phase, du fait de la faible profondeur (Figure I-9). Les caractéristiques précises du fluide (température, salinité et concentrations en gaz) varient d'un site à l'autre à l'intérieur du champ.

I-5-2-3/ Le champ hydrothermal Menez Gwen (37°51,60'N, 31°31,30'W)

Le champ hydrothermal Menez Gwen (Figure I-14) est situé dans un segment volcanique entre 37°35'N et 38°N, juste au nord du segment Lucky Strike. Le système principal est formé par un jeune volcan de 700 m de hauteur et de 17 km de diamètre. Une vallée axiale de 2 kilomètres de largeur divise son sommet. Plusieurs sites actifs ont été localisés dans les pentes Sud-Est, Est et Nord d'un petit volcan situé dans la partie nord, en bas du graben (Figure 1-14). Les cheminées, peu nombreuses et de petite taille (moins de 5 m de haut), émettent un fluide chaud (température maximale de 300°C) et translucide, dû à la faible teneur en particules. Une émission diffuse est également observée à la base des cheminées. De nombreux dépôts de baryte, d'anhydrite et de silice sont observés sur les cheminées actives. Le fluide émis présente une faible concentration en H₂S (1,8 mmol.kg⁻¹) et une chlorinité (360-380 mmol.kg⁻¹) plus basse qu'à Lucky Strike. De la même façon que tous les autres sites de la zone ATJ, le fluide est enrichi en gaz (CH₄ jusqu'à 2,2 mmol.kg⁻¹) mais est peu enrichi en métaux, comme une conséquence de la faible pression hydrostatique (Charlou *et al.*, soumis). Le site Menez Gwen *sensu stricto* est le plus important site de la zone (marqueurs D9, PP11 et F12; Figure 1-14). Il est situé sur un escarpement de la pente du volcan, entre 842 et 860 m de profondeur et est bordé dans sa partie supérieure par un champ de lave en coussin et latéralement par des roches effondrées. Des dépôts de baryte et d'anhydrite, à travers lesquels diffuse un fluide réfringent de 10-40°C, occupent le centre du site. Une cheminée active, située au nord-est de l'escarpement, crache un fluide à 277°C. Comme pour Lucky Strike, l'activité hydrothermale est contrôlée par un lac de lave (Fouquet *et al.*, 1995 ; Desbruyères *et al.*, sous presse).

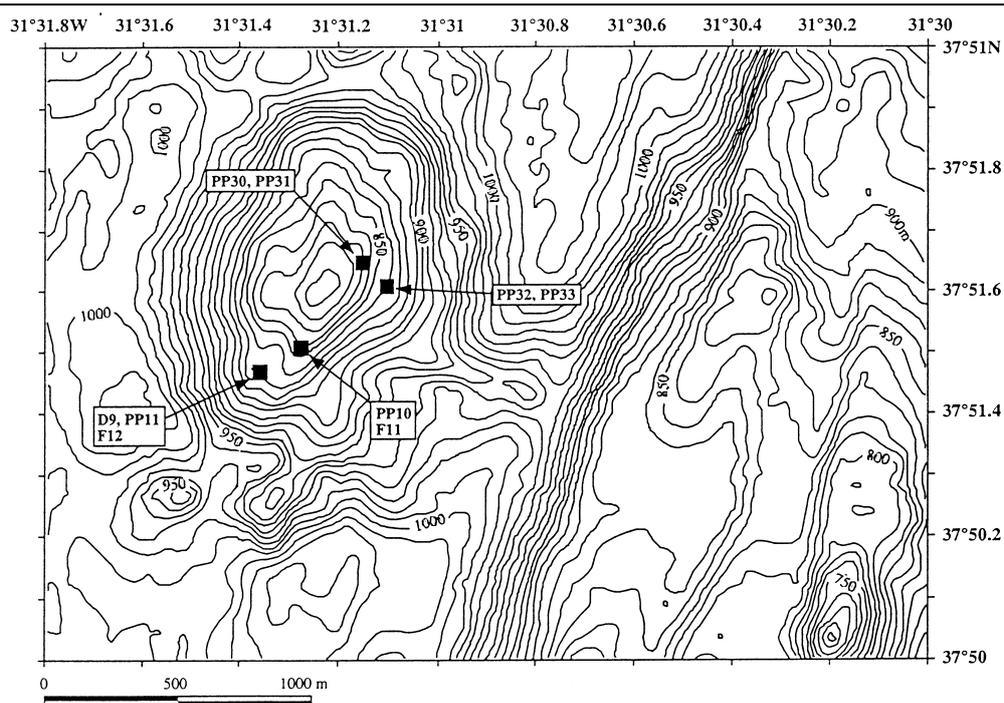


Figure I-14: Carte de localisation du site hydrothermal Menez Gwen (Desbruyères *et al.*, 2001). Les lignes noires représentent des isobathes.

I-5-2-4/ La faune associée au niveau de l'ATJ

Daniel Desbruyères et collaborateurs (sous presse) ont réalisé une synthèse de la faune associée au niveau de la zone du point triple des Açores. La faune hydrothermale est dominée par de grands bancs de moules *Bathymodiolus azoricus*, ainsi que par trois espèces de crevettes caridées : *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* et *Mirocaris fortunata*. Un polychète polynoidé est présent dans la cavité palléale des moules, avec un taux d'infestation variable d'un site à l'autre. Le crabe Bythograeidae *Segonzacia mesatlantica* représente le carnivore/détritivore le plus fréquent. Le nombre d'espèces décrites augmente au cours du temps avec l'étude de nouveaux sites actifs. Actuellement, 32 espèces ont été décrites à Rainbow, 67 à Lucky Strike et 37 à Menez Gwen. Le taux d'endémisme au niveau de la ride médio-Atlantique (28 – 72%) augmente avec la profondeur (Figure I-8). Au niveau de sites moins profonds, les espèces bathyales pénètrent au niveau des sites actifs, probablement pour se nourrir des organismes hydrothermaux. C'est le cas du crabe Geryonidae *Chaceon affinis* qui vient parfois se nourrir des moules situées en périphérie du site Menez Gwen (Colaço *et al.*, 1998 ; Biscoito et Saldanha, 2000). A Lucky Strike, ce sont deux espèces de poissons, la chimère, *Hydrolagus affinis*, et le Bythidae *Cataetix laticeps* (Saldanha et Biscoito, 1997 ; Marques et Porteiro, 1998) qui viennent se nourrir d'animaux hydrothermaux.

I-6/ Les modèles biologiques

L'étude s'est appuyée sur les crustacés décapodes afin de comprendre leur physiologie respiratoire en relation avec l'environnement hydrothermal et de comparer ces adaptations avec celles des crustacés littoraux. Sept espèces, quatre brachyours et trois caridés, ont été étudiées au niveau des deux dorsales.

I-6-1 : *Bythograea thermydron* (EPR)



Figure I-15 : *Bythograea thermydron* observé sur les alvinelles, sur le site ELSA (13°N, EPR). Photo réalisée durant la campagne HOPE'99. Le crabe mesure environ 6 cm de largeur céphalothoracique (mesuré avec un pied à coulisse au niveau de l'élargissement maximum)

Bythograea thermydron Williams, 1980 (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Bythograeoidea : Bythograeidae) est endémique des sources hydrothermales de l'EPR et de la ride des Galápagos. Ce fut le premier crabe observé sur les sources hydrothermales. Il est présent sur les sites visités entre 21°N et 18°17'S. De couleur blanche, avec une largeur céphalothoracique pouvant atteindre 8 cm, il est le plus souvent observé parmi les tubes de *Riftia* et les modioles. Prédateur et détritivore, à régime alimentaire opportuniste, il est facile à récolter au moyen de nasses appâtées.

I-6-2 : *Cyanagraea praedator* (EPR)



Figure I-16 : *Cyanagraea praedator* prélevé au site M-Vent (9°N, EPR) lors de la campagne HOPE'99. Ce spécimen mesure environ 10 cm de largeur céphalothoracique (mesuré avec un pied à coulisse au niveau de l'élargissement maximum).

Cyanagraea praedator de Saint Laurent, 1984 (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Bythograeoidea : Bythograeidae) est endémique des sources hydrothermales de l'EPR, entre 21°N et 19°S, mais absent de la ride des Galápagos. De taille relativement importante, avec une largeur céphalothoracique pouvant atteindre 15 cm, il est le plus souvent observé sur les parois de « fumeurs noirs », parmi les alvinelles qui constituent une partie de son régime alimentaire (Desbruyères et Segonzac, 1997). Malgré sa taille importante, ce crabe est très difficile à attraper car il ne vient pas dans les nasses. La ventouse est le seul moyen de le capturer en bon état, la pince du Nautilé risquant de l'abîmer.

I-6-3 : *Segonzacia mesatlantica* (MAR)

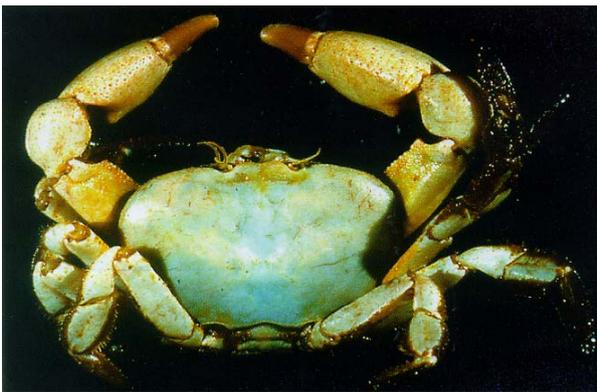


Figure I-17 : *Segonzacia mesatlantica* photographié au laboratoire. Il mesure environ 4 cm de largeur céphalothoracique (mesuré avec un pied à coulisse au niveau de l'élargissement maximum).

Segonzacia mesatlantica (Williams, 1988) (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Bythograeoidea : Bythograeidae) est endémique des sources hydrothermales de la MAR. Il présente une grande distribution géographique, puisqu'il est observé sur tous les sites connus de la MAR et ce, quelle que soit la profondeur du site. Ce crabe présente un régime alimentaire varié, même si les modioles participent moins à son régime que les crevettes (Ana

Colaço, communication personnelle). Du fait de leur nécrophagie, ces crabes sont capturés très facilement par les nasses appâtées.

I-6-4 : *Rimicaris exoculata* (MAR)

Figure I-18 : Essaim de *Rimicaris exoculata*, photographié lors de la campagne PICO, au site Rainbow (ATJ, MAR). Les crevettes mesurent environ 5 cm de longueur.

Rimicaris exoculata Williams et Rona, 1986 (Crustacea, Decapoda, Caridea : Alvinocarididae) est endémique des sources hydrothermales de la MAR. Elle est observée sur la majorité des sites connus de la MAR, à l'exception des sites les moins profonds. Pouvant atteindre 80 mm de longueur, elle se caractérise par l'absence d'œil pédonculé remplacé par un organe dorsal, et par une hypertrophie de la cavité branchiale associée à la présence de bactéries sur les épipodites des pièces buccales. Ces bactéries, ainsi que celles situées à l'intérieur du tube digestif, pourraient servir de base à leur régime alimentaire, mais cette hypothèse est encore sujet à débat (Segonzac *et al.*, 1993; Polz *et al.*, 1998 ; Rieley *et al.*, 1999). Les individus sont grégaires et forment des essaims très denses (jusqu'à 2 500 indiv./m²). Ces animaux sont généralement capturés à l'aide de l'aspirateur à faune (voir ci-dessous).

I-6-5 : *Chorocaris chacei* (MAR)

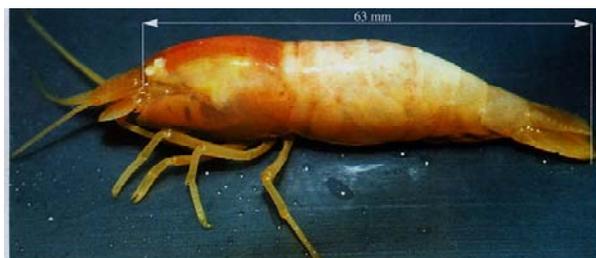


Figure I-19 : Spécimen de *Chorocaris chacei* photographié au laboratoire. Il mesure 6 cm environ de longueur.

Chorocaris chacei (Crustacea Decapoda Caridea Alvinocarididae) (Williams et Rona, 1986) est endémique des sources hydrothermales de la MAR et est observée sur la majorité des sites connus. Cette espèce présente une réduction de ses pédoncules oculaires. Il n'y a pas de formation d'essaims comme chez *Rimicaris*, mais seulement de petits groupes atteignant une densité de 6 à 10 indiv./m². Elles peuvent atteindre 75 mm de longueur. Elles sont également capturées à l'aide de l'aspirateur à faune.

I-6-6 : *Mirocaris fortunata* (MAR)



Figure I-20 : *Mirocaris fortunata*. Cet individu mesure environ 2 cm de longueur.

Mirocaris fortunata (Martin et Christiansen, 1995) (Crustacea Decapoda Caridea Mirocarididae) est endémique des sources hydrothermales de la MAR. Longue d'environ 20 à 30 mm, elle présente une réduction de ses pédoncules oculaires, comme les deux autres espèces de crevettes hydrothermales. *Mirocaris* vit à proximité des ouvertures des cheminées ou au niveau des émissions de fluide au travers des crevasses, non loin de modioles *Bathymodiolus*. Elle est présente avec des densités beaucoup moins importantes que *Rimicaris*. Sa capture s'effectue également à l'aide de l'aspirateur à faune.

I-6-7 : *Chaceon affinis* (MAR)



Figure I-21 : *Chaceon affinis* observé lors de la campagne MARVEL, à proximité du site de Menez Gwen (ATJ, MAR). Cet individu mesure environ 12 cm de largeur céphalothoracique (mesuré avec un pied à coulisse au niveau de l'élargissement maximum).

Chaceon affinis Milne Edwards et Bouvier, 1894 (Crustacea Decapoda Brachyura Portunidea Geryonidae) est une espèce bathyale commune de l'Atlantique. Elle est observée de l'Islande jusqu'au Cap Vert, y compris les Açores, Madère et les Canaries, à une profondeur comprise entre 130 et 2 050 m, le plus fréquemment entre 600 et 1 000 m. Ce crabe atteint jusqu'à 25 cm de largeur céphalothoracique. Cette espèce benthique se trouve aussi bien sur des substrats durs que sur des substrats meubles, dans la partie supérieure du plateau continental. Il a été observé lors de la campagne MARVEL à proximité du site hydrothermal Menez Gwen et occasionnellement sur ce site).

I-7/ Engins et appareils de prélèvements

L'étude de cet écosystème nécessite l'utilisation de moyens lourds d'observations et de prélèvements mis en œuvre à partir de navires océanographiques. La majeure partie de la flotte océanographique hauturière civile française est gérée par IFREMER, dont l'armateur est GENAVIR.

I-7-1 : Les navires océanographiques, Nadir et L'Atalante

Le navire océanographique **Nadir** (Figure I-22A), construit en 1974, a une longueur hors-tout de 55,75 m, une largeur hors-tout de 11,91 m et un tirant d'eau arrière de 4,68 m. Faiblement équipé en laboratoires, il est essentiellement utilisé pour la mise en œuvre du Nautil, de la sismique multitrace et du système SAR/Pasisar. La vitesse moyenne d'exploitation en transit et en campagne est de 10 nœuds. Vingt-cinq scientifiques ou opérateurs au maximum peuvent être embarqués. Deux laboratoires « humides » sous hangar

composent l'espace laboratoire à bord. Deux emplacements pour des conteneurs laboratoires ou ateliers type 20 pieds sont prévus à l'arrière bâbord et tribord.

L'Atalante (Figure I-22B) est un navire océanographique pluridisciplinaire, qui a été construit en 1989. Il mesure 84,60 m de longueur hors-tout, 15,85 m de largeur hors-tout et d'un tirant d'eau de 5,1 m. La vitesse moyenne d'exploitation en transit et en campagne est de 11 nœuds. Trente scientifiques ou opérateurs peuvent être embarqués. Ce navire est équipé de nombreux appareils scientifiques et de 8 laboratoires d'une superficie totale d'environ 130 m² dont un laboratoire humide, propre et réfrigéré. Huit conteneurs équivalents 20 pieds peuvent également être embarqués. L'Atalante a subi un carénage en 2000.

I-7-2 : Le submersible Nautille

Le submersible Nautille (Figure I-22C) permet l'observation directe, grâce à trois hublots à grand champ de vision associés à six projecteurs. Le Nautille se caractérise par une masse faible au regard de ses performances, ce qui lui permet d'être mis en œuvre à partir d'un navire-support de tonnage relativement réduit et de bénéficier d'une bonne manœuvrabilité. Il mesure 8 m de long, 2,70 m de large et 3,81 m de hauteur, pour une masse de 19,50 t. Il peut intervenir à 6 000 m de profondeur. La sphère habitée, en alliage titane, de 2,10 m de diamètre intérieur, permet à trois personnes (1 pilote, 1 co-pilote et 1 scientifique) de plonger. Cette sphère est équipée de trois hublots de 120 mm de diamètre chacun. Le sous-marin est pourvu d'un bras de préhension à 4 degrés de liberté, avec ouverture et fermeture d'une pince, d'un bras de manipulation à 6 degrés de liberté, avec ouverture et fermeture d'une pince, et d'un panier de prélèvement escamotable et isotherme, qui permettent les manipulations au fond et le prélèvement d'échantillons. Des prises de vue sont réalisées à l'aide des 2 caméras vidéo couleur 3-CCD et 2 caméras photo avec flash. Il a une autonomie de travail de 5 h sur le fond, avec une autonomie supplémentaire de sécurité de 120 h. Le Nautille est également équipé d'un sondeur d'altitude, d'un sondeur à sédiment, d'un sonar panoramique, de deux projecteurs 650 W à iode, de 5 projecteurs 400 W H.M.I. et d'une centrale d'acquisition des données et de navigation.

En 2000-2001, le Nautille va subir un grand carénage durant lequel il recevra, en particulier, une nouvelle propulsion, de nouveaux capteurs et il sera équipé d'un système d'acquisition de données et de navigation plus performant. Un effort important sera réalisé sur l'aspect imagerie par la mise en place d'une nouvelle caméra vidéo, d'un nouvel orientateur

de caméras et d'un nouveau flash.



Figure I-22 : Navires océanographiques (Nadir (A) et L'Atalante (B)) et submersible (Nautile) (C) utilisés lors des différentes campagnes sur les dorsales de l'Atlantique et du Pacifique.

I-7-3 : Les systèmes de prélèvements

Des nasses (Figure I-23A), de tailles et de formes différentes, ont été utilisées pour la capture des crabes *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis*. Il existe deux types de nasses :

- avec fermeture par le submersible, par une balle de tennis qui vient obturer l'entrée. Elles sont cylindriques avec comme dimension 60 x 28 cm,

- sans fermeture, avec une entrée conique. De forme parallélépipédique ou cylindrique, elles mesurent 40 x 20 x 20 cm.

Le diamètre de l'entrée des nasses est d'environ 6 cm. Elles sont appâtées

classiquement avec des fragments de bonites ou des broyats de moules hydrothermales.

La ventouse (Figure I-23B) est un système de prélèvement développé pour la récupération des assiettes du Titanic. Il a été utilisé, par la suite, pour le prélèvement des *Cyanagraea praedator*, qui sont des crabes de grande taille, non attirés par les nasses appâtées. Cette ventouse est placée sur l'extrémité de la canule d'aspiration de l'aspirateur.

L'aspirateur à faune (Figure I-23C) permet le prélèvement des crevettes. Il est constitué d'un tuyau de prélèvement, manipulé par le bras du submersible, et d'un barillet composé de 6 bouteilles permettant un prélèvement sélectif d'échantillons et d'une pompe d'aspiration.

L'ascenseur (Figure I-23D) est utilisé pour descendre ou remonter des appareils et/ou des échantillons.

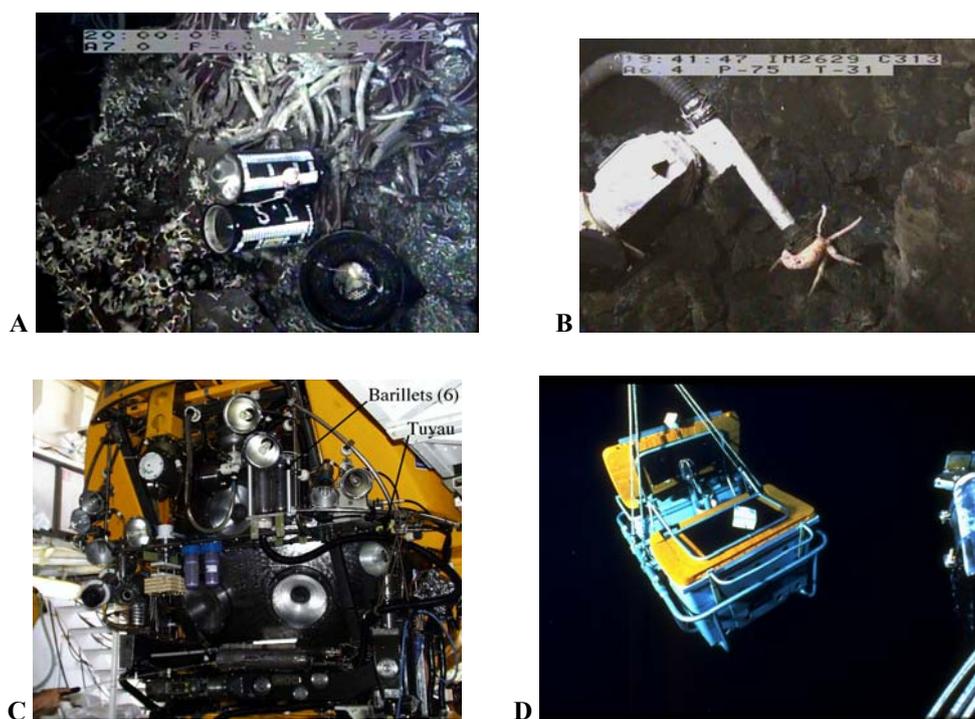


Figure I-23 : Appareils utilisés au fond pour le prélèvement des organismes. A : nasses ; B : ventouse ; C : aspirateur ; D : ascenseur.

I-8/ Les missions

Plusieurs missions océanographiques dans le Pacifique et dans l'Atlantique ont permis le prélèvement des échantillons biologiques utilisés durant mes travaux de thèse, ainsi que la

réalisation des bandes vidéo analysées pour la localisation des différentes espèces sur les cheminées hydrothermales.

I-8-1 : Missions sur la dorsale du Pacifique Oriental

Trois campagnes océanographiques : HOT'96, HOT'TIME97 et HOPE'99 ont permis la récupération d'échantillons.

La campagne **HOT'96** (Hydrothermalisme et Organismes Thermophiles) a eu lieu du 9 février au 23 mars 1996, à 9 et 13°N. Cette campagne, organisée dans le cadre de l'Unité de Recherches Marines 7 (IFREMER-CNRS-Université Paris 6), comportait deux navires : le N/O Nadir porteur du Nautille pour la partie française, et le R/V Wecoma navire laboratoire américain. Françoise Gaill et Horst Felbeck étaient les deux chefs de mission. L'objectif général de HOT'96 était d'analyser la diversité des stratégies qui permettent aux organismes de s'adapter à l'environnement hydrothermal et en particulier à celui des pôles les plus chauds. Les échantillons ont été prélevés par François Lallier (Station Biologique de Roscoff).

La campagne américaine **HOT'TIME97** a eu lieu du 24 novembre au 26 décembre 1997, à 9°N. Jim Childress, chef de mission, avait pour objectif la récolte d'échantillons biologiques. Les échantillons ont été prélevés par Franck Zal (Station Biologique de Roscoff).

La campagne **HOPE'99** (Hydrothermalisme Océanique : Physiologie et Ecologie) a eu lieu du 9 avril au 22 mai 1999, à 9 et 13°N (chef de mission François Lallier). Cette campagne, organisée par l'URM 7, s'articulait autour de deux parties, l'une axée sur l'écologie et la génétique des populations, l'autre sur la physiologie. La mission, à laquelle j'ai participé, s'est déroulée à bord du N/O L'Atalante, navire porteur du Nautille.

I-8-2 : Missions sur la ride médio -Atlantique

Les échantillons utilisés pour la réalisation de cette thèse ont été récoltés lors de deux campagnes océanographiques au point triple des Açores : MARVEL et PICO. Ces deux campagnes ont eu lieu dans le cadre du programme européen MAST3 AMORES (contrat CT MAS3 950040)

La campagne **MARVEL**, qui s'est déroulée du 13 août au 13 septembre 1997, avait pour objectifs d'une part l'étude de l'influence de la profondeur et des facteurs associés sur la biologie, la physiologie, le métabolisme et la répartition des organismes et d'autre part l'étude

de la dynamique spatio-temporelle des peuplements d'une ride lente. Cette mission, organisée par l'IFREMER et dont les chefs de mission étaient Anne-Marie Alayse et Daniel Desbruyères, s'est déroulée à bord du N/O L'Atalante, navire porteur du Nautille. Les échantillons ont été prélevés par François Lallier et Stéphane Hourdez (Station Biologique de Roscoff).

La campagne **PICO**, qui s'est déroulée du 25 juin au 11 juillet 1998, était destinée plus particulièrement à la récupération des enregistreurs et des capteurs placés sur le fond lors de la campagne MARVEL pour quantifier et mesurer les flux hydrothermaux et leurs implications biologiques sur les cycles et le recrutement. Cette campagne, organisée par l'IFREMER et dont le chef de mission était Daniel Desbruyères, s'est effectuée à bord du N/O Nadir, navire porteur du Nautille. J'ai participé à cette campagne ce qui m'a permis de réaliser des expériences avec des animaux vivants.

Plusieurs spécimens de *Chaceon affinis* ont été récoltés lors d'une campagne de pêche du bateau « Eureka » (Concarneau, 29), du 26 janvier au 09 février 2000. Ils ont été prélevés à 720 mètres de profondeur au sud de l'Irlande (55°51'N; 9°23'W). La détermination de l'espèce a été réalisée par Danièle Guinot (Muséum d'Histoires Naturelles, Paris).

Ces différentes campagnes ont permis la récupération d'échantillons biologiques mais aussi des expérimentations *in vivo* sur des organismes hydrothermaux. L'étude des enregistrements vidéo réalisés durant toutes les plongées du submersible nous a permis de localiser les crustacés décapodes sur les cheminées hydrothermales et de préciser les conditions physico-chimiques de leur micro-environnement.

II – LOCALISATION DES ESPECES ET MICRO-ENVIRONNEMENTS

Le milieu hydrothermal, zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer du fond, est un milieu considéré comme extrême de par ses propriétés physico-chimiques : chaud, hypoxique, voire anoxique, hypercapnique, riche en métaux lourds et en composés réduits, acide. Ce milieu présente également une très grande instabilité spatio-temporelle, avec des turbulences des paramètres physico-chimiques et de très forts gradients. Nous avons entrepris de localiser précisément les différentes espèces de crustacés décapodes utilisées dans notre étude afin de déterminer plus finement leur environnement physico-chimique. Pour cela, nous avons fait appel à des techniques d'analyse de bandes vidéo réalisées lors des différentes campagnes scientifiques.

Les caractéristiques physico-chimiques du micro-environnement de chaque espèce, déterminées par les chimistes du département Environnement Profond de l'IFREMER, nous permettront alors de comprendre le caractère adaptatif des mécanismes mis en place par les différentes espèces pour vivre dans leur environnement, en particulier au niveau respiratoire. Il s'agit d'une approche écophysiologique de la respiration chez les crustacés décapodes prédominants du milieu hydrothermal.

II-1/ Matériel et méthodes

II-1-1 : Analyses vidéo

Une analyse détaillée des bandes vidéo enregistrées lors des plongées du submersible français, Nautile, a permis la localisation des différentes espèces de crustacés décapodes du Pacifique (*Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*) et de l'Atlantique (*Segonzacia mesatlantica*, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* et *Chaceon affinis*).

Pour les espèces du Pacifique, la localisation a été réalisée sur les sites de Genesis (13°N, 2 640 m de profondeur), Elsa (13°N, 2 630 m de profondeur) (Figure I-4), BioVent (9°N, 2 515 m de profondeur) et M-vent (9°N, 2 510 m de profondeur) (Figure I-5) à partir

des bandes vidéo réalisées lors des campagnes HOT'96 et HOPE'99.

Pour les espèces de l'Atlantique, la localisation a été réalisée sur les sites de Menez Gwen (Figure I-14, 850 m de profondeur), Lucky Strike (Figure I-12, 1 700 m de profondeur) et Rainbow (Figure I-11, 2 300 m de profondeur) à partir des bandes vidéo réalisées lors des campagnes MARVEL et PICO.

L'estimation des densités s'est faite à l'aide de cadres quand c'était possible, ou par comparaison des distances avec un appareil de dimensions connues.

II-1-2 : Caractérisation de chaque type d'environnement

La caractérisation de chaque type d'environnement a été réalisée par Pierre-Marie Sarradin, Nadine Le Bris et Jean-Claude Caprais (IFREMER, DRO/EP). Pour cela, ils ont fait appel à plusieurs techniques de prélèvements et d'analyses détaillées ci-dessous. Le dosage des métaux a été réalisé par Ricardo Riso (Laboratoire de Chimie Marine, UBO et Station Biologique de Roscoff) par potentiométrie.

II-1-2-1/ Mesure de la température

Des mesures discrètes de température ont été réalisées à l'aide d'une sonde située sur le bras du Nautil. Pour un enregistrement pendant longue période de temps de la température, des sondes autonomes HOBO et Micrel®, contenant un module électronique d'enregistrement, ont été déposées pendant plusieurs jours sur différents sites. Ces valeurs ont été corrigées durant les missions, en utilisant un thermomètre à renversement standard.

II-1-2-2/ Prélèvements discrets

Les échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide de seringues titane de 750 ml lors des premières missions (Von Damm, 1983).

Par la suite, un nouveau système de prélèvement a été développé (Sarradin *et al.*, 1998), limitant les problèmes de dilution du fluide observés lors du prélèvement avec les seringues titane. Il s'agit d'une bouteille en titane de 200 ml dont le remplissage est obtenu grâce à la différence de pression entre l'intérieur de la bouteille, dont le vide partiel a été effectué en surface, et l'extérieur, où règne une pression de 85 à 300 bars. Le multipréleveur est formé par l'association de quatre de ces bouteilles. Le déclenchement est commandé par le Nautil.

Le tableau II-1 présente le traitement des échantillons ainsi que les techniques analytiques utilisées pour déterminer le pH, les concentrations totales en CO₂ (ΣCO₂), en soufre (ΣS) et les teneurs en cuivre, plomb et cadmium.

Tableau II-1 : Traitement des échantillons et méthodes analytiques utilisées pour analyser les échantillons d'eau du fond et du fluide (S* : précision de la mesure).

Para mètre	Techniques de Conservation	Techniques d'Analyse	S*
pH	Analyse à bo rd	Electrode potentiométrique en milieu sulfurique	0,1 pH
ΣCO ₂	Analyse à bo rd	Chromatographie gazeuse (Headspace-GC-HWD FID (Sarradin and Caprais, 1996)	10 %
ΣS (H ₂ S+HS ⁻ +S ²⁻)	Analyse à bo rd	Colorimétrie (Fons elius, 1983)	10 %
Cu, Pb, Cd	HNO ₃ Sup rapur, 1/1 000, T °C ambi ante	Potentiometric Stripping analysis (Riso <i>et al.</i> , 1997)	5 %

II-1-2-3/ Mesures *in situ* à l'aide d'ALCHIMIST

Cet appareil a été développé par IFREMER (Le Bris *et al.*, 2000) (Figure II-1). Cet Analyseur CHIMique In SiTu est basé sur une détection colorimétrique et une analyse en injection en flux (FIA), adapté pour mesurer *in situ* les (nitrates+nitrites) (N+N) et les sulfures totaux dissous (ΣS = [H₂S] + [HS⁻] + [S²⁻]) dans l'eau de l'environnement hydrothermal. La limite de détection est de 0,8 μM pour ΣS et de 0,5 μM pour (N+N). La précision des mesures *in situ* est de 1,1 % pour ΣS et de 0,8 % pour les (N+N).

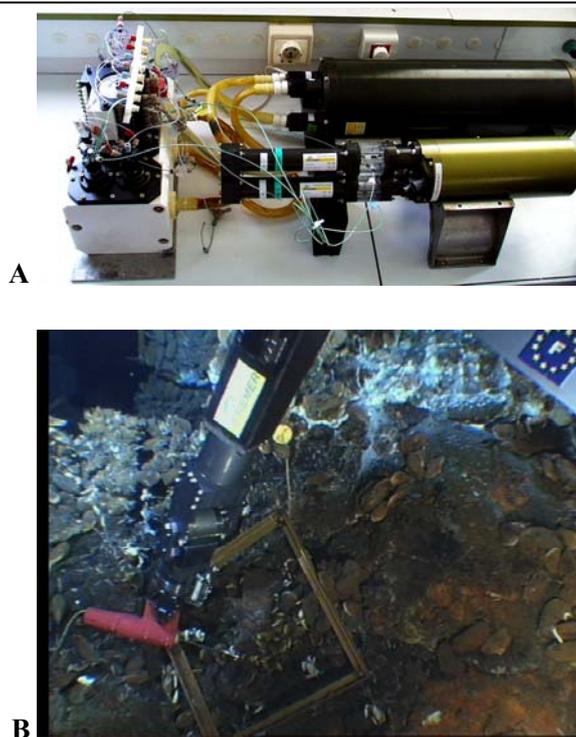


Figure II-1 : Analyseur *in situ* ALCHIMIST. La photo A présente l'appareil de mesure au laboratoire, montrant les trois modules : électronique (en noir), spectrophotométrique (vert) et hydraulique (blanc). La photo B montre la canule de prélèvement *in situ*, manipulée par le bras du submersible, et sur laquelle sont placées une sonde pH et une sonde de température.

II-2/ Résultats

II-2-1 : Pacifique

II-2-1-1/ Localisation des espèces

II-2-1-1-1 : Champ hydrothermal Genesis

Le champ hydrothermal Genesis est composé d'une cheminée principale, de neuf mètres de haut et construite sur un mur de 5 mètres de haut orienté NO/SE, émettant un fluide clair et chaud et délimitant la partie ouest du champ. La partie supérieure de la cheminée est localisée au-dessus du plateau. Lors de la campagne HOPE en 1999, et contrairement à ce qui avait été observé en 1996, les alvinelles, *Alvinella spp.*, occupent une partie très restreinte du haut de la cheminée, la majorité de celle-ci étant recouverte par *Riftia pachyptila* (Figure II-2). D'autres petites cheminées, présentes à la base de cette cheminée principale, sont recouvertes d'*Alvinella spp.* (Figure II-2).

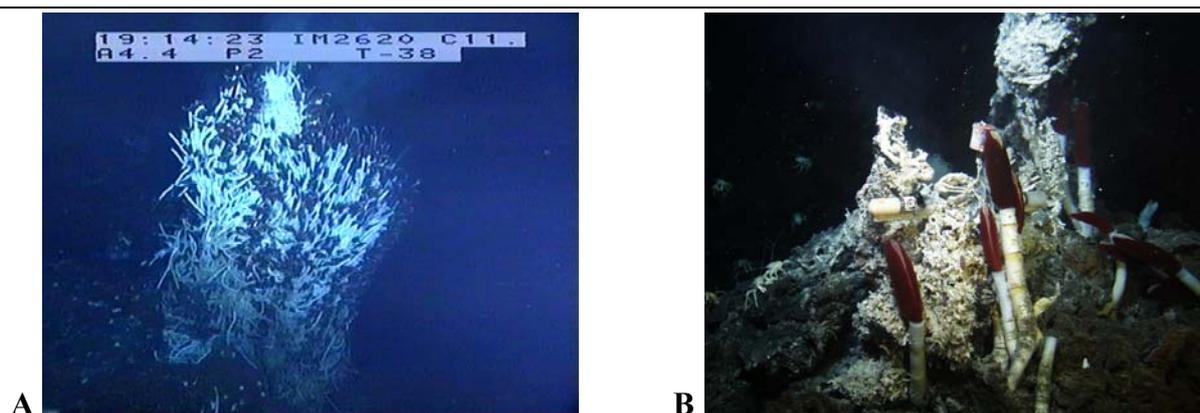


Figure II-2 : Cheminée recouverte de *Riftia* (A) et petits fumeurs recouverts d'Alvinellidae (B) sur le site Genesis

Bythograea thermydron (Figure II-3) est présent sur toutes les cheminées, de la base jusqu'au sommet des cheminées. La plus forte densité est mesurée sur les bouquets de *Riftia* (Figure II-3A), avec une densité approximative de 5 indiv./m². Ils sont également présents sur les Alvinellidae, mais avec une densité plus faible (Figure II-3B). Quelques *Bythograea* sont également présents sur les serpulidés se trouvant en périphérie de la cheminée principale du site et sur les basaltes environnants. Leur taille varie entre 3 et 8 cm environ de largeur céphalothoracique. Sur toutes les bandes vidéo analysées, aucun *Cyanagraea praedator* n'a été observé.

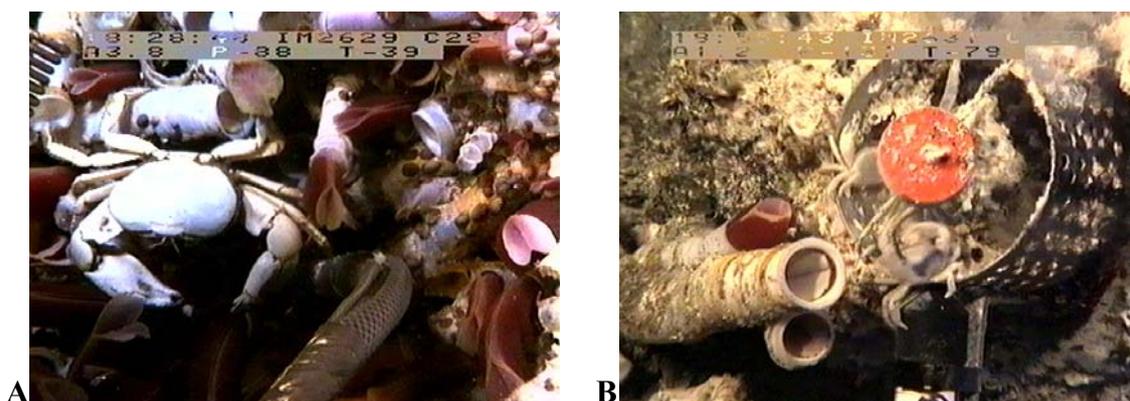


Figure II-3 : *Bythograea thermydron* observé sur un bouquet de *Riftia pachyptila* (A) et dans un TRAC (B), sur des *Alvinella sp.* au site Genesis (12°48'N, 103°56'W, 2 640 m de profondeur). Ces crabs mesurent entre 4 et 6 cm de largeur céphalothoracique.

II-2-1-1-2 : Champ hydrothermal Elsa

Le champ hydrothermal Elsa est composé d'une petite cheminée couverte de *Riftia* et d'une autre plus grande, émettant un fluide translucide et couverte d'*Alvinella* (Figure II-4).

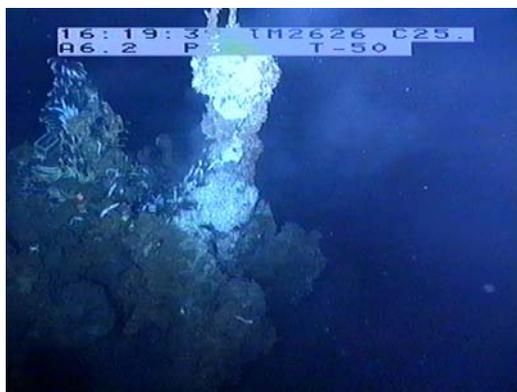


Figure II-4 : Cheminées expérimentales sur le site Elsa.

A la base de cette cheminée, se trouvent plusieurs *Riftia*. Peu de *Bythograea* sont présents sur la cheminée couverte uniquement par *Riftia* (Figure II-5A). Cependant, leur nombre augmente très rapidement dès que les prélèvements de *Riftia* par le submersible commencent.

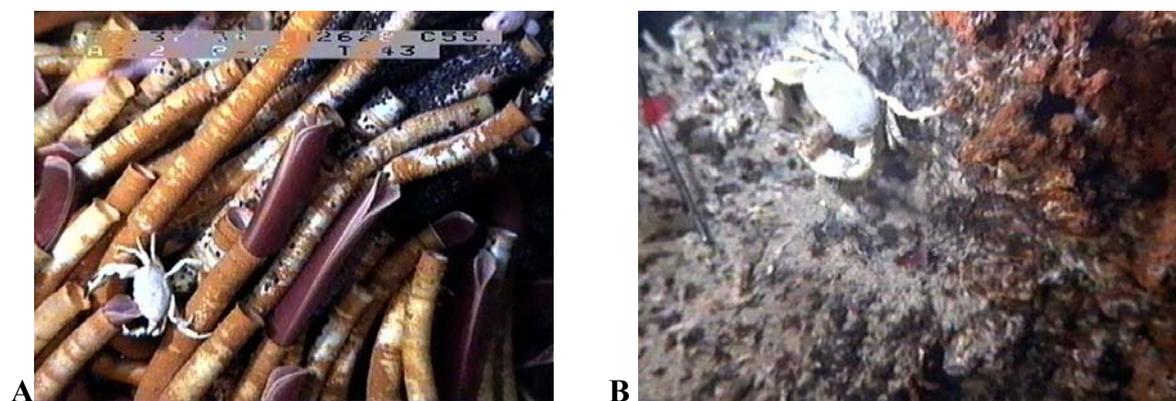


Figure II-5 : *Bythograea thermydron* observé sur un bouquet de *Riftia pachyptila* et sur des *Alvinella sp.* au site Elsa (12°48'N, 103°56'W, 2 630 m de profondeur). Ces crabes mesurent entre 4 et 6 cm de largeur céphalothoracique.

Sur la cheminée à *Alvinella spp.*, on observe des *Bythograea* de taille relativement importante, avec une largeur céphalothoracique d'environ 8 cm et ce sur toute la hauteur de la cheminée. Leur densité a été estimée à environ 6 à 8 indiv./m². Ils semblent attirés par le sous-

marin et les appareils de mesure ou par les perturbations que ceux-ci provoquent. Trois sondes de températures associées (tripode) ont été déposées durant trois jours sur un massif à *Alvinella* sur lequel se mouvaient plusieurs *Bythograea*. Des mesures avec ALCHIMIST ainsi que des prélèvements discrets ont eu lieu sur ce même massif, et à proximité des *Bythograea* (Figure II-5B).

Comme à Genesis, aucun *Cyanagraea* n'a été observé.

II-2-1-1-3 : Champ hydrothermal Bio-Vent

Ce site se caractérise par une abondance de moules, *Bathymodiolus thermophilus*, avec quelques individus de *Riftia* parmi les moules (Figure II-6).



Figure II-6 : Communauté animale observée sur le site Bio-Vent.

Le dépôt de cadres a permis d'estimer la densité des crabes. Des mesures avec ALCHIMIST ainsi que des prélèvements discrets avec des bouteilles ont eu lieu sur ces cadres. Beaucoup de *Bythograea* sont présents sur les moules (Figure II-7A), avec une densité estimée d'environ 10 indiv./m², pouvant atteindre localement 15 indiv./m². Ils se précipitent vers les moules lorsque le sous-marin les prélève. *Bythograea* est également observé au niveau des petits bouquets de *Riftia* (Figure II-7B). Comme pour les deux sites précédents, aucun *Cyanagraea* n'a été observé.

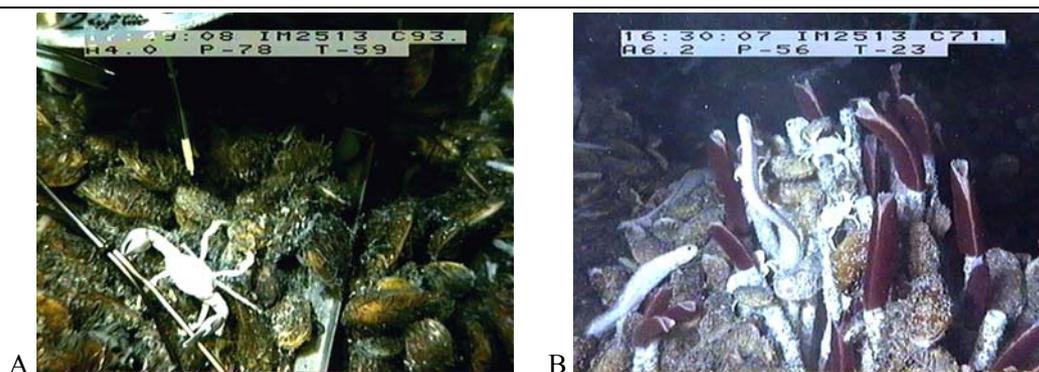


Figure II-7: *Bythograea thermydron* au niveau d'une moulière de *Bathymodiolus thermophilus*, au site Bio-Vent (9°50'N, 104°17'W, 2 520 m de profondeur). On distingue deux sondes de température HOBO sous le crabe ainsi que la canule du multipréleveur au-dessus (A). *B. thermydron* est également présent au niveau de *Riftia pachyptila* (B). Les crabes observés font entre 4 et 6 cm de largeur céphalothoracique.

II-2-1-1-4 : Champ hydrothermal M-Vent

Ce site est constitué de trois cheminées hydrothermales, alignées au bord du graben, émettant un fluide noir (Figure II-8).

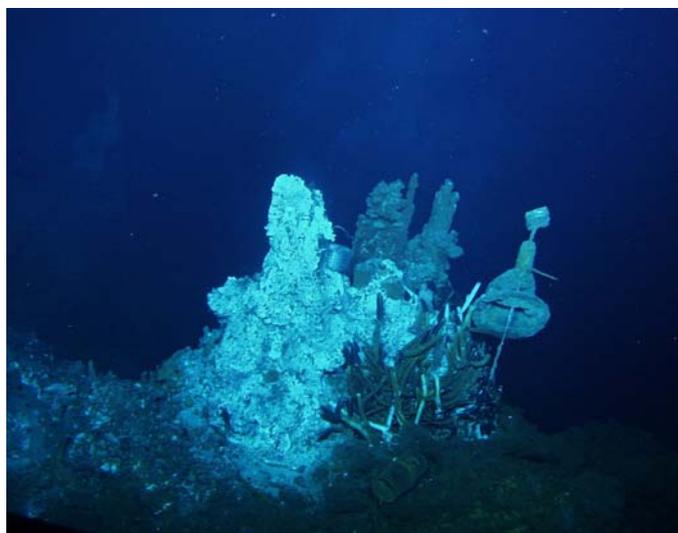


Figure II-8: Alignement des trois fumeurs du site M-Vent.

Les cheminées sont recouvertes d'*Alvinella sp.* *Cyanagraea praedator* est observé sur toute la hauteur des trois cheminées, entre elles et à leur base (Figure II-9A, B, C). De taille importante, avec une largeur céphalothoracique d'environ 11 cm, ils sont relativement abondants sur les cheminées (densité estimée de 4 à 5 indiv./m²). Certains individus sont

observés à proximité d'un « fumeur noir » et leurs pattes apparaissent couvertes de bactéries (Figure II-9C). Lorsque les projecteurs du submersible les éclairent, ils présentent un réflexe de retrait dans les fissures. Les analyses réalisées sur les bandes vidéo faites pendant la mission HOT'96 montrent que *Cyanagraea* est présent aussi bien au niveau des zones actives que des zones inactives, ainsi que sur des cheminées éteintes se trouvant à proximité. Un *Cyanagraea* a également été observé sur le pôle chaud colonisé par des alvinelles (Figure II-9). Quelques individus de *R. pachyptila* ont été observés à la base d'une des cheminées. En revanche, aucun *Bythograea thermydron* n'a été observé.

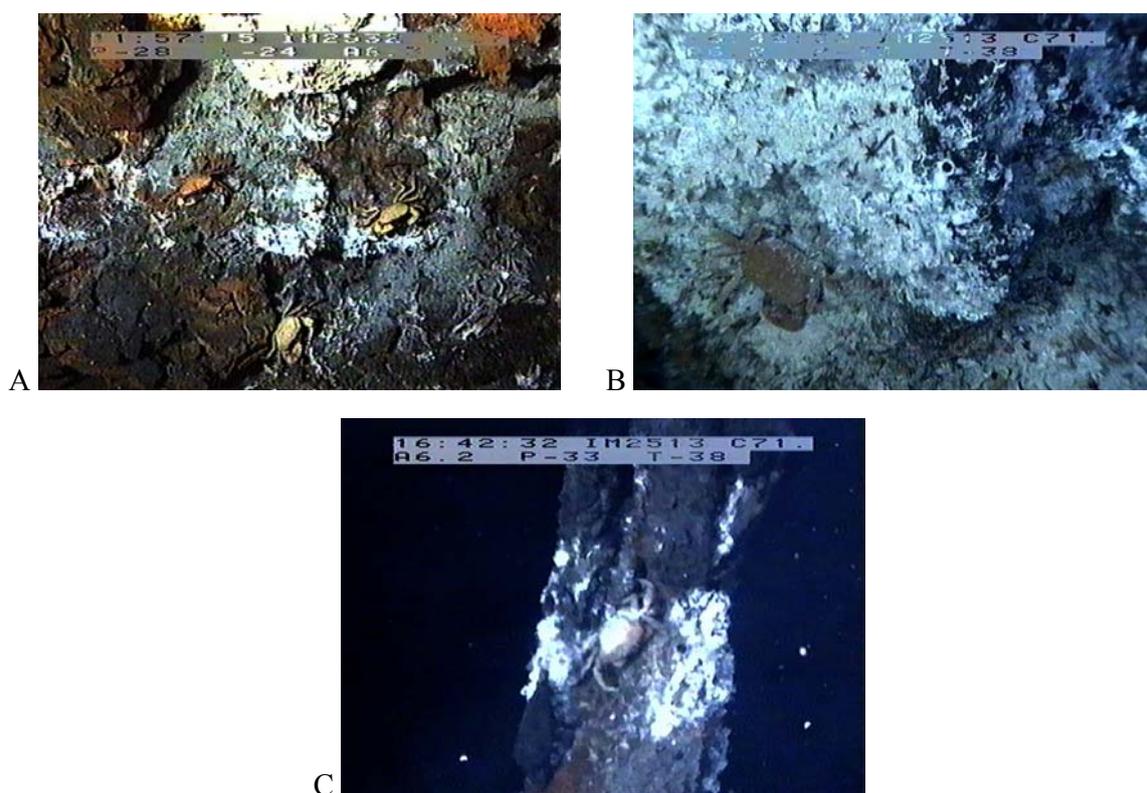


Figure II-9 : *Cyanagraea praedator* observé au site M-Vent (9°50'N, 104°17'W, 2 510 m de profondeur), au niveau de la base des cheminées (A), sur *Alvinella pompejana* (B) et près d'une émission de fluide noir (C).

II-2-1-2/ Description de l'environnement chimique

L'environnement hydrothermal se caractérise par une grande variabilité spatiale et temporelle des paramètres physico-chimiques, et ce, aussi bien dans le Pacifique que dans l'Atlantique. La figure II-10 illustre cette variabilité spatio-temporelle. Les enregistrements de trois sondes, placées dans le même massif d'*Alvinella* à des distances d'environ 10 cm, présentent des variations qui restent limitées à une certaine gamme pour chacune des sondes : de 2 à 10°C,

de 15 à 25°C et de 15 à 35°C sur une période de 48h.

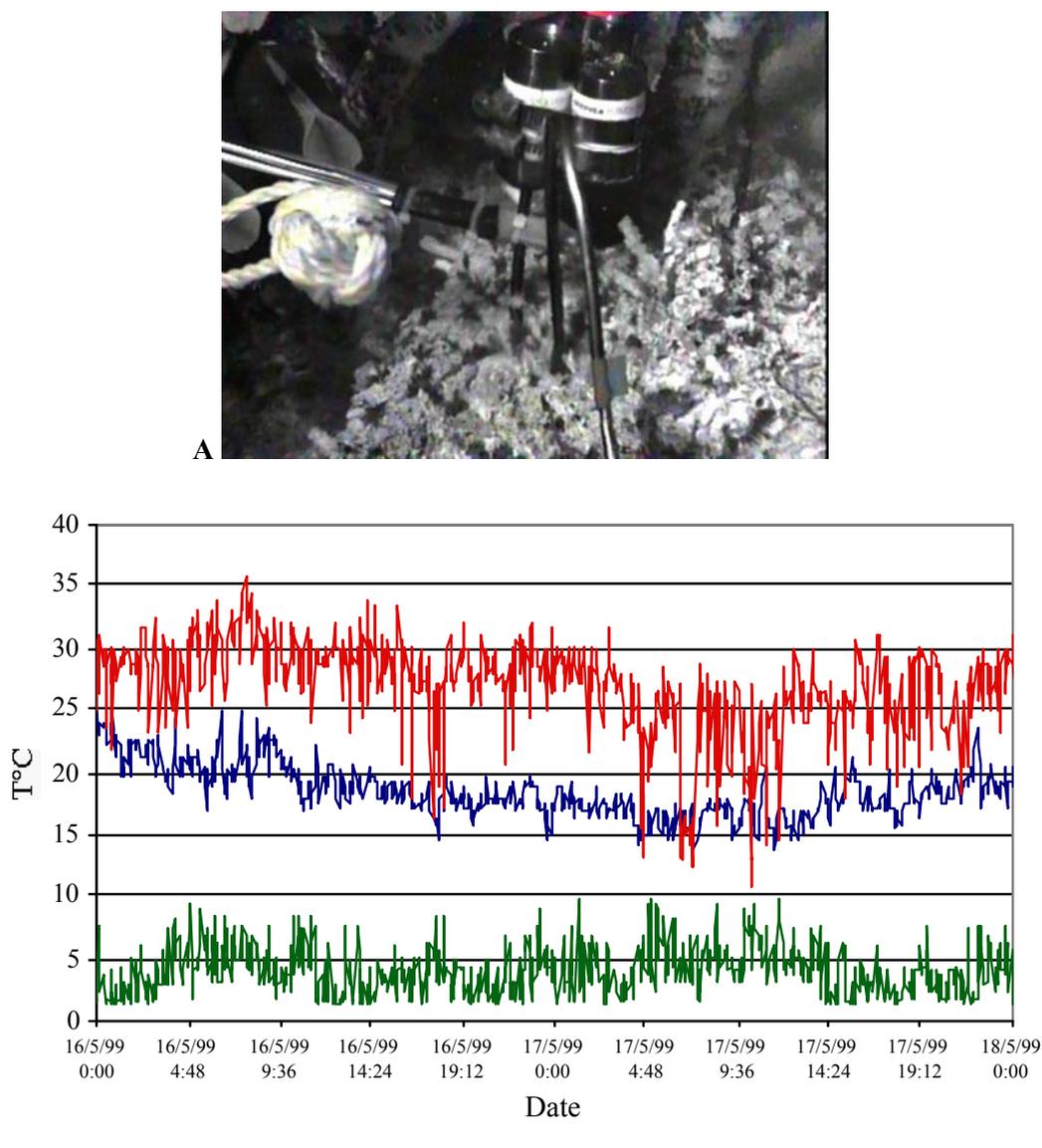


Figure II-10: Tripode de sondes (A) et relevé de températures obtenus par ce tripode (B), déposé pendant 3 jours sur le massif à *Alvinella sp.*, au site Elsa de l'EPR. Seules les données obtenues sur 48 h sont présentées (Pierre-Marie Sarradin, communication personnelle).

Les résultats présentés au cours de cette étude sont préliminaires et sont en cours de traitement par des modèles thermodynamiques. Les valeurs mentionnées correspondent à des mesures de températures, des mesures *in situ* et à des prélèvements discrets. Il est possible que les valeurs maximales soient légèrement sous estimées. Le tableau II-2 présente une synthèse des valeurs limites du micro-environnement des différentes espèces de crustacés décapodes observés au niveau des sites hydrothermaux du Pacifique et de l'Atlantique.

II-2-1-2-1 : Environnement chimique de *Bythograea thermydron*

Lors de la campagne HOPE'99, les caractéristiques chimiques et thermiques de la zone de mélange associée à deux types d'habitats, le « pôle chaud » dominé par les annélides polychètes (*Alvinella pompejana* et *Paralvinella grasslei*) et le « pôle tiède » colonisé par les vestimentifères *Riftia pachyptila* ont été étudiées au site Genesis. *Bythograea thermydron* a été observé associé à ces deux types d'habitats.

Bythograea thermydron rencontre des températures comprises entre 2 et 43°C, de façon plus ou moins prolongée (Tableau II-2). Les mesures de pH réalisées au cours de HOPE'99 montrent qu'il vit dans des zones où le pH est compris entre 5,5 et 7,8. *B. thermydron* vit dans un environnement où la teneur en O₂ varie entre 0 et 125 µM (eau de mer), celle en CO₂ entre 2 000 (eau de mer) et 7 000 µM et celle en H₂S entre 0 (eau de mer) et 200 µM.

Tableau II-2 : Synthèse des valeurs limites des paramètres physico-chimiques de l'environnement des différentes espèces de crustacés décapodes. Pour *Chaceon affinis*, mis à part pour la température, les valeurs d'une seule mesure de l'eau du fond sont données. (Jean-Claude Caprais, Nadine Le Bris, Pierre-Marie Sarradin, communications personnelles)

	T°C		pH		H ₂ S (µM)		CO ₂ (µM)		O ₂ (µM)		Cu (µM)		Pb (µM)		Cd (µM)	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<i>B. thermydron</i>	2	43	5,5	7,8	0,0	200	2000	7000	0	135	0,004	1,61	0,002	0,02	0,001	0,003
<i>C. praedator</i>	2	39 (70?)	5,4	7,8	0,0	544	2000	12000	0	125	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.
<i>R. exculata</i>	5	25,0	6,3	7,5	0,4	22	1700	2300	0-50*	250	0,4	3,2	0,01	0,09	0,01	0,02
<i>M. fortunata</i>	9	27,0	6,8	7,5	0,4	21	1700	2800	0-150*	250	0,0	3,2	0,00	0,04	0,00	0,10
<i>C. chacei</i>	4	23,0	6,4	8,0	0,5	37	1900	3100	0-50*	250	0,0	12,5	0,01	0,05	0,00	0,01
<i>S. mesatlantica</i>	4	27,0	6,3	8,0	0,4	75	1700	3100	0-50*	250	0,0	12,5	0,00	0,53	0,00	0,12
<i>C. affinis</i>	7	20	7,9		0,2		1800		250		0,1		0,00		0,00	

* : La limite d'anoxie se situe entre pH 6,1 et 7

Les gammes de teneurs en métaux sont déduites de mesures issues de prélèvements discrets uniquement. Le micro-environnement de *B. thermydron* se caractérise par des teneurs comprises entre 0,004 et 1,614 µM pour le cuivre, entre 0,002 et 0,02 µM pour le plomb et entre 0 et 0,003 µM pour le cadmium.

II-2-1-2-2 : Environnement chimique de *Cyanograea praedator*

Les données concernant le micro-environnement de *Cyanograea praedator*

proviennent uniquement de prélèvements discrets. Les mesures de température ont été réalisées lors de la mission HOT'96.

Au niveau d'un module de colonisation déposé sur le site M-Vent lors de la campagne HOT'96, et dans lequel se trouvait un individu de *C. praedator*, les températures variaient de 5 à 39°C. Des valeurs de 70°C ont été mesurées sur autre site à proximité d'un spécimen de *C. praedator*. Cependant, compte-tenu des gradients thermiques existant au niveau des sources hydrothermales, il est très difficile d'estimer la température à laquelle se trouvait réellement ce crabe.

Le micro-environnement de *C. praedator* (Tableau II-2) se caractérise par un pH compris entre 5,4 et 7,8 (eau de mer), des teneurs en O₂ comprise entre 0 et 125 µM (eau de mer), en CO₂ comprise entre 2 000 et 12 000 µM et en H₂S comprise entre 0 (eau de mer) et 544 µM.

Pour le moment, aucune donnée concernant les teneurs en métaux dans l'environnement de *C. praedator* n'est disponible. En dehors du site M-Vent décrit ci-dessus, *C. praedator* est généralement observé sur les fumeurs noirs colonisés par les alvinelles, sans vestimentifères. Ces sites, nombreux au nord de Genesis, n'ont malheureusement pas fait l'objet d'analyses détaillées *in situ*. Il apparaît que *B. thermydron* et *C. praedator* ne sont jamais observés sur les mêmes sites de l'EPR, bien que les conditions physico-chimiques de leur micro-environnement soient très proches.

II-2-2 : Atlantique

II-2-2-1/ Localisation des espèces

II-2-2-1-1 : Champ hydrothermal Rainbow

Le champ hydrothermal Rainbow est constitué d'au moins trente sites actifs. Le site le plus étudié est le site PP29/PP37 (Figure I-11). Ce site est constitué par plusieurs cheminées, dont deux émettent un fluide noir dans la partie nord du site (Figure II-11).



Figure II-11 : Fumeurs noirs observés au site Rainbow. On distingue des crevettes *Rimicaris exoculata* juste en dessous de l'évent.

La répartition de *Rimicaris exoculata* varie très fortement d'un site à un autre. Elles sont plus abondantes au site PP28 où elles forment des essaims très importants (Figure II-12A), leur densité dépassant localement les 3 000 indiv./m². Ces essaims de crevettes se situent au niveau des dépressions entre les cheminées et dans certaines failles des parois. Sur les autres sites, la répartition des *Rimicaris* est beaucoup plus éparse. Sur le site PP29/37, les crevettes se situent au niveau des cuvettes où des émissions diffuses sont présentes. Elles peuvent également se trouver à proximité de fumeurs noirs (Figure II-11).

Les crevettes *Mirocaris fortunata* et *Chorocaris chacei* sont également présentes sur ce champ hydrothermal, mais en densité beaucoup moins importante que *R. exoculata*. *Chorocaris* et *Mirocaris* se situent au niveau des moules, mais cette dernière est aussi et surtout observée dans des zones plus chaudes, au niveau des zones réduites des cheminées (Figure II-12B). Elles sont présentes en densité relativement importante (environ 200 à 300 indiv./m²), et ce sur tous les champs hydrothermaux. Une étude de l'évolution temporelle des peuplements à PP29, réalisée par Karine Olu (communication personnelle), montre que les populations de *M. fortunata* sont progressivement remplacées par des populations de *R. exoculata* entre 1997 et 1998. Il existerait soit une compétition interspécifique entre ces deux espèces, soit il y a eu une modification du micro-environnement durant cette période.

Le crabe hydrothermal *Segonzacia mesatlantica* présente une répartition relativement éparse sur ce site, mais il semble présent sur toutes les structures. Certains d'entre eux se situent près des émissions de fluide et sont recouverts de bactéries filamenteuses (Figure II-

12C). Cependant, ces crabes sont assez difficiles à voir sur les différentes structures car ils sont le plus souvent mimétiques avec le substrat, ce qui rend l'estimation de leur densité très difficile. Plusieurs individus ont également été observés sur le sédiment meuble, hors de l'influence directe de l'activité hydrothermale.

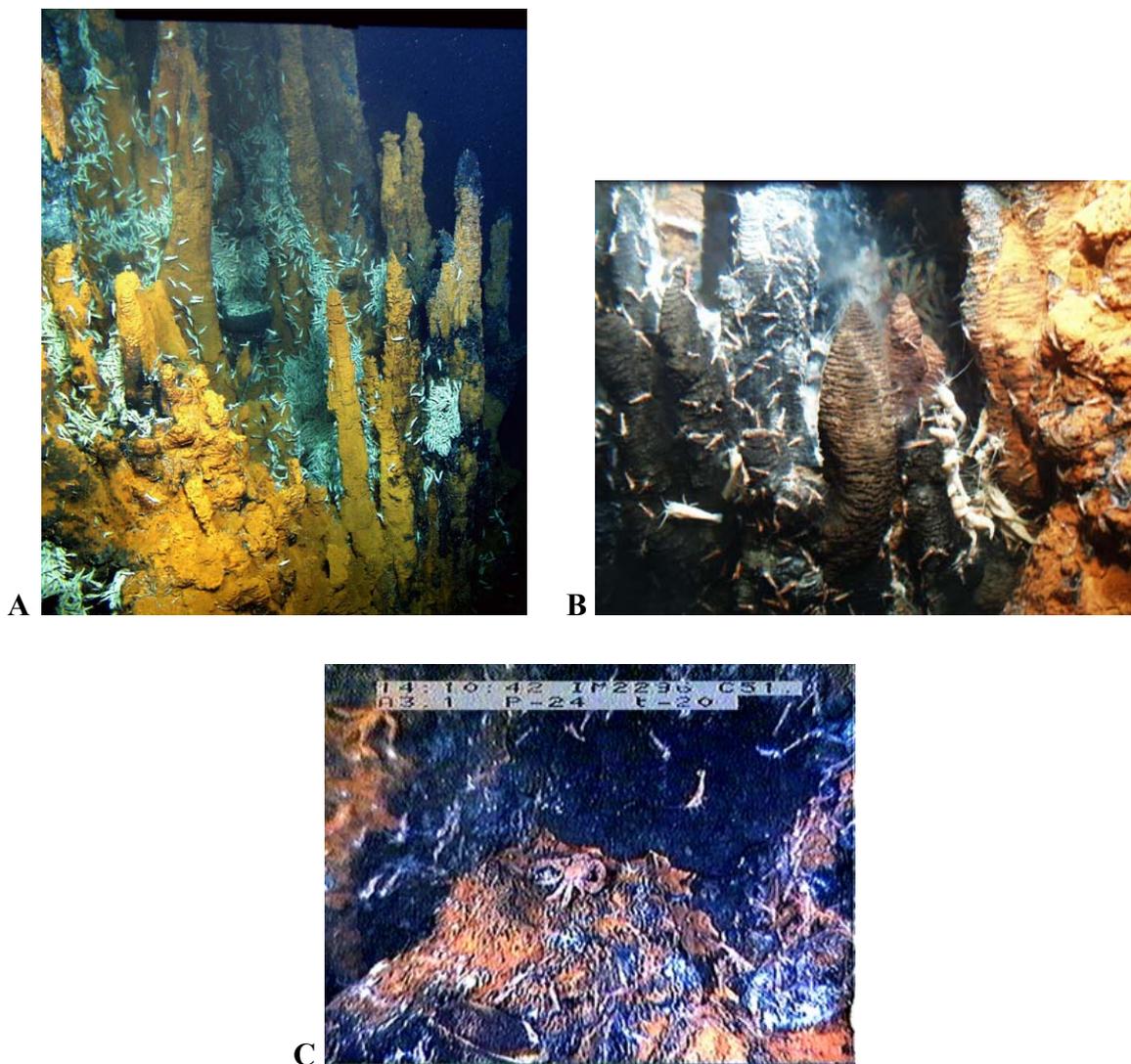


Figure II-12 : *Rimicaris exoculata* au niveau des cuvettes, formant des essaims très denses (A), *Mirocaris fortunata* sur les zones réduites des cheminées (B) et *Segonzacia mesatlantica* à proximité d'un diffuseur et couvert de bactéries (C), au site Rainbow (36°14N, 33°54W, 2 300 m de profondeur).

II-2-2-1-2 : Champ hydrothermal Lucky Strike

Le champ hydrothermal Lucky Strike est constitué de sept sites hydrothermaux répartis autour d'un lac de lave (Figure I-12). Les spécimens prélevés pour nos études

proviennent du site PP24, situé au N/O du lac de lave et du site Tour Eiffel, situé au S/E du lac de lave. Ce dernier est le site le plus actif de Lucky Strike.

Le site PP24 est constitué d'une seule cheminée présentant deux émissions de fluide noir à son sommet. De multiples diffuseurs blancs et des émissions diffuses sont présents tout le long de la cheminée et sur les deux faces. Sur ce site, les individus de *C. chacei* sont principalement observés au niveau des moulières, à proximité des émissions diffuses (Figure II-13A), avec une densité estimée à environ 100 indiv./m². Cependant, ils sont également présents sur l'ensemble de la cheminée. Quelques individus de *Mirocaris fortunata* sont aussi observés au niveau des moules. Ce site présente une très forte densité de crabes *Segonzacia mesatlantica*, la plus importante de tous les sites de Lucky Strike. Ils sont présents à tous les niveaux de la cheminée, de la base, au niveau des moulières jusqu'au sommet, près des émissions de fluide (Figure II-13). Ils sont de taille très variable, de 2 à 6 cm environ. Certains sont recouverts de filaments bactériens, en particulier les individus situés à proximité des émissions diffuses (Figure II-13C). Cependant, ils ne sont pas en contact direct avec les émissions : on observe un réflexe de retrait rapide des pattes lorsque celles-ci se trouvent en contact avec le fluide. De nombreux crabes de petite taille sont présents sous les moules (visibles lors des prélèvements de moules par le sous-marin) ce qui rend le calcul de leur densité très difficile. On peut estimer que leur densité au niveau des moules est de l'ordre de 40 à 50 indiv./m². En revanche, au niveau des zones soumises de façon plus importante à l'activité hydrothermale, les crabes sont beaucoup plus épars et leur densité est de l'ordre de 10 indiv./m². Des analyses de la composition isotopique en carbone et en azote ont montré que ces crabes se nourrissent essentiellement de crevettes et non de moules (Ana Colaço, communication personnelle).

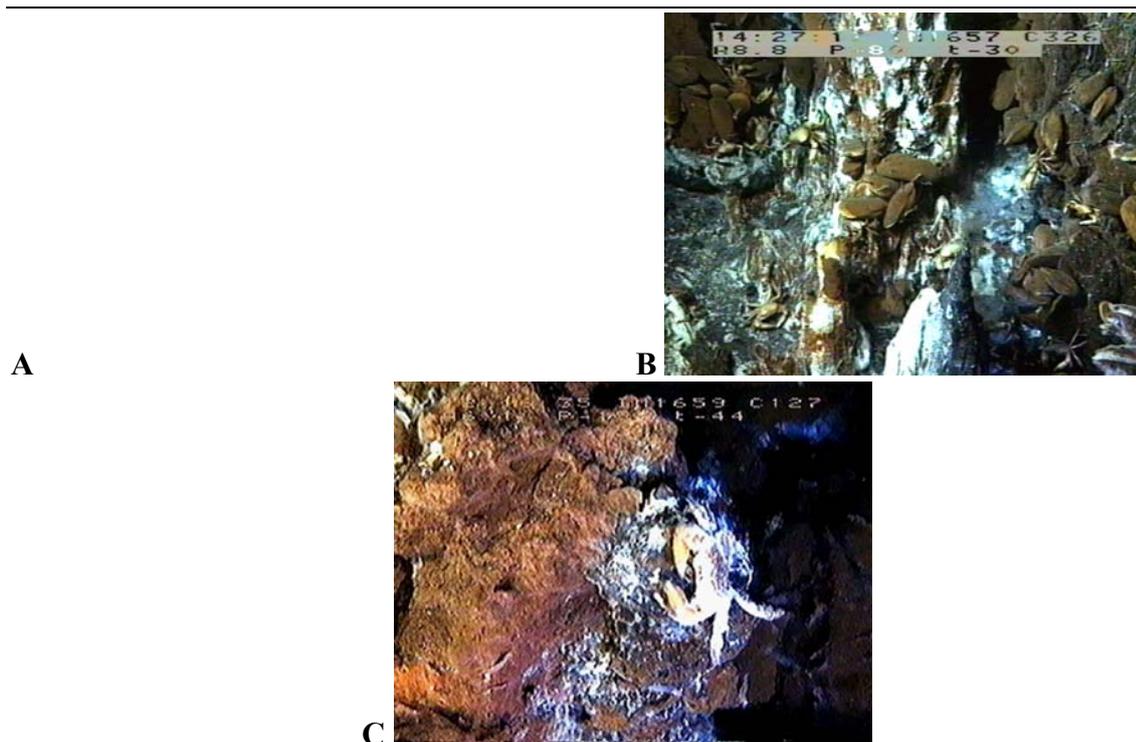


Figure II-13 : *Segonzacia mesatlantica* présent au niveau de la base des cheminées (A), des moulières (B) et des émissions diffuses (C) (pattes couvertes de bactéries) au site PP24 de Lucky Strike (37°17'N, 32°17'W, 1 700 m de profondeur). Sur la photo A, on distingue des crevettes *Chorocaris chacei*, au niveau des moules.

Le site Tour Eiffel doit son nom à sa forme. Il est composé de quatre structures d'environ 5 m de haut et d'une cheminée centrale de 6 m de haut. La communauté animale est dominée par les moules *Bathymodiolus azoricus*, les crevettes *Chorocaris chacei* et *Mirocaris fortunata* et le crabe *Segonzacia mesatlantica*. Les crevettes, *M. fortunata*, sont présentes sur les moules, mais aussi sur les parois des cheminées, où les moules sont absentes, formant des agrégats denses. Ana Colaço a estimé la densité des crevettes *M. fortunata* entre 200 et 700 indiv./m² (communication personnelle). *C. chacei* se situe uniquement au niveau des moules, avec une densité comprise entre 60 et 200 indiv./m² (Ana Colaço, communication personnelle) ainsi que *S. mesatlantica*, présent en densité plus faible qu'au site PP24 (densité approximative de 5 indiv./m²). Beaucoup de ces crabes sont couverts de bactéries filamenteuses abondantes au niveau des moules.

II-2-2-1-3 : Champ hydrothermal Menez Gwen

Le champ hydrothermal Menez Gwen est jeune et très actif. Ce site *sensu stricto* est le plus important de la zone (Figure I-14), et est relativement petit. Il est constitué par un fumeur

noir et plusieurs diffuseurs, répartis sur tout le site. Les moules recouvrent une grande partie de ce site, en tâches plus ou moins importantes. De nombreuses zones d'émissions diffuses sont présentes parmi les moules *Bathymodiolus azoricus*. Des mattes bactériennes blanches sont également bien développées. Les crabes *Segonzacia mesatlantica* ne sont présents qu'au niveau des moules et sous les moules, avec une densité d'environ 10 individus/m² (Figure II-14A). Certains crabes se situent également au niveau des tapis bactériens mais en faible densité. Des crevettes *Mirocaris fortunata* sont aussi présentes parmi les moules.

Une faune bathyale importante est observée aux alentours de ce site. Durant la campagne MARVEL, le crabe bathyal *Chaceon affinis* a été observé à proximité du site, sur des laves en coussin, hors de l'influence directe de l'activité hydrothermale (Figure II-14B). Il a également été observé se nourrissant de moules, à quelques centimètres d'un champ de moules (Figure II-14C). Cependant, il n'a pas été, jusqu'à présent, observé sur d'autres sites hydrothermaux. Ceci pourrait être dû à la profondeur trop importante des autres sites : Menez Gwen est à une profondeur d'environ 850 mètres alors que les autres sites se situent à au moins 1 600 mètres de profondeur.

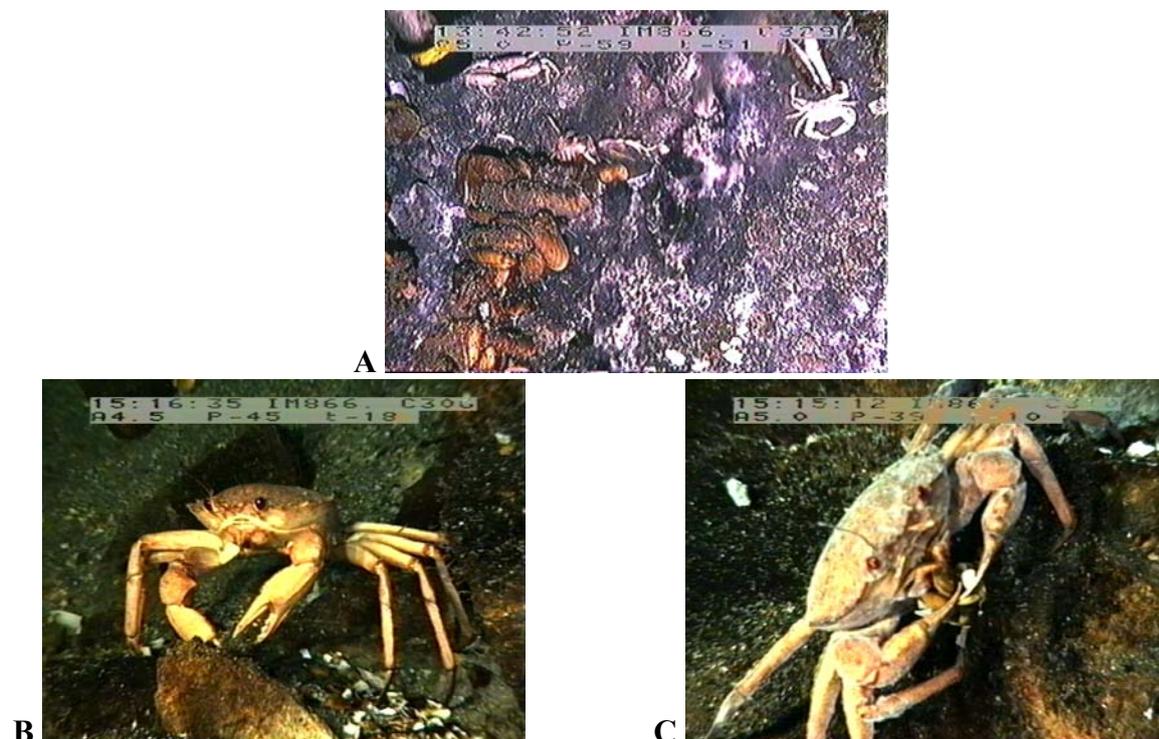


Figure II-14: *Segonzacia mesatlantica* (A) au niveau des moulières de *Bathymodiolus azoricus*, et *Chaceon affinis* à proximité (B) et se nourrissant d'une moule (C), au site Menez Gwen (37°52'N, 31°31'W, 850 m de profondeur).

II-2-2-2/ Description de l'environnement chimique

La première utilisation d'ALCHIMIST a eu lieu sur le site Lucky Strike, lors de la campagne VICTOR PREMIERE (Figure II-15). Les mesures réalisées montrent que le micro-environnement fluctue beaucoup au cours du temps en un même endroit et que les gradients de température, nitrate et sulfures sont très importants. Pour les autres sites de la MAR étudiés, les analyses se basent uniquement sur des prélèvements discrets.

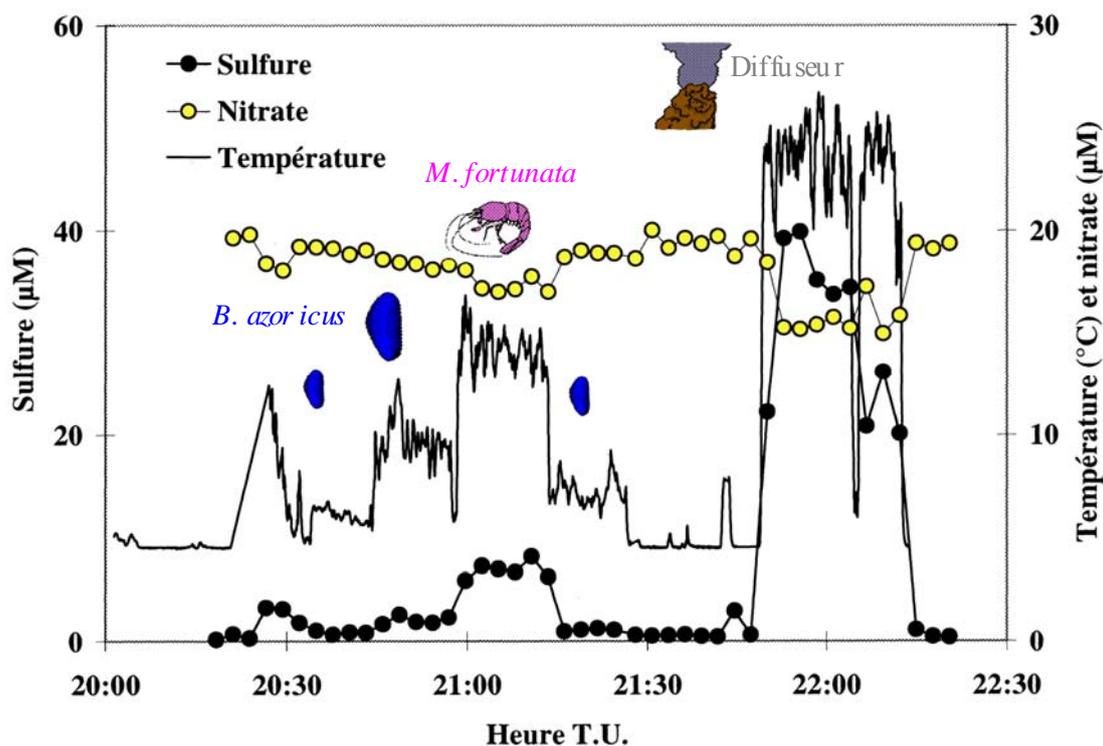


Figure II-15 : Série de données des concentrations en sulfure et en nitrate et des températures enregistrées avec l'analyseur *in situ* ALCHIMIST (modifié d'après Le Bris *et al.*, 2000). La sonde de l'analyseur a été placée à 4 points différents dans un cadre de 0,25 m² (20:00-21:30) et une zone de diffusion située à quelques mètres du cadre (21:45-22:15).

II-2-2-2-1 : Environnement chimique de *Rimicaris exoculata*

Une synthèse des paramètres physico-chimiques autour de *Rimicaris exoculata*, au site Rainbow, a été précédemment réalisée par Pierre-Marie Sarradin (communication personnelle). Les résultats sont regroupés dans le tableau II-2. L'environnement chimique de *Rimicaris exoculata* se caractérise par des températures comprises entre 5 et 25°C, un pH compris entre 6,3 et 7,5, la teneur en O₂ varie entre 0 et 250 µM, celle en CO₂ entre 1 700 et

2 300 μM et celle en H_2S entre 0,4 et 22 μM .

II-2-2-2-2 : Environnement chimique de *Mirocaris fortunata*

L'environnement physico-chimique de *Mirocaris fortunata* a également été caractérisé au site Rainbow. Les résultats sont regroupés dans le tableau II-2.

Mirocaris fortunata semble vivre dans un environnement légèrement plus chaud et plus hypercapnique que *Rimicaris exoculata* (Tableau II-2). Le pH, les teneurs en H_2S , en cadmium et en plomb sont sensiblement les mêmes. En revanche, la teneur en cuivre est plus élevée dans l'environnement de *Rimicaris* que dans celui de *Mirocaris*.

II-2-2-2-3 : Environnement chimique de *Chorocaris chacei*

Les crevettes *Chorocaris chacei* sont le plus souvent observées au niveau des moulières des sites de la MAR, et quelques fois sur les parois de petits diffuseurs. On peut donc considérer que les mesures réalisées sur les moules permettent de définir l'environnement physico-chimique de ces crevettes. Les résultats sont regroupés dans le tableau II-2.

C. chacei vit dans un environnement où la température varie entre 4 et 23°C, la teneur en O_2 varie entre 0 et 250 μM , celle en CO_2 entre 1 900 et 3 100 μM et celle en H_2S entre 0,5 et 37 μM et le pH entre 6,4 et 8.

II-2-2-2-4 : Environnement chimique de *Segonzacia mesatlantica*

Segonzacia mesatlantica est observé sur tous les sites connus de la MAR et à tous les niveaux des fumeurs. Il rencontre donc le même environnement que les trois espèces de crevettes. Il est également observé à proximité d'émissions de fluide. Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée concernant l'environnement de cette espèce au niveau des émissions n'est disponible. Une synthèse des valeurs limites des paramètres de l'environnement physico-chimique de *S. mesatlantica* est présentée dans le tableau II-2.

S. mesatlantica rencontre donc de larges variations des paramètres physico-chimiques de son micro-environnement. Les gammes des paramètres présentées pour *S. mesatlantica* correspondent aux mesures réalisées. Cependant, considérant sa localisation sur certaines cheminées (à proximité de fumeurs) et la présence de bactéries sur certains individus, on peut supposer qu'il rencontre des températures plus élevées que celles mesurées, ce qui signifierait

un pH plus acide et des teneurs en H₂S, CO₂ et métaux probablement plus élevées.

II-2-2-2-5 : Environnement chimique de *Chaceon affinis*

Chaceon affinis est observé en périphérie des sources hydrothermales du site Menez Gwen. Dans cette zone, la température de l'eau du fond est comprise entre 7,3 et 7,7°C. Deux mesures de température ont été réalisées (Biscoito et Saldanha, 2000) :

- une à 8,8°C, assez éloignée de la zone active, sur les coussins de lave, où un animal était présent
- une à 20°C à proximité des moules, où un autre individu a été observé.

La majorité des individus a été observée à la périphérie du site, à proximité des moulières. On peut donc supposer que *Chaceon affinis* ne fait que des incursions sur les sites, le temps de se nourrir. L'environnement rencontré principalement correspondra à celui de l'eau de mer du fond, dont les caractéristiques physico-chimiques sont précisées dans le tableau II-2.

II-3/ Discussion

Le milieu hydrothermal présente donc une grande variabilité spatio-temporelle de ses paramètres physico-chimiques (Figures II-10 et II-15). D'autres milieux présentent aussi le même type de variabilité. C'est le cas des cuvettes se trouvant au niveau de la zone de balancement des marées. Ces cuvettes subissent au cours de la journée des variations de leur température, pH, teneurs en O₂ et CO₂ (Truchot et Duhamel-Jouve, 1980 ; Morris et Taylor, 1983). Cependant, les concentrations des différents paramètres varient progressivement au cours du temps et non pas de façon aléatoire comme ce qui est observé dans l'environnement hydrothermal. Des variations de grande amplitude ont aussi été observées dans certaines zones littorales (Hagerman et Uglow, 1985). Certains milieux se caractérisent par de fortes teneurs en H₂S, comme les sédiments vaseux observés au niveau des estuaires (jusqu'à 336 µM) (Grieshaber et Völkel, 1998). Il existe donc des parallèles entre l'environnement physico-chimique des organismes vivant au niveau des sources hydrothermales et ceux de certaines zones littorales. Ceci peut laisser supposer que les adaptations mises en place par les organismes habitant ces différents types de milieux présentent des similitudes. Par exemple, les pigments respiratoires des organismes vivant dans des milieux hypoxiques possèdent une affinité plus élevée pour l'oxygène (Sanders et Childress, 1990a) ou les mécanismes de

détoxification des sulfures sont plus importants (Grieshaber et Völkel, 1998).

Les crustacés décapodes sont des animaux vagiles, c'est-à-dire qu'ils peuvent se déplacer lorsque les conditions environnementales leur deviennent défavorables. Cependant, les analyses vidéo ont montré que chaque espèce est le plus souvent observée dans le même type d'habitat. Ils sont donc capables de supporter les conditions physico-chimiques présentes dans ces différents habitats, d'où la nécessité de caractériser chacun de ces micro-habitats nous permettant d'avoir une approche écophysiological lors de l'étude sur la respiration. La majorité des données publiées actuellement concerne essentiellement la composition du fluide pur émis au niveau des fumeurs. Le développement d'analyseurs *in situ* adaptés aux grandes profondeurs a permis de s'affranchir des problèmes de prélèvements et de modifications du fluide lors de la remontée. Ces données très précises ainsi été obtenues vont permettre le développement de modèles thermodynamiques permettant d'estimer les concentrations de différents composés à partir d'un ou deux paramètres plus facilement mesurables comme la température ou le pH. De plus, la caractérisation des différents micro-habitats réalisée jusqu'à présent concerne uniquement les espèces sessiles *Riftia pachyptila* et *Alvinella spp.* (Sarradin *et al.*, 1998), et les modioles *Bathymodiolus sp.* (Sarradin *et al.*, 1999). Aucune étude concernant l'environnement des espèces vagiles n'a pour le moment été publiée.

Le tableau II-2 présente une synthèse des valeurs extrêmes mesurées que peut rencontrer chacune des espèces de crustacés décapodes étudiés. Dans les cas de *Cyanagraea praedator* et *Segonzacia mesatlantica*, les valeurs présentées correspondent aux mesures effectuées. Cependant, plusieurs individus de chaque espèce ont été observés sur des zones qui semblaient plus chaudes. La présence de bactéries sur leurs pattes laisse supposer que ces crabes restent longtemps dans des zones permettant leur développement.

Globalement, la comparaison des environnements du Pacifique et de l'Atlantique montre que les conditions environnementales rencontrées par les crustacés du Pacifique sont plus marquées que celles rencontrées par les espèces de l'Atlantique, et ce au niveau de pratiquement tous les paramètres mesurés au cours de notre étude : plus chaud, plus acide, plus riche en H₂S, plus hypercapnique et plus hypoxique. En ce qui concerne les teneurs en métaux, il semble, en revanche, que celles-ci soient plus importantes au niveau de l'Atlantique. Pour l'O₂, la situation est plus complexe. La teneur en O₂ de l'eau de fond est plus importante dans l'Atlantique. Cependant, la limite inférieure d'anoxie déterminée à partir des valeurs de température ou de pH est moins bien définie. Pour le moment, on ne sait pas

précisément dans quelle mesure les espèces hydrothermales de l'Atlantique peuvent se trouver dans un environnement anoxique ou pas.

La comparaison du micro-habitat de *B. thermydron* et *C. praedator* montre des similitudes au niveau du pH et de la température. En revanche, *Cyanagraea* vit dans un environnement beaucoup plus hypercapnique et riche en H₂S que *Bythograea*. Il semble également qu'il puisse rencontrer un environnement anoxique. Compte-tenu de la variabilité spatio-temporelle des conditions environnementales et de la possibilité pour le crabe de se déplacer, on peut supposer qu'il ne restera pas longtemps dans un milieu anoxique. Cependant, les données concernant le micro-environnement de *Cyanagraea* sont trop partielles. Seules des mesures de température ont été effectuées *in situ*, les autres paramètres étant déduits de celles-ci. Il serait donc intéressant que lors d'une prochaine campagne dans le Pacifique, des mesures soient réalisées au niveau de zones où est observé *Cyanagraea* pour confirmer les déductions actuelles.

Les différentes espèces de crustacés décapodes hydrothermaux semblent expérimenter des conditions environnementales similaires. Cependant, comme dans le cas de *Cyanagraea praedator*, aucune donnée concernant la température maximale rencontrée par *Segonzacia mesatlantica* n'est disponible actuellement. Les valeurs regroupées dans le tableau II-2 correspondent donc aux valeurs extrêmes mesurées pour les crevettes. Il est fort probable que *Segonzacia* rencontre des températures supérieures à 27°C et par conséquent des concentrations en H₂S, CO₂ et métaux plus élevées et des teneurs en O₂ plus faible et un pH plus acide.

L'existence d'une ségrégation spatiale entre les espèces de crevettes de l'Atlantique ne peut s'expliquer uniquement par la différence des caractéristiques physico-chimiques de leurs micro-environnements. D'autres facteurs, biotiques, peuvent expliquer cette répartition différentielle, comme par exemple une compétition interspécifique pour l'espace, ou une différence de régime trophique. Ainsi, *Mirocaris fortunata* est essentiellement observée au niveau des zones réduites des cheminées (parties noires, Figure II-12) alors que *Rimicaris exoculata* est plus volontiers sur les parties oxydées (jaunes).

Il est très probable qu'une combinaison de facteurs abiotiques et biotiques interviennent dans la localisation différentielle de l'ensemble des espèces de crustacés décapodes hydrothermaux. Une approche écophysologique doit donc intégrer

l'environnement des animaux, mais aussi la géologie, l'éthologie, les phénomènes de compétition interspécifiques, les régimes trophiques, l'écotoxicologie par exemples. Le tableau II-3 regroupe différentes données concernant l'habitat, les associations faunistiques et le régime trophique des espèces étudiées, facteurs qui pourraient jouer un rôle dans leur répartition.

Tableau II-3 : Synthèse sur la localisation des différentes espèces de crustacés décapodes, les espèces associées, leur régime trophique et quelques remarques sur leur localisation. (Sources des régimes trophiques : *Bythograea therydron* : Jollivet (1993) ; *Rimicaris exoculata* : Gebruk *et al.* (1993) ; *Segonzacia mesatlantica* : Ana Colaço, communication personnelle).

	Habitats	Associations faunistiques	Régime trophique	Remarques
<i>B. therydron</i>	Fumeurs blancs, zones de diffusion, basses	<i>Riftia</i> , alvinelles, modioles	Gastéropodes patelliformes, alvinelles, amphipodes	<i>Bythograea</i> et <i>Cyanagraea</i> : jamais observés au même endroit.
<i>C. predator</i>	Fumeurs noirs, basses	Alvinelles	Polychètes, mues de crustacés	
<i>R. exoculata</i>	Cuvettes avec diffuseurs	/	Bactéries	
<i>M. fortunata</i>	Zones de diffusion, zones réduites	modioles	Bactéries, crevettes, petits invertébrés	
<i>C. chacei</i>	Diffuseurs	modioles	Bactéries, crevettes, petits invertébrés	
<i>S. mesatlantica</i>	Tous	modioles, <i>Rimicaris</i>	Petits crustacés, polychètes	
<i>C. affinis</i>	Bathyal		Opportuniste	Proximité des moules à Menez Gwen

II-4/ Conclusion

Les crustacés décapodes sont des espèces vagiles qui, par conséquent, peuvent présenter des réponses comportementales lorsque les conditions environnementales leur deviennent défavorables. Cependant, les différentes espèces sont observées le plus souvent associées à des habitats bien précis (Tableau II-3). Les observations montrent néanmoins que **tous les organismes sont soumis à un moment ou à un autre à un milieu:**

- **acide** (plus acide que l'eau de mer)
- **avec des concentrations en H₂S importantes**
- **hypercapnique**
- **anoxique**

Une approche plus quantitative de la localisation des différentes espèces ainsi qu'une

estimation des temps d'exposition à chaque type de micro-environnement devrait permettre de déterminer les préférendums physico-chimiques de chaque espèce. La comparaison des différents micro-environnements des espèces montre que ceux-ci sont relativement similaires. Cependant, trois points peuvent être soulignés :

- les espèces de l'EPR rencontrent des conditions environnementales plus marquées que les espèces de la MAR,
- malgré le manque de données précises, il semble que *Cyanagraea praedator* peut vivre dans un environnement plus chaud que *Bythograea thermydron*,
- la ségrégation spatiale observée entre les espèces de l'Atlantique est due à un autre facteur que la composition physico-chimique de leur environnement. Par exemple, *Rimicaris exoculata* et *Mirocaris fortunata*, qui vivent dans des environnements très proches au niveau physico-chimiques, ne sont jamais observées au même endroit sur les cheminées.

Avant cette étude, l'idée couramment admise était que les espèces vagiles présentaient, comme les espèces sessiles, des aires de répartition bien définies déterminées par les paramètres physico-chimiques du micro-environnement. Par exemple, on supposait que *Bythograea thermydron* et *Cyanagraea praedator* vivaient à des niveaux très différents, *B. thermydron* étant associé aux pôles froids (serpulidés) et tiède (*R. pachyptila* et *B. thermophilus*) et *C. praedator* au pôle chaud (alvinelles). Notre étude a permis de démontrer que les crustacés hydrothermaux, contrairement aux espèces sessiles, ont des aires de répartition plus larges et que les conditions physico-chimiques de leur micro-environnement ne représentent que l'un des facteurs qui déterminent la localisation des crustacés décapodes hydrothermaux sur les cheminées.

III - STRUCTURE DES BRANCHIES

Les branchies constituent une interface physiologique entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de l'animal. Abrisées dans la chambre branchiale formée par la carapace, elles sont en contact direct avec le courant d'eau respiratoire créé par le scaphognathite. Les branchies présentent une perméabilité importante qui leur confère, en plus de leur rôle dans les échanges des gaz respiratoires (O₂, CO₂), un rôle dans les flux passifs et actifs d'ions, d'eau et d'autres solutés. Ces organes contribuent donc à la respiration, à l'osmorégulation, à l'excrétion, et à l'homéostasie acido-basique. Etant donnée l'instabilité spatio-temporelle de l'environnement hydrothermal et sa composition chimique particulière, il était intéressant d'étudier la structure des branchies des brachyours hydrothermaux afin de voir si elles présentaient une anatomie particulière comparée à celle des espèces côtières. Pour cela, nous avons fait appel à des techniques de microscopie photonique et électronique, à balayage et à transmission.

III-1/ Matériel et Méthodes

III-1-1 : Prélèvement des branchies

Les branchies de *Segonzacia mesatlantica* ont été prélevées sur des individus récoltés lors de la campagne MARVEL, sur le site PP24, Lucky Strike de la MAR. Les échantillons ont été fixés à bord du bateau par François Lallier dans du formol 10 % dans l'eau de mer filtrée.

Les branchies de *Bythograea thermydron* ont été prélevées sur des individus récoltés sur les sites BioVent (9°N), Genesis (13°N) et Grandbonum (13°N) de l'EPR, lors de la campagne HOPE'99. Les branchies de *Cyanagraea praedator* ont été prélevées sur des individus récoltés sur le site La Chaînette (13°N) de l'EPR, lors de la même campagne. Les branchies ont été fixées à bord dans du formol 7 % dans de l'eau de mer filtrée pour l'étude en microscopie photonique et à balayage.

Les branchies de *Chaceon affinis* ont été prélevées au laboratoire sur des spécimens récoltés au sud de l'Irlande lors d'une campagne de pêche de l'Eureka.

Afin d'étudier l'ultrastructure, en microscopie électronique à transmission (MET), des soies mises en évidence lors de l'étude des branchies de *Segonzacia mesatlantica*, des morceaux du vaisseau efférent des branchies de *B. thermydron* et de *C. praedator* ont été fixés dans un tampon à pH 7,3 contenant du glutaraldéhyde (4 %), du cacodylate de sodium (0,1 M), du sucrose (10 %) et du NaCl (5,5 %). Les branchies et les soies ont été conservées dans les fixateurs jusqu'au retour de mission.

III-1-2 : Etudes des formules branchiales

Les formules branchiales sont établies par observation du type d'insertion des branchies sur le corps de l'animal à l'œil nu ou sous la loupe binoculaire. On distingue trois types d'insertion des branchies (Figure III-1):

- soit sur le coxopodite (podobranche),
- soit sur la membrane articulaire (arthrobranche),
- soit sur la paroi latérale (pleurobranche).

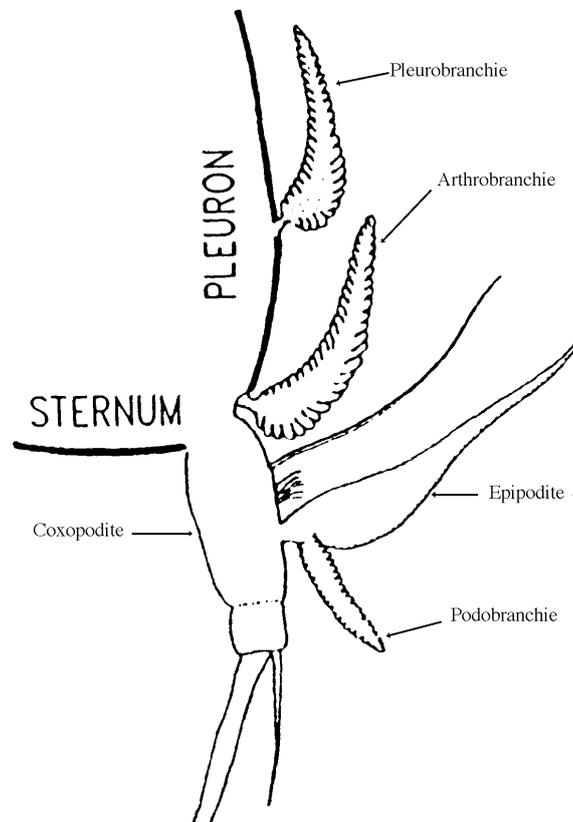


Figure III-1 : Terminologie des branchies de décapodes et des structures associées en fonction

de leur type d'insertion (modifié d'après Hong, 1988)

III-1-3 : Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'étude en microscopie électronique à balayage a été réalisée sur les branchies de *Segonzacia mesatlantica*, de *Bythograea therydron* et de *Cyanagraea praedator*. Les branchies, préalablement fixées dans du formol, sont rincées pendant 30 minutes dans une solution tampon à pH 7,4 contenant du cacodylate de sodium (0,2M), et du NaCl (1,75 %). Une post-fixation pendant 2 heures à température ambiante est effectuée dans une solution de tétr oxyde d'osmium contenant OsO₄ (1 %), du tampon cacodylate (0,1M) et NaCl (2,25 %). Les branchies sont rincées pendant 30 minutes avec le même tampon que précédemment puis elles sont déshydratées par passage de 15 minutes dans des bains d'éthanol de concentration croissante (25 %, 50 %, 70 % et 90 %) suivis de deux bains d'éthanol absolu pendant 30 minutes. Après un dernier bain dans de l'éthanol absolu (une nuit), les branchies sont déshydratées par la technique du point critique. Les échantillons, collés sur des porte-objets à l'aide d'une colle contenant de l'argent qui améliore la conduction, sont recouverts d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur. Les échantillons sont ensuite observés à l'aide d'un microscope à balayage JEOL JSM-5200.

Les branchies de *B. therydron* et *C. praedator* ont été observées par Sébastien Durand, encadré par Ann Andersen lors de son stage de maîtrise dans l'équipe Ecophysiologie de la Station Biologique de Roscoff.

III-1-4 : Microscopie électronique à transmission (MET)

Les branchies, préalablement fixées, sont rincées pendant 1 heure dans une solution tampon à pH 7,4 contenant du cacodylate de sodium (0,2M) et du NaCl (1,75 %). Une fixation à l'osmium est ensuite réalisée dans un tampon OsO₄ (1 %), du tampon cacodylate (0,1M) et NaCl (2,25 %). Les branchies sont à nouveau rincées pendant 1 heure à température ambiante puis elles sont déshydratées par passage de 15 minutes dans des bains d'éthanol de concentration croissante (25 %, 50 %, 70 % et 90 %) suivis de trois bains d'éthanol absolu pendant 10 minutes chaque. Les échantillons sont alors inclus dans un mélange à base d'Epon, résine non miscible à l'eau. Après polymérisation dans une étuve à 60°C pendant 48 heures pour leur durcissement, les blocs sont taillés en pyramide et les coupes sont réalisées

sur un ultra-microtome LEICA Ultracut LCT.

Les coupes semi-fines de 1µm, réalisées à l'aide d'un verre taillé sur un Knifemaker, sont collées par chauffage et colorées au bleu de toluidine 1 % (avec 1 % de borate de sodium) puis rincées et séchées. Elles ont été observées et photographiées au microscope photonique Leitz Laborlux D.

Les coupes ultrafines de 50 ou 60 nm, réalisées à l'aide d'un diamant DIATOME, sont posées sur des grilles en cuivre recouvertes de pioloforme (solution à 4 % dans du chloroforme). Elles sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds, 1963) et observées au microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200EX.

Cette étude a été effectuée sur les branchies de *B. thermydron* et de *C. praedator* par Sébastien Durand. Celle de *S. mesatlantica* n'a pu être réalisée car aucun échantillon n'a été correctement fixé pour cette technique lors d'une mission.

III-2/ Résultats

III-2-1 : Formules branchiales observées

Dans leur chambre branchiale délimitée par la carapace, *S. mesatlantica*, *B. thermydron*, *C. praedator* et *C. affinis* possèdent chacun neuf paires de branchies. La formule branchiale est identique pour ces quatre espèces et présentée dans le tableau III-1.

Tableau III-1 : Formule branchiale de quatre espèces de crustacés décapodes brachyours des sources hydrothermales. (Mxp α : maxillipède ; P α : patte locomotrice)

Péréiopodes	pe1	pe2	pe3	pe4	pe5	pe6
	Mxp1	Mxp2	Mxp3	P1	P2	P3
Epipodites	1	1	1	-	-	-
Pleurobranchie	-	-	-	-	1	1
Arthrobranchie	-	1	2	2	-	-
Podobranche	-	1	1	-	-	-

III-2-2 : Morphologie des branchies

Les quatre espèces de brachyours présentent des morphologies branchiales très similaires. L'observation sous la loupe binoculaire montre que les branchies sont de type phyllobranchie, c'est-à-dire formées d'une rangée de lamelles successives empilées autour d'un axe central, le raphé médian. La taille des lamelles diminue de la partie proximale vers la partie distale des branchies (Photo III-1).

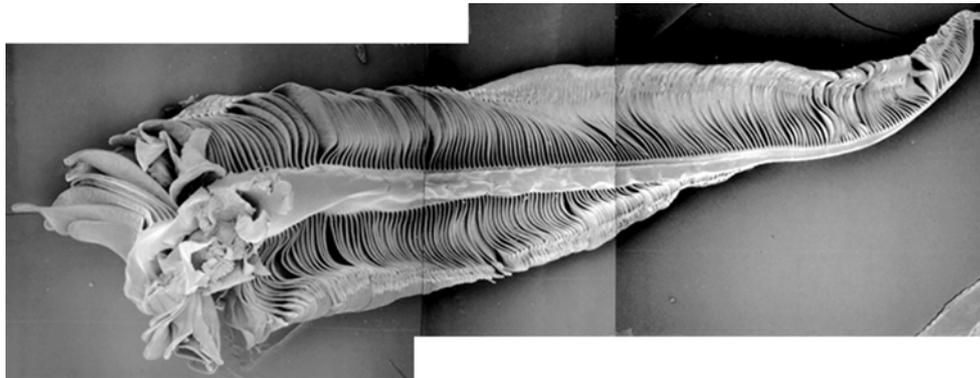


Photo III-1 : Vue en MEB d'une branchie de *Segonzacia mesatlantica* montrant l'empilement des lamelles branchiales autour du raphé médian et le vaisseau efférent. A gauche, se situe la partie proximale et à droite, la partie distale. Grossissement : x15.

A l'extrémité distale de la branchie, les lamelles apparaissent fusionnées alors qu'à l'extrémité proximale, elles sont bien distinctes les unes des autres. Le raphé médian est bordé par le vaisseau afférent orienté vers la carapace du corps et par le vaisseau efférent orienté vers la chambre branchiale (Photo III-2). Les branchies de la première paire (sur Mxp 1) sont les plus petites et celles de la sixième paire (sur P3) les plus grandes.

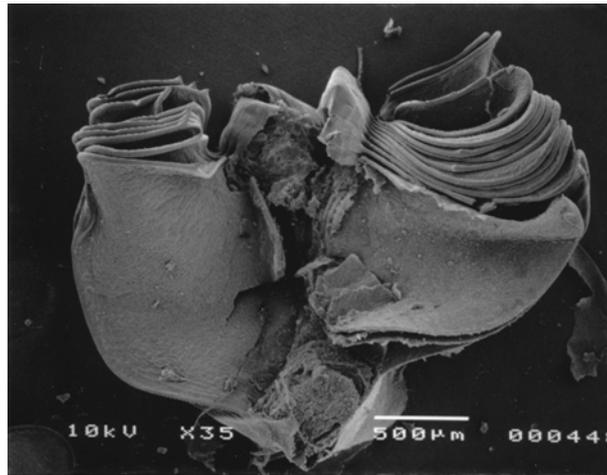


Photo III-2 : Détail en MEB d'une lamelle branchiale de *Segonzacia mesatlantica*. Le raphé médian sépare le vaisseau afférent (haut) du vaisseau efférent.

Une section transversale d'une lamelle branchiale montre la présence de deux couches épithéliales délimitant un espace intralamellaire dans lequel circule l'hémolymphe (Photo III-3). Des cellules piliers relient les deux faces de la lamelle en traversant l'hémocœle et évitent ainsi l'effondrement de la lamelle (Photo III-3). Un canal marginal limite le bord externe de la lamelle.

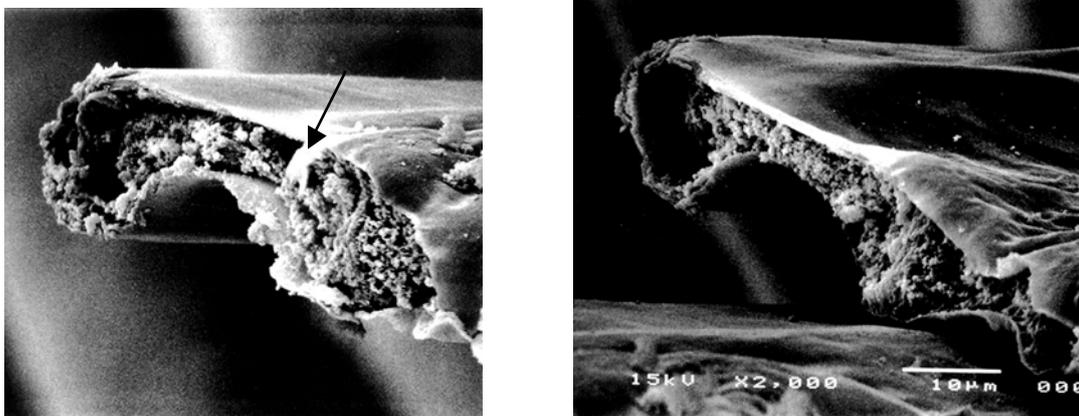
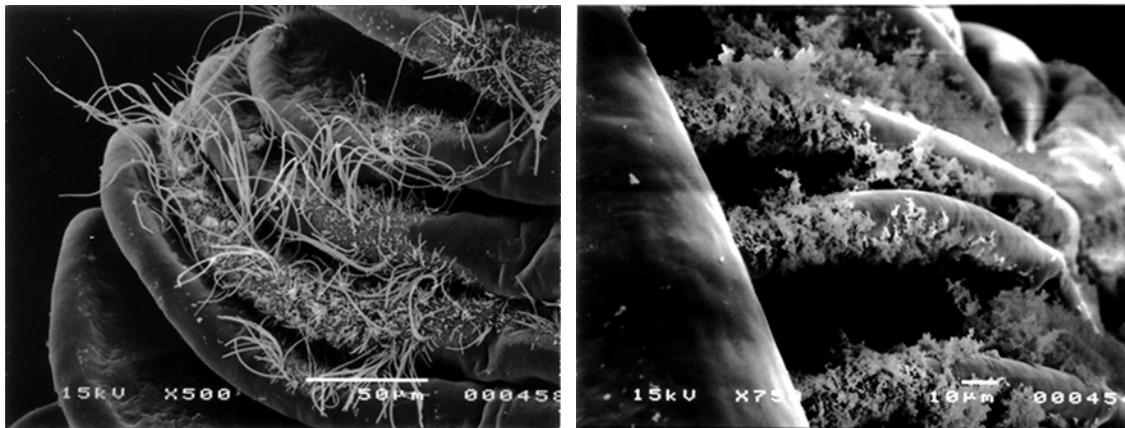


Photo III-3 : Section transversale d'une lamelle branchiale de *Segonzacia mesatlantica*, observée par MEB. On distingue une cellule pilier sur la première photo (grossissement : x2 000).

L'observation en MEB des branchies de *Segonzacia mesatlantica* et *Bythograea therydron* met en évidence la présence de bactéries sur la surface de certaines lamelles

(Photo III-4).

A



B

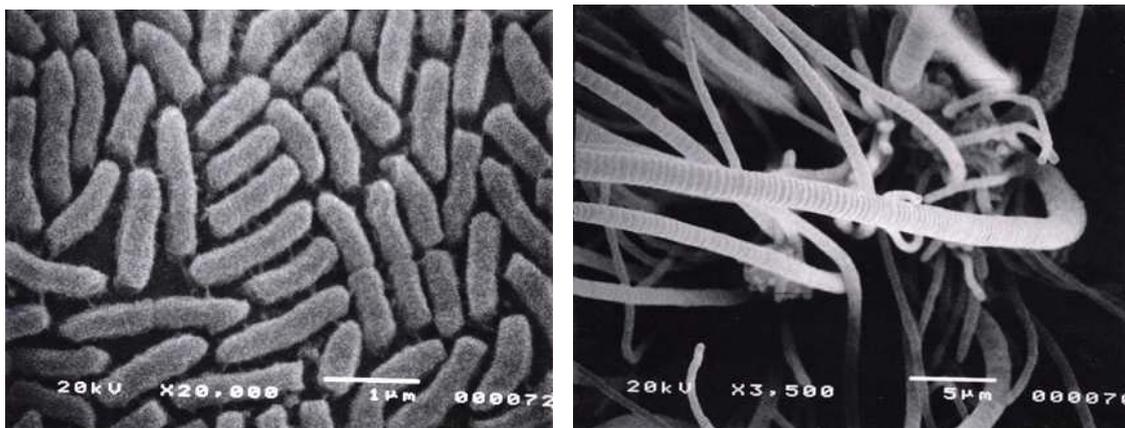


Photo III-4 : Différents types de bactéries épibiontes recouvrant certaines lamelles branchiales de *Segonzacia mesatlantica* (A) et de *Bythograea thermydron* (B).

La partie médiane du vaisseau efférent de ces deux espèces présente des soies alignées régulièrement le long de celui-ci (Photo III-5). Ces soies sont absentes des parties proximale et distale du vaisseau efférent. *Cyanograea praedator* et *Chaceon affinis* possèdent également le même type de soies alignées sur le vaisseau efférent de leurs branchies.

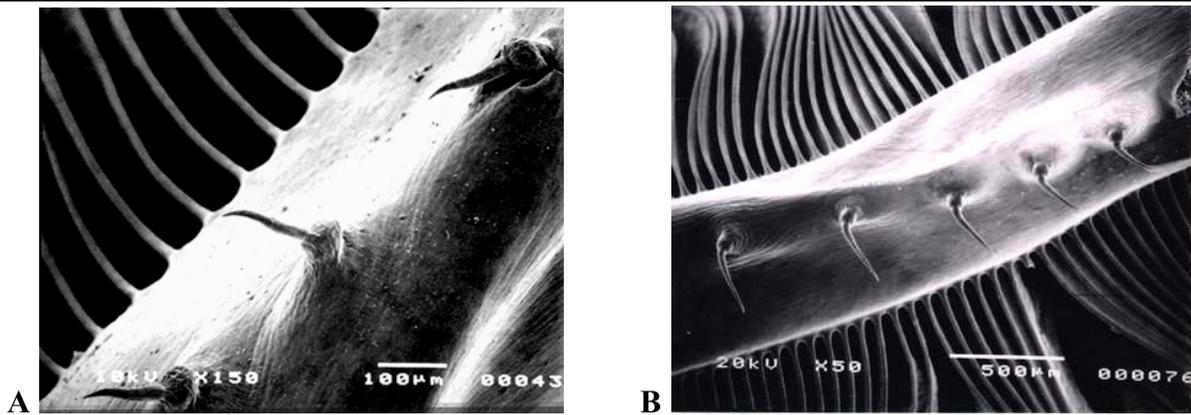


Photo III-5 : Soies se trouvant alignées sur le vaisseau efférent des branchies de *Segonzacia mesatlantica* (A) et *Bythograea thermydron* (B).

Le nombre de soies par branchie chez *B. thermydron*, *C. praedator* et *C. affinis* varie suivant la longueur du vaisseau efférent, et donc celle de la branchie : entre une dizaine pour les plus petites branchies jusqu'à une quarantaine pour les plus grandes. En revanche, les branchies se trouvant sur les épipodites ne portent pas de soies, et ce pour les trois espèces étudiées. Les soies de *Chaceon*, très nombreuses, présentent une distribution variable selon les branchies considérées. Les branchies situées au niveau des péréiopodes 3 et 6 portent des soies sur toute leur longueur, très serrées avec leurs bases quasi-jointives, tandis que les branchies des péréiopodes 4 et 5 portent des soies uniquement sur le quart proximal du vaisseau.

III-2-3 : Morphologie des soies

Chez *Bythograea*, les soies sont des expansions coniques, espacées régulièrement le long du vaisseau efférent. Elles sont non articulées et renflées à leur base (Photo III-6). En section transversale, elles mesurent environ 80 µm de diamètre à leur base et 30 µm de diamètre à mi-hauteur. L'apex a une surface de 2 µm². Elles font, en moyenne, 230 µm de longueur.

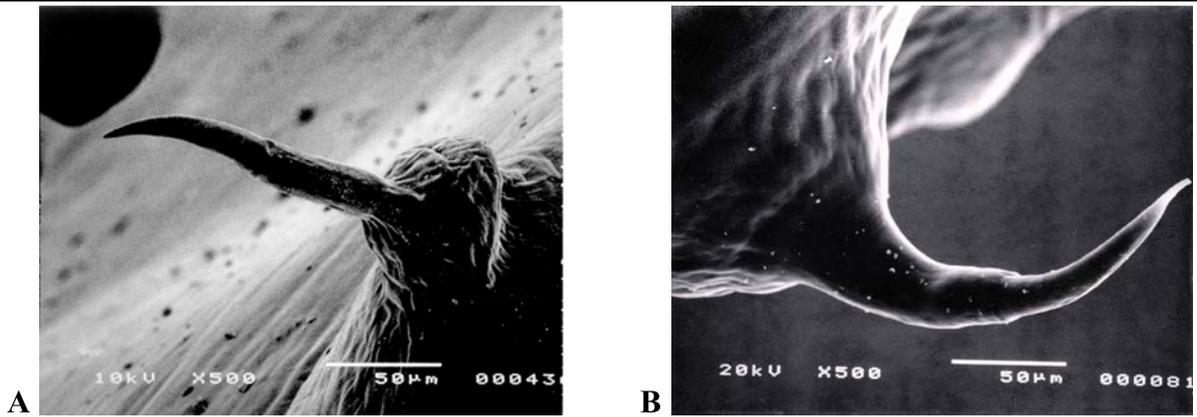


Photo III-6 : Détail des soies se trouvant sur le vaisseau efférent des branchies de *Segonzacia mesatlantica* (A) et *Bythograea thermydron* (B) montrant leur base renflée.

Vue de l'intérieur du vaisseau efférent, la soie apparaît évidée et en continuité avec le vaisseau (Photo III-7) ; elle est donc remplie d'hémolymphe. Un pore, de 1 µm de diamètre, est présent au niveau de l'apex (Photo III-8). La cuticule recouvrant la soie est relativement épaisse.

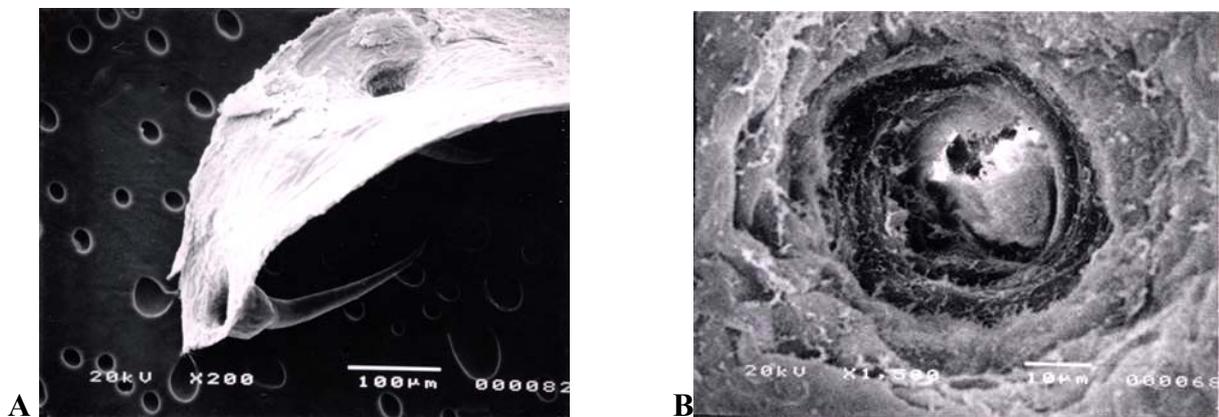


Photo III-7 : Vue interne du vaisseau efférent montrant l'insertion de soies creuses (A). Vue interne de la soie, montrant des cellules sanguines (B).

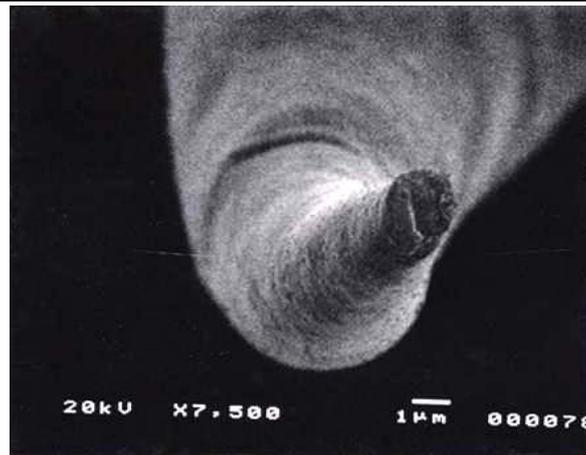


Photo III-8 : Détail du pore apical chez *Bythograea thermydron* (B).

L'observation en microscopie photonique de coupes tangentielles de la base des soies de *Cyanograea praedator* montre que la cuticule, très épaisse, est formée par plusieurs strates ondulées (Photo III-9). Des cellules sanguines sont visibles dans la zone centrale de la soie, ou médulla (Photo III-10). Une couche membraneuse puis l'épiderme qui la sécrète sont observés sous la cuticule (Photo III-11).

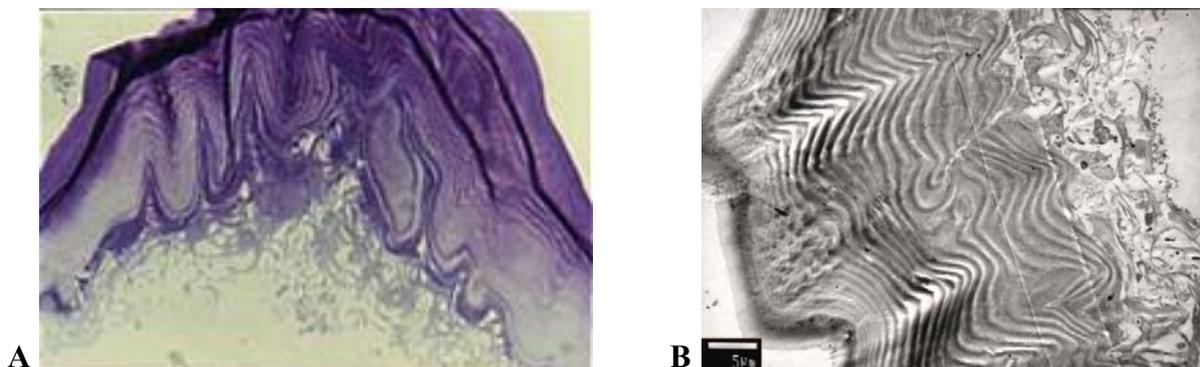


Photo III-9 : Coupe tangentielle en microscopie photonique (A) et MET (B) de la base d'une soie de *Cyanograea praedator* montrant les ondulations de la cuticule.

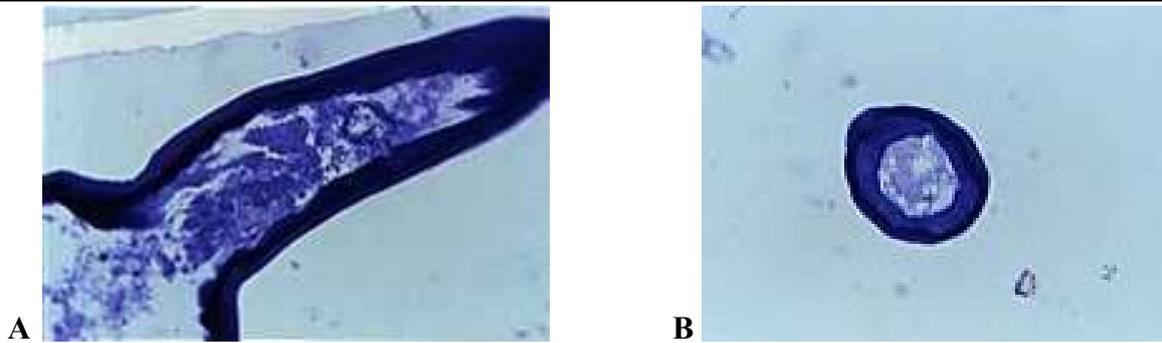


Photo III-10 : Coupes sagittale (A) et transversale (B) en microscopie photonique d'une soie de *Bythograea therydron*. On distingue les trois couches de la cuticule ainsi que l'hémolymphe située à l'intérieur de la soie.

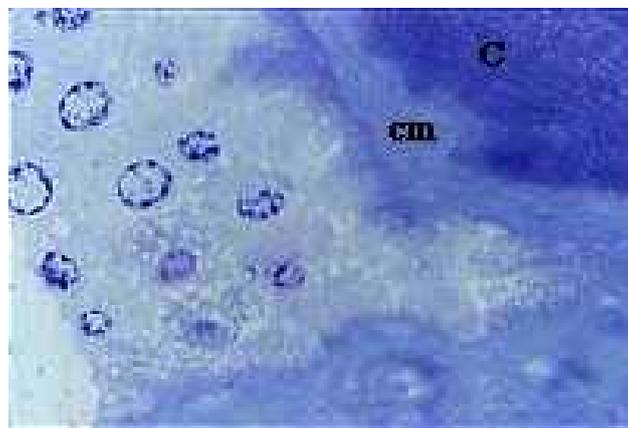


Photo III-11 : Structure en microscopie photonique de l'épiderme d'une soie de *Bythograea therydron*, séparé de la cuticule (C) par une couche membraneuse (cm). Les cellules de l'épiderme ont une forme hexagonale. La chromatine de leur noyau apparaît colorée en bleu.

La photo III-12 présente la section basale d'une soie en MET avec la succession des différentes couches formant la cuticule. De l'extérieur vers l'intérieur, on observe :

- l'épicuticule, fin liseré périphérique, en contact avec le milieu extérieur,
- l'exocuticule, formée de la couche pigmentaire avec des ondulations marquées de la cuticule, d'environ 1 à 1,5 μm d'épaisseur,
- l'endocuticule, d'environ 2 à 3 μm d'épaisseur, qui peut être plus ou moins minéralisée,
- la couche membraneuse sombre, d'environ 1 μm d'épaisseur.

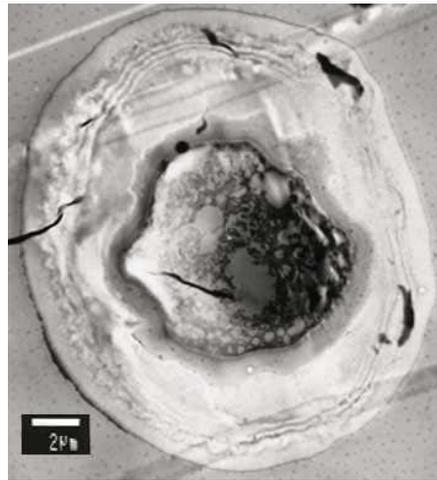


Photo III-12 : Section basale de la soie montrant la succession des différentes couches de la cuticule et l'intérieur de la soie.

L'observation fine de la cuticule en MET permet ainsi d'identifier toutes les couches cuticulaires et notamment la présence d'une couche membraneuse qui nous renseigne sur le stade d'intermue du crabe. Les crabes étudiés étaient au stade C4, stade d'intermue ou stade de repos tégumentaire qui peut être très long chez les animaux âgés dont le cycle de mue est ralenti, ou chez les animaux dont la mue est saisonnière (Vernet et Charmantier-Daures, 1994).

La médulla contient de l'hémolymphe et présente un aspect granulaire, de densité électronique moyenne avec des vésicules claires (Photos III-12, III-13). En périphérie, se trouvent des structures nerveuses plutôt arrondies, d'environ $0,5 \times 1 \mu\text{m}$, entourées d'une double membrane, et contenant une ou plusieurs dendrites (Photo III-13). A l'intérieur de la dendrite, on observe des sections de microtubules mesurant environ 15 nm de diamètre (Photo III-13).

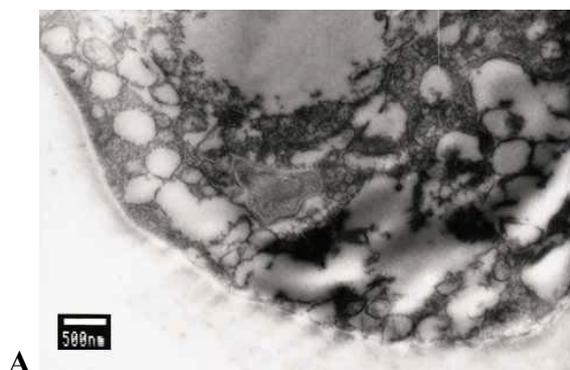


Photo III-13 : Structure nerveuse se trouvant en périphérie de la médulla de la soie (A). Grossissement de cette structure nerveuse, montrant la double membrane qui l'entoure (B). On distingue trois dendrites, avec des sections des microtubules.

III-3/ Discussion

Les quatre espèces étudiées présentent une structure classique de branchies de Brachyoures, de type phyllobranchie avec une formule branchiale identique à celle de nombreux brachyoures marins et d'eau douce (e.g. Martinez *et al.*, 1999). Les branchies sont formées de plusieurs éléments répétés, en forme de lamelles. Ces lamelles, relativement serrées, présentent des dilatations périphériques qui permettent le maintien de l'espace entre elles, et donc la circulation d'eau. Par rapport aux autres types de branchies, dendrobranchies et trichobranhies, cette organisation en lamelles permet d'augmenter la surface d'échange pour la respiration et l'osmorégulation. Il semble que la structure interne des lamelles soit semblable à celle des espèces littorales, avec la présence de cellules piliers qui traversent l'hémocœle, pour soutenir l'épiderme lamellaire (Photo III-3).

Certaines lamelles branchiales sont recouvertes de bactéries en bâtonnets ou filamenteuses (Photo III-4). C'est un phénomène courant, observé par exemple chez *Carcinus maenas*, sans que le rôle précis de ces bactéries ne soit connu (Goodman et Cavey, 1990). S'agit-il d'un simple dépôt bactérien, ou bien ces bactéries jouent-elles un rôle biologique précis, comme la détoxification des métaux ? En tout cas ce phénomène n'a rien de comparable avec ce que l'on observe chez *Rimicaris exoculata*, les crevettes de la MAR, qui présentent une hypertrophie des épipodites des pièces buccales et de la chambre branchiale associée à la présence de nombreuses bactéries. Celles-ci constitueraient chez cette espèce une source importante de nourriture (Gebruk *et al.*, 1993).

Une particularité de la structure des branchies des crabes hydrothermaux, mise en évidence au cours de notre étude, est la présence de soies, disposées régulièrement sur le vaisseau efférent (Photo III-5). Le vaisseau efférent, orienté vers l'extérieur de la chambre branchiale, est le plus exposé au milieu extérieur. Les soies sont, à proprement parler, des épines car elles ne sont ni articulées, ni flexibles (Watling, 1989). Elles sont creuses et contiennent des cellules sanguines (Photo III-7). On observe également ce type d'épines chez *Chaceon affinis*, mais elles ne présentent pas la distribution régulière observée chez les crabes

hydrothermaux.

Une étude précise de ces structures n'a été réalisée que chez *Bythograea thermydron*. En périphérie de la médulla de l'épine, des structures nerveuses sont présentes (Photo III-13). Elles contiennent une ou deux dendrites entourées d'une enveloppe et remplies de microtubules dispersés. Ces éléments confèrent probablement un rôle sensoriel à ces épines. La base de l'épine n'étant pas articulée et vue l'épaisseur de la cuticule, il est peu probable que celle-ci joue un rôle de mécanorécepteur. En revanche, la présence d'un pore apical en continuité avec la lumière interne de la soie permet une communication entre les microtubules et l'environnement (Photo III-8). Ce type de pore est généralement observé dans les chimiorécepteurs (Chaigneau, 1994). La présence également de microtubules, dispersés et peu nombreux, confirmerait le rôle de chimiorécepteur de ces épines. Les chimiorécepteurs des crustacés ont des dendrites qui sont souvent groupées par deux dans la lumière des épines, alors que les corps cellulaires sont situés dans l'hypoderme (Flegenhauer, 1992). Lors de notre étude, le prélèvement des épines isolées n'a pas permis la localisation des cellules sensorielles au niveau de l'hypoderme.

La présence d'épines a également été détectée sur le vaisseau efférent des branchies de *Carcinus mediterraneus* de la lagune de Venise (Dalla Venezia *et al.*, 1992) et de *Carcinus maenas* de la côte Est des Etats-Unis (Goodman et Cavey, 1990). Cependant, nous n'avons pas observé de telles épines sur plusieurs échantillons de *Carcinus maenas* que nous avons prélevés à Roscoff (observation personnelle). Chez *C. mediterraneus*, les épines recouvrant de façon irrégulière le vaisseau efférent sont considérées comme des éléments de stabilité mécanique, mais aucune fonction physiologique ne leur est attribuée. Goodman et Cavey (1990) suggèrent par contre que ces projections pourraient avoir un rôle sensoriel, en raison de la présence de bulbes de neurites et de la proximité de vaisseaux sanguins. Laverack et Saier (1993) ont observé deux types d'épines le long du rachis branchial chez la langoustine *Nephrops norvegicus* : des petites épines alignées et de grandes plus éparses. La présence de neurones à proximité de la base des petites épines permet d'attribuer une fonction sensorielle à ces structures chez cette espèce : ils agiraient comme récepteurs à oxygène. En revanche, les grandes épines ne présentent pas d'innervation et n'auraient donc pas de rôle sensoriel. Les auteurs supposent qu'elles aident à maintenir les branchies libres de particules ou qu'elles altèrent le flux d'eau à travers le rachis branchial. Des épines ont également été observées chez *Ucides cordatus*, crabe des mangroves américaines (Martinez *et al.*, 1999). Ces épines

sont similaires aux cônes du homard, *Homarus gammarus* (Laverack et Barrientos, 1995).

L'existence de chimiorécepteurs sur le vaisseau efférent des branchies de crustacés hydrothermaux leur permettrait de connaître très rapidement leur environnement, et d'adopter un comportement en conséquence : éviter la toxicité éventuelle du fluide ou rechercher des zones oxygénées. Cependant, les observations faites chez *Bythograea thermydron* ne peuvent pas être généralisées aux autres espèces. Seule une étude détaillée des épines chez chacune des espèces permettra de déterminer le rôle éventuel de ces structures. Des études de réponses physiologiques seraient également nécessaires pour connaître le stimulus chimique de ces chémo-récepteurs, comme cela a été fait chez *Rimicaris exoculata* (Renninger *et al.*, 1995). Chez cette espèce, il a été montré que des épines sur les antennes jouaient le rôle de récepteurs aux sulfures qui pourraient servir aux crevettes pour se diriger dans les gradients de concentrations en sulfures présents au niveau des sources hydrothermales.

Il reste donc à caractériser plus précisément les structures sensorielles mises en évidence chez *Bythograea thermydron* et à déterminer, si ce sont effectivement des chimiorécepteurs, à quelle substance ils sont sensibles. Il serait également intéressant d'étudier les soies de toutes les espèces étudiées au cours de ce travail afin de voir s'il s'agit de chimiorécepteurs ou si ce sont plutôt des éléments de stabilité mécanique (Dalla Venezia *et al.*, 1992).

III-4/ Conclusion

Les branchies de crustacés décapodes hydrothermaux apparaissent similaires à celles des crustacés côtiers. Ce travail constitue une étude préliminaire. Dans un contexte d'étude physiologique de la respiration, il serait intéressant et nécessaire de mesurer la surface branchiale ainsi que l'épaisseur des membranes des branchies des crustacés hydrothermaux. Outre des informations sur une éventuelle adaptation morphologique à l'habitat hydrothermal, ces données pourraient nous renseigner sur le style de vie et l'activité de ces espèces, comme cela a été fait pour des espèces de crabes littoraux (Johnson et Rees, 1988).

La présence de chimiorécepteurs sur le vaisseau efférent des branchies du crabe *Bythograea thermydron* est plausible. En effet, l'étude en MET de l'épine de la langoustine *Nephrops norvegicus*, qui vit dans des milieux vaseux et donc potentiellement hypoxique et

riche en H₂S, montre la présence de structures dendritiques comparables mais gainées de cellules enveloppantes épaisses sous la cuticule (Laverack et Saier, 1993). Les auteurs proposent que ces épines forment un système de détection des gaz, probablement l'oxygène. Des chimiorécepteurs sensibles aux sulfures ont également été mis en évidence chez *Rimicaris exoculata* (Renninger *et al.*, 1995). De tels récepteurs pourraient permettre à *Bythograea thermydron* de détecter rapidement les gaz présents dans son environnement, tels que l'O₂ ou l'H₂S, et ainsi d'adapter son comportement aux conditions environnementales. Si une structure sensorielle était mise en évidence chez *Cyanograea praedator* et *Segonzacia mesatlantica*, elle constituerait une adaptation anatomique à un milieu hypoxique et/ou riche en H₂S, deux paramètres importants de la physiologie respiratoire des crustacés.

IV – RESPIRATION ET PIGMENTS

RESPIRATOIRES

Le concept de respiration a évolué au cours du temps. Au XVII^e siècle, les biologistes travaillaient surtout sur la circulation du sang. A partir du XVIII^e siècle, les travaux sur la respiration se développent avec la découverte du dioxyde de carbone en 1757 par Joseph Black. À cette époque, le concept de respiration correspondait à la ventilation pulmonaire, c'est-à-dire à la respiration externe. En 1774 et 1775, Lavoisier et Priestley découvrent l'oxygène. Entre 1775 et 1779, Lavoisier assimile les phénomènes chimiques de la respiration aux phénomènes de combustion. De nos jours, les biologistes ont conservé la définition de respiration de Lavoisier, à savoir, l'ensemble des échanges gazeux entre l'organisme et son milieu environnant, avec comme corollaire la déduction de l'énergie produite par la mesure de l'O₂ consommé. Au XIX^e siècle, Spallanzani et Edwards montrent que la consommation d'O₂ et la production de CO₂ ont lieu au niveau des tissus et que la respiration est un phénomène cellulaire. Les travaux de Pasteur, en 1861, sur les fermentations complètent ces données fondamentales en établissant l'existence des processus aérobies et anaérobies du métabolisme cellulaire.

La respiration aérobie est définie par les biochimistes comme un ensemble de réactions intracellulaires productrices d'énergie, dans lesquelles l'oxydation des composés libère des atomes d'hydrogène acceptés par les atomes d'oxygène. La respiration anaérobie diffère par les accepteurs d'hydrogènes qui peuvent être des nitrates, des nitrites, ou des sulfates. Les animaux qui manquent d'O₂ peuvent tirer leur énergie de la fermentation. Les composés de la fermentation agissent à la fois comme substrats oxydables et comme agents oxydants.

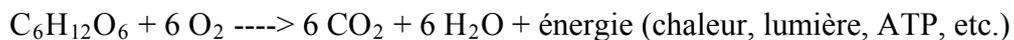
Les physiologistes reconnaissent le processus respiratoire dans l'ensemble de ces définitions puisque l'organisme vivant est considéré comme un système de transfert d'O₂ et de CO₂, avec production d'énergie dans les cellules. L'O₂ et le CO₂ sont transmis soit par diffusion, soit par convection à travers différentes structures et différents compartiments entre

les cellules et le milieu environnant, que ce soit l'air ou l'eau.

IV-1/ La respiration

IV-1-1 : Généralités

La plus grande part de l'énergie nécessaire aux êtres vivants provient de réactions chimiques qui consomment de l'O₂ et qui produisent du CO₂. Cette double opération schématise la respiration, fonction cellulaire universellement répandue, exception faite des organismes strictement anaérobies. Les carbohydrates, en particulier le glucose, fournissent généralement cette énergie, selon la réaction suivante :



Les organismes aérobies puisent leur énergie à deux sources principales : l'oxydation qui en libère de grandes quantités et la fermentation anaérobie qui a un rendement beaucoup plus faible. Les organismes unicellulaires réalisent leurs échanges gazeux directement avec le milieu extérieur alors que les cellules des organismes pluricellulaires ne peuvent les accomplir qu'avec le milieu intérieur environnant les cellules, le liquide interstitiel. Ce milieu intérieur, continuellement appauvri en O₂ et enrichi en CO₂, deviendrait rapidement impropre à la vie si la fonction circulatoire n'en assurait le renouvellement local et le transport vers des surfaces de régénération. Circulation et respiration apparaissent ainsi comme indissociables sur le plan fonctionnel.

IV-1-2 : Le processus respiratoire

La respiration est un processus complexe qui met en jeu plusieurs étapes : la fixation d'O₂, son transport et l'élimination du CO₂.

La consommation d'O₂ est proportionnelle à la variation de pression partielle en O₂, le facteur de proportionnalité étant appelé conductance :

$$\dot{M}_{\text{O}_2} = G \cdot \Delta P$$

\dot{M}_{O_2} : consommation d'O₂

G : conductance

ΔP : variation de pression partielle en O_2

Ce formalisme a été introduit par Rahn en 1966 et par Piiper et ses collaborateurs en 1971. Le transfert des gaz se fait par des processus de diffusion et de convection, la conductance différant selon les cas :

- convection du milieu extérieur au contact des surfaces d'échange qui correspond à la ventilation branchiale ou pulmonaire, la conductance est alors : $G = \dot{V}_w \cdot \alpha_g$ (avec \dot{V}_w le débit d'eau et α_g la solubilité du gaz),

- convection des liquides intérieurs qui assure le transport des gaz entre les organes de la respiration externe et les cellules, la conductance est alors : $G = \dot{V}_b \cdot \beta_b$ (avec \dot{V}_b le débit du sang et β_b la capacitance du sang).

Pour la diffusion, la conductance est égale à : $G = (A \cdot D / E) \cdot \beta$ (avec A, la surface branchiale ; D, le coefficient de diffusion ; E, la distance de diffusion).

Dans ce transport circulatoire, l'oxygène se trouve en partie sous forme dissoute, mais sa faible solubilité dans les liquides physiologiques limite rapidement la quantité de gaz pouvant être ainsi transportée. Pour augmenter la capacité de transport du système, certaines espèces appartenant à tous les phylums du règne animal depuis l'apparition des cœlomates, ont développé une métalloprotéine, appelée pigment respiratoire, qui permet à l' O_2 de se combiner de façon réversible. Ainsi, la capacitance du sang pour l' O_2 (β_{bO_2}) augmente par rapport à la solubilité strictement physico-chimique de l' O_2 dans le sang ($\beta_{bO_2} > \alpha_{bO_2}$).

IV-2/ Les pigments respiratoires

Les pigments respiratoires sont des macromolécules spécialisées des fluides corporels circulants, dont la principale fonction est la fixation réversible (transport) de l' O_2 . La fonction de base de ces molécules est de compenser la faible solubilité de l'oxygène libre dans les milieux aqueux. En relation avec la convection du fluide extracellulaire, les pigments diminuent la distance de diffusion effective entre la source d' O_2 environnementale et l'intérieur des mitochondries. Ce sont des protéines intracellulaires ou extracellulaires capables de lier réversiblement l' O_2 et d'augmenter ainsi considérablement (jusqu'à cent fois) la capacité de transport de ce gaz par le sang. Au cours de l'évolution, sont apparues trois grandes catégories de transporteurs d' O_2 dont les couleurs tout à fait caractéristiques leur ont

valu le nom de « pigments » (Figure IV-1) :

- l'hémoglobine (Hb) : pigment le plus familier avec sa couleur rouge typique, il est présent dans la plupart des phylums ; la chlorocruorine, très proche de l'Hb, est un pigment vert que l'on rencontre chez quatre familles d'annélides polychètes ;
- l'hémérythrine (Hr) : de couleur rose, ce pigment apparaît dans le règne animal d'une façon plus sporadique (sipunculien, brachiopodes et priapulides) ;
- l'hémocyanine (Hc) : pigment bleu, on le rencontre chez certains mollusques et arthropodes.

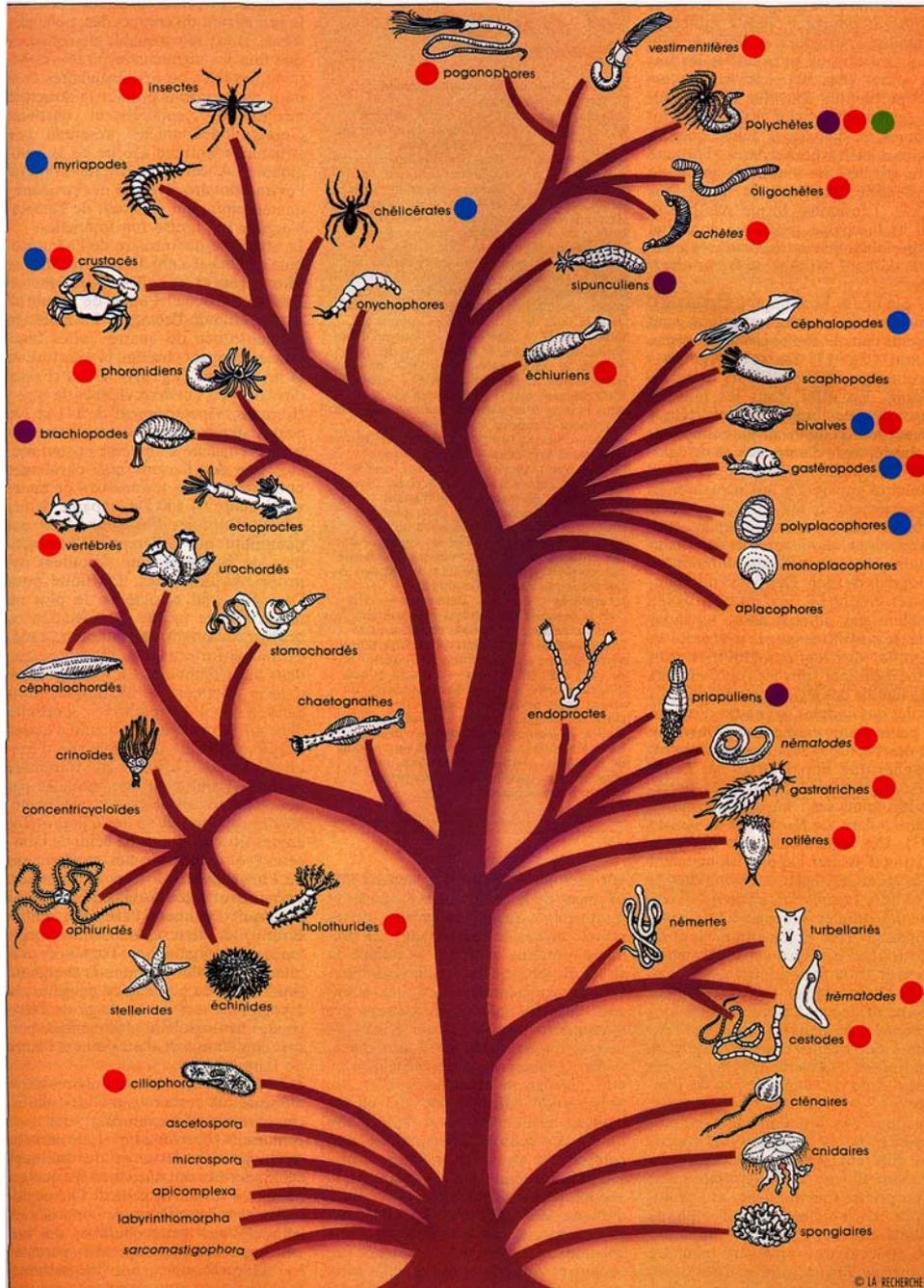


Figure IV-1: Distribution des pigments respiratoires dans les principaux phylums et classes du règne animal (d'après Toulmond et Truchot, 1993). La couleur des points indique la nature du pigment respiratoire éventuellement présent: rouge pour les hémoglobines, vert pour les chlorocruorines, violet pour les hémérythrines et bleu pour les hémocyanines. L'absence de point signifie qu'aucun pigment n'a été détecté jusqu'à présent. Inversement, la présence de point ne signifie pas que tous les représentants du groupe considéré possèdent le pigment signalé.

IV-2-1 : Site actif

Tous les transporteurs d'O₂ sanguins sont des métalloprotéines, c'est-à-dire des protéines dont la structure possède un ou plusieurs atomes métalliques, sur lesquels se fixent la ou les molécules d'O₂ (Tableau IV-1). Le métal utilisé peut-être soit du fer (Hb, Hr), soit du cuivre (Hc). Le métal est soit lié directement à la chaîne polypeptidique via un ou plusieurs acides aminés (le plus souvent l'histidine) (Hr, Hc), soit logé au centre d'une protoporphyrine (Hb). Le site de fixation de l'O₂ est totalement différent dans chaque protéine. Les Hb possèdent un atome de fer unique associé à une protoporphyrine ; dans les Hr, deux atomes de Fe(II) sont liés à la chaîne d'acides aminés tandis que dans les Hc, ce sont deux atomes de cuivre (I) qui sont fixés directement sur la chaîne polypeptidique.

Tableau IV-1 : Propriétés des protéines de liaison de l'oxygène chez les Invertébrés (modifié d'après Van Holde, 1997/98)

Classe de protéines	Site de liaison	Couleur	Localisation	Caractéristiques moléculaires	Revue s récentes
Hémoglobines (incluant érythrocytes, chlorocruorines)	Hème à Fe Fe(II)	Rouge (vert)	Intracellulaire	Chaînes de globine monomériques à tétramériques	Riggs, 1991 Lamy <i>et al.</i> , 1996
Hémérythrine	Fe ₂ Fe(II)→Fe(III)	Violet-rouge	Intracellulaire	Trimères ou octamères de petites sous-unités	Terwilliger, 1992 Kurtz, 1992 Hendrickson <i>et al.</i> , 1995
Hémocyanines (arthropodes)	Cu ₂ Cu(I)→Cu(II)	Bleu (quandoxy)	Extracellulaire	Multi sous-unités, très grande ; construites à partir de motifs d'hexamères	VanHolde and Miller, 1995 VanHeel and Dub e, 1994
Hémocyanines (mollusques)	Cu ₂ Cu(I)→Cu(II)	Bleu (quandoxy)	Extracellulaire	Très grande, construite à partir de grandes sous-unités multidomaines. Motifs en décimères.	VanHolde and Miller, 1995

IV-2-2 : Structure quaternaire

Les transporteurs d'O₂ présentent des structures quaternaires très diverses. Deux grands types de structure existent :

- des monomères ou polymères liés de façon covalente ou non. Par exemple, la glycère possède une hémoglobine monomérique alors que certaines annélides possèdent des hémoglobines extracellulaires polymériques avec 144 sites de liaison de l'O₂ et certains arthropodes possèdent des polymères d'hémocyanines avec 6 à 48 sites de liaison de l'O₂.
- des polypeptides multidomaines, tels que les hémocyanines de mollusques (7 à 8 domaines), qui peuvent eux-mêmes s'associer en polymères (70 à 160 sites de liaison de l'O₂).

La formation de structures polymériques ou multidomaines confère aux hémoglobines et aux hémocyanines des propriétés de coopérativité de liaison de l'O₂. En revanche, la plupart des hémérythrine ne possède pas cette propriété.

IV-3/ Les hémocyanines (Hc)

Le terme hémocyanine fut utilisé pour la première fois en 1878 par un savant Belge Léon Fredericq qui travaillait sur le sang du poulpe, *Octopus vulgaris* à la Station Biologique de Roscoff. Il nota que ce pigment présentait une couleur bleue sous forme oxy-Hc, couleur due à la présence de cuivre dans la molécule, et était incolore sous forme déoxy-Hc. La couleur bleue est à l'origine du mot hémocyanine : du grec *haima*, sang et *cyanos*, bleu. Les Hc sont largement répandues chez les arthropodes et les mollusques, qui peuvent aussi posséder de l'hémoglobine (Van Holde et Miller, 1982). Les Hc sont toujours présentes sous forme libre dans le sang. Contrairement aux hémoglobines et aux hémérythrine, les Hc de mollusques ou d'arthropodes ne se présentent pas sous forme monomérique. Il existe de la myoglobine et de la myohémérythrine mais pas de *myohémocyanine* si bien que ce pigment respiratoire n'a pas de rôle de stockage tissulaire de l'oxygène. Bien que la structure du site actif de l'Hc soit similaire chez les mollusques et chez les arthropodes, une paire d'atome de cuivre par site de liaison de l'O₂, leur structure quaternaire est totalement différente.

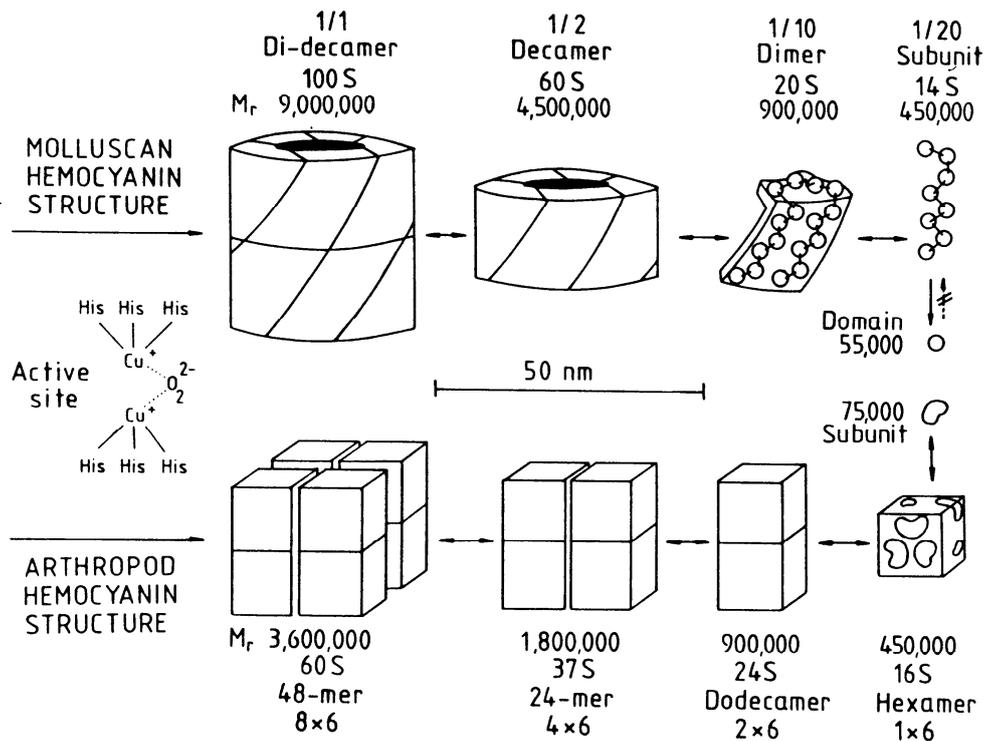


Figure IV-2 : Structures quaternaires principales des hémocyanines. Les flèches indiquent la dissociation en pH alcalin et réassociation à pH neutre. Le clivage des sous-unités d'hémocyanines de mollusques qui nécessite une protéolyse est irréversible. Chaque domaine de l'hémocyanine de mollusques et chaque sous-unité de l'hémocyanine d'arthropodes comportent un seul site actif contenant une paire d'atomes de cuivre qui lie une molécule d'oxygène. Mr : poids moléculaire ; S : coefficient de sédimentation ; His : histidine (D'après Markl, 1987).

IV-3-1 : Les hémocyanines de mollusques

Les hémocyanines sont présentes dans quatre classes de mollusques parmi les huit existantes. Probablement toutes les espèces de polyplacophores, la majorité des espèces de gastéropodes, parmi les bivalves les protobranches primitifs (Morse *et al.*, 1986) et toutes les espèces de céphalopodes en possèdent. L'Hc est une protéine extracellulaire, dissoute dans l'hémolymphe. Il a été plus difficile de définir le lieu de synthèse de l'Hc car elle est présente sous forme dissoute dans les liquides corporels. De plus, il semble que le site de synthèse de l'Hc varie suivant les espèces.

IV-3-1-1/ Structure moléculaire

Les Hc de mollusques sont constituées d'une ou plusieurs unités décāmériques formées de chaînes polypeptidiques ou sous-unités (Figure IV-2). Ces sous-unités sont organisées en séries de régions globulaires qui, en microscopie électronique, apparaissent comme des colliers de 7 perles (chez les octopodes) ou 8 (chez les autres groupes). Chacune de ces perles représente une unité fonctionnelle de liaison avec l'O₂ de 50-55 kDa. Les unités fonctionnelles ne sont pas identiques entre elles, même au sein d'une sous-unité. Les méthodes immunologiques permettent de les différencier. Les sous-unités peuvent être clivées par protéolyse en unités fonctionnelles. Le décāmère (4,5.10⁶ Da) est de forme cylindrique creuse d'environ 350 Å de diamètre, fermé partiellement à l'une de ses extrémités par un collet (Figure IV-2). Cet agrégat est stabilisé par les ions divalents et par l'hydrogène. Chez les polyplacophores et les céphalopodes, les molécules d'Hc sont présentes sous cette forme décāmérique. Dans le cas des bivalves et de certains gastéropodes, on observe souvent des doubles décāmères (9.10⁶ Da) qui sont formés de deux cylindres décāmériques disposés bout à bout avec de petits collets à chaque extrémité qui ferment le cylindre. Certains gastéropodes présentent des assemblages plus importants, ressemblant à des tubes creux. Toutefois, la taille maximale de ces agrégats demeure incertaine car les mesures s'effectuent rarement dans les

conditions physiologiques.

Le site actif de chaque unité fonctionnelle de l'Hc possède deux atomes de cuivre, appelés cuivre A et cuivre B. Chez les mollusques, ces deux sites sont totalement différents. En effet, leur unité fonctionnelle résulterait de la fusion d'un gène contenant la séquence du site B avec un autre gène, contenant la séquence du site A. Seule la région autour du site B présente des similarités structurales avec les Hc d'arthropodes. La région du site A présente des similarités de structure avec les tyrosinases, ce qui laisse supposer un ancêtre commun à ces deux classes de protéines (Lerch *et al.*, 1986 ; Drexel *et al.*, 1987 ; Lerch et German, 1988).

IV-3-1-2/ Propriétés fonctionnelles

La capacité oxyphorique de l'hémolymphe des mollusques possédant de l'Hc est faible chez les polyplacophores, de faible à modérée chez la plupart des gastéropodes et chez *Nautilus*, et un peu plus élevée chez les plus grands céphalopodes (Mangum, 1992).

Les Hc de mollusques sont beaucoup moins connues, au niveau physiologique, que les Hc d'arthropodes. Cependant, elles ne semblent pas posséder certaines des propriétés permettant une bonne adaptation de nombreux crustacés à leur environnement. Les seules fonctions connues des Hc de mollusques sont le transport de gaz et la régulation de l'équilibre acido-basique du sang. Ce pigment peut transporter quantitativement beaucoup plus d'O₂, au moins celui des gastéropodes et des céphalopodes, que celui de n'importe quel autre groupe animal, y compris les vertébrés. Seules quelques généralisations peuvent être faites concernant les Hc de mollusques :

1/ elles ne sont pas sensibles aux effecteurs organiques et leurs propriétés fonctionnelles ne sont pas modifiées par la dialyse (Mangum, 1983b ; Miller et Mangum, 1989) ;

2/ elles sont sensibles à la composition en ions inorganiques du milieu (Mangum et Lykkeboe, 1979) ;

3/ toutes les Hc de mollusques étudiées sont sensibles au CO₂, même si cet effet est indirect chez le gastéropode *Busycon canaliculatum* (Mangum et Burnett, 1986) et probablement chez d'autres espèces (Miller et Mangum, 1989). Alors que le CO₂ moléculaire n'a pas d'effet connu, les ions bicarbonate fixent les cations divalents, et par conséquent,

augmentent l'affinité pour l'O₂.

IV-3-2 : Les hémocyanines d'arthropodes

Les hémocyanines sont présentes dans la plupart des taxons vivants d'arthropodes. Elles sont très répandues à la fois chez les crustacés et les chélicérates aquatiques et terrestres. Elles étaient vraisemblablement présentes chez le groupe éteint des Trilobites, exclusivement marins, composé d'animaux de grande taille. Chez les insectes, les Hc semblent avoir été perdues lorsque le système trachéal a commencé à se développer et à se connecter directement aux tissus. Protéines extracellulaires, comme pour les mollusques, il n'existe pas de cellules contenant d'Hc.

IV-3-2-1/ Structure moléculaire

Les Hc d'arthropodes, apparues indépendamment des Hc de mollusques, présentent une structure quaternaire conservée entre les différents taxons. Les Hc d'arthropodes sont constituées de chaînes polypeptidiques de 75 000 Da environ (Figure IV-2). Chacune des sous-unités possède un site actif, contenant une paire d'atomes de cuivre qui fixe la molécule d'O₂. Les atomes de cuivre sont directement liés à la chaîne polypeptidique par l'intermédiaire de six histidines (Figure IV-2). Les sous-unités comprennent environ 620 acides aminés chez les chélicérates et 660 chez les crustacés. Des analyses de séquences ont montré une homologie élevée des sous-unités entre les chélicérates et les crustacés. Par exemple, il y a environ 33 % de similarité entre la séquence d'une des sous-unités de l'Hc de l'araignée, *Eurypelma californicum* et celle de la langouste, *Panulirus interruptus*, bien que ces deux espèces aient divergé il y a plus de 600 millions d'années (Linzen *et al.*, 1985b). Les sous-unités, en forme de « haricot » (Figure IV-2), sont composées de trois domaines très distincts structuralement (Figure IV-3). Le domaine 1 se caractérise par la présence d'hélices α et pourrait avoir un rôle important dans la coopérativité lors de la liaison de l'oxygène. Le domaine 2 est localisé au centre de la sous-unité et comporte la paire d'atomes de cuivre. Une molécule d'O₂ peut se lier de façon réversible entre les atomes de cuivre, désignés sous les noms Cu(A) et Cu(B). Chaque atome de cuivre est très fortement complexé avec le groupement imidazole de deux résidus histidine et moins fortement avec une troisième histidine. Le domaine 3 est caractérisé par plusieurs feuilletts β . La partie centrale de ce domaine, composée de 7 feuilletts β antiparallèles, représente un motif commun avec une structure secondaire très conservée, laquelle est trouvée dans plusieurs protéines globulaires,

y compris les immunoglobulines (Gaykema *et al.*, 1984). Globalement, tous domaines confondus, les comparaisons de la structure primaire des sous-unités de crustacés et de chélicérates montrent une homologie de 55 %. Cependant, il existe des différences suivant le domaine considéré. Le domaine 2 présente la plus forte homologie avec un taux de 75 %, le domaine 3, environ 51 % d'homologie et le domaine 1 environ 45 % d'homologie entre les deux groupes. Cette différence de conservation de séquences entre les différents domaines correspond à l'idée d'une fonctionnalité distincte (Markl et Decker, 1992).

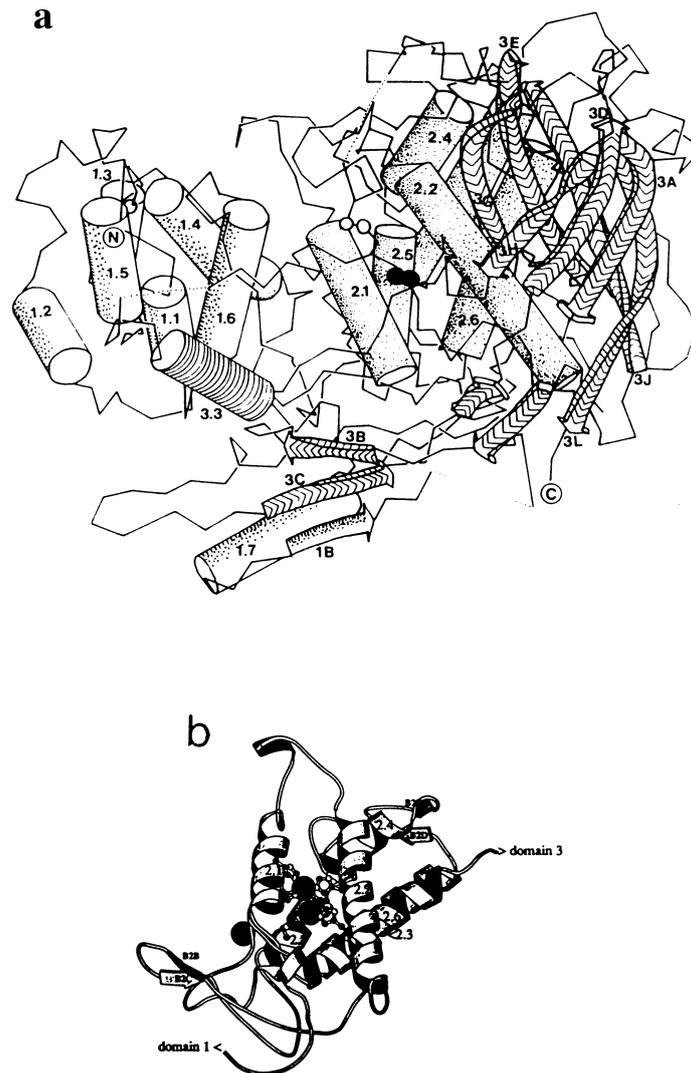


Figure IV-3 : Structure tri-dimensionnelle de la sous-unité II de l'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. (a) : sous-unité entière, comprenant les trois domaines (Markl and Decker, 1992) ; (b) : détail du domaine 2, contenant le site à deux atomes de cuivre dans un ensemble de 4 hélices α (Van Holde, 1997/98).

Les sous-unités s'associent par six pour former des hexamères. L'hexamère est l'unité de base, ou unité fonctionnelle des Hc. Ces molécules font environ 100Å de diamètre. Les six

sous-unités forment un antiprisme à base triangulaire et sont associées par leur face convexe, établissant un axe de rotation à trois faces (Figure IV-4a). Deux trimères sont associés en sandwich avec une symétrie miroir, et une rotation d'environ 60° de l'un par rapport à l'autre le long de l'axe de rotation. Vu de profil, l'hexamère a une forme cubique. Vue de face, la molécule apparaît comme un hexagone. Les six copies du domaine 2 de chaque sous-unité, contenant les six paires d'atomes de cuivre, forment le centre de l'hexamère. L'unité 1 x 6 des Hc d'arthropodes est plutôt un « trimère de dimères » qu'un « dimère de trimères » (Linzen *et al.*, 1985b). Ceci signifie que les sous-unités situées sur chaque niveau trimérique ont des contacts peu étroits alors que les sous-unités situées sur chacun des trimères ont des liaisons très fortes, formant trois dimères très fortement liés. La stabilité de ces dimères est due aux nombreuses liaisons impliquées ainsi qu'à leur caractère hydrophobique (Volbeda et Hol, 1989).

Les Hc de plusieurs crustacés, comme les crevettes, le krill, la langouste et plusieurs isopodes, consistent en un seul hexamère (1 x 6 unités ; 450 kDa environ) (Ellerton *et al.*, 1983 ; Markl, 1986) (Figure IV-4a). Certaines protéines d'insectes (hexamérines), qui dérivent très probablement des Hc, sont également constituées de simples hexamères. La plupart des Reptantia, notamment les écrevisses, les crabes, les pagures et les scyllarides, quelques crevettes, et l'isopode *Ligia sp.* possèdent des Hc formées de deux hexamères (2 x 6), ou dodécamères (900 kDa environ), souvent en mélange avec les hexamères (Figure IV-4b, c, d, e) (Terwilliger, 1982 ; Ellerton *et al.*, 1983 ; Markl, 1986). La crevette thalassinidée, *Callinassa californiensis*, présente une Hc particulière, avec une structure tétraédrique composée de quatre hexamères (1 800 kDa environ) (Figure IV-4f). Une simulation informatique a permis de créer un modèle de cette Hc à partir d'images de microscopie électronique (Cavellec *et al.*, 1990). Dans ce modèle, l'Hc 4 x 6 est formée par l'association de deux dodécamères classiques de crustacés, de telle sorte que chaque hexamère occupe le coin d'un tétraèdre. Les Hc formées de quatre hexamères sont fréquentes chez les arachnides, telles que les scorpions et les araignées (Van Bruggen *et al.*, 1981 ; Markl, 1986), mais avec une architecture différente. La structure quaternaire des Hc du scorpion *Androctonus australis* et de la tarentule *Eurypelma californicum* a été très largement étudiée et ces deux molécules apparaissent similaires (Bijlholt *et al.*, 1982). Ces 4 x 6-mères sont composés de deux dodécamères associés de façon antiparallèle par deux ponts centraux (Figure IV-4g). Parmi les myriapodes, une Hc composée de six hexamères (2 700 kDa environ) a été détectée chez le centipède *Scutigera coleoptrata* (Figure IV-4h). La plus grande molécule d'Hc

d'arthropodes a été trouvé chez les mérostomes, avec l'association de huit hexamères (3 600 kDa environ) (Figure IV-4i). La demi-molécule 4 x 6-mères de la limule *Limulus polyphemus* correspond aux 4 x 6-mères des arachnides.

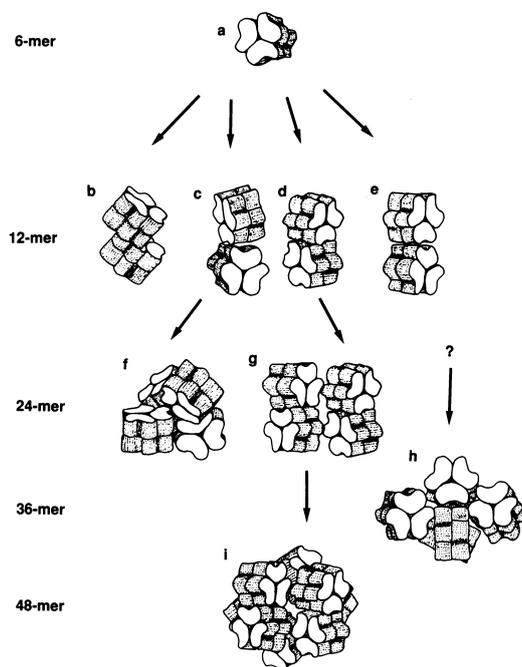


Figure IV-4 : Structures générées par l'auto-association des molécules d'hexamères d'hémocyanine d'arthropodes : (a) hexamères de la langouste ; (b) dodécamères du stomatopode *Squilla mantis* ; (c) dodécamères du crabe *Cancer pagurus* ; (d) dodécamère hypothétique permettant des structures plus complexes chez les chélicérates ; (e) dodécamères de l'araignée, *Cupiennus salei* ; (f) 24-mères de la crevette thalassinidée *Callinassa californiensis* ; (g) 24-mères de beaucoup d'arachnides, incluant le scorpion, *Androctonus australis*, et de la tarantule, *Eurypelma californicum* ; (h) 36-mères du centipède, *Scutigera coleoptrata* ; et (i) 48-mères de la limule, *Limulus polyphemus*.

Un des traits caractéristiques les plus intéressants des Hc est l'hétérogénéité très marquée des sous-unités (Ellerton *et al.*, 1983 ; Linzen, 1983 ; Ghidalia, 1985) (Figure IV-5). Selon les espèces, entre 3 et 17 composés différents peuvent être séparés électrophorétiquement sur gels de polyacrylamide à haute résolution (Markl et Decker, 1992). Considérant les résultats obtenus pour les Hc d'araignée, de scorpion et de limule, on peut déduire que les Hc composées de huit et quatre hexamères chez les chélicérates comprennent généralement sept à huit sous-unités distinctes immunologiquement (Markl et Decker, 1992). Bien que ce soient clairement des protéines homologues, ces sous-unités diffèrent considérablement au niveau de leur structure primaire et sont très probablement codées par des gènes différents (Jolles *et al.*, 1979 ; Linzen *et al.*, 1985a,b ; Soeter *et al.*, 1987 ; Voll et Voit, 1990). Ces résultats contrastent avec la composition des hexamères et des dodécamères

de certaines araignées qui ne possèdent qu'une et deux catégories de sous-unités, respectivement (Markl, 1980 ; Kempter *et al.*, 1985). Dans les Hc de crustacés, notamment celles des décapodes, jusqu'à huit sous-unités différentes ont été identifiées par électrophorèse (Markl et Decker, 1992). Au niveau immunologique, elles ont été classées en trois catégories, désignées par alpha, bêta et gamma (Markl et Decker, 1992).

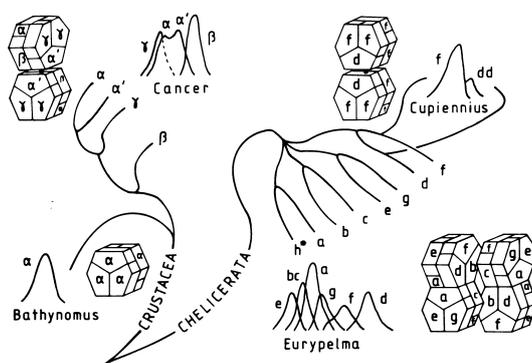


Figure IV-5 : Modèles topographiques de la structure quaternaire des hémocyanines de quatre arthropodes (Hc) : Hc 1x6 de l'isopode géant de l'océan profond, *Bathynomus giganteus* ; Hc 2x6 du crabe européen, *Cancer pagurus* ; Hc 2x6 de l'araignée de l'Amérique Centrale, *Cupiennius salei* ; et Hc 4x6 de la tarentule de l'Amérique du Nord, *Eurypelma californicum*. L'arbre phylogénétique montre la relation entre les différents types de sous-unités, représentées, en plus, par leurs profils immunoélectrophorétiques croisés respectifs (Markl and Decker, 1992).

Les Hc d'arthropodes représentent une hiérarchie de structures apparentées, c'est-à-dire des multiples de six sous-unités. La formation des hexamères nécessite un seul type de sous-unité. Plusieurs sous-unités d'Hc hexamérique et dodécamérique peuvent former des homohexamères lors d'expériences de réassociation (Markl et Decker, 1992). En revanche, il y a peu d'exemples de formation d'homohexamères parmi les plus grosses Hc des chélicérates (Brenowitz *et al.*, 1983). Chez l'araignée *Eurypelma*, à partir d'un seul type de sous-unité, on ne peut obtenir d'association au-delà du stade dimère (Markl *et al.*, 1982). Dans certaines Hc dodécamériques et 4 x 6-mériques, un rôle de linker inter-hexamère a été attribué aux sous-unités dimériques (e.g. Lamy *et al.*, 1977 ; Jeffrey *et al.*, 1978 ; Markl *et al.*, 1979 ; Markl *et al.*, 1981a ; Pilz *et al.*, 1980 ; Van Bruggen *et al.*, 1980 ; Rochu et Fine, 1984 ; Stöcker *et al.*, 1988). En 1980, Markl a localisé de façon directe un pont covalent dans le dodécamère d'Hc de l'araignée *Cupiennius salei*. Cette Hc comporte uniquement deux types de sous-unités : dix copies d'un monomère d'environ 75 kDa et un homo-dimère d'environ 150 kDa, les deux monomères étant liés par un pont disulfure. Ce pont a été mis en évidence lors d'une expérience de dissociation qui a révélé un intermédiaire de dissociation, jusqu'alors

inconnu, contenant sept monomères. Cet heptamère présente, en microscopie électronique, un hexamère normal avec une protubérance. Un modèle similaire avait été proposé auparavant pour les dodécamères d'Hc de l'écrevisse *Cherax destructor*, mais avec des preuves indirectes (Jeffrey, 1979). Le modèle est également valable pour l'Hc d'*Astacus leptodactylus* (Stöcker *et al.*, 1988). Cependant, pour la plupart des dodécamères d'Hc de crustacés, il ne semble pas y avoir de liaison des deux hexamères par un pont disulfure (Kegeles et Tai, 1973 ; Markl et Kempter, 1981 ; Terwilliger, 1982). Les Hc 8 x 6-mériques de la limule *Limulus polyphemus*, et 4 x 6-mériques du scorpion *Androctonus australis* et de la tarentule *Eurypelma californicum* contiennent chacune de sept à huit types de sous-unités dont les proportions sont constantes entre les différents individus de la même espèce. Des expériences de réassociation avec des sous-unités isolées et leur combinaison montrent que chacune de ces sous-unités joue un rôle spécifique dans l'architecture des oligohexamères natifs (Lamy *et al.*, 1977 ; Bijlholt *et al.*, 1979 ; Markl, 1980 ; Markl *et al.*, 1982 ; Brenowitz *et al.*, 1984). De plus, chez *Eurypelma*, la composition en sous-unités de quatre intermédiaires différents de dissociation (19-mères, dodécamères, heptamères et hexamères) indique que chaque type de sous-unité est distribué de façon symétrique dans les quatre hexamères formant la molécule native (Markl *et al.*, 1981b).

Chez certains crustacés, la composition en sous-unités des Hc varie suivant la saison, l'hypoxie ou la salinité (Mangum et Rainer, 1988 ; De Fur *et al.*, 1990). Chez certains crabes ou les homards, la composition en sous-unités monomériques varie au cours du développement (Olson *et al.*, 1988 ; Terwilliger et Terwilliger, 1982 ; Wache *et al.*, 1988). Différentes expériences chez la tarentule *Eurypelma californicum* ont mis en évidence que chaque type de sous-unité est impliqué dans des processus allostériques (Decker *et al.*, 1989). Ainsi, des expériences de substitution de chacun des types de monomères par sa forme apo- ou met- montrent qu'ils contribuent tous de façon identique, à l'affinité pour l'oxygène et à l'effet Bohr. En revanche, ils contribuent de façon distincte sur la coopérativité et la sensibilité de celle-ci au pH, chacun ayant une action spécifique (Decker *et al.*, 1989).

L'hétérogénéité des sous-unités a deux impacts majeurs sur la fonction des Hc :

- la formation de structures plus importantes que les hexamères, créant de nouveaux niveaux d'interaction allostérique,
- une augmentation de la plasticité fonctionnelle.

IV-3-2-2/ Propriétés fonctionnelles

Les capacités de transport de l'O₂ de l'hémolymphe des arthropodes sont faibles, habituellement comprises entre 0,3 et 1 mM d'O₂ fixée pour une saturation complète (Truchot, 1992). Quelques variations liées à la position taxinomique ou au mode de vie de l'animal sont connues. Par exemple, parmi les crustacés décapodes, les espèces terrestres ont tendance à avoir des concentrations en Hc plus élevées que les espèces aquatiques. Les Natantia présentent également des capacités oxyphoriques plus grandes que les Reptantia (Truchot, 1992). La concentration de l'Hc dans l'hémolymphe est essentiellement limitée par des facteurs non-respiratoires, à savoir, leurs effets sur la pression osmotique colloïdale et la viscosité du fluide circulant (Mangum et Johansen, 1975 ; Snyder et Mangum, 1982 ; Mangum, 1986). Les arthropodes possèdent un système circulatoire ouvert, travaillant à faibles pressions hydrostatiques dans de larges sinus. Ainsi, une concentration en protéines et une pression osmotique colloïdale augmentées peuvent compromettre la filtration urinaire et la régulation des volumes corporels, en particulier chez les animaux hyperosmorégulateurs (Truchot, 1992). Les hexamères d'Hc des arthropodes constituent l'unité fonctionnelle, avec une liaison réversible et coopérative de l'oxygène dont les propriétés oxyphoriques sont proches de celles de la molécule native (Savel-Niemann *et al.*, 1988). La polymérisation à des niveaux supérieurs à l'hexamère apparaît donc comme un moyen de maximiser la capacité oxyphorique, en évitant une augmentation excessive de la pression osmotique colloïdale. Un autre facteur limitant de la concentration en Hc est lié à une augmentation de la viscosité sanguine. Cette dernière augmente de façon exponentielle avec la concentration en Hc, mais cette augmentation semble être moins importante pour les molécules polymérisées que pour les sous-unités isolées (Snyder et Mangum, 1982). Ceci indique que la polymérisation constitue un moyen de réduire la viscosité du sang. Ainsi, chez les arthropodes, la concentration en Hc de l'hémolymphe semble être principalement limitée par les contraintes osmotiques, c'est-à-dire par la relation entre la pression osmotique colloïdale du transporteur d'O₂ extracellulaire et les faibles pressions hydrostatiques dans les sinus (Mangum, 1986). La capacité oxyphorique de l'hémolymphe des arthropodes n'est pas seulement faible, mais elle varie aussi en fonction d'un certain nombre de facteurs. Une des raisons de cette variabilité est que l'Hc ne joue pas un rôle uniquement dans le transport d'oxygène, mais elle présente également d'autres fonctions. En effet, l'Hc assure l'essentiel du pouvoir tampon du sang des crustacés. C'est également une réserve importante de substances nutritives organiques (Hagerman, 1983) et elle peut aussi jouer un rôle dans le stockage des acides aminés libérés

par les cellules durant un choc hypo-osmotique (Schoffeniels, 1976). À l'inverse, l'Hc peut participer au relargage de certains acides aminés nécessaires comme effecteurs osmotiques lors d'un stress hyper-osmotique. Enfin, elle joue également un rôle dans la détoxification des métaux lourds, en particulier du cuivre, par fixation de ce dernier en-dehors du site de fixation de l'O₂ (Johnston et Barber, 1969 ; Rtal et Truchot, 1996).

Le transport d'O₂ est fonction de la quantité d'O₂ fixée au niveau des sites externes de chargement de l'O₂ et du relargage vers les tissus par la protéine respiratoire. L'efficacité de ce système dépend donc, non seulement de la capacité oxyphorique, mais aussi de la balance entre les valeurs de pression partielle en O₂, pO₂, existant à chaque localisation et de la gamme de pO₂ dans laquelle la fixation réversible de l'O₂ a lieu. Cette gamme est essentiellement déterminée par l'affinité du transporteur pour l'O₂, communément mesurée par la pression partielle d'O₂ à la demi-saturation, P₅₀, et par la coopérativité de la liaison de l'O₂, qui se traduit par la forme plus ou moins sigmoïdale de la courbe de dissociation de l'O₂ (voir Chapitre VII-1).

Beaucoup de données existent sur la liaison de l'O₂ par les Hc d'arthropodes, regroupées en partie par Truchot (1992) (Tableau IV-2). Globalement, les propriétés fonctionnelles des Hc d'arthropodes sont considérées comme relativement conservatives, c'est-à-dire relativement homogènes, au moins à l'intérieur d'un même taxon. L'affinité de ce pigment pour l'O₂ est généralement faible (Truchot, 1992). Beaucoup de crustacés ont des valeurs de P₅₀ comprises entre 10 et 15 Torr dans les conditions physiologiques. En général, les crustacés à respiration aérienne ont une affinité pour l'O₂ supérieure aux espèces à respiration aquatique, et l'affinité intrinsèque est augmentée chez les espèces tropicales par rapport aux espèces des eaux froides (Mangum, 1982).

Tableau IV-2 : Sélection de valeurs décrivant l'affinité pour l'oxygène (P₅₀), la coopérativité de la liaison de l'oxygène (n₅₀) et les coefficients de Bohr ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) pour les hémocyanines d'arthropodes (Truchot, 1992).

Species	Temperature ^a (°C)	pH ^a	P ₅₀ (torr)	n ₅₀	ΔlogP ₅₀ /ΔpH	References
Myriapoda						
<i>Scutigera coleoptrata</i>	25	7.5	54	8.9	-0.87	Mangum et al. (1985b)
Chelicerata						
<i>Limulus polyphemus</i>	25	7.5	10	1.5	+1.05	Mangum (1983c)
<i>Lasiadora erythrocythara</i>	25	7.6	23	3.1	-0.71	Bridges (1988)
Crustacea						
Pericarida						
<i>Gnathopausia ingens</i>	5.5	7.87	1.4	3.5	-0.80	Sanders and Childress (1990a)
<i>Orchestia gammarellus</i>	10	7.8	93.7	3.0	-0.84	Taylor and Spicer (1986)
<i>Glyptonotus antarcticus</i>	0	8.07	10.0	2.6	-1.4	Jokumsen et al. (1981)
Hoplocarida						
<i>Squilla empusa</i>	23	7.6	20	4.0	-0.92	Mangum (1983e)
Euphausiacea						
<i>Euphausia superba</i>	-1.5	8.2	27	3.2	-1.40	Bridges et al. (1983)
Decapoda						
<i>Penaeus japonicus</i>	25	7.6	22.1	4.0	-1.50	Lallier and Truchot (1989a)
<i>Palaemon adspersus</i>	15	7.85	16.0	2.7	-2.0	Weber and Hagerman (1981)
<i>Palaemon elegans</i>	10	7.8	16.5	2.9	-1.1	Bridges et al. (1984)
<i>Austropotamobius pallipes</i>	15	7.9	2.3	2.2	-0.45	Morris et al. (1986)
<i>Homarus vulgaris</i>	15	7.9	9.3	-	-1.17	Bouchet and Truchot (1985)
<i>Nephrops norvegicus</i>	10	7.9	11.2	3.8	-1.19	Bridges (1986)
<i>Carcinus maenas</i>	15	7.84	10.9	4.5	-0.83	Lallier and Truchot (1989b)
<i>Callinectes sapidus</i>	25	7.6	16	4.0	-1.7	Mauro and Mangum (1982a)
<i>Callinectes sapidus</i>	20	7.6	9.4	2.6	-1.14	Booth et al. (1982)
<i>Bythograea thermydron</i>	10	7.7	3.4	≈2	-0.34	Sanders et al. (1988)
<i>Corystes cassivelaunus</i>	10	7.9	3.4	2.2	-1.48	Bridges (1986)
<i>Ocyrode saratan</i>	30	7.8	12	2.8	-0.67	Morris and Bridges (1985)
<i>Birgus latro</i>	30	7.6	13.6	2.8	-0.60	Morris et al. (1988b)
<i>Holthuisana transversa</i>	25	7.35	5.9	2.5	-0.13	Morris et al. (1988a)
<i>Eupagurus bernhardus</i>	10	8.0	22.4	3.9	-1.19	Bridges (1986)
<i>Eupagurus bernhardus</i>	15	7.83	48	3.7	-1.55	Jokumsen and Weber (1982)

^aTemperature and pH values chosen as the most representative for the species under usual conditions.

La coopérativité est relativement élevée dans les conditions physiologiques, avec un coefficient de Hill compris entre 3 et 4, voire même supérieur chez certaines espèces. Cependant, la signification physiologique de la coopérativité et de ses variations reste à établir pour les Hc d'arthropodes (Truchot, 1992).

La liaison de l'O₂ aux molécules d'Hc est très sensible à la température. Comme pour la majorité des transporteurs d'O₂, l'affinité pour l'O₂ diminue avec l'augmentation de température, indiquant que la réaction d'oxygénation est globalement exothermique. Cependant, il existe quelques rares exceptions, avec des réactions d'oxygénation apparemment endothermiques (Morris *et al.*, 1985b ; Sanders *et al.*, 1988), ou une complète insensibilité à la température (Jokumsen et Weber, 1982). Ces exceptions sont généralement expliquées par une faible chaleur d'oxygénation, contrebalancée ou dépassée par d'autres réactions thermiques telles que la chaleur de dissolution de l'oxygène ou la dissociation des protons de Bohr de l'O₂ lié. Il existe aussi une grande variabilité interspécifique de la sensibilité à la température, la chaleur apparente d'oxygénation ΔH étant comprise entre 0 et -158 kJ.mol⁻¹ (Bridges, 1986 ; Burnett *et al.*, 1988).

La liaison de l'oxygène à l'Hc est très sensible au pH dans les conditions physiologiques. L'affinité décroît avec le pH, c'est-à-dire que l'effet Bohr est normal dans tous les cas connus à l'heure actuelle, à l'exception de *Limulus* et d'autres Mérostomes qui

présentent un effet Bohr inverse. Cet effet Bohr normal est souvent fort, en fait, plus important que ce qui est habituellement observé pour les autres pigments respiratoires, en particulier l'Hb. Les coefficients de Bohr atteignent des valeurs inférieures à -1 dans de nombreux cas (Tableau IV-2).

Les Hc d'arthropodes présentent une grande plasticité fonctionnelle, en partie due à l'effet de différents cofacteurs. Une augmentation de la concentration totale en sels dans l'hémolymphe des crustacés entraîne une augmentation d'affinité. En revanche chez la limule, les araignées (Loewe et Linzen, 1975) et les scorpions (Lamy *et al.*, 1980), on observe le phénomène inverse. Les effets des ions peuvent être non-spécifiques, résultant de la création de ponts salins dans la molécule lorsque la force ionique augmente. Mais le plus souvent, ils sont dus à des liaisons allostériques de certains ions sur des sites spécifiques. Tous les ions n'agissent pas de la même façon. Les ions divalents, Ca^{2+} et Mg^{2+} , généralement nécessaires à l'assemblage de la molécule, ont une action particulièrement importante et sont responsables le plus souvent de l'essentiel des effets observés (Truchot, 1992). Les ions inorganiques peuvent également agir de façon complexe sur la coopérativité. Cependant, leurs effets sont bien marqués uniquement pour de fortes concentrations en sels et sont le plus souvent négligeables dans la gamme physiologique de concentration (Mason *et al.*, 1983). Plusieurs cofacteurs organiques agissent sur les Hc d'arthropodes, mais ces effets semblent limités aux Hc de crustacés (Truchot, 1992). Le premier cofacteur identifié a été le L-lactate, qui augmente l'affinité chez de nombreux crustacés (Truchot, 1980). Le lactate se fixe de façon préférentielle sur l'oxyHc, au niveau d'un site différent de celui de liaison de l' O_2 (Johnson *et al.*, 1984). L'effet du lactate est important dans la gamme physiologique (0-10 mM) mais la sensibilité est très variable selon les espèces (Bridges et Morris, 1986). L'effet lactate est complètement absent chez un certain nombre d'espèces terrestres. Un deuxième cofacteur organique de l'Hc est l'urate, qui a un effet chez plusieurs espèces (Morris *et al.*, 1985a ; Truchot, 1992). Comme pour le lactate, l'urate augmente l'affinité pour l'oxygène, sans modifier l'effet Bohr, ni la coopérativité. D'autres cofacteurs ont été décrits, mais chez un plus petit nombre d'espèces, comme la dopamine (Morris et McMahon, 1989) ou le thiosulfate (Sanders et Childress, 1992 ; Hagerman et Vismann, 1999).

IV-3-2-3/ Biosynthèse

Le site de biosynthèse des Hc n'est connu que chez très peu d'espèces. De plus, il semble varier d'une espèce à l'autre. Cependant, le processus a toujours lieu dans des cellules

dérivant du mésenchyme, associées à la circulation du sang (Markl et Decker, 1992). Chez la limule *Limulus polyphemus*, Fahrenbach (1970) a observé un nouveau type de cellules sanguines qu'il a appelé « cyanocyte ». Ces cellules sont très rares dans la circulation générale, mais elles sont présentes en grandes quantités au niveau des sinus des yeux composés. Des ARNm codant pour l'Hc ont été extraits de ces cellules (Wood et Bonaventura, 1981). Chez le scorpion *Androctonus australis* et chez la tarentule *Eurypelma californicum*, les ARNm codant pour les Hc ont été extraits respectivement de l'endocuticule, sous la chitine de la carapace, et à partir du cœur (Alliel *et al.*, 1983 ; Kempter, 1983 ; Voit et Schneider, 1986).

Chez les crustacés, les cyanocytes ont été observés dans l'œil composé du stomatopode *Squilla mantis* (Schönenberger *et al.*, 1980). Chez le homard *Homarus americanus*, l'écrevisse *Astacus leptodactylus*, et le tourteau *Cancer pagurus*, la formation des Hc se fait dans l'hépatopancréas (Jacobs *et al.*, 1984 ; de Bethune *et al.*, 1985 ; Préaux *et al.*, 1986). Cependant, chez le crabe vert *Carcinus maenas*, l'origine des cyanocytes a été détectée uniquement dans des nodules lymphocytogéniques de l'estomac pylorique (Ghiretti-Magaldi *et al.*, 1973; Ghiretti-Magaldi *et al.*, 1977).

Le mécanisme par lequel le cuivre est inséré dans le site de fixation de l'O₂ est inconnu. Cependant, il semble que les métallothionéines à cuivre des glandes digestives peuvent agir comme donneurs de cuivre à l'apoHc et que la conformation de l'Hc est un facteur déterminant dans le mécanisme de transfert du cuivre (Brouwer *et al.*, 1986).

IV-4/ Conclusion

Les hémocyanines d'arthropodes se caractérisent par une remarquable plasticité adaptative. La composition en sous-unités des différentes formes d'hémocyanines peut varier en fonction de nombreux facteurs intrinsèques (e.g. stade de développement) ou extrinsèques (e.g. salinité du milieu extérieur). Cette plasticité structurale peut permettre une adaptation à long terme des individus à leur environnement. Ce pigment respiratoire présente également une plasticité fonctionnelle considérable. L'affinité du pigment pour l'O₂, mesurée par la P₅₀, pression partielle d'O₂ nécessaire pour saturer 50 % du pigment, varie en fonction de facteurs environnementaux (e.g. température), mais aussi de la composition de l'hémolymphe (e.g. concentrations en cations divalents, lactate, urate). L'effet Bohr, effet des ions H⁺ sur l'affinité Hc-O₂, mesurée par la variation d'affinité en fonction du pH de l'hémolymphe, peut

également être modifié par ces différents facteurs. La fixation de l'O₂ sur les Hc d'arthropodes, mesurée par le coefficient de Hill, n_{50} , se fait le plus souvent de façon coopérative c'est-à-dire que la fixation d'une première molécule d'O₂ facilite la fixation des autres molécules.

Du fait de la plasticité adaptative de l'hémocyanine, l'étude de ce pigment respiratoire chez les crustacés décapodes hydrothermaux est nécessaire pour comprendre les adaptations respiratoires de ces espèces en fonction des paramètres physico-chimiques de leur micro-environnement préalablement définis (cf. chapitre II). Cette approche écophysiologique permettra de mieux comprendre la répartition différentielle des différentes espèces de décapodes le long de multiples gradients (température, pH, O₂, CO₂, H₂S) qui se développent autour d'une source hydrothermale.

V – COMPOSITION DE L'HEMOLYMPHE

L'hémolymphe désigne le liquide interne circulant des animaux à système circulatoire ouvert, et est essentiellement l'équivalent du sang et de la lymphe. Elle a comme principale fonction le transport de substances telles que les gaz respiratoires (O₂ et CO₂), les substances nutritives, les produits métaboliques et les électrolytes. Elle a également un rôle dans la transmission des signaux (hormones), le pouvoir tampon et la défense contre les substances étrangères. L'hémocyanine, pigment respiratoire des crustacés décapodes, se trouve sous forme libre et dissoute dans l'hémolymphe. Les invertébrés marins, bien que perméables aux ions de l'eau de mer, possèdent des capacités de régulation ionique variables. Chez les crustacés, ces capacités de régulation sont importantes et s'effectuent principalement par deux mécanismes : une excrétion sélective des ions de l'hémolymphe via les glandes antennaires et une absorption contrôlée des ions au travers des branchies. L'hémolymphe constitue donc un mélange complexe dont la composition reflète l'état physiologique de l'animal. C'est dans cette optique que nous avons exploré la composition de l'hémolymphe chez les différentes espèces utilisées au cours de notre étude, d'une part au regard de leur environnement en ce qui concerne les ions majeurs et quelques métaux, d'autre part comme témoin de stress métaboliques pour ce qui est des concentrations en hémocyanine, urate et lactate.

V-1/ Matériel et méthodes

V-1-1 : Prélèvement de l'hémolymphe

Les individus de *Cyanograea praedator* et de *Bythograea thermydron* ont été récoltés lors des campagnes HOT'96 et HOPE'99 à 9°N et 13°N sur la ride du Pacifique oriental. Les spécimens de *Mirocaris fortunata* et de *Chaceon affinis* ont été prélevés durant la mission MARVEL sur le site Menez Gwen (37°50'N) de la ride médio-Atlantique (MAR) et ceux de *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* et *Segonzacia mesatlantica* durant la mission PICO sur les sites de Rainbow (36°13'N) et de Lucky Strike (37°17'N) de la MAR. Des individus de *Chaceon affinis* ont également été récoltés au sud de l'Irlande (55°51'N; 9°23'W).

Le prélèvement d'hémolymphe est réalisé, à l'aide d'une seringue, dans le sinus infrabranchial au niveau de la quatrième paire de pattes, à travers la membrane articulaire pour les crabes (*Bythograea thermydron*, *Cyanograea praedator*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis*) et dans le péricarde au niveau de l'articulation thorax/abdomen pour les crevettes (*Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* et *Mirocaris fortunata*).

Dès le prélèvement, l'hémolymphe a été congelée dans de l'azote liquide. Avant analyse, les échantillons ont été décongelés à 4°C et centrifugés pendant 10 mn à 12 000 rpm.

V-1-2 : Techniques colorimétriques

Le dosage du calcium se fait à l'aide d'un kit colorimétrique Boehringer Mannheim MPR3. Les ions Ca^{2+} présents dans le sérum se lient à un chromogène, l'o-crésyl-phtaléine, pour former un complexe violet qui absorbe à 546 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en ions Ca^{2+} . La calibration se fait à l'aide d'une solution de chlorure de calcium à 2 mM. Les échantillons sont dilués 10 fois dans de l'eau bidistillée avant analyse.

Le dosage du cuivre total (Cu^{2+} libre + Cu^{2+} hémocyanique) se fait à l'aide d'un kit Boehringer Mannheim MPR1. Les ions Cu^{2+} se lient au disulphonate de bathocuproïne pour former un complexe dont la coloration est directement proportionnelle à la concentration en ions Cu^{2+} . L'échantillon est dilué 50 fois dans de l'eau bidistillée et une déprotéinisation à l'acide chlorhydrique et perchlorique est nécessaire avant de faire le dosage. Le complexe coloré absorbe à 480 nm. La calibration se fait à l'aide d'une solution de sel de cuivre à 31,5 μM .

Le dosage du magnésium se fait également à l'aide d'un kit Merkotest 14102. Les ions Mg^{2+} se lient au bleu de xylidile pour former un complexe coloré soluble dans l'eau qui absorbe à 505 nm. L'intensité de la coloration du complexe est directement proportionnelle à la concentration en ions Mg^{2+} . L'échantillon est préalablement dilué 10 fois. La calibration se fait à l'aide d'une solution de chlorure de magnésium à 2 mM.

Le dosage du lactate s'effectue à l'aide d'un kit enzymatique Boehringer Mannheim 139 084. Le L-lactate est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase en présence de NAD. L'équilibre de cette réaction se fait normalement en faveur du L-lactate. En piégeant le pyruvate dans une réaction catalysée par l'enzyme glutamate-pyruvate transaminase en

présence de L-glutamate, l'équilibre de la réaction peut être déplacé en faveur du pyruvate et du NADH. La quantité de NADH formée est donc en proportion stœchiométrique avec la quantité de L-lactate présent dans le sérum. L'augmentation de la quantité de NADH est déterminée par lecture de l'absorbance à 340 nm sachant que le coefficient d'absorption du NADH à cette longueur d'onde est de $6,3 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Avant d'effectuer le dosage, une déprotéinisation des échantillons à l'acide perchlorique 8 % est réalisée. Les échantillons sont dilués trois fois avant analyse.

L'urate est dosé à l'aide d'un kit enzymatique Sigma 685 mettant en jeu 2 réactions : une oxydation de l'urate par l'uricase en peroxyde d'hydrogène, ce dernier étant transformé par la peroxydase en quinonéimine. La quinonéimine est un colorant, en quantité proportionnelle à la quantité initiale d'urate. Sa concentration est calculée à partir de son absorbance à 520 nm. Il n'est pas nécessaire de diluer les échantillons avant le dosage. Un standard d'urate à 5,95 mM est utilisé pour faire un étalonnage des mesures.

Le dosage des protéines de l'hémolymphe est réalisé selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Les échantillons sont dilués de 50 à 200 fois dans de l'eau bidistillée. 50 μl de la solution diluée sont mélangés à 2,5 ml d'un réactif préparé quotidiennement (100 ml de Na_2CO_3 à 4 %, 100 ml de NaOH 0,1N, 2 ml de NaK à 2 % et 2 ml de CuSO_4 à 1 %). 250 μl de réactif de Fiolin-Ciocalteu dilué sont ajoutés. La réaction se développe pendant 60 minutes à l'obscurité puis l'absorbance est lue à 695 nm. La gamme standard est constituée d'une gamme de solution de sérum albumine bovine (de 0,1 à 1 g.l^{-1}) traitée de façon similaire.

Le dosage de l'hémocyanine se fait par dosage du cuivre hémocyanique. Le réactif utilisé, mis au point par Jean-Paul Truchot sur *Carcinus maenas* (communication personnelle), est composé de 50 mM de Tris, 50 mM d'EDTA et 0,4 M de NaCl, pH ajusté à 8,92. La présence d'EDTA et le pH élevé permettent de complexer le calcium et de dissocier les oligomères d'hémocyanine en monomères qui absorbent alors à 335 nm. La concentration en cuivre hémocyanique est déduite à l'aide d'une équation empirique, établie par Jean-Paul Truchot sur *C. maenas* (communication personnelle) :

$$[\text{Cu}_{\text{Hc}}] = 4234 \times \text{DO}_{335\text{nm}} - 3,8 \text{ (}\mu\text{M)}$$

À partir de la concentration en cuivre hémocyanique, la concentration en hémocyanine est estimée sachant que l'on a deux atomes de cuivre par monomère d'hémocyanine de 75 kDa :

$$[\text{Hc}] = 37,5 \times [\text{Cu}_{\text{Hc}}] \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$$

Les échantillons n'ont pas besoin d'être dilués préalablement.

Pour certains échantillons, l'hémocyanine a été dosée de façon directe. Ce dosage repose sur la différence d'absorption à 335 nm entre l'oxy-Hc et la déoxy-Hc sachant que le coefficient d'extinction de l'Hc, à cette longueur d'onde, est de 2,33 (Nickerson et Van Holde, 1971). Du fait de la forte affinité du pigment pour l'O₂, l'oxy-Hc est obtenue par simple équilibration à l'air. La déoxy-Hc est obtenue par ajout d'environ 30 mg de sulfite de sodium (Na₂SO₃). Un échantillon d'hémolymphe est dilué 50 fois dans une solution saline et son absorbance est lue à 335 nm contre la même solution saline (Aox). Le Na₂SO₃ est ajouté dans la cuve, on agite vigoureusement puis on laisse reposer 30 mn. On réalise une nouvelle mesure dans les mêmes conditions que précédemment (Adox). La concentration en Hc est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$[\text{Hc}] = (\text{Aox-Adox}) \times 50 / 2,33.10^{-1} \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$$

Les deux techniques de dosage donnant des résultats similaires, seule la première technique a été par la suite utilisée pour doser l'Hc..

V-1-3 : Coulométrie

La concentration en chlore est mesurée à l'aide d'un chloridomètre (Corning 920) qui, par une titration argentique en milieu acide, détermine la concentration de l'échantillon en halogénures (concentration donnée en meq.l⁻¹). Pour chaque mesure, on utilise 20 µl d'échantillon dilué au 1/4 dans de l'eau distillée. Un standard de chlorure à 100 mM est utilisé pour calibrer l'appareil avant utilisation.

V-1-4 : Photométrie de flamme

Le dosage des ions Na⁺ et K⁺ se fait à l'aide d'un photomètre de flamme (Radiometer Copenhagen FLM3 Flame Photometer). Pour cela, l'échantillon natif est dilué au 1/4 dans de l'eau bidistillée. La lecture des concentrations ioniques des échantillons dilués se fait directement après étalonnage de l'appareil.

V-1-5 : Chromatographie ionique

Les analyses sont réalisées sur un système isocratique Dionex DX-120. Les échantillons sont injectés à l'aide d'un passeur automatique (Dionex AS 40). L'analyse des anions se fait à l'aide d'une colonne Dionex IonPac® AS9 HC-4mm, une pré-colonne Dionex IonPac AG9 HC-4mm et un supresseur Dionex ASRS ultra 4 mm. L'éluant est une solution de carbonate de sodium 9 mM. Les cations, quant à eux, sont analysés à l'aide d'une colonne Dionex IonPac® CS15-4 couplée à une pré-colonne Dionex IonPac CG15 et un supresseur Dionex CSRS ultra 4 mm. Dans ce cas, l'éluant est une solution d'acide sulfurique 0,1 N, 9 % d'acétonitrile.

Quatre standards de salinité 10,131 ‰, 30,185 ‰, 34,997 ‰ et 38,003 ‰ sont utilisés pour calibrer les deux colonnes. Ils sont préparés par dilution au 1/100ième d'ampoules d'eau de mer synthétique (Ocean Scientific International, IAPSO standards sea water). Avant analyse, les échantillons sont déprotéinisés dans de l'acétonitrile (1 volume d'hémolymphe pour 1 volume d'acétonitrile), puis ils sont centrifugés 7 minutes à 7 000 rpm et le surnageant est dilué 50 fois dans de l'eau mQ. L'acquisition des spectres se fait à l'aide du logiciel BORWIN.

V-1-6 :Potentiométrie

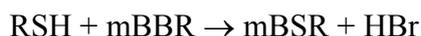
La technique de potentiométrie a été utilisée pour le dosage du cuivre total, du plomb et du cadmium. Elle a été mise au point par Riso *et al.* (1997) et est utilisée pour la première fois ici pour doser les métaux dans l'hémolymphe de crustacés. Les dosages ont été réalisés par Ricardo Riso.

Avant analyse, les échantillons sont déprotéinisés avec de l'HCl 0,5 M (Suprapur Merck®). Pour cela, un volume d'acide est ajouté à un volume d'échantillon pendant 10 minutes à température ambiante. On centrifuge à 12 000 rpm, à 4°C, pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite dilué 25 fois dans de l'HCl 0,5 M (Suprapur Merck®) puis analysé. Le système est préalablement calibré avec des solutions étalon de cuivre, plomb et cadmium (40, 5 et 2,5 ppb respectivement).

V-1-7 : Dosage des composés soufrés par HPLC en phase inverse

Les composés soufrés sont séparés par HPLC en phase inverse puis détectés par

spectrofluorescence. Cette méthode a été mise au point par Gru *et al.* (1998) sur des échantillons hydrothermaux d'eau et de fluides biologiques par adaptation de la méthode analytique publiée par Vetter *et al.* (1989) et Fahey *et al.* (1983). Le principe de la méthode repose sur l'utilisation du monobromobimane (mBBR), un agent fluorescent, qui réagit sélectivement avec les composés protéiques et ceux possédant un doublet libre sur l'atome de soufre, selon la réaction de substitution nucléophile suivante :



Le système HPLC est formé d'une pompe Spectra-Physics Analytical Spectrasystem P2000 (San Jose, CA, USA), d'un passeur automatique Spectra-Physics Analytical Spectrasystem AS 3000 (volume injecté : 10 µl), d'une pré-colonne (Upchurch C135B ; CIL), d'une colonne Spherisorb en phase inverse (250 x 4,6 mm ; CIL S5 ODS2-250A). Ce système est connecté à un spectrofluorimètre (Jasco FP 920) réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et sur une longueur d'émission de 480 nm. L'acquisition se fait à l'aide du logiciel BORWIN.

V-1-8 : Etude de l'évolution des teneurs en lactate

Durant la campagne HOPE'99, nous avons étudié l'évolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Cyanograea praedator* et *Bythograea thermydron*.

V-1-8-1/ Etude chez *Cyanograea praedator*

L'étude chez *C. praedator* s'est faite sur trois individus maintenus dans un aquarium rempli d'eau de mer de surface à 15°C et à pression atmosphérique. L'expérimentation a duré 14 heures. Environ 70 µl d'hémolymphe ont été prélevés à chaque temps d'expérimentation (début, 4h30 et 14h).

V-1-8-2/ Etude chez *Bythograea thermydron*

Deux types d'expérimentation ont eu lieu avec l'espèce *B. thermydron* :

i/ Nous avons suivi pendant 14 heures l'évolution du lactate dans l'hémolymphe de six individus maintenus dans un aquarium rempli d'eau de mer de surface à 15°C et à pression atmosphérique. Comme dans le cas de *C. praedator*, environ 70 µl d'hémolymphe ont été prélevés à chaque temps d'expérimentation (début, 1h, 3h, 6h et 14h).

ii/ Six individus ont été maintenus isolément dans des boîtes hermétiquement fermées de 0,5 litre remplies d'eau de mer de surface à 15°C, à 260 bars pendant quatre heures dans l'aquarium pressurisé IPOCAMP (Incubateur Pressurisé pour l'Observation en Culture d'Animaux Marins Profonds) (Figure V-1). Cette étude a été réalisée en collaboration avec Bruce Shillito (UPMC) et Pierre-Marie Sarradin (IFREMER, DRO/EP). En parallèle, six autres individus ont été maintenus dans les mêmes conditions mais dans un aquarium, à pression atmosphérique pendant 2 heures (1 individu), 3 heures (1 individu) et 4 heures (4 individus). La teneur en O₂ dans l'eau de chaque boîte a été mesurée à la fin de chaque expérimentation. Elle a également été mesurée au début des expérimentations dans l'eau mise dans les boîtes. L'hémolymphe a été rapidement prélevée après chaque expérimentation.

Dans tous les cas, les échantillons ont été déprotéinisés à l'acide perchlorique 8 % et maintenus à 4°C jusqu'au retour au laboratoire où le dosage du lactate a été effectué.



Figure V-1 : A : aquarium pressurisé IPOCAMP (Incubateur Pressurisé pour l'Observation en Culture d'Animaux Marins Profonds) utilisé pour la première fois lors de la campagne HOPE'99, conçu et géré par Bruce Shillito. B : montage expérimental utilisé pour étudier l'évolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Bythograea therydron*.

V-2/ Résultats

Pour certains composés, deux méthodes de mesures ont été utilisées, mais aucune

différence significative n'a été observée entre les résultats obtenus avec ces deux méthodes. Nous avons donc utilisé les résultats des deux techniques pour calculer les moyennes et les écarts-types chez les différentes espèces pour les différents ions.

V-2-1 : Composition en ions majeurs de l'hémolymphe

Les résultats des dosages effectués sur l'hémolymphe des différentes espèces étudiées sont regroupés dans la figure V-2 et dans les tableaux V-1 et V-2. La figure V-2 présente les gammes de concentration des ions mesurées pour les espèces hydrothermales et une espèce bathyale. Pour une espèce donnée, la variabilité inter-individuelle est très importante. Par exemple, la concentration en sodium varie entre 236 et 542 mM chez *Bythograea therydron*, celle en chlorures entre 401 et 549 mM chez *Segonzacia mesatlantica*. La concentration en magnésium de l'hémolymphe des brachyours est supérieure à celle des caridés. La majorité des crustacés maintient sa concentration en ion chlore similaire à celle du milieu environnant aussi est-il habituel de transformer les concentrations des ions en valeur relative en se basant sur une valeur relative pour le chlore hémolympatique de 100. Le ratio Mg^{2+}/Cl^{-} a été calculé pour les 7 espèces. Les résultats sont regroupés dans les tableaux V-1 et V-2. On constate un rapport supérieur à 4 chez tous les crabes, alors qu'il est inférieur à 3 pour les crevettes.

Les six espèces hydrothermales étudiées présentent une bio-accumulation en cuivre très importante, même en comparaison avec les fluides hydrothermaux enrichis en métaux, avec des concentrations en cuivre non lié au site actif de l'hémocyanine supérieures à 820 μM .

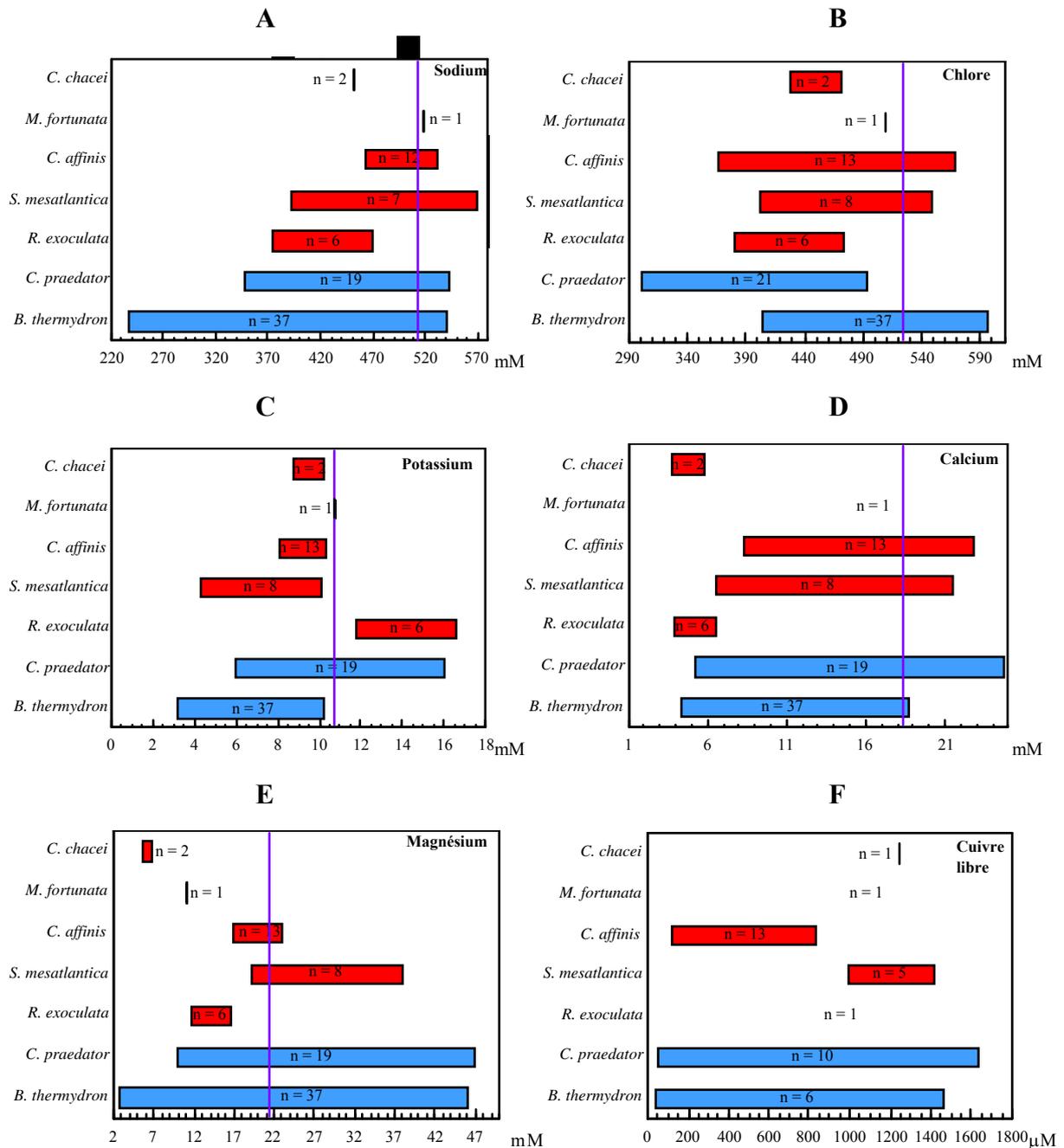


Figure V-2 : Gammes des concentrations en ions majeurs dans l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux du Pacifique (*Cyanograea praedator*, *Bythograea thermydron*) et de l'Atlantique (*Rimicaris exoculata*, *Segonzacia mesatlantica*, *Mirocaris fortunata*, *Chorocaris chacei*) et du crabe bathyal de l'Atlantique (*Chaceon affinis*). A : Na⁺ (mM) ; B : Cl⁻ (mM) ; C : K⁺ (mM) ; D : Ca²⁺ (mM) ; E : Mg²⁺ (mM) ; F : Cu²⁺ libre (µM). Le trait violet représente les valeurs mesurées dans l'hémolymphe du crabe littoral *Carcinus maenas*.

Tableau V-1 : Composition en ions majeurs de l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux du Pacifique, *Cyanagraea praedator* et *Bythograea thermydron* (E. T. = Ecart-Type ; n= nombre d'individus) et des concentrations relatives en magnésium, chacune basée pour une valeur relative en ion chlore hémolympatique de 100 [(Mg²⁺/Cl⁻) x 100].

	<i>Cyanagraea praedator</i>			<i>Bythograea thermydron</i>		
	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n
Na ⁺ (mM)	479,6	43,7	19	431,6	73,4	43
Cl ⁻ (mM)	421,7	46,1	21	476,4	43,4	46
K ⁺ (mM)	8,7	2,2	19	6,9	1,7	43
Ca ²⁺ (mM)	14,9	6,2	19	9,3	4,5	44
Mg ²⁺ (mM)	21,6	9,3	19	19,0	9,6	43
Mg ²⁺ /Cl ⁻ x 100	5,0	1,8	19	4,0	2,2	43
Cu ²⁺ total (µM)	2015,2	996,2	18	2198,3	962,5	13
Cu ²⁺ libre (µM)	730,5	469,6	10	842,8	471,3	6

Tableau V-2 : Composition en ions majeurs de l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux de l'Atlantique, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* et *Segonzacia mesatlantica* et du crabe bathyal, *Chaceon affinis* (Moy. = Moyenne ; E. T. = Ecart-Type ; n= nombre d'individus) et des concentrations relatives en magnésium, chacune basée pour une valeur relative en ion chlore hémolympatique de 100 [(Mg²⁺/Cl⁻) x 100].

	<i>Rimicaris exoculata</i>			<i>Chorocaris chacei</i>			<i>Mirocaris fortunata</i>			<i>Segonzacia mesatlantica</i>			<i>Chaceon affinis</i>		
	Moyenne	E.T.	n	Moyenne	E.T.	n	Moyenne	E.T.	n	Moyenne	E.T.	n	Moyenne	E.T.	n
Na ⁺ (mM)	403,4	37,4	6	451,8	1,2	2	518,0	/	1	443,5	81,0	8	504,8	19,2	12
Cl ⁻ (mM)	390,4	44,8	6	449,9	21,9	2	509,3	/	1	467,6	48,9	8	490,5	55,8	13
K ⁺ (mM)	5,4	1,1	4	9,6	0,8	2	10,8	/	1	8,0	1,8	8	8,8	0,7	13
Ca ²⁺ (mM)	4,6	1,5	6	4,8	1,0	2	17,9	/	1	12,2	5,7	8	14,8	4,6	13
Mg ²⁺ (mM)	14,2	6,4	6	6,2	0,7	2	11,0	/	1	27,3	7,4	8	19,5	2,1	13
Mg ²⁺ /Cl ⁻	3,1	1,1	6	1,4	0,2	2	2,2	/	1	6,0	2,0	8	4,0	0,8	13
Cu ²⁺ total (µM)	2938,3	804,5	5	2667,1	315,3	2	2180,4	/	1	2348,3	693,9	7	735,0	439,5	13
Cu ²⁺ libre (µM)	826,1	/	1	1238,9	/	1	971,1	/	1	1243,7	176,2	5	398,0	228,4	13

V-2-2 : Teneurs en composés organiques

Les résultats sont regroupés dans le tableau V-3.

La teneur en protéines est très élevée chez toutes les espèces hydrothermales (82 à 124 g.l⁻¹). En revanche, elle est plus faible chez le crabe bathyal *Chaceon affinis* (46 g.l⁻¹). De même, la concentration en hémocyanine est élevée chez les espèces hydrothermales (34 à 45 g.l⁻¹). Elle est plus faible chez *C. affinis* (13 g.l⁻¹). Le tableau V-3 présente également la proportion d'hémocyanine par rapport aux protéines totales. Curieusement, les hémocyanines ne représentent qu'une faible proportion des protéines totales. La plus faible proportion est mesurée chez l'espèce bathyale *Chaceon affinis* (26 %) et la plus élevée chez *Cyanagraea praedator* (60 %). Nous reviendrons sur l'interprétation de ces résultats.

Tableau V-3 : Teneurs en protéines, hémocyanine, lactate et urate et pourcentage d'hémocyanine en fonction des protéines totales dans l'hémolymphe des crustacés décapodes

hydrothermaux du Pacifique (*Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*) et de l'Atlantique (*Rimicaris exoculata*, *Segonzacia mesatlantica*, *Mirocaris fortunata*, *Chorocaris chacei*) et du crabe bathyal de l'Atlantique (*Chaceon affinis*).

	Protéine (g.l ⁻¹)			Hémocyanine (g.l ⁻¹)			[Hc]/ [Prot] * 100			Lactate (mM)			Urate (µM)		
	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n
<i>C. praedator</i>	82,6	49,3	13	39,9	17,5	13	60,1	30,1	12	8,6	4,7	18	147,1	80,3	11
<i>B. th. thermydron</i>	101,9	34,3	40	40,2	8,6	9	44,2	14,2	17	15,2	8,6	38	83,5	7,1	6
<i>R. exoculata</i>	112,7	22,4	30	41,6	9,0	30	37,0	6,6	29	18,4	8,0	27	95,1	/	1
<i>C. chacei</i>	99,7	/	1	41,7	/	1	41,9	/	1	14,2	/	1	92,6	/	1
<i>M. fortunata</i>	123,2	/	1	45,4	/	1	36,8	/	1	6,4	/	1	136,1	/	1
<i>S. mesatlantica</i>	107,6	33,3	5	34,5	12,5	5	31,6	4,2	5	2,6	1,5	5	91,5	42,2	5
<i>C. affinis</i> (bathyal)	46,0	22,2	13	12,6	8,5	13	25,9	8,3	13	1,3	1,5	13	29,8	16,4	13

La teneur en lactate est relativement élevée chez les espèces hydrothermales, surtout chez les crevettes *R. exoculata* et *C. chacei* et chez le crabe *B. thermydron* (> 14 mM pour les trois espèces). À l'inverse, elle est modérée chez le crabe *S. mesatlantica* et chez le crabe bathyal, *C. affinis* (<3mM).

La concentration en urate est plus élevée chez *Cyanagraea praedator* (147 µM) et *Mirocaris fortunata* (136 µM). Elle est du même ordre de grandeur chez les 4 autres espèces hydrothermales, d'environ 90 µM. La teneur en urate chez *Chaceon affinis* est beaucoup plus faible (30 µM).

V-2-3 : Teneurs en composés soufrés

Ce dosage constituait une tentative de mesure des composés soufrés sur des échantillons congelés, sans préparation préalable, c'est-à-dire sans dérivation à bord avant congélation. Les résultats sont regroupés dans le tableau V-4.

Tableau V-4 : Teneurs en composés soufrés dans l'hémolymphe de six espèces de crustacés décapodes hydrothermaux et d'une espèce bathyale.

	SO ₄ ²⁻ (µM)			SO ₃ ²⁻ (µM)			S ₂ O ₃ ²⁻ (µM)			S ²⁻ (µM)		
	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n	Moyenne	± E.T.	n
<i>C.pra edator</i>	22,6	4,9	10	0	0	4	7,6	4,8	4	8,0	0,1	4
<i>B.th ermydron</i>	9,2	3,1	31	n.m.	/	/	n.m.	/	/	n.m.	/	/
<i>R.ex oculata</i>	8,3	4,1	6	3,4	/	1	0,4	/	1	7,5	/	1
<i>C. chacei</i>	6,2	1,4	2	0	/	1	1,1	/	1	6,5	/	1
<i>M. fortunata</i>	n. m.	/	/	0	/	1	0	/	1	7,5	/	1
<i>S.m esatlantica</i>	12,2	5,0	5	0	/	1	23,8	/	1	7,8	/	1
<i>C.a ffinis</i>	14,7	3,3	12	0	0	6	0,3	0,7	6	6,9	0,9	6

Les valeurs obtenues sont comprises entre 6,2 et 22,6 µM pour les sulfates, entre 0 et 3,4 µM pour les sulfites, entre 0 et 23,8 µM pour le thiosulfate et entre 6,5 et 7,8 µM pour les sulfures. Si on somme les différentes formes de composés soufrés, les concentrations les plus importantes sont observées chez *Cyanagraea praedator* (38,2 µM) et *Segonzacia mesatlantica* (43,8 µM) et les plus faibles chez les crevettes *Rimicaris exoculata* (19,6 µM) et *Chorocaris chacei* (13,8 µM).

V-2-4 : Evolution des teneurs en lactate

V-2-4-1/ *Cyanagraea praedator*

Le taux de survie semble faible chez *Cyanagraea praedator*. Sur les trois crabes expérimentés, un seul a survécu pendant toute l'expérimentation qui a duré 14 heures. Le tableau V-5 regroupe l'évolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe des 3 individus.

Tableau V-5 : Evolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de trois individus de *Cyanagraea praedator* maintenus dans un aquarium contenant de l'eau de mer de surface à 15°C et à pression atmosphérique.

	t0	t0+4 h30	t0+14 h
<i>C.pra edator</i> 1	5,4 mM	15,3 mM	Mort
<i>C.pra edator</i> 2	8,1 mM	20,4 mM	Mort
<i>C.pra edator</i> 3	5,5 mM	Non mesuré	4,8 mM

La teneur en lactate augmente énormément pour les deux crabes qui n'ont pas survécu, atteignant 15 et 20 mM de lactate après 4h30. En revanche, elle reste stable pour le troisième individu.

V-2-4-2/ Evolution chez *Bythograea thermydron*

L'évolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Bythograea* sous normobarie est présentée dans la figure V-3. Un seul crabe est mort au bout de 6 heures d'expérimentation. Cette espèce semble donc avoir un taux de survie supérieur à celui de *Cyanograea praedator*.

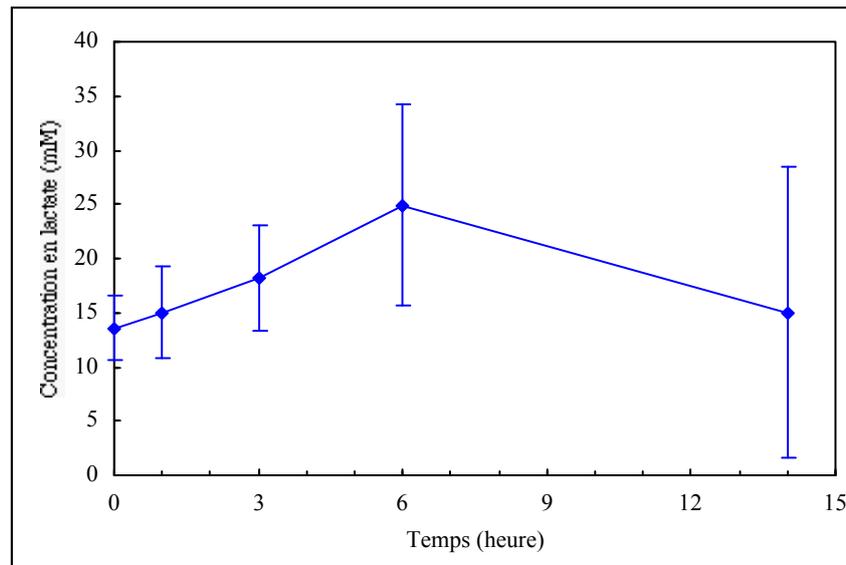


Figure V-3 : Evolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de six individus de *Bythograea thermydron* maintenus dans un aquarium contenant de l'eau de mer de surface à 15°C et à pression atmosphérique. Valeurs moyennes \pm écart-type, $n = 6$ jusqu'à 3 heures puis $n = 5$ à 6 et 14 heures.

La teneur en lactate augmente plus ou moins fortement chez tous les individus pendant les six premières heures, mis à part pour un individu, chez qui elle reste constante. Puis entre 6 et 14 heures d'expérimentation, la concentration en lactate diminue chez tous les individus, sauf chez un où l'on observe que la teneur en lactate augmente toujours. Celle-ci peut varier fortement et rapidement. Ainsi, chez un des spécimens, la teneur en lactate passe de 14 mM à 37 mM entre 3 et 6 heures, puis de 37 à 1,5 mM entre 6 et 14 heures d'expérimentation. On constate également que la variabilité interindividuelle augmente au cours du temps.

Les résultats obtenus sous pression atmosphérique et sous hyperbarie avec des crabes confinés dans un volume réduit sont regroupés dans le tableau V-6.

La teneur en lactate augmente au cours du temps chez les crabes maintenus à pression atmosphérique. Cependant, au bout de 4 heures d'expérimentation, les teneurs en lactate n'étaient pas significativement différentes entre les crabes maintenus à pression

atmosphérique et ceux maintenus à 260 bars.

Par contre, dès 2 heures, les crabes ont consommé pratiquement tout l'oxygène disponible. De même, à 260 bars, la teneur en O₂ est très faible dans l'eau après les 4 heures d'expérimentation. Il est clair que ce type d'expérience nécessite un dispositif de renouvellement de l'eau et de régulation de son oxygénation, qui n'était malheureusement pas disponible lors de ce premier essai d'IPOCAMP.

Tableau V-6 : Evolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de crabes *Bythograea thermydron* maintenus dans des boîtes isolées contenant 0,5 l d'eau de mer de surface à 15°C, soit à pression atmosphérique (normobare), soit à 260 bars (hyperbare) et de la diminution de la teneur en O₂ dans le milieu.

		[Lactate] (mM)			Diminution de la [O ₂] (%)		
		Moyenne	E.T.	n	Moyenne	E.T.	n
Normobare	2 h	12,3	/	1	93,7	/	1
	3 h	5,8	/	1	88,6	/	1
	4 h	31,1	4,4	3	94,1	3,6	3
Hyperbare	4 h	22,8	11,7	6	95,1	0,9	6

V-3/ Discussion

V-3-1 : Ions majeurs de l'hémolymphe

Comparaison avec l'environnement :

Le tableau V-7 présente la composition de l'eau de mer et du fluide hydrothermal et celle estimée d'une zone de mélange correspondant à 10 % de fluide hydrothermal et 90 % d'eau de mer du fond au niveau du Pacifique et de l'Atlantique.

Tableau V-7 : Composition ionique de l'eau du fond et du fluide hydrothermal émis au niveau des dorsales du Pacifique oriental (EPR) et de l'Atlantique (MAR). Tous les dosages ont été réalisés par J.-C. Caprais, à l'exception du cuivre dosé par R. Riso. (communications personnelles). La colonne « estimé » correspond à une estimation des concentrations des différents sels pour un mélange de 10 % de fluide hydrothermal et de 90 % d'eau de mer du fond, ce qui correspond à une température d'environ 27°C.

	EPR			MAR		
	Eau du fond	Estimé	Fumeur	Eau du fond	Estimé	Diffuse ¹
Na⁺ (mM)	442	450	509	406	410	468
Cl⁻ (mM)	592	610	726	550	550	546
Ca²⁺ (mM)	12	23	165	10	11	25
Mg²⁺ (mM)	48	45	2	53	50	22
Cu²⁺ (μM)	0,0	10	102	7	14	88

Les concentrations en ions sodium et chlore ne présentent pas de variations importantes, surtout si l'on considère la zone de mélange où vivent les animaux. De plus, les faibles fluctuations sont très rapides et donc affectent sans doute peu la physiologie des crustacés dans la mesure où les réponses physiologiques face à une variation de salinité se mettent en place après plus de 24 heures d'exposition chez *Bythograea therymydron* (Anne-Sophie Martinez, communication personnelle). Cependant, certains ions, quantitativement moins importants mais biologiquement actifs, peuvent, quant à eux, fluctuer de façon plus importante du fait de leur différence de concentration entre l'eau du fond et le fluide hydrothermal, en particulier le magnésium et le calcium.

La concentration en sodium dans l'hémolymphe des différentes espèces est isotonique à celle de leur environnement, celle en chlore est légèrement hypotonique. La teneur en calcium est hypo-réglée par rapport à celle du fluide ; en revanche, elle est isotonique à l'eau de mer du fond. La concentration en magnésium est hypo-réglée par rapport à l'eau du fond, mais elle est hyper-réglée par rapport à celle du fluide pour les espèces du Pacifique. Martinez et collaborateurs (Anne-Sophie Martinez, communication personnelle) ont montré que *Bythograea therymydron* est sténohalin, c'est-à-dire qu'il ne supporte pas de grandes variations de salinité de son milieu environnant et qu'il est osmoconformeur. Cette espèce présente également des adaptations très rapides aux changements de salinité ce qui suppose des échanges importants d'eau et d'ions à travers la paroi du corps. En effet, il apparaît que *B. therymydron* s'adapte en 15-24 heures à une diminution de salinité (Anne-Sophie Martinez, communication personnelle) alors que les autres décapodes ont besoin en général de plusieurs jours et parfois d'une à deux semaines pour s'adapter à ce type de variation de salinité (revue dans Mantel et Farmer, 1983).

L'environnement hydrothermal présente un enrichissement en cuivre, avec des concentrations jusqu'à 100 fois supérieures à celles des eaux côtières au niveau des fumeurs

(Tableau V-7). Le cuivre présente, comme chez les espèces littorales, un phénomène de bioaccumulation dans l'hémolymphe par rapport au milieu environnant, avec des concentrations jusqu'à plus de 100 fois supérieures dans l'hémolymphe par rapport à celle du milieu environnant (Tableaux V-1, V-2 et V-7).

Comparaison avec les espèces littorales:

La composition ionique de l'hémolymphe de *Cyanograea praedator*, *Bythograea therydron*, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis* est similaire à celle des espèces littorales pour la majorité des composés (Figure V-2). La forte variabilité interindividuelle, mesurée chez toutes les espèces étudiées, peut résulter du fait que l'état physiologique des animaux n'est que partiellement estimé et la présence d'un ou plusieurs individus moribonds peut augmenter considérablement la gamme des concentrations mesurées.

La concentration en magnésium est plus importante dans l'hémolymphe des crabes que dans celle des crevettes, une tendance que l'on retrouve également chez les crustacés littoraux (Frederich *et al.*, 2000 ; Tentori et Lockwood, 1990 ; Walters et Uglow, 1981). La teneur en magnésium dans l'hémolymphe des crevettes est similaire à celle habituellement observée chez les espèces littorales, comprise entre 5 et 15 mM (Frederich *et al.*, 2000). Dans le cas de *Rimicaris exoculata*, on observe que la concentration en magnésium est légèrement supérieure à celle des autres espèces. Cependant, les individus utilisés lors de ce dosage étaient moribonds au moment du prélèvement d'hémolymphe ce qui peut expliquer cette teneur plus élevée en magnésium. En revanche, la teneur en magnésium dans l'hémolymphe des brachyours est légèrement inférieure à celle généralement mesurée chez les espèces littorales (30 à 50 mM) (Walters et Uglow, 1981 ; Tentori et Lockwood, 1990 ; Frederich *et al.*, 2000). Le calcul du ratio Mg^{2+}/Cl^{-} montre que le magnésium représente une part plus importante de la composition en ions de l'hémolymphe chez les crabes que chez les crevettes. Le magnésium est un inhibiteur de l'activité neuromusculaire, c'est-à-dire que plus la concentration en magnésium augmente, plus l'activité de l'animal est faible (Katz, 1936). Le terme d'activité se réfère à la vitesse de réponse de l'animal à une stimulation mécanique ainsi qu'à l'activité générale (Robertson, 1953). On peut donc supposer que les crabes hydrothermaux, qui ont une concentration en magnésium plus faible que leurs cousins

littoraux, répondront plus rapidement à une stimulation extérieure. Ceci leur permettra de fuir plus rapidement lorsqu'ils percevront un facteur environnemental défavorable, comme une augmentation brutale de la température. Walters et Uglow (1981) ont montré une relation linéaire négative entre la concentration en magnésium dans l'hémolymphe et l'activité cardiaque relative. Lors de l'augmentation de l'activité cardiaque, il y a augmentation du débit sanguin au niveau des tissus et des branchies, et donc un renouvellement plus rapide de l'hémolymphe. Ainsi, les crabes hydrothermaux, en ayant une concentration en magnésium plus faible, auront un débit sanguin plus élevé. Ce dernier paramètre peut se traduire par une meilleure extraction d'O₂ au niveau des branchies, ce qui peut être considéré comme une adaptation en milieu hypoxique, tel que le milieu hydrothermal.

La teneur en cuivre libre, c'est-à-dire non fixé au site actif de l'hémocyanine, est très élevée comparée à celle des espèces non hydrothermales. Les fortes teneurs mesurées dans l'hémolymphe des espèces hydrothermales sont assez inhabituelles comparées aux doses létales chez les espèces littorales telles que *Carcinus maenas* (150-220 µmol.l⁻¹ dans l'hémolymphe) (Rtal *et al.*, 1996). Le cuivre hémolympatique peut exister en solution ou fixé à des protéines circulantes, le plus souvent sur l'hémocyanine mais aussi sur les méthallothionéines, protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine. Le phénomène de bio-accumulation du cuivre semble exister chez d'autres espèces hydrothermales telles que *Riftia pachyptila*, *Calymene magnifica*, *Bathymodiolus thermophilus* et *Neomphalus fretterae* (Cosson, 1996). L'existence de protéines de type méthallothionéines a été démontrée chez plusieurs espèces hydrothermales, en particulier, *Riftia pachyptila*, *Calymene magnifica* et *Alvinella pompejana* (Cosson-Mannevy *et al.*, 1986). Chez le crabe hydrothermal *Bythograea thermydron* (Cosson et Vivier, 1997), le cuivre est trouvé en grande abondance dans la glande digestive, ce qui peut être lié à la synthèse de l'hémocyanine et/ou à la présence de granules de cuivre contenant des sulfures dans des cellules particulières. Il a été montré que l'hémocyanine pouvait représenter jusqu'à 50 % des protéines synthétisées dans cet organe (Viarengo et Nott, 1993). De plus, cette espèce présente de fortes capacités d'induction des méthallothionéines dont les teneurs tissulaires, par rapport à la teneur totale en protéines, sont les plus élevées de tous les organismes hydrothermaux étudiés (Cosson et Vivier, 1997). Chez *Rimicaris exoculata*, le cuivre est en majorité présent sous forme insoluble et la plus grande concentration en cuivre est mesurée dans les branchies. Cependant, la prédominance de la forme insoluble pourrait être due à l'existence de dépôts minéraux sur les branchies (Geret *et al.*, soumis).

V-3-2 : Composés organiques

Les concentrations en protéines et en hémocyanine sont variables, comme chez beaucoup de crustacés. L'aspect le plus surprenant est la grande différence qui existe entre la protéinémie totale et la teneur en hémocyanine. Nos résultats montrent que l'hémocyanine représente entre 26 et 60 % des protéines circulantes (Tableau V-3). Cependant, aucune fraction majeure n'a été observée sur les spectres FPLC à 280 nm, autres que celles correspondant aux hexamères et aux dodécamères d'hémocyanine (cf. chapitre VI). Il faut noter que la concentration en hémocyanine mesurée selon notre protocole (*i.e.* absorbance à 335 nm) correspond à l'hémocyanine fonctionnelle. Par conséquent, cette mesure ne prend pas en compte l'apo-hémocyanine, dont la partie protéique est identique à celle de l'hémocyanine mais qui ne contient pas de cuivre au site actif, et ce dérivé peut représenter une part relativement importante des protéines totales de l'hémolymphe (Horn et Kerr, 1963). L'apohémocyanine pourrait avoir plusieurs rôles :

- réserve énergétique,
- réserve pour fabriquer de l'hémocyanine fonctionnelle très rapidement, juste par incorporation de cuivre au niveau du site actif (le site d'incorporation du cuivre dans l'apoHc n'est pas encore défini bien précisément),
- détoxification des métaux, en particulier du cuivre. Comme nous l'avons dit précédemment, la teneur en cuivre non hémocyanique est très élevée chez les espèces hydrothermales. Or, le cuivre peut se fixer sur l'hémocyanine en-dehors du site actif (Rtal *et al.*, 1996 ; Rtal et Truchot, 1996). L'apohémocyanine, en fixant le cuivre, éviterait donc l'effet létal de celui-ci lorsqu'il se trouve en trop grande concentration dans l'hémolymphe.

Il existe également une autre forme de protéine, la cryptocyanine (Terwilliger *et al.*, 1999) qui est apparentée aux hexamères d'hémocyanine. Cette protéine éluée en même temps que les hexamères d'hémocyanine mais, comme dans le cas de l'apohémocyanine, elle est dépourvue de cuivre et n'est donc pas prise en compte dans le dosage de l'hémocyanine. Elle intervient au cours du cycle de mue (Terwilliger *et al.*, 1999).

La teneur en lactate est assez élevée pour toutes les espèces hydrothermales, à l'exception de *Segonzacia mesatlantica*. Il est fort probable que cette concentration élevée soit due au stress provoqué par la capture et la remontée en surface. Les espèces littorales, telles que

Carcinus maenas, présentent une augmentation de lactate dans leur hémolymphe juste après leur capture puis celle-ci diminue après quelques heures d'acclimatation pour devenir très basse sous normoxie et au repos (< 0,5 mM) (Lallier *et al.*, 1987). Chez *Rimicaris exoculata*, une diminution de la teneur en lactate au cours du temps a été observée lors d'expérience d'acclimatation à l'hypercapnie (cf. chapitre VIII).

La teneur en urate chez les crustacés hydrothermaux se trouve dans les valeurs supérieures à celles mesurées chez les espèces littorales (Lallier *et al.*, 1987). Ces valeurs légèrement élevées peuvent s'expliquer par le fait qu'une augmentation de la température ou une hypoxie du milieu environnemental induisent une augmentation de la teneur en urate dans l'hémolymphe (Lallier *et al.*, 1987).

V-3-3 : Teneurs en composés soufrés

La proportion des différents composés soufrés peut être biaisée car les échantillons ont été dérivatisés au moment de leur analyse et non au moment de leur prélèvement, avant la congélation. Des études de la cinétique d'oxydation des composés soufrés au cours du temps et de la congélation seraient nécessaire pour connaître la façon dont ils évoluent. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être émises avec les résultats obtenus.

Lors d'expériences d'acclimatation de crabes *Bythograea thermydron* à des concentrations variables de sulfures dans son environnement, Vetter et ses collaborateurs (1987) ont montré que le thiosulfate est le composé soufré majoritaire dans l'hémolymphe du crabe. Ce composé est le produit final formé lors de l'oxydation des sulfures au niveau de l'hépatopancréas. Or, dans notre cas, le thiosulfate est uniquement majoritaire dans l'hémolymphe de *Segonzacia mesatlantica*. Chez les autres espèces, à l'exception de *Chorocaris chacei*, ce sont les sulfates qui sont majoritaires. Les sulfates peuvent résulter de la lente transformation des thiosulfates, qui ne sont excrétés qu'au niveau des glandes antennaires, les membranes corporelles étant imperméables à ce composé (Vetter *et al.*, 1987). Les teneurs en composés soufrés augmentent dans l'hémolymphe en même temps que les concentrations en sulfure dans le milieu environnant. Si on considère les teneurs totales en composés soufrés, on peut supposer que *Segonzacia mesatlantica* et *Cyanagraea praedator* vivent dans un environnement plus riche en sulfures que *Chorocaris chacei* et *Rimicaris exoculata*, ce qui est observé dans le cas de *C. praedator* (Tableau II-2). Si cette hypothèse est exacte, on peut en déduire que *S. mesatlantica* vit dans un environnement plus riche en

sulfures que les crevettes et donc dans un environnement plus chaud. Des données plus complètes sur la composition en composés soufrés chez *Bythograea thermydron* et *Mirocaris fortunata* seraient nécessaires ainsi que des données plus précises sur l'environnement physico-chimique de *S. mesatlantica*.

V-3-4 : Évolution des teneurs en lactate

V-3-4-1/ Évolution à pression atmosphérique et en milieu ouvert

La teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Cyanograea praedator* est relativement faible au temps t_0 par rapport à *Bythograea thermydron* (tableau V-4 et Figure V-3). Les deux individus de *C. praedator* qui sont morts présentaient une teneur en lactate très élevée. On peut supposer que cette augmentation en lactate est le reflet du stress subi par les animaux. Par contre, pour le troisième individu, le taux de lactate reste constant durant toute l'expérimentation. La teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Bythograea thermydron* augmente durant les six premières heures pour ensuite diminuer sauf chez un individu (Figure V-3). *Bythograea* présente des mouvements désordonnés pendant les premières heures de son maintien dans les aquariums, se retrouvant souvent sur le dos (observation personnelle). On sait qu'un des principaux effets de la décompression concerne les propriétés des membranes d'où des troubles neurologiques potentiellement importants (e.g. Airriess et Childress, 1994). Des teneurs élevées en glucose ont également été mesurées dans l'hémolymphe de *B. thermydron*, avec une augmentation au cours du temps (Jean-Yves Toullec, communication personnelle), et ce pendant 48 heures. Ces fortes teneurs en lactate sont très certainement dues au stress provoqué par la remontée et par le maintien des animaux à pression atmosphérique. Ces expérimentations réalisées à pression atmosphérique, montrant une diminution de la concentration en lactate au bout de 14h, nous permettent d'envisager de réaliser des expériences de physiologie à pression atmosphérique après récupération adéquate (voir Chapitre VIII).

V-3-4-2/ Évolution en milieu confiné

Les expériences réalisées avec l'enceinte pressurisée IPOCAMP montrent que la teneur en lactate ne varie pas beaucoup entre les individus maintenus à pression atmosphérique et ceux maintenus à 260 bars. Cependant, les mesures d'O₂ montrent que les différents crabes étaient déjà en quasi-anoxie au bout de 2 heures d'expérimentation (temps le plus court

utilisé). De plus, lorsqu'on compare la consommation d'O₂ entre 2 et 4 heures, on constate que celle-ci ne varie pratiquement pas. On peut supposer que *Bythograea thermydron* est passé à un métabolisme anaérobie qui induit une augmentation de la teneur en lactate dans l'hémolymphe (ce qu'on observe à pression atmosphérique, Tableau V-6). Les capacités anaérobies de *B. thermydron* sont assez exceptionnelles. Mickel et Childress (1982b) ont montré que cette espèce peut survivre pendant plus de 12 heures dans un environnement dépourvu d'O₂.

V-4/ Conclusion

L'hémolymphe des crustacés hydrothermaux présente une composition ionique relativement proche de celle du milieu environnant à l'exception du magnésium, du calcium et du cuivre. Ils semblent être sténohalins et osmoconformeurs (Anne-Sophie Martinez, communication personnelle). La composition de l'hémolymphe est similaire à celle des crabes littoraux et bathyaux pour la plupart des composés. Les hémocyanines ne représentent qu'une proportion modérée des protéines totales. Or, aucune protéine majeure autre que les différentes formes d'hémocyanine n'apparaît sur les spectres d'élution des hémolymphe en chromatographie basse pression (cf. chapitre VI). Ces résultats, à priori contradictoires, pourraient s'expliquer par la présence en grande quantité d'apohémocyanine, voire de cryptocyanine, qui éluent au même endroit que les hexamères d'hémocyanine mais qui, dépourvues de cuivre hémocyanique, ne sont pas détectées lors du dosage de l'hémocyanine. Les crustacés hydrothermaux présentent de fortes teneurs en cuivre dont la détoxification pourrait faire intervenir, en plus des métallothionéines (Cosson, 1997), l'apoHc et/ou la cryptocyanine ce qui expliquerait leur abondance. Les teneurs en lactate sont très élevées, ce qui est probablement dû au stress de la remontée et du maintien à pression atmosphérique. Les expériences en milieu confiné montrent que *B. thermydron* peut survivre assez longtemps dans un environnement dépourvu d'O₂. L'augmentation de la teneur en lactate laisse supposer que son métabolisme est alors anaérobie. Des mesures de la teneur en O₂ dans l'hémolymphe de crabes en anoxie devraient permettre de confirmer cette hypothèse.

VI - STRUCTURE QUATERNAIRE DES HEMOCYANINES

Les hémocyanines sont connues pour leur grande plasticité structurale. La composition en monomères des polymères d'hémocyanine peut varier selon le stade de développement, mais aussi suivant les paramètres physico-chimiques de l'environnement du crustacé. En raison de l'extrême variabilité des paramètres physico-chimiques de l'environnement hydrothermal profond, l'étude de la plasticité éventuelle des hémocyanines des crustacés décapodes nous est parue intéressante à étudier. Pour réaliser ces études structurales, nous avons utilisé tout un panel de techniques biophysiques et biochimiques telles que la microscopie électronique à transmission en contraste négatif, la chromatographie basse pression, des gels d'électrophorèse et la spectrométrie de masse.

VI-1/ Matériel et méthodes

VI-1-1 : Prélèvements de l'hémolymphe

Les individus de *Cyanograea praedator* et *Bythograea thermydron* ont été récoltés lors des campagnes HOT'96 et HOPE'99 à 9°N sur la ride du Pacifique oriental. Les spécimens de *Mirocaris fortunata*, *Chaceon affinis* ont été prélevés durant la mission MARVEL sur le site Menez Gwen (37°50'N) de la ride médio-Atlantique (MAR) et ceux de *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* et *Segonzacia mesatlantica* durant la mission PICO sur les sites de Rainbow (36°13'N) et de Lucky Strike (37°17'N) de la MAR. Le prélèvement d'hémolymphe s'est fait comme décrit dans le chapitre V-1-1.

VI-1-2 : Microscope électronique à transmission (MET)

L'observation des dodécamères et des hexamères d'hémocyanines s'est faite par microscopie électronique à transmission en contraste négatif (Valentine *et al.*, 1968). Cette technique consiste à adsorber les molécules d'hémocyanine (en solution à 0,2 mg.ml⁻¹) sur un film de carbone préalablement déposé sur une lame de mica. Le film de carbone est ensuite

déposé sur une solution d'acétate d'uranyle à 2 % (agent contrastant) pendant environ une minute. Une grille de cuivre est posée sur le film de carbone et récupérée à l'aide d'un morceau de papier journal. Après séchage, les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Jeol JEM-1200EX. Les molécules apparaissent en clair sur un fond sombre. L'observation a été faite uniquement sur les hémocyanines de *Cyanagraea praedator*.

VI-1-3 : Purification des différents assemblages d'hémocyanine

VI-1-3-1/ Purification

La purification FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) se base sur une méthode chromatographique d'exclusion par la taille à basse pression. Pour détecter les molécules d'hémocyanine, la densité optique est mesurée à 280 nm (pic d'absorption des protéines) et à 337 nm (pic d'absorption de l'oxyhémocyanine). La colonne utilisée est une colonne Superose 6 qui permet la séparation de protéines de poids moléculaire compris entre 5 et 5 000 kDa. La pression de travail est de 8 bars et le débit est de 0,5 ml.min⁻¹. Le tampon d'éluion a pour composition : NaCl : 500 mM, KCl : 10 mM, MgSO₄, 7H₂O : 30 mM, CaCl₂, 2H₂O : 20 mM, Tris : 50 mM; pH : 7. Cent à 200 µl d'hémolymphe pure ont été injectés en haut de la colonne. Les fractions absorbant aux deux longueurs d'onde (280 nm et 337 nm) ont été récupérées. Une fois purifiées, les différentes fractions sont concentrées sur Centricon 10 dont le point de coupure se situe à 10 kDa. La concentration en protéines de chaque fraction est mesurée par la méthode de Lowry (1951).

VI-1-3-2/ Estimation de la masse des différents assemblages

Une courbe de calibration est établie en injectant, dans les mêmes conditions que l'échantillon étudié, de l'hémoglobine vasculaire de *Riftia pachyptila* obtenue sur des fluides conservés congelés. On obtient ainsi 4 pics correspondant à SV1 (3 000 kDa), SV2 (440 kDa), SV3 (220 kDa) et SV4 (150 kDa) (Zal *et al.*, 1996). Grâce à ces 4 molécules, on établit une courbe d'étalonnage correspondant à l'équation : $f(\log PM) = -K_{av}$. La valeur de K_{av} correspond à l'équation : $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, (V_e est le volume d'éluion de la substance considéré, V_0 est le volume mort de la colonne utilisée, mesuré par une substance dont le poids moléculaire est en limite supérieure du maillage du gel et V_t est le volume total de la colonne). Cette équation permet d'obtenir une droite d'étalonnage qui sert par la suite à

déterminer les masses moléculaires de protéines inconnues. Toutefois, la précision de la masse mesurée est, au mieux, de l'ordre de 10 %. Cette mesure dépend de nombreux paramètres indépendants de la masse elle-même, comme la forme de la molécule ou l'interaction des molécules avec la matrice formée par le gel.

VI-1-3-3/ Etude de la stabilité thermique

Pour étudier la stabilité thermique des différentes formes d'hémocyanine, l'hémolymphe de chaque espèce a été incubée à 35°C (température maximale d'étude des propriétés fonctionnelles) pendant 1 heure, 3 heures, 6 heures, 12 heures et 24 heures. A chaque temps d'expérimentation, 50 µl d'hémolymphe ont été injectés dans la colonne et la proportion dodécamère / hexamère mesurée.

VI-1-4 : Electrophorèse

Le principe de l'électrophorèse est de faire migrer des protéines dans un gel d'acrylamide (PAGE = PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) sous l'action d'un champ électrique ce qui permet la séparation des molécules en fonction de différents paramètres suivant le type d'électrophorèse. Pour cette étude, un gel de migration à 10 % et un gel de concentration à 4 % ont été utilisés (Laemmli, 1970).

VI-1-4-1/ Sodium Dodecyl Sulfate-PAGE (SDS-PAGE)

On utilise ce type d'électrophorèse pour estimer le poids moléculaire des différents monomères constituant les hexamères et les dodécamères d'hémocyanine. Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), agent dénaturant, qui se fixe de façon quasi-identique sur toutes les protéines, permet une migration dépendant essentiellement du poids moléculaire. Des marqueurs de poids moléculaires connus (bleu dextran 2 000 kDa, BSA 67 kDa, ovalbumine 43 kDa, anhydrase carbonique 30 kDa, inhibiteur de trypsine de graine de soja 20,1 kDa) permettent d'estimer le poids moléculaire apparent des molécules (LMW, Pharmacia).

Les échantillons purifiés, l'hémolymphe totale et les marqueurs de poids moléculaires sont d'abord incubés volume à volume dans un tampon de traitement contenant du SDS en présence de 2-β-mercaptoéthanol. Puis, ils sont mis à bouillir pendant 90 secondes dans un bain marie à 100°C. Les gels de polyacrylamide utilisés sont formés d'un gel inférieur, appelé « gel de séparation », de pH 8,8, constitué de 10 % acrylamide et 2,7 % bis-acrylamide et

d'un gel supérieur, appelé « gel de concentration », de pH 6,8 constitué de 4 % acrylamide et 2,7 % bis-acrylamide. Le tampon des cuves est le Tris-Glycine (pH 8,3) contenant 0,1 % de SDS. L'appareil utilisé est un système à migration verticale LKB utilisant des gels de 1,5 mm d'épaisseur, pour des dimensions de 16 cm x 18 cm. Les échantillons migrent pendant 4 heures environ à courant constant (250 V).

VI-1-4-2/ PAGE après dissociation des polymères d'hémocyanine en monomères

Les différentes sous-unités composant l'hémocyanine ayant toutes à peu près le même poids moléculaire, afin de les dénombrer de façon moins équivoque, on réalise une migration en conditions natives. En plus du poids moléculaire, la charge des unités intervient également dans ce type de migration.

Pour dissocier les oligomères d'hémocyanine en monomères, 10 µl de sérum sont dilués dans 300 µl de tampon contenant du Tris 0,05 M (pH 8,9) et de l'EDTA 0,01 M. La dissociation a lieu pendant 12 heures à 4°C (Mangum et Greaves, 1996).

Comme pour les migrations en SDS-PAGE, les gels de polyacrylamide sont composés d'un gel de migration à 10 % et d'un gel de concentration à 4 %. Le tampon des cuves est le Tris-Glycine (pH 8,3). C'est le même appareillage qui est utilisé dans les deux types d'électrophorèse.

VI-1-4-3/ Coloration des gels

Après migration, les gels sont mis pendant 12 heures dans une solution fixatrice composée 45 ml d'éthanol absolu, 15 ml d'acide acétique pur et 75 µl de formol. Après réhydratation progressive, le gel est coloré à l'argent. Les protéines sont réduites à l'aide d'une solution d'hyposulfite de sodium 0,01 %, puis exposées à une solution de nitrate d'argent après rinçage. Les protéines réagissent avec l'argent et le produit est visualisé avec un révélateur. Cette technique permet de détecter de très faibles quantités de protéines (2 ng de protéines) (Bollag et Edelstein, 1991).

VI-1-5 : Spectrométrie de masse

Cette étude a été effectuée par Franck Zal (Station Biologique de Roscoff) en collaboration avec Brian N. Green (Micromass, Altrincham, UK). En raison du poids élevé des chaînes protéiques constituant les hémocyanines, l'utilisation de la spectrométrie de

masse s'avérait encore impossible il y a quelques années. L'émergence de nouveaux instruments nous a permis d'effectuer les premières analyses d'hémocyanine en spectrométrie de masse. Cette étude a été réalisée par deux types d'instruments : un ESI-MS (ElectroSpray Ionisation – Mass Spectrometry) classique et un ESI-QToF (ElectroSpray Ionisation – Quadrupole Time of Flight).

VI-1-5-1/ Définition d'un spectre de masse

Un spectromètre de masse est un appareil qui, à partir de la substance étudiée, produit des particules ionisées, qu'il sépare en fonction du rapport masse/charge, avant d'en donner la répartition sous forme d'un spectre de masse. Un spectromètre de masse se décompose en trois parties distinctes (Figure VI-1) : (i) une source, permettant l'ionisation des molécules ou la fragmentation des ions ; (ii) un système dispersif, séparant les différentes particules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) ; (iii) un ensemble de détection, d'enregistrement et de traitement du signal, qui mesure l'abondance relative de chaque particule ionisée.

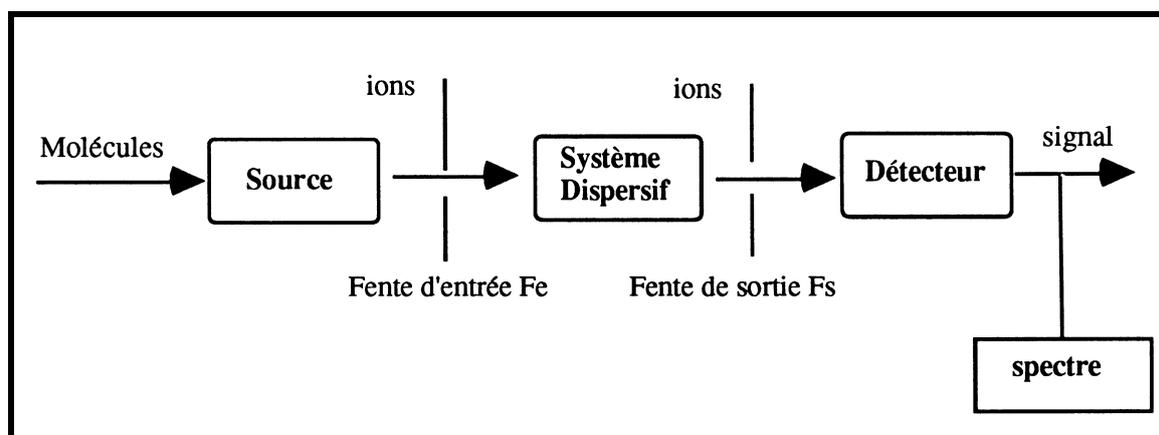


Figure VI-1 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse (dessin F. Zal).

VI-1-5-2 : Intérêt de l'ESI-MS dans l'analyse protéique

La précision de la technique ESI-MS est de l'ordre de 0,01 %, tandis que les techniques classiques, telles que SDS-PAGE, chromatographie ou ultracentrifugation, déterminent la masse avec une précision de seulement 5 à 10 % de la masse réelle. De plus, c'est une méthode rapide, puisqu'il faut environ 15 minutes entre l'injection de l'échantillon et l'acquisition du spectre de masse final. Elle est également sensible et nécessite une quantité infime de l'échantillon étudié, puisqu'une picomole de protéine pure suffit. Grâce à

l'utilisation de logiciels d'analyse numérique performants, on peut également déterminer les masses dans un mélange complexe, comme c'est le cas pour les sous-unités d'hémocyanine de crustacés décapodes. En raison des propriétés intrinsèques de cette technique, c'est-à-dire haute résolution et faible bruit de fond, on peut également déterminer la présence de composés mineurs au sein d'une protéine multimérique.

VI-1-5-3 : Analyse de l'Hc par ESI-MS de type Q-ToF : conditions natives

Le système Q-ToF-MS™ (Micromass UK, Ltd.) nous a permis d'étudier les polymères d'hémocyanine en conditions natives et donc de déterminer la masse totale des différents polymères. Le couplage d'un quadripôle (Q) et d'un détecteur temps de vol (ToF = Time-of-Flight) (Figure VI-2) permet de combiner la simplicité d'utilisation d'un quadripôle avec la sensibilité, la résolution et la précision des mesures de masse d'un réflectron-TOF. L'utilisation d'une source Z-Spray, par ailleurs, nous a permis d'éliminer une grande partie des ions sodium associés à de gros complexes protéiques et difficilement éliminés par simple dialyse. Cette source permet d'augmenter considérablement la sensibilité donc la précision des mesures.

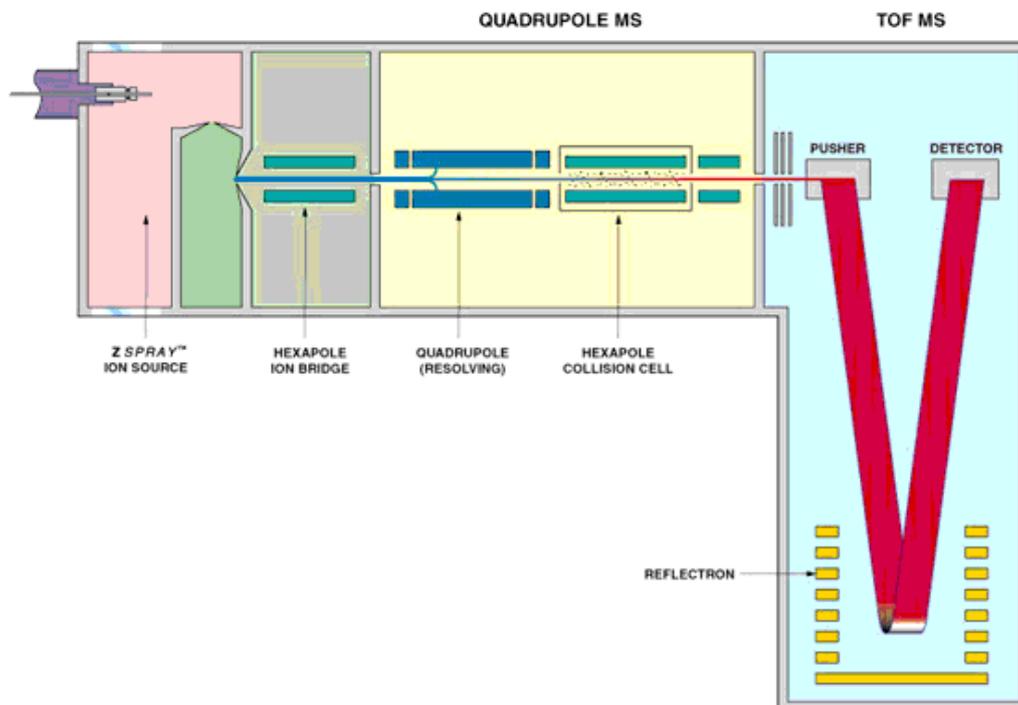


Figure VI-2 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type Z Spray™-QToF-MS (issu du site internet : www.micromass.co.uk).

Les échantillons sont dessalés par rinçages successifs, à l'aide de Microcon ayant un

point de coupure de 10 kDa, dans une solution d'acétate d'ammonium à 200 mM, pH 6,5-7,5. Les échantillons sont alors introduits à l'aide d'une seringue dans la source avec un débit de 3-4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. L'analyse de masse a été faite en sortie du ToF, en balayant une gamme de m/z compris entre 600 et 4 000 en 10 secondes par scan. Les données ont été accumulées sur une période de 5 à 10 minutes. Les spectres finaux ont été obtenus après déconvolution par le système MaxEnt ou par Transformée de Fourier.

VI-1-5-4 : Analyse de l'Hc par ESI-MS de type quadripôle : conditions dénaturantes

Nous avons utilisé comme système d'introduction de l'échantillon une source ESI et comme système dispersif un quadripôle. Ce dispositif nous a permis d'étudier dans des conditions dénaturantes les différents monomères constituant les polymères d'hémocyanine. Toutes les analyses ont été réalisées à partir d'une solution de travail de concentration 0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ dans 50 % d'acétonitrile aqueux contenant 0,4 % d'acide formique. Les échantillons ont été introduits à l'aide d'une seringue à travers un capillaire en silice dans la source électrospray avec un débit de 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. L'analyse ESI-MS a été faite sur un spectromètre de masse de type quadripôle LCZ Quattro (Micromass UK, Ltd.) balayant une gamme de m/z compris entre 600 et 1 700 en 10 secondes par scan. Pour obtenir les spectres finaux, les données ont été accumulées sur une période de 5 à 10 minutes, avant d'être déconvolués à l'aide du système d'analyse MaxEnt (Ferridge *et al.*, 1992) afin de présenter les données sur une échelle de masse moléculaire. La calibration de l'échelle de masse s'est faite à l'aide d'ions multichargés obtenus par l'introduction séparée de 10 $\text{pM}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de myoglobine de cœur de cheval (16951,5 Da, Sigma Cat. M-1882). Les masses moléculaires sont basées sur le poids atomique des éléments donnés par IUPAC (IUPAC, 1993).

Le tableau VI-1 présente une synthèse de l'apport, des avantages et des inconvénients des différentes techniques utilisées pour étudier la structure quaternaire des hémocyanines de crustacés décapodes.

Tableau VI-1 : Apports, avantages et inconvénients de chacune des techniques utilisées pour étudier la structure quaternaire des hémocyanines de crustacés décapodes hydrothermaux et bathyal.

	Apports de la technique	Avantages	Inconvénients
MET	Observation de la structure quaternaire des agrégats d'Hc	Visualisation des molécules Dimension du polymère	Peu informative
FPLC	Séparation des différents agrégats d'Hc en fonction de la masse	Purification des différentes formes d'Hc et mesure de leur masse	Mesure des masses peu précises
SDS-PAGE	Séparation par la masse des différents monomères d'Hc	Facile à mettre en œuvre Peu onéreux	Précision de 10 % sur les masses
PAGE natif	Séparation des différents monomères d'Hc selon la masse et la charge.	Facile à mettre en œuvre Peu onéreux	Résolution faible
ESI-Q-MS	Mesure de la masse des différents monomères d'Hc	Précision des mesures : 0,01% Peu d'échantillonnage	Appareil onéreux
ESI-Q-ToF-MS	Mesure de la masse des différents agrégats d'Hc	Précision des mesures : 0,01% Peu d'échantillonnage	Appareil onéreux

VI-2/ Résultats

VI-2-1 : Microscope électronique à transmission (MET)

La figure VI-3 présente une vue des molécules d'hémocyanine de *Cyanograea praedator* en microscopie électronique à transmission.

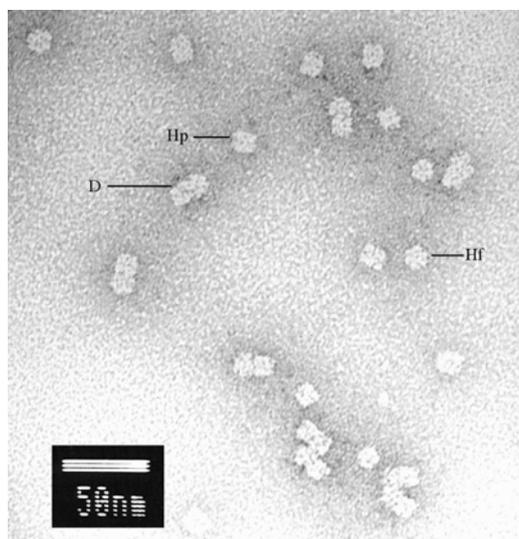


Figure VI-3 : Molécules d'hémocyanine de *Cyanograea praedator* observées en microscopie électronique à transmission en contraste négatif. D : Dodécamères ; Hp : Hexamères, vue de profil ; Hf : Hexamères, vue de face.

On observe des hexamères en vue de face (rosettes à 6 pétales, dimensions : 14 nm) et en vue de profil (forme rectangulaire, dimensions : 14 x 11 nm). On observe également des

dodécamères qui semblent formés par l'association perpendiculaire de deux hexamères.

VI-2-2 : FPLC - Étude des molécules natives

La figure VI-4 présente les profils d'éluion obtenus par FPLC avec de l'hémolymphe de *Cyanograea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica*, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* et *Chaceon affinis*. Deux pics majeurs, absorbant à la fois à 280 nm et 337 nm, sont observés chez les crabes et un pic majeur chez les crevettes. Le premier pic, présent chez les crabes, éluant à environ 928 kDa, correspond aux dodécamères et le deuxième, présent chez les crabes et les crevettes, éluant à environ 385 kDa, correspond aux hexamères.

Contrairement à la majorité des brachyours littoraux, la forme hexamérique est la forme prédominante chez *C. praedator* et *B. thermydron*, et non la forme dodécamérique. Chez *C. praedator*, les hexamères représentent 54,7 % des hémocyanines et les dodécamères 45,3 %. Le spectre d'éluion de l'hémolymphe de *B. thermydron* présente un pic supplémentaire, éluant en premier et correspondant à une masse d'environ 2 300 kDa. Ce pic représente 2,8 % des hémocyanines, les dodécamères 26,8% et les hexamères 70,4 %. Contrairement aux deux espèces hydrothermales, les dodécamères représentent la forme majoritaire de l'hémocyanine chez *Chaceon affinis* avec 61,7 % des hémocyanines totales. Les hexamères représentent, quant à eux, 38,3 % des hémocyanines totales.

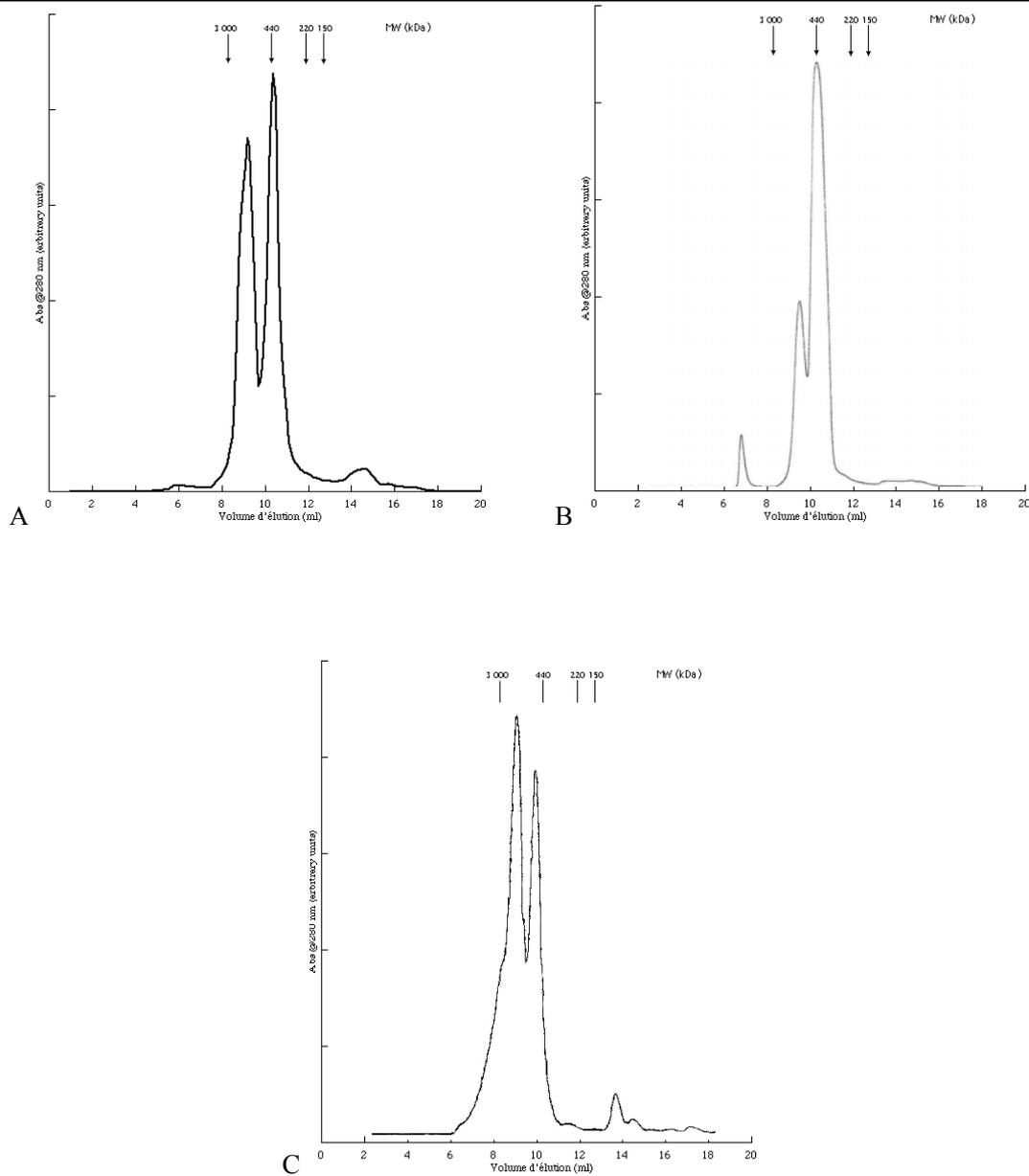


Figure VI-4: Profils d'élution d'hémolymphe native de *Cyanagraea praedator* (A), *Bythograea therydron* (B), *Chaceon affinis* (C), obtenus par FPLC.

Pour *Rimicaris exoculata* et *Chorocaris chacei*, les dodécamères représentent 8,7 % et 3,6 % respectivement, et les hexamères 88,5 % et 95,3 %.

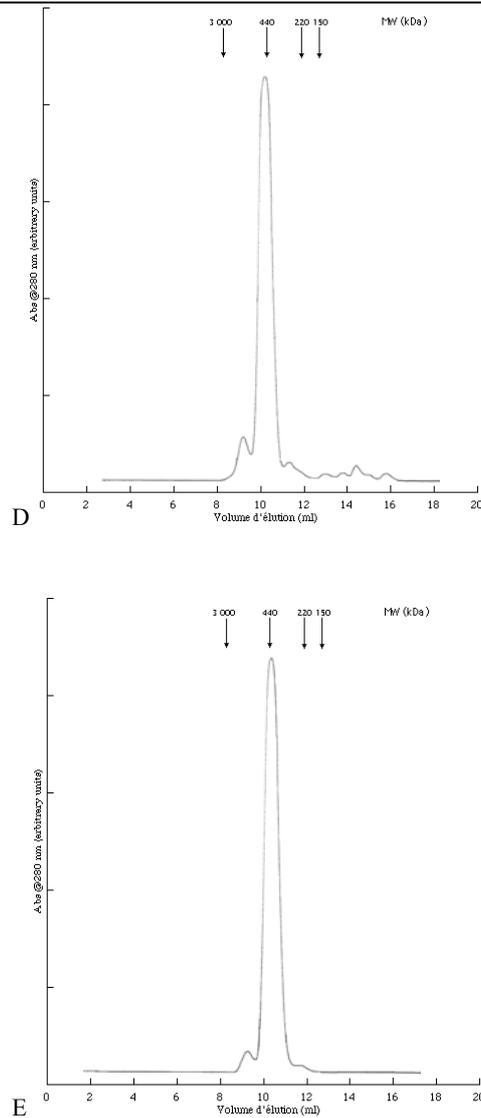


Figure VI-4 (suite) : Profils d'élution d'hémolymphe native de *Rimicaris exoculata* (D) et *Chorocaris chacei* (E), obtenus par FPLC.

Les études de stabilité thermique ont montré que les deux formes d'hémocyanine sont stables jusqu'à 35°C, pour les 5 espèces étudiées. En effet, sur les profils FPLC obtenus après incubation, on n'observe pas de dissociation des dodécamères en hexamères ou en monomères, ni des hexamères en monomères.

VI-2-3 : Electrophorèses – Étude de la composition en sous-unités

Les migrations sont comparables, mais le nombre et la position des bandes diffèrent selon les espèces.

Chez *Cyanagraea praedator*, quand les hexamères purifiés sont soumis à un SDS-

PAGE (Figure VI-5A), quatre bandes différentes apparaissent, avec des poids moléculaires compris entre 71 kDa et 85 kDa. Dans les mêmes conditions d'analyse, les dodécamères possèdent une sous-unité supplémentaire de 77,5 kDa (Figure VI-5A). Les analyses de l'hémolymphe totale montrent le même résultat que les dodécamères.

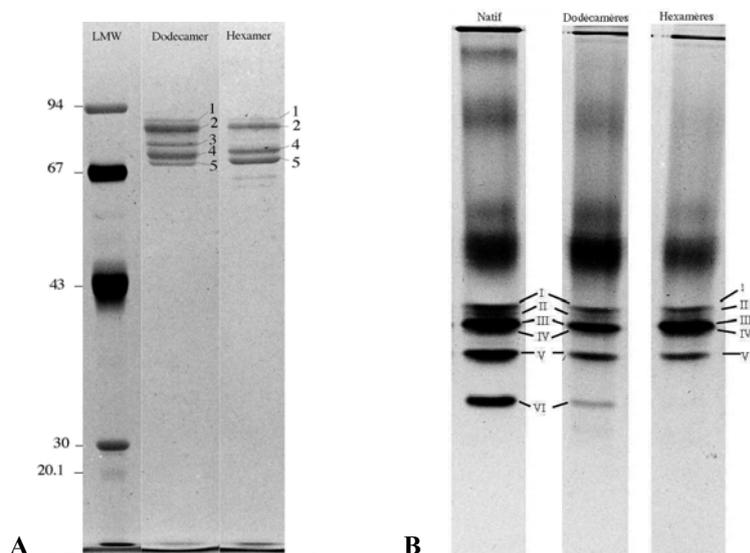


Figure VI-5 : Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Cyanograea praedator*.

Quand les hexamères et les dodécamères purifiés d'hémocyanine de *C. praedator* sont soumis à un PAGE dissociant, les hexamères apparaissent composés de cinq sous-unités différentes alors que l'on observe six bandes pour les dodécamères. Ainsi, comme pour les analyses en SDS-PAGE, les dodécamères possèdent une sous-unité supplémentaire (Figure VI-5B). L'hémolymphe totale montre le même profil que les dodécamères.

Chez *Bythograea thermydron*, aussi bien en SDS-PAGE qu'en PAGE dissociant (Figure VI-6), on retrouve le même nombre de bandes entre les dodécamères et les hexamères. Ils sont formés de 5 sous-unités différentes, de poids moléculaires compris entre 67,7 et 79 kDa.

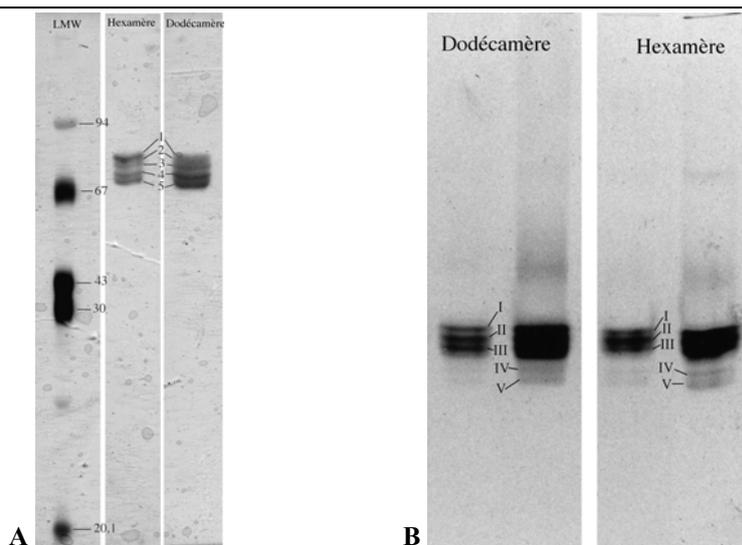


Figure VI-6 : Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Bythograea thermydron*.

Les hexamères et les dodécamères d'hémocyanine de *Rimicaris exoculata* (Figure VI-7A) et de *Chorocaris chacei* (Figure VI-8A) apparaissent composés de sous-unités de poids moléculaire compris entre 68 et 77,7 kDa dans le cas de *R. exoculata*, et entre 66,8 et 77,2 kDa dans le cas de *C. chacei*. Ces sous-unités semblent similaires dans les dodécamères et les hexamères, et ce chez les deux espèces de crevettes. Cependant, on observe plus de bandes en PAGE natif qu'en SDS-PAGE.

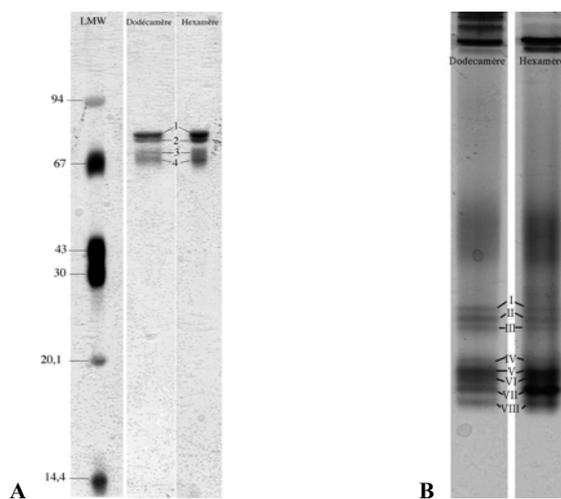


Figure VI-7 : Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Rimicaris exoculata*.

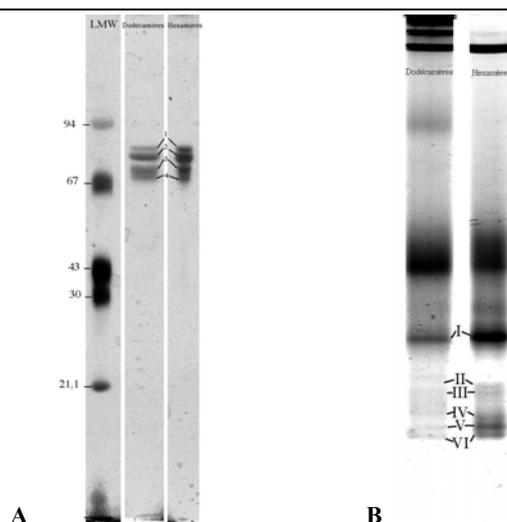


Figure VI-8 : Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Chorocaris chacei*.

VI-2-4 : Spectrométrie de masse – Étude de la structure quaternaire

VI-2-4-1/ Masses moléculaires des hémocyanines natives

L'analyse de l'hémolymphe de *Bythograea thermydron* en Z Spray-QToF-MS donne naissance à quatre familles d'ions multichargés (Figure VI-9) qui, après déconvolution, correspondent à des masses de $75\,016 \pm 80$ Da (monomères), $460\,782 \pm 95$ Da (hexamères), $902\,670 \pm 110$ Da (dodécamères) et $1\,338\,254 \pm 240$ Da (18-mères). La détermination de telles masses n'est possible que dans la mesure où les hémocyanines fixent un nombre très important de charges (jusqu'à 87 charges sur les 18-mères). De plus, un composé de 150 530 Da est également observé sur certains des spectres obtenus, bien qu'il ne soit pas visible sur le spectre présenté.

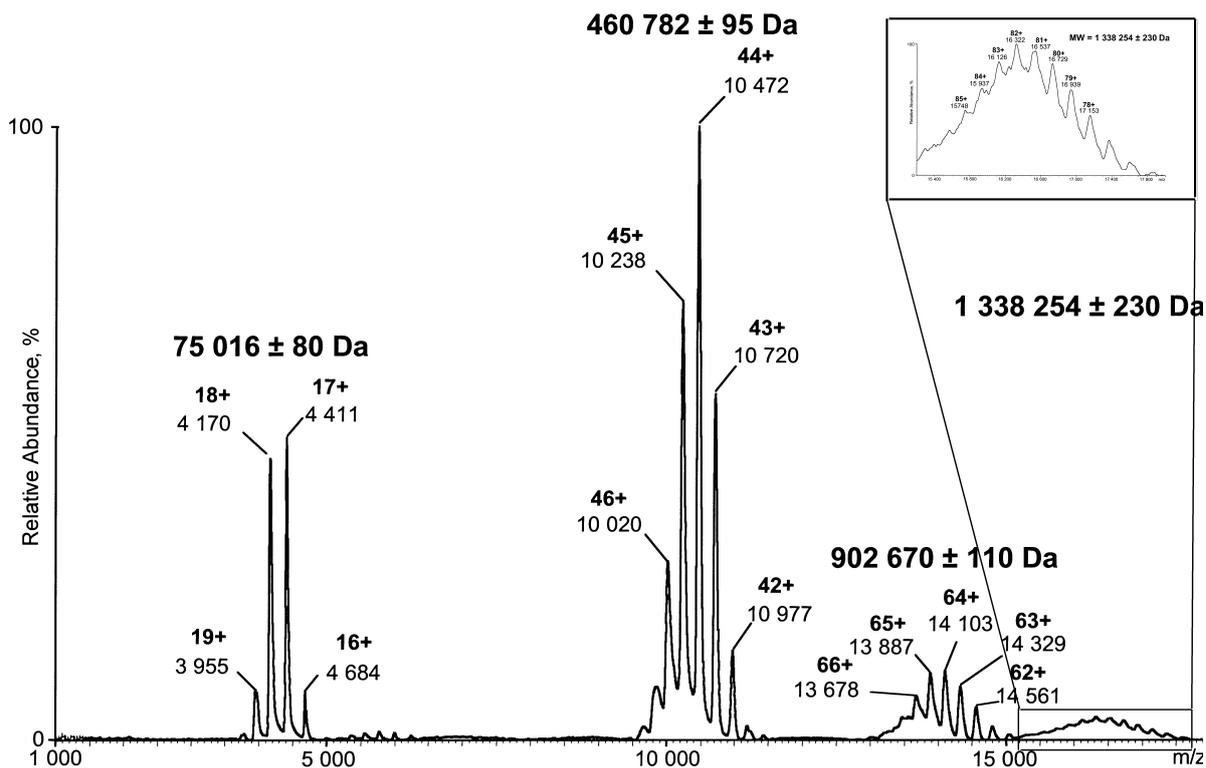


Figure VI-9: Spectre obtenu en Z Spray-QToF-MS avec de l'hémolymphe native de *Bythograea thermydron*.

VI-2-4-2/ Masses moléculaires des différents monomères d'hémocyanine

Pour la première fois, des hémocyanines d'arthropodes ont été soumises à la spectrométrie de masse par nébulisation électrique (ESI-MS). En conditions dénaturantes, l'hémocyanine de *Cyanagraea praedator* produit un spectre brut multichargé, avec un grand nombre de charges (50 à 100 charges), permettant la séparation des sous-unités individuelles différant d'environ 50 Da ou plus. Des exemples de spectres ESI-MS, déconvolués par MaxEnt, d'hémocyanines dodécamériques et hexamériques sont illustrés dans la figure VI-10. Les masses moléculaires sont, quant à elles, détaillées dans le tableau VI-2.

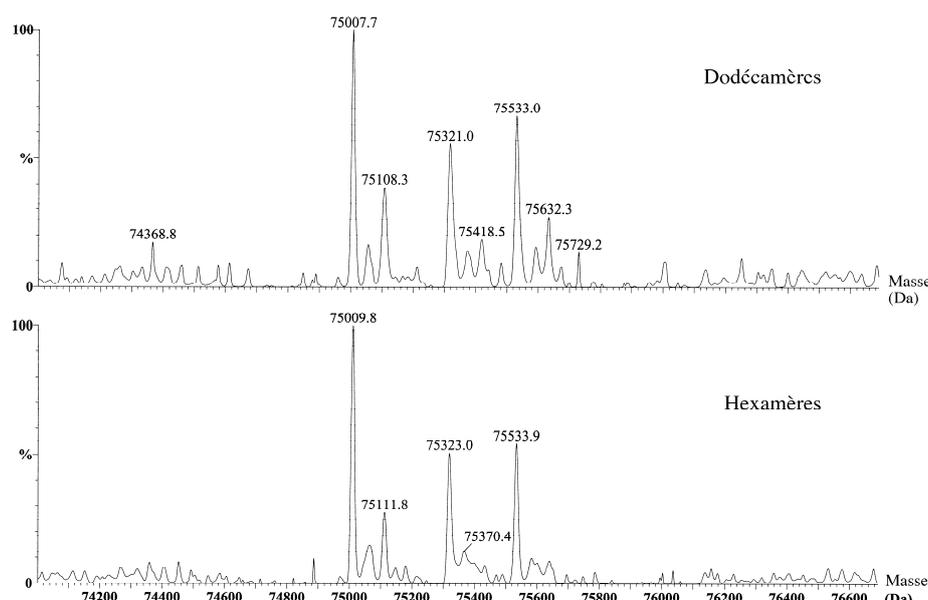


Figure VI-10 : Spectres obtenus par ESI-MS avec les sous-unités monomériques des dodécamères et des hexamères d'hémocyanine de *Cyanograea praedator*.

Les dodécamères et les hexamères sont composés de 6 sous-unités communes avec des masses moléculaires comprises entre 75 007,8 Da et 75 533,5 Da. De plus, nous avons relevé 2 sous-unités spécifiques des dodécamères (75 419,1 Da et 75 628,6 Da).

Tableau VI-2 : Masses (Da) des sous-unités d'hémocyanines dodécamériques et hexamériques de *Cyanograea praedator* déterminées par ESI-MS. N.D.: Non Détecté, < 0,1 intensité relative; ^a: moyenne sur 3 déterminations; ^b: intensité relative; ^c: moyenne sur 4 déterminations.

Dodécamère			Hexamère		
Masse ^a	± S.D.	Int ^b	Masse ^c	± S.D.	Int ^b
75 007,8	0,2	1,0	75 008,9	1,2	1,0
75 063,6	4,2	0,2	75 060,8	0,8	0,3
75 109,5	2,0	0,5	75 111,1	2,2	0,4
75 322,0	0,7	0,8	75 321,3	1,3	0,6
75 375,7	6,0	0,3	75 376,1	3,8	0,2
75 419,1	5,3	0,3	ND	/	/
75 533,5	1,1	0,8	75 532,6	0,9	0,6
75 628,6	3,8	0,4	ND	/	/

Les analyses préliminaires réalisées sur les dodécamères d'Hc de *Bythograea*

thermydron mettent en évidence 5 sous-unités différentes, de poids moléculaire compris entre 74 542,9 et 74 764,2 Da.

Les dodécamères d'hémocyanine de *Rimicaris exoculata* semblent être formés de 4 monomères différents de poids moléculaire compris entre 75 016,7 et 75 539,3 Da alors que les hexamères apparaissent formés de 6 monomères différents de poids moléculaire compris entre 74 816,2 et 75 020,2 Da (Tableau VI-3). Un seul monomère semble commun aux 2 formes (75 016,7 Da et 75 020,2 Da).

Tableau VI-3 : Masses (Da) des sous-unités d'hémocyanines dodécamériques et hexamériques de *Rimicaris exoculata* déterminées par ESI-MS. N.D.: Non Détecté, < 0.1 intensité relative; ^a: moyenne sur 3 déterminations; ^b: intensité relative; ^c: moyenne sur 2 déterminations.

Dodécamère		Hexamère	
Masse ^a	± S.D.	Masse ^c	± S.D.
ND	/	74 816,2	1,0
ND	/	74 865,3	2,3
ND	/	74902,5	1,5
ND	/	74 939,6	2,6
ND	/	74 979,8	4,5
75 016,7	5,9	75 020,2	4,5
75 326,4	5,1	ND	
75 539,3	6,2	ND	

VI-3/ Discussion

Le tableau VI-4 récapitule les résultats qualitatifs obtenus par FPLC, SDS-PAGE, PAGE natif, ESI-MS et Zspray-QToF-MS avec les hémocyanines de *Cyanograea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Chaceon affinis*, *Rimicaris exoculata* et *Chorocaris chacei*.

Tableau VI-4 : Synthèse des résultats obtenus par FPLC, SDS-PAGE, PAGE natif, ESI-MS et Z Spray-QToF-MS avec les différentes espèces de crustacés décapodes. D : dodécamères ; H : hexamères.

	FPLC	SDS-PAGE	PAGE natif	ESI-MS	ZS pray -QToF-MS
<i>C. praedator</i>	D < H	D : 5 monomères H : 4 monomères	D : 6 monomères H : 5 monomères	D : 8 monomères H : 6 monomères	Non étudié
<i>B. thermydron</i>	D < H	D : 5 monomères H : 5 monomères	D : 5 monomères H : 5 monomères	D : 5 monomères H : non étudié	Mono mères + D + H + 18-mères
<i>C. affinis</i> (bathyal)	D > H	Non étudié	Non étudié	Non étudié	Non étudié
<i>R. exoculata</i>	H >>> D	D : 4 monomères H : 4 monomères	D : 8 monomères H : 8 monomères	D : 3 monomères H : 6 monomères	Non étudié
<i>C. chacei</i>	H >>> D	D : 4 monomères H : 4 monomères	D : 6 monomères H : 6 monomères	Non étudié	Non étudié

Les différents états d'agrégation des hémocyanines

Observée en microscopie électronique à transmission (Figure VI-3), la structure quaternaire des hexamères et des dodécamères d'hémocyanine de *Cyanograea praedator* apparaît relativement similaire à celle des espèces côtières (Markl et Decker, 1992 ; Van Holde et Miller, 1995), avec la combinaison perpendiculaire de deux hexamères pour former un dodécamère. Peu de données existent concernant la taille des molécules d'hémocyanine. Les monomères, en forme de « haricot », mesure 7,8 x 4,6 x 4,4 nm (Ellerton *et al.*, 1983). Donc, la taille des hexamères (Figure VI-3), que nous avons mesuré en MET à contraste négatif, apparaissent tout à fait plausible si l'on considère que les monomères s'associent en antiprisme à base triangulaire pour former les hexamères (Figure IV-4).

Les hémocyanines de *C. praedator*, *Bythograea thermydron* et *Chaceon affinis*, étudiées par filtration sur gel, sont composées de dodécamères et d'hexamères (Figure VI-4). La forme hexamérique est prédominante chez les crabes hydrothermaux, alors que chez le crabe bathyal *C. affinis* et les crabes littoraux, l'hémocyanine native est le plus souvent sous forme dodécamérique (Truchot, 1992). Cependant, il a été montré que le ratio dodécamère/hexamère varie naturellement chez le crabe bleu, *Callinectes sapidus* (Greaves *et al.*, 1992). La température peut aussi influencer l'état d'agrégation de l'hémocyanine, comme chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus* (Decker et Foll, 2000), ce qui ne semble pas être le cas ici (expériences de dénaturation à 35°C).

La proportion des dodécamères est faible chez les crevettes *Rimicaris exoculata* et *Chorocaris chacei*. La forme hexamérique est largement majoritaire (Figure VI-4), comme cela est généralement observé chez les crevettes caridées (Markl et Decker, 1992).

Les analyses réalisées sur l'hémolymphe native de *B. thermydron* par Z Spray-QToF-MS mettent en évidence les trois états d'agrégation classiquement observés chez les brachyours, c'est-à-dire monomères, hexamères et dodécamères. Une famille d'ions multichargés supplémentaire est mesurée, avec une masse correspondant à des 18-mères (Figure VI-9). Les 18-mères seraient formés par l'association de trois hexamères (Figure VI-11).

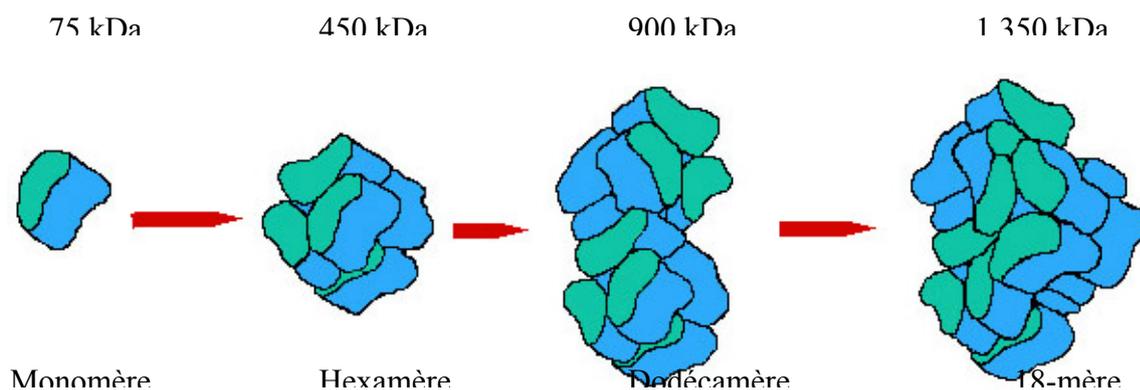


Figure VI-11 : Schéma présentant les différents agrégats d'hémocyanine mis en évidence par Z spray-Q-ToF-MS.

C'est la première fois qu'une masse aussi élevée (1 350 kDa) est mesurée par spectrométrie de masse (Zal *et al.*, soumis). La présence de 18-mères d'hémocyanine dans l'hémolymphe d'arthropodes n'a jamais été mise en évidence jusqu'à présent. Ce polymère d'hémocyanine n'apparaît pas sur les spectres FPLC obtenus avec l'hémolymphe de *B. thermydron*. Compte-tenu de sa taille, il devrait éluer juste avant les dodécamères et former un épaulement sur le pic de ceux-ci. Il serait intéressant d'essayer de le rechercher à l'avenir, en modifiant les conditions d'élution ou la nature de la colonne pour augmenter la résolution dans cette gamme de poids élevés. Cependant, le comportement en phase gazeuse des polymères d'hémocyanine est pour le moment inconnu. Cet état d'agrégation en 18-mère pourrait résulter d'un début de dégradation des hémocyanines car les molécules d'Hc ont tendance à former des agrégats de haut poids moléculaire (observations personnelles). On ne peut néanmoins exclure qu'un tel état d'agrégation puisse exister naturellement dans l'hémolymphe des arthropodes. La haute résolution de la spectrométrie de masse, alliée à la faible quantité de matériel nécessaire, permet de mettre en évidence des états d'agrégation, très minoritaires dans l'hémolymphe. Cette technique a également permis de révéler l'existence d'une molécule de poids moléculaire de 150 530,3 Da, qui pourrait correspondre à un dimère.

Composition monomérique des différentes formes d'hémocyanine

Les études électrophorétiques en PAGE, réalisées chez *Cyanograea praedator* (Figure VI-5) ont montré que 5 sous-unités monomériques, de poids moléculaires compris entre 71 kDa et 85 kDa, sont communes aux deux formes d'hémocyanines. Les dodécamères semblent posséder une sous-unité additionnelle. Ces résultats obtenus par électrophorèse ont été confirmés plus précisément par des études en ESI-MS (Figure VI-11), avec des masses moléculaires comprises entre 75 008 et 75 534 Da. Deux sous-unités spécifiques des dodécamères ont alors été observées. Ces sous-unités pourraient jouer un rôle dans la combinaison des hexamères pour former les dodécamères. Un phénomène similaire a été observé, pour la première fois, dans la formation des dodécamères d'hémocyanine chez l'araignée *Cupiennus salei* (Markl et Decker, 1992).

Les études électrophorétiques réalisées aussi bien en conditions natives qu'en conditions dénaturantes et réductrices montrent que les dodécamères et les hexamères de *Bythograea thermydron* sont formés par l'association de 5 monomères différents, dont le poids moléculaire apparent est compris entre 67,7 et 79 kDa. Les analyses réalisées en ESI-MS en conditions dénaturantes mais non réductrices mettent également en évidence 5 monomères différents de poids moléculaire compris entre 74 542 et 74 764 Da. La formation des dodécamères pourrait faire intervenir un dimère ; un pic en ESI-MS à 150 kDa a bien été observé en conditions non dénaturantes. Par contre ce pic n'est pas détecté lors des analyses en conditions dénaturantes. Deux raisons peuvent être avancées pour expliquer l'absence de ce pic :

- soit les deux monomères du dimère sont liés par une liaison non covalente plus forte que les autres monomères ce qui peut expliquer l'observation du dimère en conditions non dénaturantes, alors qu'il serait dissocié en conditions dénaturantes

- soit les deux monomères sont liés par une liaison covalente de type pont disulfure. Ce composé ne serait alors pas détecté en ESI-MS en conditions dénaturantes mais non réductrices car il serait en dehors de la gamme de masse détectable avec le spectromètre de masse utilisé.

Des études futures en conditions dénaturantes et réductrices permettront de savoir quel type de liaison est mis en jeu dans la formation du dimère (covalente ou non-covalente).

L'existence de ponts disulfures a été précédemment mis en évidence chez plusieurs espèces de crustacés décapodes (cf. chapitre IV). Il serait donc tout à fait probable que ce type de liaison existe chez *B. thermydron*.

Les dodécamères et les hexamères d'hémocyanines de *Rimicaris exoculata* et *Chorocaris chacei* présentent les mêmes profils pour une technique donnée, en SDS-PAGE ou en PAGE natif. En SDS-PAGE, 4 monomères différents sont révélés, avec un poids moléculaire compris entre 68 et 77,7 kDa chez *R. exoculata* et entre 66,8 et 77,2 kDa chez *C. chacei*. En PAGE natif, 8 bandes différentes apparaissent chez *R. exoculata* et au moins 6 bandes différentes chez *C. chacei*. Il semble donc qu'il existe un plus grand nombre de monomères différents dans les hémocyanines de crevettes que dans celle des crabes.

Seules les hémocyanines de *R. exoculata* ont été étudiées en ESI-MS. Comme en SDS-PAGE, 4 monomères différents de poids moléculaire compris entre 75 016 et 75 539 Da sont détectés dans les dodécamères. En revanche, six monomères différents, de poids moléculaire compris entre 74 816 et 75 020 Da sont mis en évidence dans les hexamères. Un seul monomère semble commun aux deux formes d'hémocyanine alors que les profils obtenus par électrophorèse étaient identiques entre les dodécamères et les hexamères. Il apparaît donc que les différentes techniques utilisées donnent des résultats différents. Des analyses plus détaillées en spectrométrie de masse sont actuellement en cours ce qui nous permettra de décrire plus précisément la composition en monomères des hexamères et des dodécamères.

VI-4/ Conclusion

Globalement, les caractéristiques de la structure quaternaire observées chez les espèces hydrothermales sont typiques d'hémocyanine de crustacés décapodes et aucune particularité majeure ne peut être corrélée avec l'environnement hydrothermal. Toutefois, le temps de dissociation dans un tampon Tris/EDTA pH 8,9 utilisé pour dissocier les polymères d'hémocyanines en monomères (PAGE natif) apparaît plus long chez les espèces hydrothermales que chez les espèces littorales. En effet, il reste beaucoup plus de matériel non dissocié en haut des gels dans le cas des espèces hydrothermales que des espèces côtières. Il semble donc que les liaisons entre les monomères soient plus fortes ce qui conférerait une stabilité plus importante aux hémocyanines de crustacés hydrothermaux par rapport à celles des crustacés littoraux. L'étude de cinétiques de dissociation chez les espèces hydrothermales et littorales devrait permettre de comparer les temps de dissociation des différents polymères

et d'avoir ainsi une estimation de la stabilité des molécules.

Quant à la composition précise des polymères d'hémocyanines en sous-unités, nos travaux préliminaires montrent de toute évidence que la haute résolution de la spectrométrie de masse devra être utilisée à l'avenir pour réexaminer la structure des hémocyanines d'arthropodes. De la même façon que ce qui a été fait sur les hémoglobines extracellulaires d'annélide (Lamy *et al.*, 1996) cette nouvelle approche expérimentale devrait être très prometteuse.

VII - PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HEMOCYANINES

Les hémocyanines de crustacés décapodes sont connues pour leur plasticité fonctionnelle. Leurs propriétés peuvent être modulées en fonction des conditions environnementales et de l'état physiologique des animaux (cf. chapitre IV). Ainsi, nous avons choisi d'étudier les propriétés fonctionnelles des hémocyanines de *Cyanograea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis* afin de connaître les mécanismes adaptatifs liés à la fonction respiratoire qui pourraient être mis en jeu dans un environnement où les paramètres physico-chimiques varient fortement. La liaison de l'O₂ à une molécule de pigment respiratoire est décrite par une courbe représentant les variations de la proportion de sites actifs oxygénés en fonction de la concentration d'O₂ libre, conventionnellement représentée par la pression partielle d'O₂. Deux paramètres sont utilisés pour caractériser cette liaison :

- l'affinité, exprimée par la P₅₀, et qui représente la pression partielle d'O₂ à demi-saturation du pigment respiratoire. Une relation inverse existe donc entre l'affinité et la P₅₀.
- la coopérativité, exprimée à l'aide du coefficient de Hill, n₅₀, indice de la coopérativité de la liaison de l'O₂ à l'Hc.

Nous avons étudié les effets du pH (effet Bohr), de la température et d'effecteurs spécifiques comme le lactate sur ces deux paramètres afin de caractériser les propriétés fonctionnelles des hémocyanines d'espèces hydrothermales. Une étude concernant la crevette *Rimicaris exoculata* a déjà été publiée (Lallier et Truchot, 1997) ainsi que quelques résultats préliminaires concernant *Chorocaris chacei* (Lallier *et al.*, 1998).

VII-1/ Matériel et Méthodes

VII-1-1: Récolte des animaux et prélèvements de l'hémolymphe

Cyanograea praedator et *Bythograea thermydron* ont été récoltés lors des campagnes HOT'96 et HOPE'99 à 9°N sur l'EPR. Les spécimens de *Chaceon affinis* ont été prélevés durant la mission MARVEL sur le site Menez Gwen de la MAR et ceux de *Segonzacia mesatlantica* durant la mission PICO sur le site Lucky Strike de la MAR. Le prélèvement d'hémolymphe s'est fait comme décrit dans le chapitre V-1-1.

VII-1-2 : Courbes de dissociation

Les courbes de dissociation sont réalisées à l'aide d'une méthode photométrique dont le principe repose sur la loi de Beer-Lambert qui établit une relation de proportionnalité entre l'absorption de l'oxyhémocyanine et sa concentration. Un échantillon de 8 μ l, déposé sur une lame de verre, est introduit dans une chambre de diffusion (Sick & Gersonde, 1969 ; modifiée par Lykkeboe *et al.*, 1975) de façon à ce que l'échantillon se trouve sur la trajectoire du faisceau monochromatique d'un photomètre (Figure VII-1). Une équilibration est alors réalisée dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau pendant environ 2 heures pour que le film d'hémolymphe ait une épaisseur constante (limitation de la dérive et obtention de mesures comparables tout au long de l'analyse). Le faisceau lumineux émis par une lampe à mercure filtré à 365 nm (UV) (photomètre Eppendorf 1101M) traverse l'échantillon, provoquant une déviation plus ou moins importante selon l'état d'oxygénation. Le signal de sortie, traité dans un convertisseur logarithmique pour le rendre proportionnel à l'absorption de l'hémocyanine, est recueilli sous la forme d'un enregistrement graphique (SEFRAM).

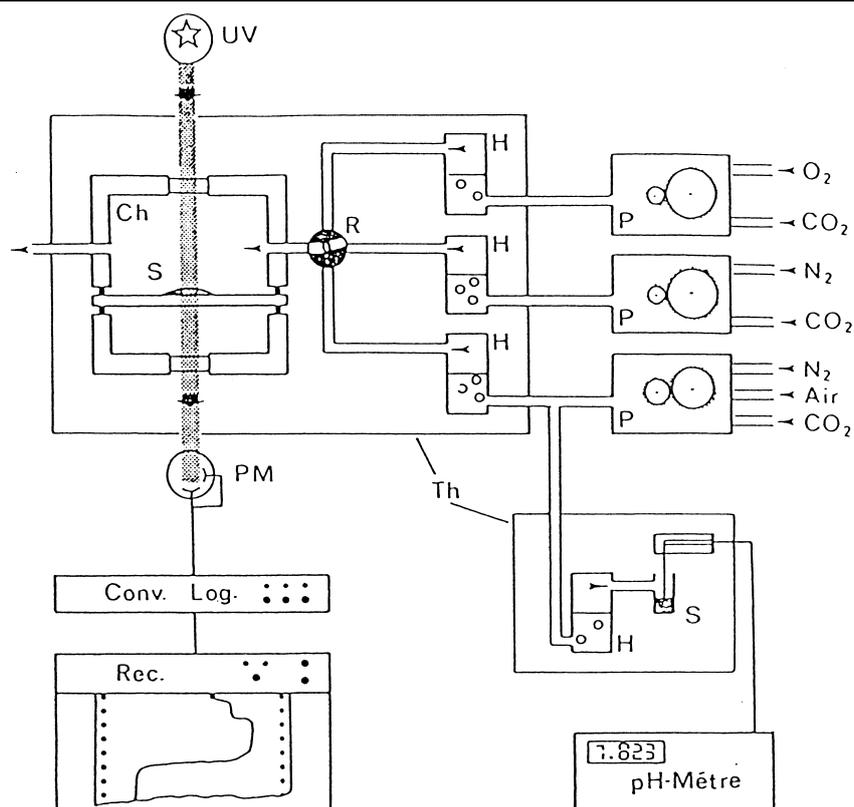


Figure VII-1 : Appareillage pour la mesure des courbes de dissociation

Ch : chambre de diffusion ; Conv. Log. : convertisseur logarithmique ; H : humidificateur ; P : débitmètres Tylan ou pompes Wösthoff (mélange des gaz) ; PM : photomultiplicateur ; R : robinet multivoie ; Rec. : enregistreur graphique ; S : échantillon d'hémolymphe ; Th : enceinte thermostatée ; UV : lampe mercure filtrée à 365 nm. (D'après Lallier, 1988).

La chambre où se trouve l'échantillon est thermostatée à la température d'expérimentation. Un mélange gazeux variable circule au-dessus de l'échantillon. Ces mélanges sont réalisés, soit à l'aide de débitmètres massiques MKS, contrôlés et pilotés par un système électronique, soit à l'aide de pompes Wösthoff à pistons, à partir de gaz secs comprimés (O_2 , N_2 et CO_2) et d'air, puis saturés en vapeur d'eau par des humidificateurs. Le mélange ternaire (Air + CO_2 + N_2) est dirigé simultanément vers les tonomètres d'un analyseur permettant de mesurer le pH de l'échantillon sur un volume de 70 μ l (Radiometer, BMS2).

La grandeur mesurée correspond à la saturation de l'hémocyanine en O_2 notée S :

$$S = [Hc-O_2] / [Hc]_T.$$

La première étape consiste à équilibrer l'échantillon avec un mélange (O_2 + CO_2) (S=1), puis avec un mélange (N_2 + CO_2) (S=0). Ensuite, pas à pas et sans modifier la

proportion de CO₂, des fractions croissantes d'O₂ (mélange Air + N₂ + CO₂, de pO₂ connue) sont ajoutées jusqu'à saturation complète (mélange O₂ + CO₂, S=1). Un mélange N₂ + CO₂ est à nouveau utilisé afin de compenser une dérive éventuelle. Aux environs de la demi-saturation (S = 0,5), le pH de l'échantillon est mesuré (Figure VII-2). L'opération est alors renouvelée sur le même échantillon avec une proportion différente de CO₂, qui correspond à un pH différent. Les proportions de CO₂ sont choisies de façon à pouvoir couvrir une gamme de pH physiologique.

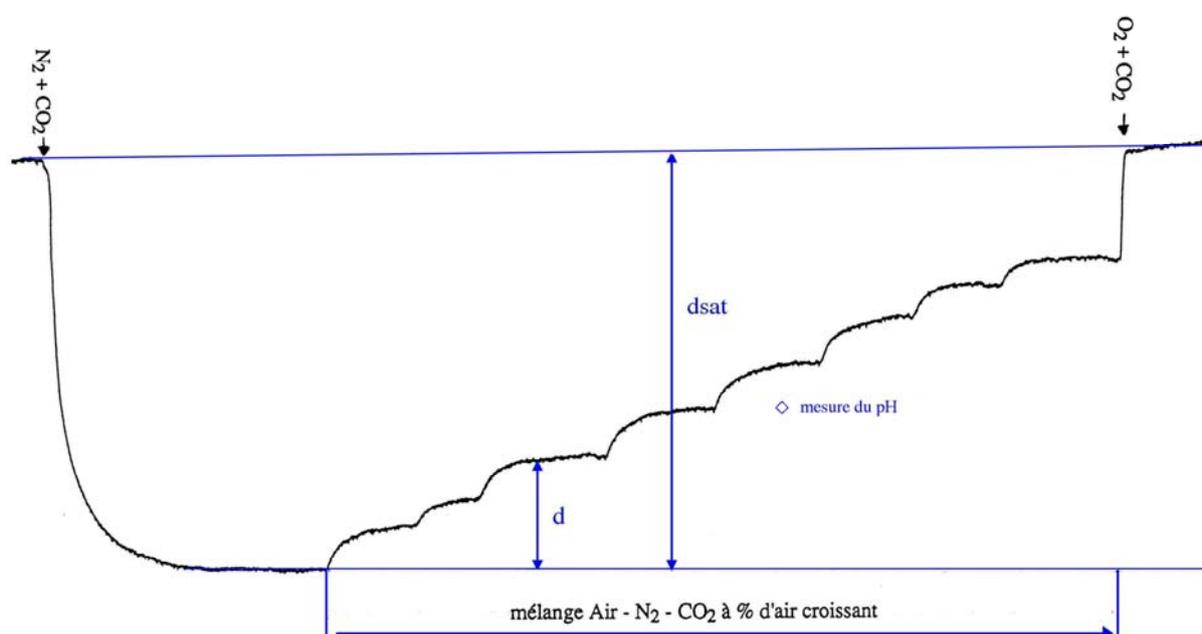


Figure VII-2 : Exemple de tracé obtenu sur l'enregistreur graphique et calcul de paliers de saturation lors de l'étude de la liaison de l'oxygène à l'hémocyanine à l'aide de la chambre de diffusion. (◇ : représente le moment où la mesure de pH a eu lieu).

Les données ainsi recueillies (couples (S, pO₂)) permettent de calculer, après transformation, le coefficient de Hill, n_{50} , représentant la coopérativité moyenne entre 20 % et 80 % de saturation, et la P₅₀, pression partielle d'oxygène à demi-saturation (Figure VII-3). Les différents couples (pH, P₅₀) obtenus montrent l'effet des ions H⁺ sur la liaison Hc-O₂, ou effet Bohr, mesuré par le taux de variation ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$).

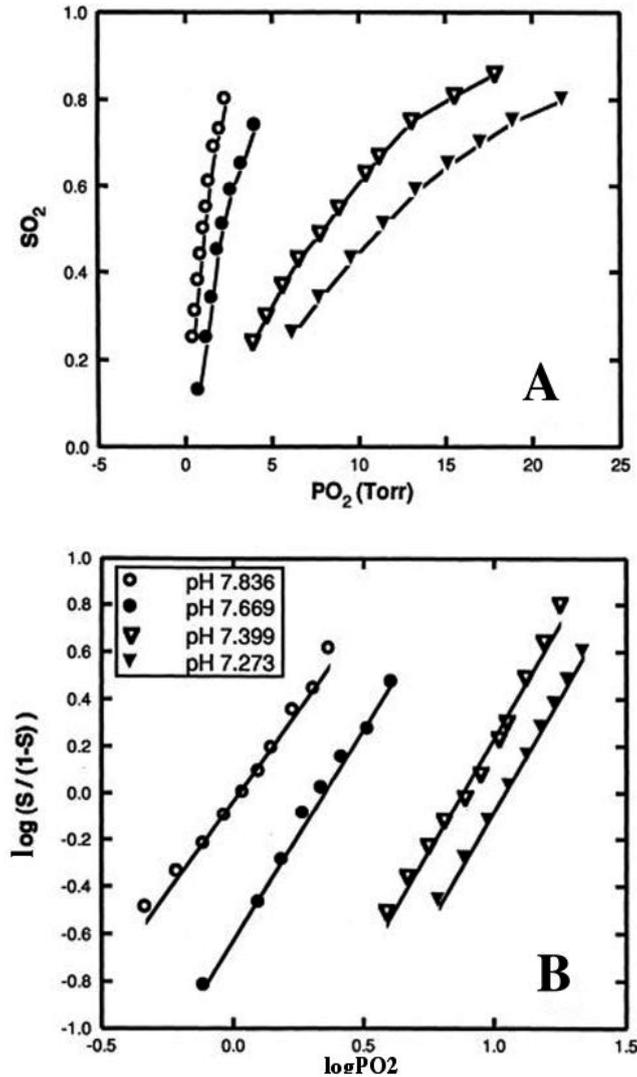


Figure VII-3 : Exemple de traitements graphiques réalisés avec les données obtenues sur le sérum dialysé de *Cyanograea praedator* à 15°C pour calculer P_{50} et n_{50} .
 A : courbe de saturation de l'hémocyanine de *C. praedator* par l'oxygène
 B : transformation de Hill

VII-2-3 : Traitement des résultats

Pour chaque palier du tracé réalisé, un triplet de valeurs (F_{O_2} , d_{sat} , d) est obtenu (Figure VII-2) avec :

- F_{O_2} : fraction d'oxygène dans le mélange gazeux, calculée pour chaque point à partir des réglages des débitmètres ;
- d_{sat} : distance, exprimée en mm, entre la ligne de base (équilibration à N_2) et la ligne de saturation complète (équilibration à O_2) ;
- d : distance, exprimée en mm, entre la ligne de base et le palier d'équilibration

correspondant à la fraction d' O₂.

Ces calculs reposent sur l'hypothèse que la légère dérive qui subsiste (pente des lignes de base 0 et 100 %) reste constante au cours du temps.

A partir de ces valeurs, on peut calculer la pression partielle d'oxygène (pO₂) et la saturation de l'hémocyanine par l'oxygène (S) pour chaque point du tracé :

- $S = d / d_{\text{sat}}$
- $pO_2 = FO_2 \times (P_B - P_{H_2O})$

avec P_B, pression barométrique et P_{H₂O}, pression de vapeur d'eau saturante à la température d'analyse.

La transformation de Hill, $\log[S / (1-S)]$ en fonction de $\log(pO_2)$ (Figure VII-3A), conduit à une courbe dont la partie centrale, entre 20 % et 80 % de saturation, peut être assimilée à une droite (intervalle valide). La pente de la régression linéaire, effectuée sur les points inclus dans l'intervalle valide, représente la valeur du coefficient de Hill, n₅₀. L'intersection avec l'axe des abscisses ($S / (1-S) = 1$, c'est-à-dire $S = 0,5$) donne la valeur de P₅₀. A partir des valeurs calculées de P₅₀ et n₅₀, on peut construire une courbe de saturation de forme sigmoïde s'ajustant aux points expérimentaux, dont l'équation est déduite de celle de la droite de Hill ($S = [1 + (P_{50}/ P_{O_2})^{n_{50}}]^{-1}$).

A partir des couples de données (pH, P₅₀) obtenus sur plusieurs courbes de saturation à différentes pCO₂, un graphe représentant les variations de logP₅₀ en fonction de celles du pH est construit. Généralement, on calcule sur les points expérimentaux une droite de régression dont la pente représente l'effet Bohr moyen sur l'intervalle de pH considéré. Ce type de représentation est non seulement nécessaire à l'étude de l'effet Bohr, mais aussi à l'analyse de l'action d'autres substances ou dans des conditions différentes, indépendamment des variations de pH.

VII-1-4 : Courbes de dissociation réalisées

Le protocole opératoire utilisé pour étudier les propriétés fonctionnelles des hémocyanines est présenté sur la figure VII-4. Dans les mêmes conditions, les propriétés de

l'hémolymphe native sont d'abord analysées puis celles de l'hémolymphe dialysée afin de supprimer l'effet d'éventuels cofacteurs.

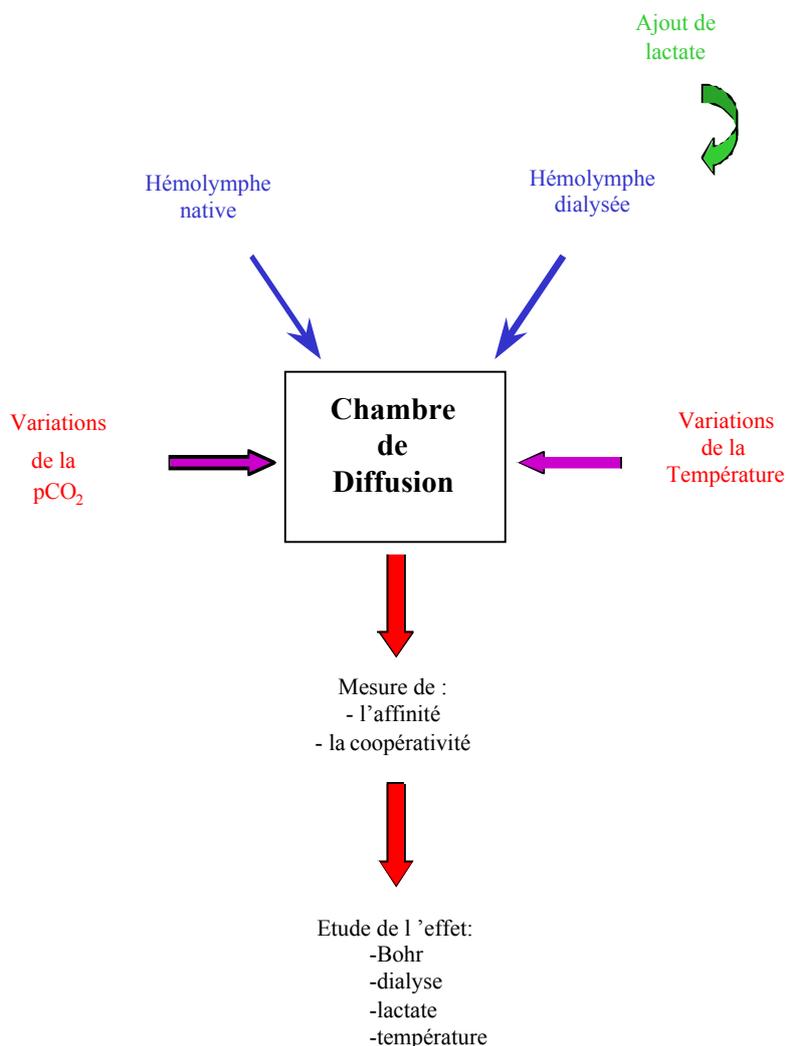


Figure VII-4 : Schéma du protocole opératoire utilisé pour étudier les propriétés fonctionnelles des hémocyanines de crustacés décapodes.

Le travail sur l'hémolymphe native ou dialysée à des températures variables : 5°C, 15°C, 25°C et 35°C permet de déceler un éventuel effet de la température.

L'addition de lactate au sérum dialysé permet d'étudier ses effets possibles sur la liaison Hc-O₂. Afin d'éviter la dilution de l'échantillon, 0,5ml de sérum dialysé sont concentrés deux fois par centrifugation pendant 15 minutes à 2 000 g, à 4°C dans des tubes Centrisart I (SM 13239, Sartorius) dont le point de coupure du filtre se situe à 10 000 Da. On ajoute un volume variable (suivant la concentration finale voulue) de solution de L-lactate de lithium 0,1 M aux 250 µl de sérum dialysé concentré, le volume final étant ajusté à 500 µl avec la solution saline

utilisée pour la dialyse. La solution de L-lactate de lithium 0,1 M est préparée à partir de L-lactate de lithium (Sigma) et de solution saline adaptée aux concentrations mesurées pour l'échantillon étudié. L'étude de l'effet du lactate se fait à 15°C. La concentration en lactate après ajout dans le sérum est mesurée de la même façon que précédemment.

VII-1-5 : Traitements statistiques

Pour comparer les différentes conditions d'expérimentation, des analyses de covariance (ANCOVA) ont été réalisées (Sokal et Rohlf, 1981). L'analyse de covariance permet de comparer deux droites de régression. Dans un premier temps, on compare les pentes des deux droites. Dans un deuxième temps, lorsque les deux droites sont parallèles, on vérifie que l'ordonnée à l'origine est la même pour ces deux droites. Pour chaque analyse, l'hypothèse nulle (les deux droites sont similaires) est rejetée avec une probabilité de 95 %, soit un seuil de risque de 5 %.

VII-2/ Résultats

VII-2-1 : Affinité, coopérativité, effet Bohr

Les valeurs de l'affinité, de la coopérativité et de l'effet Bohr sont regroupées dans le tableau VII-1.

Tableau VII-1 : Affinité (P_{50}), et coopérativité (n_{50}) des hémocyanines mesurées à pH 7,5 et 15°C sur de l'hémolymphe native. L'effet des protons ou effet Bohr ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) est mesuré à 15°C pour une gamme de pH comprise entre 7,2 et 7,8. Pour *Cyanagraea praedator*, les mesures ont été réalisées sur trois individus, et sur deux individus pour *Bythograea thermydron*.

	P_{50} (Torr)	n_{50}	$\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$
<i>Cyanagraea praedator</i>	12,4 / 7,0 / 4,2	2,7 / 1,9 / 2,2	- 1,9 / - 1,8 / - 1,2
<i>Bythograea thermydron</i>	3,4 / 2,2	1,6 / 1,7	- 1,8 / - 1,7
<i>Segonzacia mesatlantica</i>	2,1	1,5	- 2,7
<i>Chaceon affinis</i>	24,0	1,5	- 0,71

Les affinités pour les trois espèces hydrothermales sont relativement élevées alors que

pour *Chaceon affinis*, celle-ci est beaucoup plus faible. Pour les quatre espèces étudiées, la coopérativité est faible, avec un coefficient de Hill excédant rarement 2. L'effet Bohr est normal pour les quatre espèces étudiées, l'affinité pour l'oxygène augmentant avec le pH. Le coefficient de Bohr, $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$, est très élevé pour les trois espèces hydrothermales. En revanche, pour le géryon, le coefficient de Bohr est beaucoup plus faible.

VII-2-2 : Effet du lactate

En raison de problèmes techniques, l'effet du lactate a été étudié uniquement chez *Cyanagraea praedator* et *Bythograea thermydron*. L'effet du lactate est mesuré par ajout d'une quantité connue de lactate dans le sérum dialysé. Cette mesure s'effectue à 15°C.

Chez *Cyanagraea praedator*, l'effet du lactate a été mesuré pour une gamme de concentration comprise entre 0,2 et 8,9 mM (Figure VII-5). L'hémolymphe native de l'individu utilisé pour cette étude présentait une concentration en lactate de 1,96 mM. Le tableau VII-2 regroupe les valeurs de la P_{50} et du $\log P_{50}$ en fonction de la teneur en lactate dans l'hémolymphe. A pH 7,5, l'effet lactate, $\Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{lactate}]$, est égal à -0,03 et à pH 7,8, à +0,002. Une analyse de covariance (ANCOVA) montre que cet effet n'est pas significatif ($P > 0,95$) ni sur l'affinité, ni sur l'effet Bohr.

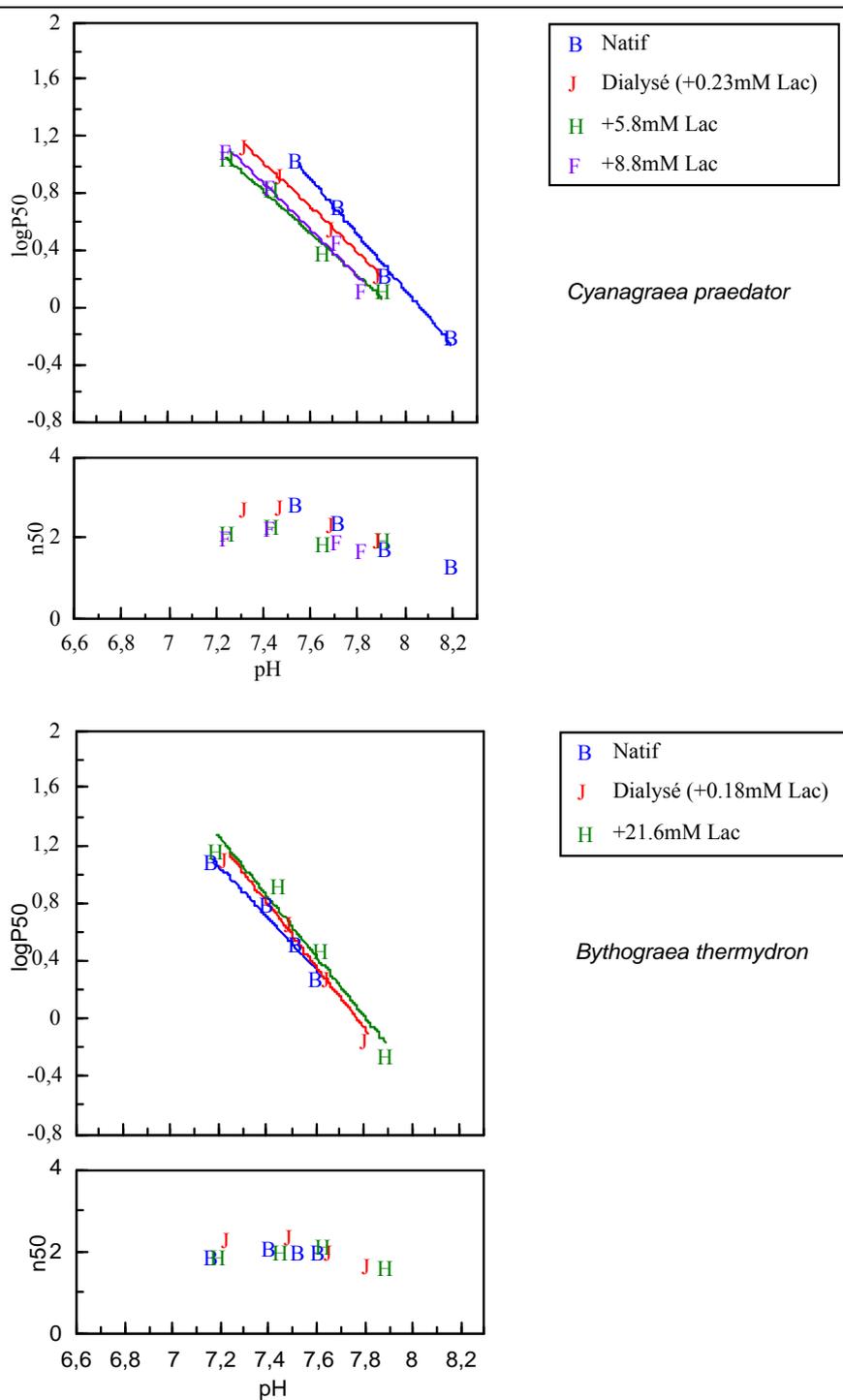


Figure VII-5 : Effet de la dialyse et de l'ajout de lactate au sérum dialysé sur la liaison de l'oxygène à l'hémocyanine (15°C).

Tableau VII-2: Variations de la P_{50} et du $\log P_{50}$ à deux pH différents en fonction de la concentration en lactate dans l'hémolymphe de *C. praedator*.

0,2 mM

5,8 mM

8,8 mM

	pH 7,5	pH 7,8	pH 7,5	pH 7,8	pH 7,5	pH 7,8
P₅₀ (Torr)	4,5	1,3	4,1	1,1	4,1	1,4
logP₅₀	0,65	0,10	0,61	0,02	0,61	0,16

Chez *Bythograea thermydron*, l'effet du lactate a été mesuré pour une gamme de concentrations comprise entre 0,1 et 21,6 mM de lactate (Figure VII-5). Cette mesure a été réalisée sur un pool de 6 échantillons, dont la concentration en lactate était de 23,54 mM (courbe « natif », Figure VII-5). Le tableau VII-3 regroupe les valeurs de la P₅₀ et du logP₅₀ en fonction de la teneur en lactate dans l'hémolymphe.

Tableau VII-3: Variations de la P₅₀ et du logP₅₀ à deux pH différents en fonction de la concentration en lactate chez *B. thermydron*.

	0,2 mM		21,6 mM	
	pH 7,5	pH 7,8	pH 7,5	pH 7,8
P₅₀ (Torr)	3,9	0,9	4,4	1,1
logP₅₀	0,59	- 0,06	0,64	0,02

A pH 7,5, l'effet lactate, $\Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{lactate}]$, est égal à +0,03 et à pH 7,8, à +0,04. Une analyse de covariance (ANCOVA) montre que cet effet n'est pas significatif ($P > 0,95$) ni sur l'affinité, ni sur l'effet Bohr.

VII-2-3 : Effet de la dialyse

La figure VIII-6 regroupe les effets de la dialyse chez *Cyanograea praedator*, *Bythograea thermydron* et *Chaceon affinis*. En raison des problèmes techniques déjà évoqués et de la faible quantité d'échantillons disponibles, nous n'avons pas pu étudier l'effet de la dialyse chez *Segonzacia mesatlantica*.

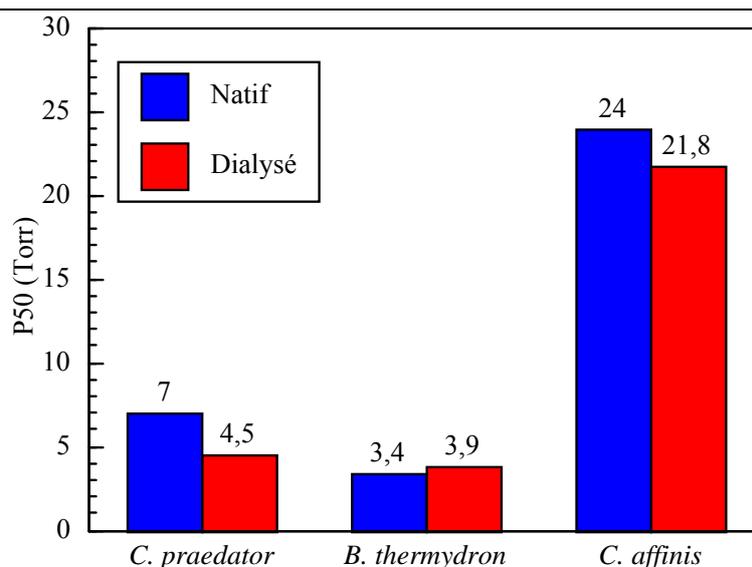


Figure VII-6 : Effet de la dialyse sur l'affinité de l'hémocyanine vis-à-vis de l'oxygène chez *Cyanograea praedator*, *Bythograea thermydron* et *Chaceon affinis*. La composition du tampon de dialyse dérive des mesures de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ et Cl^- faites dans l'hémolymphe native de chaque individu étudié. Les mesures ont été réalisées à pH 7,5 et 15°C.

Chez *B. thermydron*, la dialyse induit une légère diminution d'affinité, la P_{50} augmentant de 3,36 Torr à 3,86 Torr (pH 7,5 et 15°C). Une analyse de covariance (ANCOVA) montre que l'effet de la dialyse n'est pas significatif ($P > 0,95$) ni sur l'affinité, et sur l'effet Bohr.

En revanche, chez *C. praedator*, la dialyse provoque une nette augmentation d'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène, avec P_{50} diminuant de 6,98 Torr à 4,51 Torr. On peut supposer que lors de la dialyse, il y a eu élimination d'un facteur, de nature inconnue, appelé ici facteur X, qui diminue l'affinité du pigment pour l'oxygène. En supposant que la dialyse élimine le même pourcentage de facteur X que de lactate, on peut faire une estimation de l'effet de ce facteur sur l'affinité. A 15°C et pH 7,5, $P_{50} = 6,98$ Torr pour l'échantillon natif qui contient 100% du facteur X et $P_{50} = 4,51$ Torr pour l'échantillon dialysé qui ne contient plus que 12% du facteur. L'effet du facteur X, $\Delta \log P_{50} / \Delta \log [X]$, serait alors de 0,21.

Chez *C. affinis*, la dialyse ne provoque pas de variation importante de l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène. Une analyse de covariance (ANCOVA) montre que la dialyse a un effet non significatif ($P > 0,95$) sur l'affinité, et sur l'effet Bohr. Cependant, il faut noter que la concentration en lactate était faible dans l'échantillon utilisé ($[\text{lactate}] = 1,52$ mM) pour cette étude.

VII-2-4 : Effet de la température

L'effet de la température a été étudié entre 5°C et 35°C chez *C. praedator* et *B. thermydron*, entre 15°C et 35°C chez *S. mesatlantica* et entre 15°C et 25°C chez *C. affinis*. Les résultats sont regroupés dans la figure VII-7. La chaleur apparente d'oxygénation, ou enthalpie (ΔH), est calculée pour chaque intervalle de température, à l'aide de l'équation :

$$\Delta H = - 2,303 R \Delta \log P_{50} / \Delta(T^{-1})$$

avec R la constante des gaz parfaits (8,314 J.(K.mol)⁻¹) et T la température absolue (K).

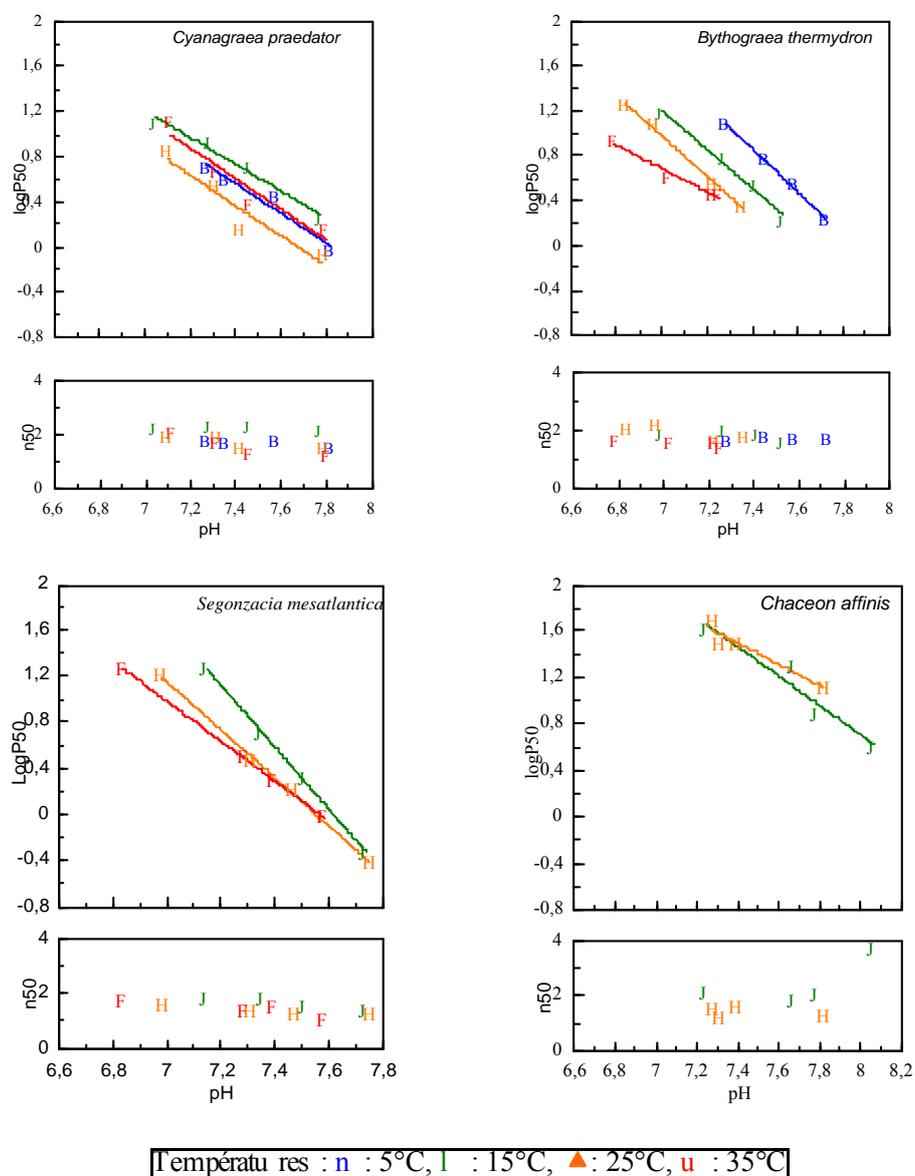
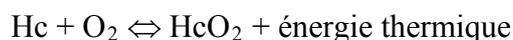


Figure VII-7 : Effets de la température sur l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène chez *Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis*.

Les mesures ont été réalisées sur de l'hémolymphe native sauf pour *C. affinis* (hémolymphe dialysée).

La réaction d'oxygénation de l'hémocyanine est exothermique :



Une augmentation de température déplace l'équilibre vers la gauche et diminue l'affinité. Néanmoins, un résultat négatif indique un processus endothermique responsable d'une augmentation de l'affinité. On peut également réaliser un diagramme d'Arrhénius en exprimant $\log P_{50}$ en fonction de la température (Figure VII-8).

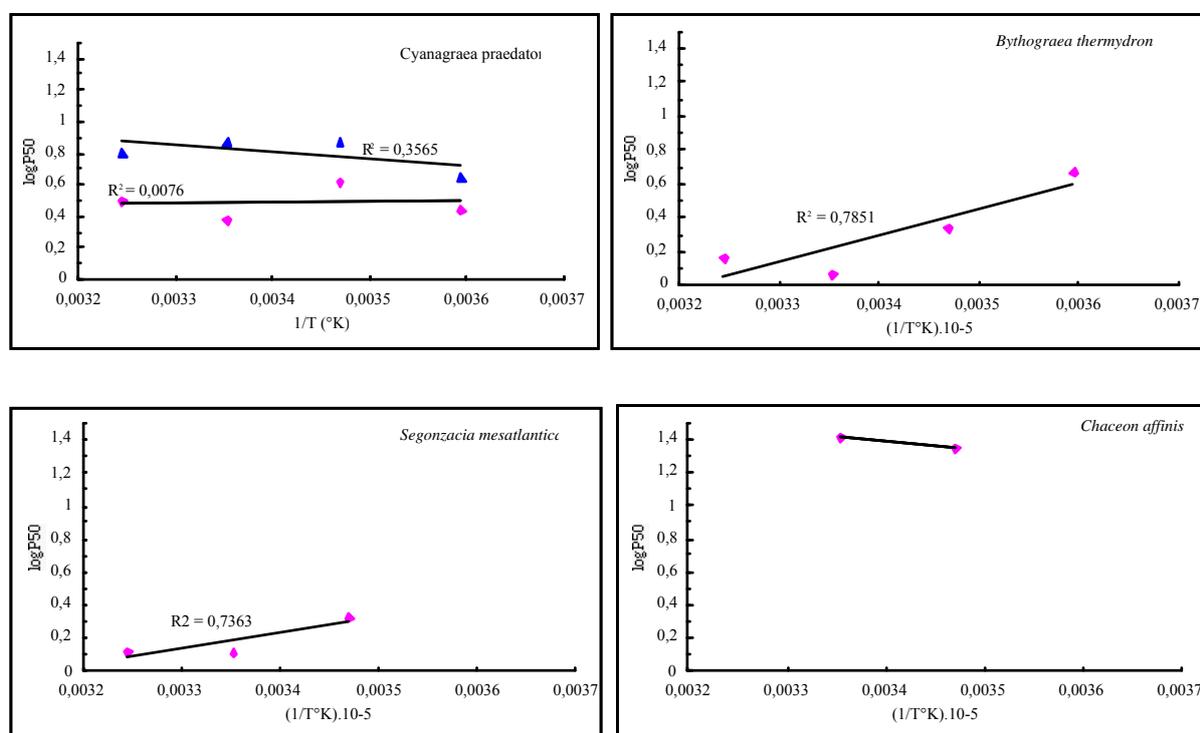


Figure VII-8 : Diagramme d'Arrhénius montrant la variation de l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène en fonction de la température chez *Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis*. Les mesures ont été faites à pH 7,5, sur de l'hémolymphe native (♦) (et dialysée (σ), dans le cas de *C. praedator*).

Chez *C. praedator*, l'effet de la température est faible mais normal, ce qui signifie que l'affinité diminue avec l'augmentation de la température. Entre 5°C et 35°C, $\Delta H = + 1,16$ kJ.mol⁻¹ pour l'hémolymphe native et $\Delta H = - 7,93$ kJ.mol⁻¹ pour l'hémolymphe dialysée.

Chez *B. thermydron*, nous observons un effet température inverse, c'est-à-dire que l'affinité augmente avec la température. Sur la gamme de température étudiée (5°C – 35°C), $\Delta H = + 29,88$ kJ.mol⁻¹. Il en est de même pour *S. mesatlantica* avec $\Delta H = + 17,19$ kJ.mol⁻¹

entre 15 et 35°C.

Chez *C. affinis*, l'effet température est normal et marqué, avec $\Delta H = -12,33 \text{ kJ.mol}^{-1}$ entre 15 et 25°C.

Généralement, l'effet Bohr et la coopérativité ne sont pas ou peu affectés par la variation de température. Chez *B. thermydron*, une étude faite sur un autre individu (résultats non montrés) montre que l'effet Bohr n'est pas du tout affecté par la variation de température entre 15 et 35°C. En revanche, l'effet Bohr est affecté par la variation de température chez *S. mesatlantica*, une augmentation de température entraînant une diminution de l'effet Bohr.

VII-3/ Discussion

Au cours de la discussion, nous allons comparer les différentes propriétés fonctionnelles des hémocyanines des crustacés hydrothermaux entre elles et avec celles des espèces littorales, afin de dégager des caractéristiques adaptatives en liaison avec l'environnement.

Affinité

L'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène est très élevée chez les trois espèces hydrothermales (Tableau VII-1), *Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron* et *Segonzacia mesatlantica*. Les crevettes hydrothermales de l'Atlantique, *Rimicaris exoculata* ($P_{50} = 3 \text{ Torr}$ à 15°C et pH 7,5) (Lallier et Truchot, 1997) et *Chorocaris chacei* ($P_{50} = 4,75 \text{ Torr}$ à 15°C et pH 7,5) (Lallier *et al.*, 1998) présentent également une forte affinité. La majorité des espèces littorales ont une affinité beaucoup plus faible, avec des P_{50} souvent supérieures à 10 Torr, et pouvant atteindre 48 Torr à pH 7,8 et 15°C comme chez le pagure *Eupagurus bernhardus* (Truchot, 1992). En revanche, il semble que les organismes vivant dans des milieux hypoxiques ont une hémocyanine à très forte affinité pour l'O₂ ce qui leur permet d'extraire le peu d'oxygène présent dans leur environnement. Par exemple, *Gnathophausia ingens*, euphausiacée bathypélagique vivant dans l'OML (Oxygen Minimum Layer) possède une hémocyanine ayant une très forte affinité pour l'oxygène, avec $P_{50} = 0,4 \text{ Torr}$ à 5,5°C et pH 7,5 (Sanders et Childress, 1990a). De même, les hémocyanines de cinq espèces de thalassinidés, vivant dans des vases réduites et donc connaissant des périodes

d'anoxie, présentent des affinités élevées pour l'O₂, avec des P₅₀ comprises entre 1,0 et 9,3 Torr (Taylor *et al.*, 2000). Il apparaît donc que l'affinité de l'hémocyanine pour l'O₂ chez les espèces qui rencontrent régulièrement des périodes d'anoxie dans leur environnement est supérieure, et ce de façon significative, à celle des décapodes vivant dans des habitats normoxiques.

Contrairement aux crabes hydrothermaux, le crabe bathyal, *Chaceon affinis*, présente une affinité faible pour l'oxygène, avec P₅₀ = 24 Torr à 15°C et pH 7,5. Il se situe donc dans la partie supérieure des valeurs d'affinité mesurées. Il apparaît que *Chaceon affinis* n'a développé aucune adaptation particulière. Des travaux d'écologie (Biscoito et Saldanha, 2000) ont montré qu'il s'agissait d'une espèce opportuniste que l'on rencontre en périphérie du site de Menez Gwen, dans des zones où la proportion de fluide hydrothermal est faible par rapport à la proportion d'eau de mer de fond, c'est-à-dire un milieu non hypoxique.

La structure quaternaire des hémocyanines des espèces hydrothermales pourrait contribuer aux fortes affinités observées. En effet, les hexamères, présents en proportion plus importante que les dodécamères (cf. chapitre VI), possèdent généralement une affinité plus élevée que les dodécamères (Mangum *et al.*, 1991).

Effet Bohr

L'effet Bohr est très important chez les trois espèces hydrothermales, en particulier chez *S. mesatlantica*, avec une valeur de -2,7 pour l'hémolymphe native, à 15°C (Tableau VII-1). Cette valeur est importante, surtout chez les crustacés décapodes. La majorité des espèces littorales a un coefficient de Bohr compris entre - 0,5 et - 1,5 (Truchot, 1992). L'affinité du pigment pour l'oxygène diminue donc très fortement lorsque le pH diminue. De forts effets Bohr ont également été mis en évidence chez deux espèces de crevettes hydrothermales, *Rimicaris exoculata* (-1,87) (Lallier et Truchot, 1997) et *Chorocaris chacei* (-1,68) (Lallier *et al.*, 1998). Par conséquent, il semble qu'un effet Bohr marqué caractérise les crustacés hydrothermaux.

On peut émettre l'hypothèse que l'O₂, lié avec une forte affinité au niveau des branchies, se libérerait plus facilement à proximité des tissus en activité. La production de CO₂ par les tissus, entraînant probablement une diminution locale du pH, provoquerait une diminution d'affinité du pigment pour l'O₂ et par conséquent un relargage de ce gaz. Les valeurs de coefficients de Bohr que nous avons trouvées sont différentes de celles reportées

par Sanders pour *C. praedator* (-1,10 ; Sanders, 1989) et *B. thermydron* (-1,14 ; Sanders *et al.*, 1988). De même, Sanders trouve un effet Bohr très peu marqué chez une autre espèce de crevettes de la ride du Pacifique oriental, *Alvinocaris lusca* (Sanders, 1989). Pour le géryon, l'effet Bohr se situe dans la gamme habituelle de ce qui est observé chez d'autres espèces de crustacés décapodes non hydrothermaux (Truchot, 1992).

Coopérativité

La coopérativité, d'ordinaire assez élevée pour les hémocyanines d'arthropodes ($n_{50} = 2,0 - 4,5$) (Truchot, 1992), apparaît faible chez les espèces des sources hydrothermales, avec une valeur du coefficient de Hill le plus souvent inférieure à 2, et indépendante du pH. Les crevettes *R. exoculata* (Lallier et Truchot, 1997) et *C. chacei* (Lallier *et al.*, 1998) présentent également une faible coopérativité. Toutefois, Sanders (1989) rapporte une coopérativité supérieure à 3 et augmentant avec le pH chez *C. praedator*, et comprise entre 0,95 et 3,95 toujours augmentant avec le pH chez *B. thermydron*. Comme pour l'effet Bohr, nos résultats sont en contradiction avec ceux de Sanders (1989). La mesure de la coopérativité est extrêmement dépendante des techniques employées, ce qui expliquerait les différences observées. Cependant, la signification physiologique de la coopérativité ainsi que ces variations restent à établir pour les hémocyanines d'arthropodes (Truchot, 1992). Chez *C. affinis*, la coopérativité est faible (- 1,5).

Le fait de congeler les échantillons dans de l'azote liquide, dès leur prélèvement et jusqu'à leur utilisation, pourrait expliquer ces résultats de faible coopérativité. La congélation affecte la coopérativité de l'hémocyanine de crustacés (Morris, 1988). Cependant, Sanders et Childress (1992) ont montré que la congélation n'affecte ni l'affinité, ni la coopérativité chez *B. thermydron*. Des résultats analogues ont été reportés dans la littérature pour *Callinectes sapidus* (Mangum *et al.*, 1991). Par ailleurs, les hexamères, majoritaires chez les espèces hydrothermales, présentent une coopérativité plus faible que les dodécamères (Mangum *et al.*, 1991). L'effet de la congélation pourrait résulter indirectement de la modification des proportions entre hexamères et dodécamères.

Effet lactate

Le L-lactate a été le premier cofacteur organique identifié pour les hémocyanines des crustacés (Truchot, 1980). Ce cofacteur se fixe préférentiellement sur l'oxy-hémocyanine et augmente ainsi l'affinité du pigment pour l'O₂ (Truchot, 1992). Chez de nombreuses espèces

de décapodes, l'effet du lactate varie entre $-0,09$ et $-0,6$ et augmente avec le pH (Bridges et Morris, 1986). Le L-lactate est le produit final du métabolisme anaérobie chez les crustacés et de fortes teneurs en lactate sont mesurées dans l'hémolymphe des crustacés hydrothermaux (cf. Chapitre V). Pour *B. thermydron* et *C. praedator*, le lactate ne semble pas avoir d'effet sur l'affinité pour l' O_2 . En revanche, chez *R. exoculata* (Lallier et Truchot, 1997) et *C. chacei* (Lallier *et al.*, 1998), l'effet spécifique du lactate est modéré mais significatif et indépendant des variations de pH. Une hypoxie environnementale est une des situations dans lesquelles une augmentation de la concentration en lactate permet de réguler le transport de l' O_2 *in vivo* chez les crabes littoraux (Lallier et Truchot, 1989a). Par conséquent, un effet lactate, quand il est présent, peut aider à maintenir une bonne oxygénation de l'hémolymphe au niveau des branchies dans un environnement hypoxique. Néanmoins, dans l'hypothèse où les espèces hydrothermales ont souvent recours au métabolisme anaérobie, et accumulent donc des quantités élevées de lactate dans leur hémolymphe, un fort effet lactate pourrait ne pas être adaptatif, une trop forte affinité pour l'oxygène pouvant alors limiter la libération de celui-ci au niveau des tissus. D'autres espèces de crustacés décapodes ne possèdent pas d'effet lactate (e. g. Taylor *et al.*, 2000). L'existence d'un effet lactate chez certains décapodes, mais pas chez tous, n'est pas encore complètement expliqué. Des études utilisant la titration colorimétrique isothermique ont montré que le lactate ne se fixe pas sur les hémocyanines ne présentant pas d'effet lactate, alors qu'il se fixe sur les molécules d'hémocyanine sensibles au lactate (Taylor *et al.*, 2000). Des études supplémentaires sont nécessaires pour étendre les travaux préliminaires de Graham (1985) sur les mécanismes de liaison du lactate sur les hémocyanines.

Effet de la dialyse

Un certain nombre de molécules organiques et inorganiques affecte les propriétés de liaison de l'oxygène à l'hémocyanine chez les crustacés (Truchot, 1992). Ces propriétés sont étudiées sur de l'hémolymphe dialysée. Pour la majorité des espèces étudiées, la dialyse de l'hémolymphe entraîne une diminution d'affinité, due à l'élimination du L-lactate et de l'urate le plus souvent, deux facteurs qui augmentent l'affinité. C'est le cas pour *B. thermydron*, chez qui la dialyse induit une augmentation de la P_{50} , d'où une augmentation de l'affinité Hc- O_2 (Figure VII-6), et pour la crevette *C. chacei* (Lallier *et al.*, 1998). Cependant, chez *C. praedator*, la dialyse de l'hémolymphe entraîne une situation inverse (Figure VII-6). Cette propriété pourrait être due à l'existence d'une molécule dialysable, présente dans

l'hémolymphe native de ce crabe, qui diminuerait l'affinité de l'hémocyanine pour l'O₂. Une telle augmentation d'affinité après dialyse a déjà été observée chez la crevette *R. exoculata* (Lallier et Truchot, 1997), chez les crabes terrestres de la famille des Ocypodidae (Morris et Bridges, 1985 ; Bridges *et al.*, 1997) et chez le crabe des cocotiers *Birgus latro* (Morris *et al.*, 1988b). Le ou les facteur(s) plasmatique(s) responsables sont encore inconnus. Bridges *et al.* (1997) ont montré que chez les Ocypodidae il s'agit d'un facteur de faible poids moléculaire (< 5 000 Da). Aucune évidence claire ne permet d'affirmer son réel pouvoir modulateur sur l'affinité Hc-O₂ plutôt qu'un rôle dans une compensation de P₅₀ afin de contre-balancer les grandes quantités de bicarbonates plasmatiques. En effet, ces derniers pourraient, en augmentant le pH *in vivo*, compromettre le transport de l'O₂ jusqu'aux tissus. Ce facteur plasmatique semble intervenir dans le pouvoir tampon de l'hémolymphe pour le dioxyde de carbone. Il est capable de fixer de grandes quantités de CO₂ chez l'espèce *Ocypodes serratan* (Bridges *et al.*, 1997). Ce facteur inconnu semble être présent chez les décapodes qui présentent de fortes teneurs en bicarbonates et en calcium (Bridges et Taylor, 1992). Chez *Chaceon affinis*, la dialyse ne provoque pas de variation de l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène. Ceci pourrait être dû à la faible concentration en lactate dans l'échantillon utilisé.

Effet température

Généralement, l'affinité de l'hémocyanine pour l'O₂ chez les arthropodes diminue avec l'augmentation de la température, en raison du caractère exothermique de la réaction, avec des valeurs de ΔH comprises entre 0 et -158 kJ.mol⁻¹ (Truchot, 1992). Chez *C. praedator*, la température n'a aucun effet sur l'affinité, sur l'effet Bohr, ou sur la coopérativité (Figure VII-8). En revanche, chez *B. therydron* et *S. mesatlantica* (Figure VII-8), on observe un effet température inverse, l'affinité augmentant légèrement avec la température.

Notons que, malgré quelques différences quantitatives, toutes les hémocyanines des décapodes hydrothermaux étudiés montrent cette relative insensibilité aux variations de températures, comme en témoignent les valeurs négatives d'enthalpie libre déterminées chez *R. exoculata*, $\Delta H = -1,23$ kJ.mol⁻¹ (Lallier et Truchot, 1997) et chez *C. chacei*, $\Delta H = -13,96$ kJ.mol⁻¹ (Lallier *et al.*, 1998). Au niveau de l'environnement hydrothermal, la température et la concentration en oxygène sont négativement corrélées. Ainsi, une perte de l'effet température, ou un effet inverse, peut être interprété comme un avantage dans un environnement caractérisé par des fluctuations O₂/température importantes. Une absence d'effet de la température sur l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène a également été mise

en évidence chez plusieurs espèces de crustacés intertidaux, tels que le pagure, *Pagurus bernhardus* (Jokumsen et Weber, 1982), ou la crevette *Palaemon elegans* (Morris *et al.*, 1985b). Morris *et al.* (1985b) supposent que cette indépendance à la température de l'affinité pour l'O₂ constitue une adaptation aux changements très rapides de température qui peuvent avoir lieu dans les cuvettes intertidales. Il apparaît donc qu'une insensibilité de l'affinité Hc-O₂ à la température soit un processus physiologique assez répandu chez les décapodes vivant dans des milieux où les variations de températures sont très importantes et rapides. En revanche, chez *Chaceon affinis*, l'augmentation de température de 15°C à 25°C entraîne une diminution de l'affinité, avec un $\Delta H = -20,40 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Il apparaît donc que, contrairement aux espèces hydrothermales étudiées, *C. affinis* ne soit pas adapté aux variations de température du milieu hydrothermal. Ce crabe est une espèce abyssale qui, par conséquent, vit dans un environnement où la température est stable au cours du temps.

Burnett *et al.* (1988) ont noté qu'il existait une relation négative entre l'importance de l'effet Bohr et l'effet de la température sur les hémocyanines. Ces auteurs supposent que, lorsque l'effet du pH sur l'affinité pour l'O₂ est important, un faible effet de la température minimiserait l'effet indirect de la température dû à la sensibilité thermique du pH de l'hémolymphe. Il semble que nos résultats renforcent cette hypothèse et il serait intéressant d'étudier l'effet de la température sur le pH hémolympatique chez les espèces hydrothermales pour la confirmer.

D'autres cofacteurs peuvent jouer un rôle adaptatif chez les crustacés hydrothermaux. Ainsi, Sanders et Childress (1992) ont montré que, chez *Bythograea thermydron*, le thiosulfate augmente l'affinité Hc-O₂. Cet effet a été interprété comme une adaptation spécifique aux fortes concentrations en sulfures, le thiosulfate étant un produit d'oxydation, et aux faibles teneurs en oxygène dans le milieu hydrothermal. Hagerman et Vismann (1999) ont également trouvé un effet positif du thiosulfate sur l'affinité Hc-O₂ chez l'isopode *Saduria entomon*. Chez le Thalassinidé *Calocaris macandreae*, vivant dans la vase, le thiosulfate induit une diminution faible mais significative de la P₅₀ (Taylor *et al.*, 1999). Malheureusement, du fait de problèmes techniques, nous n'avons pas pu étudier l'effet du thiosulfate sur les espèces hydrothermales.

VII-4/ Conclusion

Bien que des données *in vivo* soient nécessaires pour déduire des adaptations physiologiques réelles, il est tentant de spéculer à partir des caractéristiques mesurées *in vitro* sur les hémocyanines. Les propriétés fonctionnelles des hémocyanines de crustacés décapodes hydrothermaux présentent des particularités qui semblent liées aux caractéristiques de l'environnement hydrothermal. Une **forte affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène**, observée chez tous les crustacés hydrothermaux étudiés à ce jour, permet une oxygénation suffisante du pigment respiratoire dans un environnement potentiellement hypoxique alors qu'un **fort effet Bohr** permet le relargage de l'oxygène au niveau des tissus. L'**insensibilité à la température**, voire même son effet inverse observé chez *Bythograea thermydron* et *Segonzacia mesatlantica*, apparaît comme une bonne adaptation dans un milieu où les températures fluctuent énormément et où la température et la concentration en oxygène sont négativement corrélées. Ces spéculations sont confortées par les différences de propriétés fonctionnelles observées entre les crustacés hydrothermaux et les crabes bathyaux, *Chaceon affinis*, mais également par les similitudes constatées chez des espèces colonisant des milieux hypoxiques.

La présence éventuelle d'un facteur inconnu qui diminue l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène, présent chez *Cyanograea praedator* et *Rimicaris exoculata*, pourrait renforcer le potentiel, déjà très important, de la régulation du transport de l'oxygène chez les crustacés via la plasticité fonctionnelle de l'hémocyanine.

VIII – ADAPTATIONS A L'HYPERCAPNIE

Le déficit en oxygène dans les environnements aqueux est un phénomène général et les effets de l'hypoxie ont fait l'objet d'un grand nombre d'études physiologiques. En revanche, de hautes concentrations en dioxyde de carbone sont moins répandues dues à un taux de diffusion élevée et à une conversion rapide en bicarbonate et carbonate (Dejours, 1981). Les sources hydrothermales forment un environnement naturel dans lequel de fortes teneurs en CO₂ ont été mesurées. Par conséquent, ces milieux particuliers forment un environnement idéal pour étudier les adaptations acquises par les crustacés décapodes pour faire face à une hypercapnie. L'équilibre acido-basique de l'hémolymphe est en outre une composante fondamentale de la physiologie respiratoire, dans la mesure où il influe sur le pH dont on a vu l'effet important sur les propriétés de l'hémocyanine (Chapitre VII). D'une manière générale, le maintien du pH extracellulaire à une valeur constante est nécessaire pour assurer l'intégrité fonctionnelle des processus physiologiques et structurels (Truchot, 1987). Cet état acido-basique résulte d'un équilibre entre la production et l'excrétion de différentes bases et acides dont le système tampon CO₂/HCO₃⁻ est le plus important :



Le pouvoir tampon du bicarbonate dans l'organisme provoque la formation d'un système ouvert car la pCO₂ et donc la [CO₂] de l'hémolymphe sont réglées par la respiration. Dans un environnement hypercapnique, il y a un déplacement de l'équation (1) vers la droite d'où une acidification de l'hémolymphe. Les crustacés hydrothermaux ont dû développer des mécanismes leur permettant d'éviter de trop fortes variations de leur pH dans un milieu hypercapnique. C'est pourquoi nous avons mesuré le pouvoir tampon de l'hémolymphe des différentes espèces de crustacés hydrothermaux, le pouvoir tampon d'une solution étant la quantité d'acide nécessaire pour faire varier le pH d'une unité. Les réponses aux perturbations de l'équilibre acido-basique dans l'hémolymphe des crevettes, *Rimicaris exoculata* ont également été mesurées pendant une exposition dans de l'eau de mer de surface hypercapnique, à 15°C et pression atmosphérique puis comparées à celles rapportées pour les crustacés côtiers.

VIII-1/ Matériel et méthodes

VIII-1-1 : Récoltes et prélèvements d'hémolymphe

Les individus de *Cyanograea praedator* et *Bythograea thermydron* ont été récoltés lors des campagnes HOT'96, HOT'TIME'97 et HOPE'99. Les spécimens de *Segonzacia mesatlantica*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* et *Chaceon affinis* ont été prélevés durant les missions MARVEL et PICO. Le prélèvement d'hémolymphe s'est fait comme décrit dans le chapitre V-1-1.

VIII-1-2 : Récolte des animaux et acclimatation *in vivo* de *Rimicaris exoculata*

Les individus de *Rimicaris exoculata* ont été récoltés lors de la campagne PICO, sur le site Rainbow. Les crevettes ont été récupérées dans les barillets de l'aspirateur à faune dès l'arrivée du submersible sur le navire, c'est-à-dire environ 2 à 3 heures après le prélèvement sur le fond. Les animaux ont été transférés immédiatement dans les aquariums expérimentaux et maintenus à pression atmosphérique et à 15°C dans de l'eau de mer de surface équilibrée avec de l'air (normocapnie), ou avec 1 % de CO₂ (hypercapnie). Les expériences ont débuté une heure après la mise en stabulation des crevettes dans les aquariums. Les individus sous normocapnie ont servi de contrôle. A des temps différents, trois crevettes ont été prélevées de l'aquarium, leur hémolymphe immédiatement ponctionnée dans le péricarde. Les échantillons ont été mélangés et conservés dans la glace quelques minutes. Le pH a été mesuré aussi rapidement que possible comme décrit ci-dessous. Une mesure unique a été réalisée pour chaque temps d'échantillonnage en raison du petit nombre d'individus disponibles. Le reste des échantillons mélangés a été congelé dans de l'azote liquide pour les analyses au laboratoire de l'équilibre acido-basique. Avant utilisation, les échantillons ont été décongelés à 4°C, centrifugés 15 minutes à 12 000 rpm, et le surnageant récupéré.

VIII-1-3 : Analyse de l'équilibre acido-basique

Les bicarbonates et les carbonates des différents échantillons ont été mesurés à l'aide de la méthode d'Astrup. Un échantillon de 70µl d'hémolymphe a été équilibré dans un analyseur

de gaz du sang de type BMS2 Radiometer, avec différents mélanges gazeux (air + CO₂) à deux ou trois pCO₂ différentes (entre 0,75 et 38 Torr). Ces mélanges de gaz ont été obtenus à l'aide d'un débitmètre massique (MKS). Après équilibration, le pH a été mesuré à l'aide d'une micro électrode capillaire Radiometer (G297/G2), connectée à un analyseur de sang et calibrée avec des tampons de précision (Radiometer S 1500 et S 1510). Par la suite, les concentrations en bicarbonate et en carbonate ont été calculées à l'aide des équations d'Henderson-Hasselbalch :

$$\text{pH} = \text{pK}'_1 + \log ([\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2])$$

$$\text{pH} = \text{pK}'_2 + \log ([\text{CO}_3^{2-}] / [\text{HCO}_3^-])$$

avec $[\text{CO}_2] = \alpha_{\text{CO}_2} \cdot \text{pCO}_2$

pK'₁ : première constante de dissociation apparente du CO₂

pK'₂ : deuxième constante de dissociation apparente du CO₂

α_{CO₂} : coefficient de solubilité du CO₂

pCO₂ : pression partielle en CO₂

Les valeurs des constantes utilisées dans cette étude sont celles calculées par Truchot (1976) sur le sérum de *Carcinus maenas* à 15°C (*i.e.* α_{CO₂} = 0,0499 mmol.l⁻¹.Torr⁻¹; pK'₁ = 6,027 et pK'₂ = 9,29 ; 1 Torr = 0,133 kPa).

VIII-1-4 : Mesure des concentrations en lactate

La concentration en L-lactate a été mesurée sur des échantillons déprotéinisés à l'aide d'un test enzymatique (Boehringer Mannheim N° 139 084) (cf. chapitre V). Les mesures de lactate ont été réalisées en double pour chaque pool d'échantillon.

VIII-1-5 : Analyses statistiques

Afin de mettre en évidence des différences significatives entre les moyennes des pouvoirs tampons des différentes espèces, nous avons utilisé un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis, avec un seuil de signification 0,05.

Pour comparer deux à deux les moyennes des pouvoirs tampons, nous n'avons pas

utilisé le test t (test de Student) car les variables ne remplissent pas les conditions d'application des tests paramétriques. Nous avons utilisé l'équivalent non paramétrique du test t qui est le test U de Mann-Withney, avec un seuil de signification 0,05.

Les données du pouvoir tampon de l'hémolymphe de *Chorocaris chacei* et *Mirocaris fortunata* n'ont pas été prises en compte dans les analyses statistiques car une seule valeur était disponible pour ces deux espèces.

VIII-2/ Résultats

VIII-2-1 : Pouvoirs tampons chez les différentes espèces

Les valeurs des pouvoirs tampons spécifiques et rapportées aux concentrations en protéines et en hémocyanine de l'hémolymphe de *C. praedator*, *B. thermydron*, *S. mesatlantica*, *R. exoculata*, *C. chacei*, *M. fortunata* et *C. affinis* sont présentées dans le tableau VIII-1. Le pouvoir tampon spécifique varie beaucoup d'un individu à l'autre, et au sein d'une même espèce, en relation avec la variabilité des concentrations en protéines et en hémocyanine de l'hémolymphe. Pour pouvoir faire des comparaisons entre espèces, il est plus correct de ramener le pouvoir tampon aux concentrations en protéines ou en hémocyanine. Une analyse statistique à l'aide d'un test non paramétrique montre que le facteur « espèce » a un effet significatif sur le pouvoir tampon (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,02$). Ensuite, nous avons fait des comparaisons à l'aide d'un test non-paramétrique (test U de Mann-Withney). Les résultats montrent que les pouvoirs tampons de *C. praedator* et de *B. thermydron* ne sont pas significativement différents ($p = 0,64$). Le pouvoir tampon de *C. praedator* est significativement différent de celui de *R. exoculata* ($p = 0,02$) et de celui de *C. affinis* ($p = 0,003$). De même, le pouvoir tampon de *B. thermydron* est significativement différent de celui de *R. exoculata* ($p = 0,02$). Les pouvoirs tampons de *S. mesatlantica*, *R. exoculata* et *C. affinis* ne sont pas significativement différents ($p = 0,8$ entre *S. mesatlantica* et *R. exoculata* ; $p = 1$ entre *S. mesatlantica* et *C. affinis* ; $p = 1$ entre *R. exoculata* et *C. affinis*). Les résultats du test suggèrent une différence significative entre le pouvoir tampon de *C. praedator* et celui de *S. mesatlantica* et entre celui de *B. thermydron* et celui de *C. affinis* ($p = 0,06$ dans les deux cas). Ils suggèrent également une différence significative entre le pouvoir tampon de *B. thermydron* et celui de *S. mesatlantica* ($p = 0,07$). Il apparaît donc que l'hémolymphe des espèces du

Pacifique présente un pouvoir tampon supérieur à celui des espèces de l’Atlantique.

Tableau VIII-1 : Pouvoir tampon spécifique (β), concentration en protéines, concentration en hémocyanine et pouvoir tampon ramené à la concentration en protéines et à la concentration en hémocyanine pour *Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica*, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* et *Chaceon affinis*.

		β	[protéines]	[hémocya nine]	β /[pro téines]	β /[hémocya nine]
	n	mM/unité <p>H</p>	g/l	g/l	mM/unité <p>H</p> /g	mM/unité <p>H</p> /g
<i>C. praeda tor</i>	10	-21,7 + 12,51	80,8 + 40,60	42,1 + 18,23	-0,27 + 0,06	-0,54 + 0,26
<i>B. thermydro n</i>	12	-25,5 + 10,83	94,0 + 26,44	37,4 + 8,29	-0,26 + 0,06	-0,70 + 0,30
<i>S. mesa tlantica</i>	5	-21,7 + 5,51	107,6 + 33,3	34,5 + 12,45	-0,21 + 0,03	-0,68 + 0,16
<i>R. exoc ulata</i>	27	-19,5 + 4,69	94,0 + 28,94	36,7 + 6,20	-0,21 + 0,02	-0,53 + 0,04
<i>C. chacei</i>	pool	-18,8	99,7	41,7	-0,19	-0,45
<i>M. fortunata</i>	pool	-21,6	123,2	45,3	-0,18	-0,48
<i>C. affinis</i>	4	-10,7 + 4,78	49,7 + 21,1	18,8 + 9,18	-0,21 + 0,02	-0,63 + 0,15

VIII-2-2: Acclimatation in vivo de *Rimicaris exoculata* à l’hypercapnie

Les expériences ont commencé juste après une heure de stabulation, sans aucune acclimatation de survie habituelle, car nous ne connaissions pas avant la mission le temps de survie et l’état physiologique des crevettes *Rimicaris exoculata* dans des aquariums à pression atmosphérique. Durant les expérimentations, le comportement des crevettes *R. exoculata* semblait normal dans les aquariums. Toutes les crevettes restaient groupées dans le même endroit de l’aquarium, autour des sorties de gaz. Leur comportement était semblable à celui observé *in situ*. Lors de la première heure de maintien des crevettes, avant le début des expérimentations, le taux de mortalité des individus était très élevé (environ 20 %). Il s’agissait probablement d’individus endommagés durant la capture et/ou la remontée. En revanche, durant les expérimentations, ce taux de mortalité était faible. Aucune mortalité n’a été observée durant les 20 premières heures d’hypercapnie. Au-delà de la 20^{ième} heure, les crevettes de plus petite taille ont commencé à mourir.

La figure VIII-1 résume l’évolution de la teneur en lactate dans l’hémolymphe des crevettes en normocapnie et en hypercapnie. Les teneurs initiales sont très élevées, avec des valeurs aux alentours de 30 mM. Sous normocapnie, la concentration en lactate commence à diminuer après 3 heures d’exposition, et ce jusqu’à 12 heures d’exposition, pour atteindre un plateau aux alentours de 14 mM. Sous hypercapnie, la teneur en lactate diminue de façon

similaire, de 23 mM à une valeur instable autour de 10-15 mM en 15 heures approximativement.

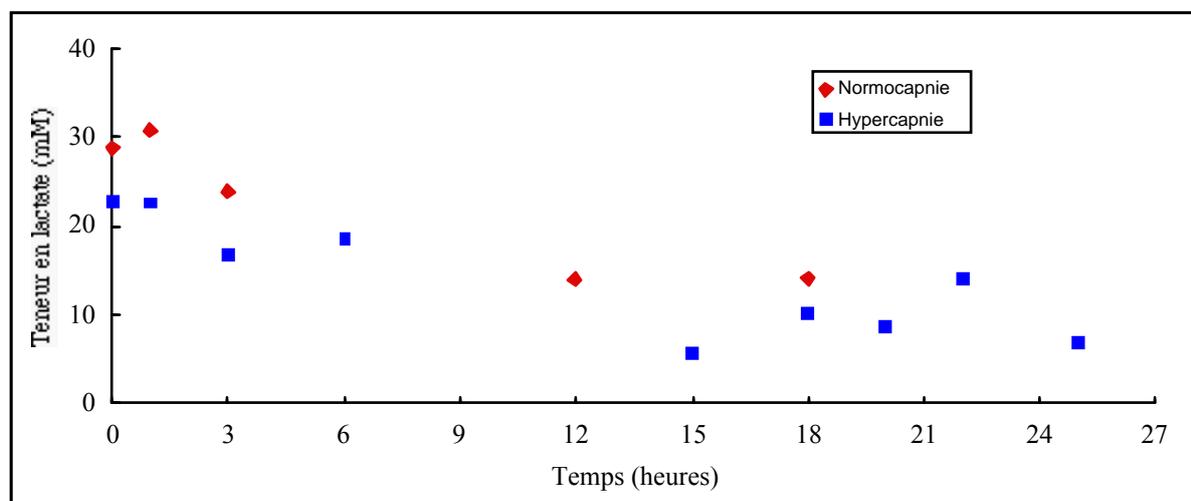


Figure VIII-1 : Variations de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Rimicaris exoculata* maintenues à pression atmosphérique et à 15°C en conditions normocapniques (◇ : air) ou hypercapniques (■ : 1% CO₂).

Les données acido-basiques obtenues peuvent être interprétées à l'aide d'un diagramme de Davenport. En conditions normocapniques (Figure VIII-2), utilisées comme contrôle, *Rimicaris exoculata* développe une alcalose, le pH augmentant de 7,3 à 7,7 dans les 12 heures et se stabilisant ensuite. La concentration en bicarbonates reste stable alors que la pCO₂ diminue de moitié, indiquant la combinaison d'une alcalose respiratoire et d'une alcalose métabolique importante. Considérant ces résultats (alcalose sous normocapnie), nous pouvons supposer que la « vraie » condition stationnaire de ces crevettes sous normocapnie aurait été à pH 7,6-7,7, [HCO₃⁻] = 2,5 mM et une pCO₂ = 1,5-2 Torr.

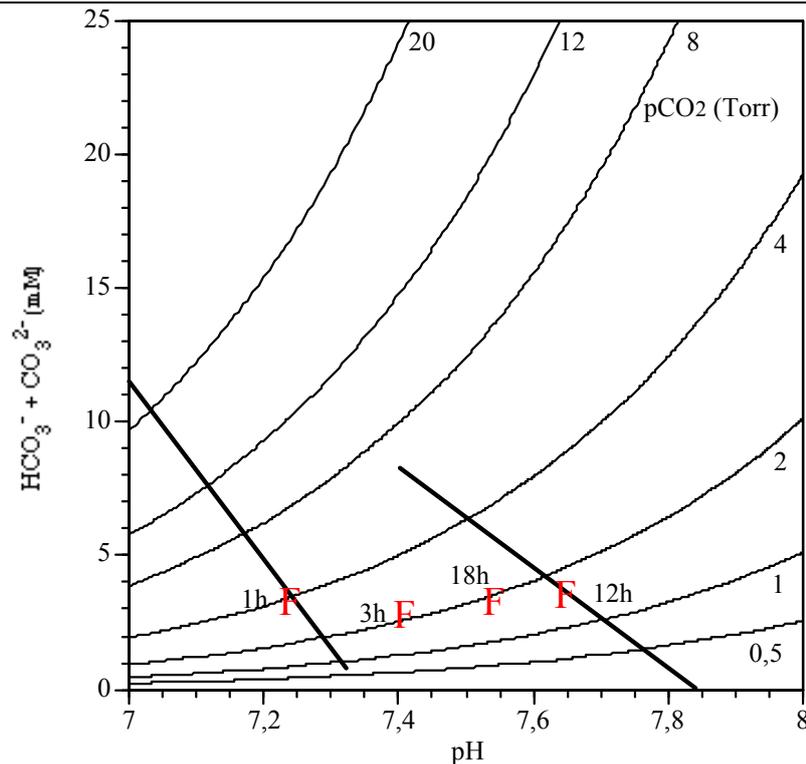


Figure VIII-2: Diagramme de Davenport représentant les variations de l'équilibre acido-basique *in vivo* dans l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata* pendant une exposition normocapnique, qui sert de contrôle. Les droites dessinées à 1h et 12h représentent les droites tampon. Les lignes d'iso- $p\text{CO}_2$ (0,5 à 20 Torr) sont dessinées sur le diagramme. Température : 15°C ; salinité : 36 ‰ ; pression atmosphérique.

Sous hypercapnie (Figure VIII-3), *R. exoculata* développe apparemment une forte alcalose métabolique, le pH augmentant de 7,3 à 7,6 en 6 heures. La forte augmentation de la teneur en bicarbonates, de 2 mM à 23 mM en 15 heures, indique une composante métabolique importante. Cependant, cette alcalose apparaît partiellement compensée par une acidose respiratoire, puisque la $p\text{CO}_2$ augmente également, de 3 Torr à 12 Torr en 15 heures. Ensuite et jusqu'à 25 heures d'hypercapnie, on observe une situation inverse avec une alcalose respiratoire, la $p\text{CO}_2$ diminuant de 12 à 5 Torr, combinée à une acidose métabolique, la teneur en bicarbonate diminuant de 23 mM à 7 mM. Ceci aboutit presque à un retour à l'état initial (pH 7,46, $[\text{HCO}_3^-] = 7,18$ mM et $p\text{CO}_2 = 5,26$ Torr) mesuré au début de l'hypercapnie bien que les conditions du milieu soient encore hypercapniques (1 % CO_2 , i.e. $p\text{CO}_2$ dans l'eau aux alentours de 7,5 Torr). La récupération sous normocapnie amène rapidement l'état acido-basique à une position nouvelle et stable à pH 7,6, $[\text{HCO}_3^-] = 5$ mM et $p\text{CO}_2 = 2,8$ Torr.

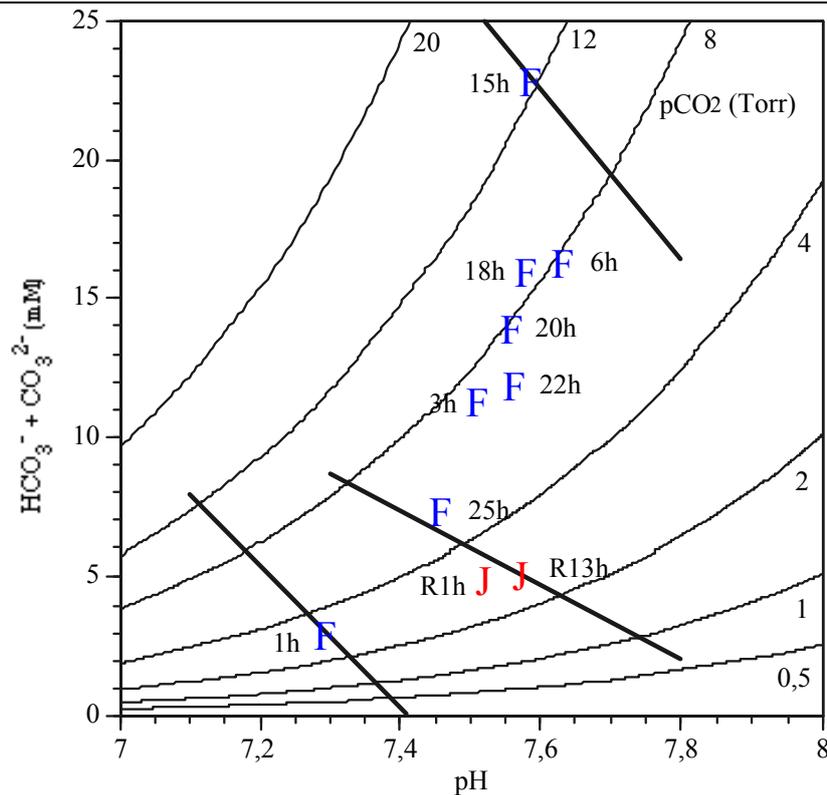


Figure VIII-3: Diagramme de Davenport représentant les variations de l'équilibre acido-basique *in vivo* dans l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata* pendant une exposition hypercapnique (υ : 1% CO₂) et après récupération sous normocapnie (λ). Les droites dessinées à 1h, 15h et R13h représentent les droites tampon. Les lignes d'iso-pCO₂ (0,5 à 20 Torr) sont dessinées sur le diagramme. Température : 15°C ; salinité : 36 ‰ ; pression atmosphérique.

VIII-3/ Discussion

VIII-3-1 : Pouvoirs tampons chez les différentes espèces

La comparaison avec les espèces littorales montre que les crustacés hydrothermaux présentent un pouvoir tampon légèrement supérieur, avec des valeurs comprises entre $-0,18$ et $-0,27$ mM/unité pH/g protéine (Tableau VIII-1). Le crabe vert, *Carcinus maenas*, présente un pouvoir tampon égal à $-0,16$ mM/unité pH/g prot. (Truchot, 1976) et la crevette rose, *Palaemon serratus*, égal à $-0,19$ mM/unité pH/g prot. (L. Camus, communication personnelle). Le crabe bathyal, *Chaceon affinis*, possède également un pouvoir tampon similaire. Les espèces du Pacifique ont un pouvoir tampon supérieur à celui des espèces de l'Atlantique. Or, les crabes du Pacifique rencontrent des concentrations en CO₂ supérieures à

celles de l'Atlantique : jusqu'à 12 000 μM pour *C. praedator* contre 3 100 μM au maximum pour *S. mesatlantica* et *C. affinis* (cf. chapitre II).

VIII-3-2 : Acclimatation *in vivo* de *Rimicaris exoculata* à l'hypercapnie

Le protocole expérimental utilisé pendant cette étude ne correspond pas aux standards habituels mis en place avec des espèces plus facilement récupérables (*e. g.* littorales), du fait de la localisation des écosystèmes hydrothermaux, des contraintes temporelles des missions (expériences uniques) et de notre absence de connaissance sur le potentiel de survie de *Rimicaris exoculata*. En particulier, en commençant les expériences dès la récupération des animaux du submersible et leur installation dans les aquariums, leur état physiologique était incertain. Des études antérieures sur la même espèce, échantillonnée en 1993 sur le site de Snake Pit, situé à une profondeur plus importante (3 500 m) (Lallier et Truchot, 1997), avaient conclu qu'aucune étude de physiologie ne pourrait être menée chez *Rimicaris*. Cependant, en 1994, quelques individus de *Rimicaris* furent observés, soit directement, soit sur des vidéos, autour des sites du champ hydrothermal, Lucky Strike, indiquant que cette espèce pouvait être trouvée dans des sites moins profonds (1 700 mètres de profondeur). En 1997, un nouveau site, Rainbow, a été découvert à une profondeur de 2 400 mètres. De larges agrégats de *Rimicaris* furent observés autour des cheminées hydrothermales (Desbruyères *et al.*, 2001). Malheureusement, de mauvaises conditions météorologiques annulèrent plusieurs plongées et il fallut attendre 1998 pour tenter les premières expériences *in vivo* avec *Rimicaris*.

Pour les raisons exposées ci-dessus, l'apparente alcalose initiale observée sous hypercapnie chez *Rimicaris* (Figure VIII-3) est trompeuse. Ces données peuvent uniquement être interprétées en examinant la réponse observée sous normocapnie. En effet, l'alcalose observée sur la figure VIII-2 suggère très fortement que les crevettes n'avaient pas récupéré du stress provoqué par leur capture et leur voyage jusqu'à la surface. L'évolution des teneurs en lactate dans l'hémolymphe soutient cette hypothèse.

Les mesures de la concentration en lactate (Figure VIII-1) montrent une décroissance entre le début de l'expérience et la fin, de 29 mM à 14 mM sous normocapnie et de 23 mM à 10 mM sous hypercapnie. Il est également intéressant de noter que les variations de la teneur en lactate sont pratiquement identiques entre la normocapnie et l'hypercapnie, laissant supposer que l'hypercapnie en elle-même ne modifie pas la balance du métabolisme aérobie

et du métabolisme anaérobie chez *Rimicaris exoculata*. La forte teneur en lactate mesurée au début est probablement due au stress, mais sa « stabilisation » à environ 10 mM est intéressante. Deux hypothèses peuvent être proposées : (i) maintenir les crevettes à pression atmosphérique peut perturber la prise d'oxygène, et provoquer les signes d'un métabolisme anaérobie ; (ii) il est possible que l'état physiologique normal des crevettes, *in situ*, résulte d'une contribution non négligeable du métabolisme anaérobie, afin de maintenir une activité motrice importante dans un environnement hypoxique (Segonzac *et al.*, 1993). De telles teneurs en lactate ont été rapportées chez *Rimicaris* par Lallier et Truchot (1997). Chez d'autres décapodes hydrothermaux du Pacifique et de l'Atlantique, des concentrations élevées en lactate ont également été trouvées (Sanders et Childress, 1992) (cf. chapitre V).

Pour les crabes, la teneur en lactate dans l'hémolymphe est généralement plus faible que chez les crevettes. Des conditions provoquant une anaérobiose fonctionnelle ou environnementale sont connues pour induire une accumulation de lactate dans l'hémolymphe des crustacés décapodes (Bridges et Brand, 1980 ; Gäde, 1983). Une étude des ressources énergétiques (*e. g.* le glycogène) et des voies métaboliques (*e. g.* les activités des enzymes glycolytiques) pourrait aider à résoudre ce point.

Sanders et Childress (1992) ont montré qu'une diminution de la teneur en lactate s'accompagnait d'une augmentation du pH hémolympatique de *Bythograea thermydron* durant son maintien dans un aquarium pressurisé à circulation d'eau. On peut donc supposer que le même processus existe chez *Rimicaris*. L'alcalose initiale observée sous normocapnie et sous hypercapnie est probablement due à l'élimination du lactate dans l'hémolymphe des crevettes pendant les 12 premières heures d'expérience. Ces résultats suggèrent qu'il aurait fallu laisser les crevettes en stabulation pendant au moins 12 heures avant de commencer les expérimentations afin qu'elles récupèrent du stress provoqué par la remontée. Si l'on considère que l'équilibre acido-basique entre 12 et 18 heures de normocapnie est très proche de la « vraie » condition stationnaire de ces crevettes, à pH 7,6, $[\text{HCO}_3^-] = 2,5 \text{ mM}$ et $\text{pCO}_2 = 2 \text{ Torr}$, la réponse à l'hypercapnie peut être réexaminée (Figure VIII-4).

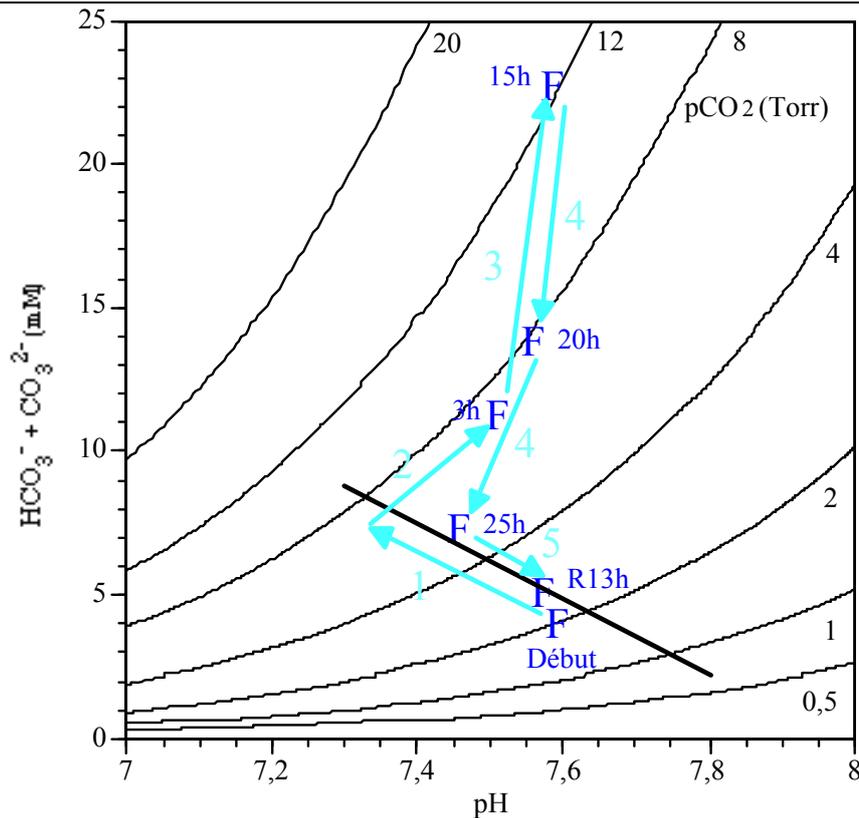


Figure VIII-4 : Diagramme de Davenport représentant notre interprétation des variations acido-basiques dans l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata*. « Début » représente la condition stationnaire postulée, basée sur les expériences de normocapnie (Figure VIII-2). L'acidose respiratoire initiale (Flèche 1) serait rapidement compensée (Flèche 2) et l'accumulation des bicarbonates (Flèche 3) permettrait une complète restauration du pH hémolympatique. Mais, après 15h, des mécanismes inconnus permettent aux bicarbonates et à la pCO₂ de diminuer sans que le pH ne bouge de trop (Flèche 4). La récupération sous normocapnie (Flèche 5) permet d'atteindre rapidement un état proche du point « Début ».

Il faut noter que les conditions stationnaires sous normocapnie chez le crabe vert, *Carcinus maenas*, à 15°C, sont similaires pour la concentration en bicarbonates (3 mM) et pour la pression partielle en CO₂ (1,3 Torr) bien que le pH hémolympatique soit plus basique (pH 7,8) (Truchot, 1975). En commençant à ces conditions stationnaires (Figure VIII-4, Début), l'hypercapnie provoquerait une forte acidose respiratoire dans les premiers temps, le pH diminuant de façon hypothétique de 7,6 à 7,3 (Figure VIII-4, flèche 1). Mais, cette acidose respiratoire initiale serait rapidement compensée par une alcalose métabolique (Figure VIII-4, flèche 2), avec une augmentation de la concentration en bicarbonates et de la pression partielle en CO₂, aboutissant à un pH de 7,5 après seulement 3 heures d'hypercapnie. Ainsi, les réponses initiales de *R. exoculata* à l'hypercapnie auraient été identiques à celles des crustacés littoraux, bien que beaucoup plus rapides, à savoir une acidose respiratoire avec une compensation métabolique due à une augmentation de la concentration en bicarbonates

(Truchot, 1975 ; Cameron, 1978). Après 15 heures d'hypercapnie métabolique (Figure VIII-4, flèche 3), les bicarbonates et la $p\text{CO}_2$ ont atteint leur niveau maximal, avec une teneur en CO_2 total de 24 mM, permettant une compensation complète du pH (pH proche de 7,6). Chez *Carcinus maenas* et *Callinectes sapidus*, la compensation du pH est seulement partielle (50 %) après 24 heures d'exposition à l'hypercapnie (Truchot, 1975 ; Cameron, 1978). Un autre animal hydrothermal, le vestimentifère *Riftia pachyptila*, possède une forte capacité à réguler son pH interne (Goffredi *et al.*, 1997). Ce vestimentifère arrive à compenser totalement les perturbations de son équilibre acido-basique. Cependant, le résultat le plus surprenant est que *Rimicaris* semble capable d'éliminer les fortes teneurs en bicarbonates qui se sont accumulées durant les 15 premières heures, et aussi de diminuer sa $p\text{CO}_2$ hémolympatique à 4 Torr, tout en maintenant son pH (Figure VIII-4, flèche 4). En effet, après 25 heures, l'équilibre acido-basique est très proche de celui atteint après 13 heures de récupération sous normocapnie (Figure VIII-4, flèche 5), ou de l'état stationnaire estimé (Figure VIII-4, Début). Même si ces résultats sont quelque peu biaisés par le protocole expérimental utilisé, ils dénotent des adaptations remarquables à l'hypercapnie chez *Rimicaris*.

VIII-4/ Conclusion

Il apparaît que le pouvoir tampon des espèces du Pacifique, qui rencontrent des teneurs en CO_2 plus élevées, est supérieur à celui des espèces de l'Atlantique. Les crevettes *Rimicaris exoculata* possèdent des capacités d'adaptation à l'hypercapnie très importantes. Il existe un facteur plasmatique qui diminue l'affinité Hc- O_2 mis en évidence chez les crabes de la famille des Ocypodidae (Bridges *et al.*, 1997). Un facteur similaire a également été mis en évidence chez *Rimicaris exoculata* et *Cyanograea praedator* (Chapitre VII) (Lallier et Truchot, 1997). Le facteur, présent chez les Ocypodidae, est un peptide ou une protéine de faible poids moléculaire qui lie le CO_2 et les ions H^+ (C. Bridges, communication personnelle). On peut supposer que le facteur présent chez *R. exoculata* et *C. praedator* mais pas chez *B. thermydron* serait lui aussi capable de fixer de grandes quantités de CO_2 et donc de jouer un rôle dans la régulation de l'équilibre acido-basique en cas d'hypercapnie environnementale. La comparaison des réponses face à une hypercapnie entre *B. thermydron*, *C. praedator* et *R. exoculata* permettra de confirmer le rôle éventuel de ce facteur dans la régulation de l'équilibre acido-basique chez les espèces hydrothermales et d'expliquer partiellement la rapidité de la réponse observée chez *R. exoculata*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail constitue une première approche de la physiologie respiratoire des crustacés décapodes des sources hydrothermales des dorsales du Pacifique oriental et médio-Atlantique. Nous avons voulu aborder cette problématique sous l'angle de l'écophysiologie, au sens propre du mot, c'est-à-dire en réunissant des données sur l'habitat et les caractéristiques physico-chimiques du micro-environnement et sur la physiologie respiratoire d'espèces endémiques, en cherchant à mettre en évidence des relations pouvant exister entre ces deux ensembles de données. L'ensemble de ce projet peut alors paraître ambitieux quand on connaît la difficulté d'obtenir des données fiables dans cet environnement turbulent ou d'expérimenter dans les conditions matérielles imposées par une campagne océanographique. Cela n'a été possible qu'en bénéficiant de l'expérience et les compétences de deux équipes, l'une de chimistes s'employant depuis quelques années à développer les outils d'analyse nécessaires pour répondre aux questions que se posent les biologistes, l'autre de physiologistes, spécialiste notamment des propriétés des pigments respiratoires. Malgré tout, sans doute les résultats présentés dans les différents chapitres qui précèdent ne permettent-ils pas de répondre à toutes les questions que nous nous posions. Néanmoins, l'intérêt de ce travail réside aussi dans les perspectives de recherche qu'il ouvre et que nous avons essayé de dégager ici.

Tout d'abord, s'il est besoin de rappeler une évidence, les crabes et crevettes que nous avons étudiés sont des espèces vagiles qui font preuve d'une activité motrice importante comme en témoignent les images prises sur le fond. Ces organismes peuvent ainsi avoir une réponse comportementale quant au choix de leur environnement et la caractérisation de celui-ci n'en est que plus difficile. L'approche choisie, mettant en relation des mesures ponctuelles et des observations vidéo, semble néanmoins avoir donné de bons résultats. La description du micro-environnement de chacune des espèces étudiées nous a permis de mettre en évidence quelques différences au niveau des propriétés physico-chimiques de celui-ci. Ainsi, il apparaît que les espèces du Pacifique rencontrent des conditions plus marquées que les espèces de

l'Atlantique : plus chaud, plus acide, plus riche en H₂S, plus hypercapnique et plus hypoxique. Malgré le manque de données concernant les maximums rencontrés par *Cyanagraea praedator* et *Segonzacia mesatlantica*, la température limite supérieure de vie des crustacés hydrothermaux semble être inférieure à 50°C. Cependant, tous les animaux rencontrent des périodes d'anoxie, d'hypercapnie et d'acidité plus ou moins longues. Il serait d'ailleurs intéressant d'estimer le temps que passe chacune des espèces dans chaque type d'environnement. Il faudrait pour cela prévoir des prises de vue dédiées à une espèce et compléter les données physico-chimiques en ce qui concerne les extrêmes : pôle froid en limite de la zone de mélange pour évaluer la fréquence des apports de mélange en provenance des émissions hydrothermales, et pôle chaud, en particulier sur les fumeurs noirs. Les mesures *in situ* récemment réalisées grâce à ALCHIMIST sont très informatives mais ont été pour l'instant confinées à l'environnement des modèles principaux : *Riftia*, *Bathymodiolus* et *Alvinella* (sur diffuseurs) pour le Pacifique, *Bathymodiolus* et crevettes en Atlantique. Les campagnes d'ores et déjà prévue en 2001 (ATOS, Atlantique) et demandée en 2002 (Pacifique) devraient enrichir ce corpus de données physico-chimiques.

Conséquence de l'existence d'une cuticule épaisse, les branchies des crustacés décapodes constituent la seule interface respiratoire entre milieux extérieur et intérieur. Le temps a manqué pour analyser deux paramètres importants pour la fonction respiratoire, et qui peuvent être l'objet d'adaptations morphologiques intéressantes : la surface branchiale et la distance de diffusion. Ces paramètres devront être analysés à l'avenir, d'autant plus qu'une relation entre surface branchiale spécifique et niveau d'activité motrice semble exister chez les brachyours (Johnson et Rees, 1988). Par contre, la présence probable de chimiorécepteurs sur le vaisseau efférent des branchies de brachyours, mise en évidence dans cette étude, constituerait une adaptation remarquable pour ces organismes en leur fournissant une information sur leur environnement (hypoxie ou présence de sulfures). Ce type de récepteur pourrait permettre une réponse neuro-physiologique rapide, associée à des modifications du rythme respiratoire (scaphognathite) ou du débit circulatoire (fréquence cardiaque), qui constituerait une adaptation physiologique face aux variations brusques des caractéristiques de l'environnement hydrothermal. Il est intéressant de souligner que si les crevettes ne possèdent pas ce type de structure neuro-sensorielle sur les branchies, la présence de chimiorécepteurs sensibles au sulfure sur les antennes de *Rimicaris exoculata* a été récemment démontrée (Renninger *et al.*, 1995).

L'hémolymphe assure le transport des différents solutés dans l'organisme et constitue à ce titre le reflet de l'état physiologique des organismes. La composition ionique de l'hémolymphe des crustacés hydrothermaux est peu différente de celle des crustacés littoraux et bathyaux, à l'exception de la bioaccumulation de cuivre libre, et de fortes teneurs en protéines et en lactate. Une fraction importante des protéines hémolympatiques semble constituée d'apohémocyanine, précurseur ou dérivé non fonctionnel de l'hémocyanine qui pourrait jouer un rôle dans la détoxification du cuivre. Les concentrations élevées en lactate, produit final du métabolisme anaérobie, peuvent résulter du maintien d'une activité motrice importante dans un environnement souvent hypoxique. Le crabe *Bythograea thermydron* présente des capacités de résistance à l'anoxie très importantes (Mickel et Childress, 1982b) probablement dues au passage à un métabolisme anaérobie. Une approche physiologique *in vivo*, en suivant par exemple la concentration en oxygène dans l'hémolymphe des crustacés en fonction de celle du milieu, permettrait de préciser la transition aérobie/anaérobie (pression critique), à condition de valider l'expérimentation à pression atmosphérique par des essais plus approfondis en enceinte pressurisée (celle-ci n'ayant pas pour le moment la souplesse nécessaire pour envisager les protocoles expérimentaux adéquats). Une approche complémentaire, *in vitro*, est néanmoins nécessaire pour préciser les potentiels métaboliques, par l'analyse d'activités enzymatiques comme celle de la lactate déshydrogénase ou de la citrate synthase.

Les crustacés décapodes possèdent comme pigment respiratoire, l'hémocyanine dont une des caractéristiques est de présenter une plasticité structurale et fonctionnelle très importante. Pourtant, nos résultats indiquent que la structure quaternaire des hémocyanines semble essentiellement corrélée avec la position taxinomique des espèces étudiées, sans présenter de particularités liées à l'environnement hydrothermal. Ainsi, l'hémocyanine des crevettes *Rimicaris exoculata* et *Chorocaris chacei* est essentiellement présente sous forme hexamérique, comme chez les crevettes littorales, alors que celle des crabes *Cyanograea praedator* et *Bythograea thermydron* existe sous formes dodécamérique et hexamérique, avec toutefois une proportion plus importante d'hexamères, contrairement aux crabes littoraux. Lors de nos analyses, nous avons néanmoins eu des difficultés à dissocier complètement les hémocyanines d'espèces hydrothermales, une observation qui pourrait indiquer une cohésion

plus forte des polymères et qui mériterait des analyses approfondies des cinétiques de dissociation. La composition en sous-unités apparaît pourtant conforme à ce qui est observé chez les autres crustacés. Cependant, l'étude de la structure quaternaire des hémocyanines par spectrométrie de masse, initiée au cours de ce travail, devrait permettre d'obtenir des données plus précises concernant les différentes formes polymériques d'hémocyanine, la composition en sous-unités et les liaisons existant entre ces monomères.

Les hémocyanines étudiées présentent des caractéristiques communes – forte affinité intrinsèque pour l'oxygène et forte sensibilité au pH, faible sensibilité au lactate – mais peuvent être regroupées en deux grandes catégories selon leurs propriétés fonctionnelles :

- la présence d'un facteur dialysable de faible poids moléculaire qui diminue l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène, associée à une relative insensibilité aux variations de température du milieu, caractérise les hémocyanines du crabe *Cyanograea praedator* et de la crevette *Rimicaris exoculata*,

- l'absence de ce facteur, mais un effet température inversé, l'affinité étant sensiblement plus élevée quand la température augmente caractérise les hémocyanines des crabes *Bythograea thermydron* et *Segonzacia mesatlantica*.

Toutefois, des données concernant l'effet de la dialyse chez *S. mesatlantica* seraient nécessaires pour compléter ce schéma général.

Les fortes affinités mesurées chez toutes les espèces hydrothermales (mais pas chez l'espèce bathyale *Chaceon affinis*) permettent probablement une fixation suffisante de l'oxygène même dans un environnement hypoxique. Un effet Bohr important compenserait cette forte affinité en facilitant le relargage de l'O₂ au niveau des tissus métaboliquement actifs. L'absence d'effet température, ou son effet inverse, apparaît comme fortement favorable dans un milieu où la température et la concentration en O₂ sont négativement corrélées. Cependant, lorsqu'on met en relation les propriétés fonctionnelles des hémocyanines avec les caractéristiques physico-chimiques du micro-environnement de chaque espèce, telles qu'elles ont été estimées dans cette étude (Chapitre II), la corrélation n'est pas évidente. On ne peut pas véritablement distinguer deux grands types de micro-environnement, l'un correspondant à *C. praedator* et *R. exoculata* et l'autre à *B. thermydron*

et *S. mesatlantica*. Notons toutefois que ces deux dernières espèces ont une répartition plus large. Il est possible également que ce soit la durée ou la fréquence d'exposition aux différentes conditions environnementales, et non les conditions rencontrées en tant que telles, qui soient importantes pour déterminer la répartition des différentes espèces en fonction de leurs capacités respiratoires. Cependant, comme le suggéraient Mickel et Childress (1982b), «en général, la distribution des crabes hydrothermaux autour des sources hydrothermales n'est apparemment pas déterminée par leurs capacités physiologiques mais plutôt par des facteurs écologiques ».

Le milieu hydrothermal se caractérise par de fortes teneurs en dioxyde de carbone, qui en modifiant le pH hémolympatique par une acidose respiratoire, va modifier les propriétés de liaison de l'oxygène à l'hémocyanine et donc les capacités respiratoires des animaux. Le pouvoir tampon apparaît supérieur chez les espèces du Pacifique qui rencontrent des concentrations en dioxyde de carbone plus élevées par rapport aux espèces de l'Atlantique. Surtout, la crevette *Rimicaris exoculata* présente des capacités d'adaptation face à une hypercapnie tout à fait exceptionnelles avec une réponse rapide et complète comparée à celle qui est observée chez les crustacés littoraux. Il est évident que la nature préliminaire de nos résultats ne nous permet pas d'extrapoler plus ou de faire des hypothèses sur les mécanismes permettant une telle réponse. Dans le futur, de nouvelles expériences sont planifiées durant la campagne ATOS (2001, chef de mission : Pierre-Marie Sarradin, L'Atalante et le ROV Victor 6 000), avec des animaux du site Rainbow, sachant cette fois-ci que les crevettes peuvent survivre au moins 10 jours à pression atmosphérique et avec la possibilité d'utiliser l'enceinte pressurisée IPOCAMP basée dans un laboratoire à terre à La Horta (Les Açores)¹. Des expérimentations avec les espèces du Pacifique sont également prévues à partir de 2002. Mais il faudra également se pencher sur les mécanismes qui pourraient être mis en jeu pour aboutir à cette régulation rapide de l'équilibre acido-basique, et notamment sur les activités de l'anhydrase carbonique, des canaux ioniques ou des pompes à protons.

¹ projet européen Ventox, EEC EVK3-CT-1999-0003. Thèse de Gaëtan Derchef, « Adaptations physiologiques à l'hypercapnie chez les crustacés : étude comparative entre espèces des environnements littoraux et hydrothermaux », équipe Ecophysiologie, Station Biologique de Roscoff.

Cette thèse constitue une première approche de l'écophysiologie respiratoire des différentes espèces de crustacés décapodes que l'on trouve autour des sources hydrothermales profondes. Elle constitue donc une étude préliminaire des adaptations respiratoires que peuvent avoir développé ces organismes pour coloniser cet environnement «extrême», comme :

- la détection chémosensorielle de certaines caractéristiques de l'environnement
- le fort potentiel d'extraction de l'oxygène en milieu hypoxique
- la capacité de régulation de l'équilibre acido-basique extracellulaire

Plusieurs aspects importants doivent être pris en compte pour compléter ce travail, et notamment :

- surface branchiale et distance de diffusion,
- potentiel métabolique pour l'anaérobiose
- capacité d'échanges ioniques et de conversion du CO₂.

Enfin, pour aboutir à une vision plus intégrée des transferts gazeux chez les crustacés hydrothermaux, d'autres paramètres seraient nécessaires, comme les débits ventilatoire et circulatoire ou les pressions partielles d'oxygène et de CO₂ dans l'hémolymphe pré- et post-branchiale, mais ils seront certainement plus difficiles à évaluer compte tenu des contraintes imposées par la récolte et l'expérimentation sur ces espèces. L'étude des effets des sulfures, poison connu de la chaîne respiratoire, devra également être menée afin de voir comment les crustacés arrivent à éviter leur toxicité.

Crabes et crevettes hydrothermaux n'en constituent pas moins des « modèles biologiques » fascinants. D'une part, la variété des habitats colonisés par les crustacés décapodes en général (marins, intertidaux, terrestres ou dulçaquicoles) autorise une approche comparative suffisamment large pour être intéressante. D'autre part, la pérennité à l'échelle des temps géologiques de l'environnement hydrothermal profond avec ses caractéristiques « extrêmes » et hyper-variables a pour conséquence attendue la fixation de caractéristiques adaptatives chez les espèces endémiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Airriess CN et Childress JJ.** 1994. Homeoviscous properties implicated by the interactive effects of pressure and temperature on the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydron*. *Biological Bulletin* 187: 208-214.
- Alliel PM, Dautigny A, Lamy J, Lamy J et Jolles P.** 1983. Cell-free synthesis of hemocyanin from the scorpion *Androctonus australis*. Characterization of the translation products by monospecific antisera. *European Journal of Biochemistry* 134: 407-414.
- Arp AJ, Childress JJ et Fischer CR.** 1984. Metabolic and blood gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*. *Physiological Zoology* 57: 648-662.
- Batuyev BN, Krotov AG, Markov VF, Cherkashev GA, Krasnov SG et Lisitsyn YD.** 1994. Massive sulphide deposits discovered and sampled at 14°45'N, Mid-Atlantic ridge. *BRIDGE Newsletter* 6: 6-10.
- Bijlholt MMC, Van Bruggen EF et Bonaventura J.** 1979. Dissociation and reassembly of *Limulus polyphemus* hemocyanin. *European Journal of Biochemistry* 95: 399-405.
- Bijlholt MMC, Van Heel MC et Van Bruggen EFJ.** 1982. Comparison of the 4 x 6-meric hemocyanins from three different arthropods using computer alignment and correspondence analysis. *Journal of Molecular Biology* 161: 139-153.
- Biscoito M et Saldanha L.** 2000. Occurrence of *Chaceon affinis* (Decapoda : Geryonidae) in the vicinity of a hydrothermal vent site on the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Crustacean Biology* 20: 128-131.
- Bollag DM et Edelstein SJ.** 1991. Silver staining a gel. In: *Protein Methods*. New-York: Wiley-Liss; 117-122.
- Booth CE, McMahon BR et Pinder AW.** 1982. Oxygen uptake and the potentiating effects of increased haemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab,

-
- Callinectes sapidus*. Journal of Comparative Physiology 148B: 111-121.
- Boss KJ et Turner RD.** 1980. The giant white clam from the Galápagos Rift, *Calyptogena magnifica species novum*. Malacologia 20: 161-194.
- Bouchet JY et Truchot JP.** 1985. Effects of hypoxia and L-lactate on the hemocyanin oxygen affinity of the lobster, *Homarus vulgaris*. Comparative Biochemistry and Physiology 80A: 69-73.
- Brenowitz M, Bonaventura C et Bonaventura J.** 1983. Assembly and calcium-induced cooperativity in *Limulus* IV hemocyanin: a model system for analysis of structure-function relationships in the absence of subunit heterogeneity. Biochemistry 22: 4707-4713.
- Brenowitz M, Bonaventura C et Bonaventura J.** 1984. Self-association and oxygen-binding characteristics of the isolated subunits of *Limulus polyphemus* hemocyanin. Archives of Biochemistry and Biophysics 230: 238-249.
- Bridges CR et Brand AR.** 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine Crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology 65A: 399-409.
- Bridges CR, Savel A, Stöcker W, Markl J et Linzen B.** 1983. Structure and function of krill (*Euphausia superba*) haemocyanin-adaptation to life at low temperature. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (Wood EJ, ed). Life Chem Rep Suppl 1 London: Harwood; 353-356.
- Bridges CR, Morris S et Grieshaber MK.** 1984. Modulation of hemocyanin oxygen affinity in the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke). Respiration Physiology 57: 189-200.
- Bridges CR.** 1986. A comparative study of the respiratory properties and physiological function of haemocyanin in two burrowing and two non-burrowing crustaceans. Comparative Biochemistry and Physiology 83A: 261-270.
- Bridges CR et Morris S.** 1986. Modulation of hemocyanin oxygen affinity by L-lactate - a role for other cofactors. In: Invertebrate Oxygen Carriers (Linzen B, ed). Heidelberg:

Springer-Verlag; 341-352.

- Bridges CR.** 1988. The haemocyanin of the tarantula *Lasiodora erythrocythara*: the influence of CO₂, organic cofactors and temperature on oxygen affinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89A: 661-667.
- Bridges CR et Taylor AC.** 1992. Ecophysiological adaptations of the haemocyanin of *Ocypode sp.* to an aquatic and terrestrial mode of life. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 85: 10.
- Bridges CR, Hupperts V, Eshky AA et Taylor AC.** 1997. Haemocyanin oxygen transport in *Ocypode spp.*: modulation of oxygen affinity? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 77: 145-158.
- Brouwer M, Whaling P et Engel DW.** 1986. Copper-metallothioneins in the American lobster, *Homarus americanus*: potential role as Cu(I) donors to apohemocyanin. *Environmental Health Perspectives* 65: 93-100.
- Burnett LE, Scholnick DA et Mangum CP.** 1988. Temperature sensitivity of molluscan and arthropod hemocyanins. *Biological Bulletin* 174: 153-162.
- Cameron JN.** 1978. Effects of hypercapnia on blood acid-base status, NaCl fluxes, and trans-gill potential in freshwater blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Journal of Comparative Physiology* 123: 137-141.
- Campbell AC, Palmer MR, Klinkhammer GP, Bowers TS, Edmond JM, Lawrence JR, Casey JF, Thompson G, Humphris S, Rona P et Karson JA.** 1988. Chemistry of hot springs on the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* 335: 514-519.
- Cann J, Van Dover CL, Walker C, Dando P et Murton BJ.** 1994. Diversity of vent ecosystems (DOVE). *BRIDGE newsletter* 4: 1-39.
- Cary SC, Shank T et Stein J.** 1998. Worms bask in extreme temperatures. *Nature* 391: 545-546.
- Cavanaugh CM, Gardiner SL, Jones ML, Jannasch HW et Waterbury JB.** 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213: 340-342.

- Cavanaugh CM, Wirsen CO et Jannasch HW.** 1992. Evidence for methylo-trophic symbionts in a hydrothermal vent mussel (*Bivalvia* : Mytilidae) from the mid-Atlantic Ridge. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3799 -3803.
- Cavellec A, Boisset N, Taveau J-C et Lamy JN.** 1990. Image processing of electron-microscopic views of *Callianassa californiensis* hemocyanin. In: *Invertebrate Dioxygen Carriers* (Préaux G, Lontie R, eds). Leuven: Leuven University Press; 271-274.
- Chaigneau J.** 1994. Les organes des sens autres que ceux de la vision. In: *Traité de Zoologie, Crustacés Morphologie, Physiologie, Reproduction, Embryologie.* (Grassé P-P, ed). Paris: Masson; 345-410.
- Charlou J-L, Donval J-P, Douville E, Radford-Knoery J et Fouquet Y.** Soumis. Geochemistry of hydrothermal fluids collected at Lucky Strike (37°17'N) and Menez Gwen (37°50'N) hydrothermal fields, South of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic ridge (DIVA 1 cruise, May 1994). *Journal of Geophysical Research, B.*
- Chevaldonné P, Desbruyères D et Le Haitre M.** 1991. Time-series of temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep-Sea Research* 38: 1417-1430.
- Chevaldonné P, Desbruyères D et Childress JJ.** 1992. Some like it hot ... and some even hotter. *Nature* 359: 593-594.
- Chevaldonné P, Jollivet D, Vangriesheim A et Desbruyères D.** 1997. Hydrothermal-vent alvinellid polychaete dispersal in the eastern Pacific. 1. Influence of vent site distribution, bottom currents, and biological patterns. *Limnology and Oceanography* 42: 67-80.
- Chevaldonné P, Fisher CR, Childress JJ, Desbruyères D, Jollivet D, Zal F et Toulmond A.** 2000. Thermotolerance and the 'Pompeii worm'. *Marine Ecology-Progress Series* 208: 293-295.
- Childress JJ et Fisher CR.** 1992. The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review* 30: 337-441.

- Colaço A, Desbruyeres D, Comtet T et Alayse AM.** 1998. Ecology of the Menez Gwen hydrothermal vent field (Mid-Atlantic Ridge Azores Triple Junction). *Cahiers de Biologie Marine* 39: 237-240.
- Corliss JB et Ballard RD.** 1977. Oases of life in the cold abyss. *National Geographic* 152: 441-454.
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Herzen RPV, Ballard RD, Green K, Williams D, Bainbridge A, Crane K et van Andel TH.** 1979. Submarine thermal springs on the Galápagos rift. *Science* 203: 1073-1083.
- Cosson RP.** 1996. Bioaccumulation of mineral elements within the vestimentiferan tube worm *Riftia pachyptila* (Jones): a review. *Oceanologica Acta* 19: 163-176.
- Cosson RP.** 1997. Adaptations developed by hydrothermal vent organisms to face the stress of heavy metals. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 122: 109-126.
- Cosson RP et Vivier JP.** 1997. Interactions of metallic elements and organisms within hydrothermal vents. *Cahiers de Biologie Marine* 38: 43-50.
- Cosson-Mannevy MA, Cosson R et Gaill F.** 1986. Mise en évidence de protéines de type métallothionéine chez deux invertébrés des sources hydrothermales, le pogonophore vestimentifère *Riftia pachyptila* et l'annélide polychète *Alvinella pompejana*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 302: 347-352.
- Dalla Venezia L, Zago C, Siebers D et Menetto A.** 1992. Structural elements of the gills of the shore crab *Carcinus mediterraneus*. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 46: 425-434.
- De Bethune B, Cleuter Y, Marbaix G et Préaux G.** 1985. Site of biosynthesis of the hemocyanin in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 93: B75.
- Decker H, Savel-Niemann A, Körschenhausen D, Eckerskorn E et Markl J.** 1989. Allosteric oxygen-binding properties of reassembled tarantula (*Eurypelma californicum*)hemocyanin with incorporated apo- or met-subunits. *Biological and Chemical Hoppe-Seyler* 370: 511-523.

-
- Decker H et Foll R.** 2000. Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127A: 147-154.
- De Fur PL, Mangum CP et Reese JE.** 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biological Bulletin* 178: 46-54.
- Dejours P.** 1981. *Principles of Comparative Respiratory Physiology*, 2nd edition (First edition 1975). Amsterdam: Elsevier/North Holland. 265 p.
- de Saint Laurent M.** 1984. Crustacés décapodes d'un site hydrothermal actif de la dorsale du Pacifique oriental (13°Nord), en provenance de la campagne française Biocyatherm. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 299: 355-360.
- Desbruyères D et Laubier L.** 1980. *Alvinella pompejana* gen. sp. nov., Ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride Est-Pacifique. *Oceanologica Acta* 3: 267-274.
- Desbruyères D et Laubier L.** 1986. Les Alvinellidae, une famille nouvelle d'annélides polychètes inféodées aux sources hydrothermales sous-marines: systématique, biologie et écologie. *Canadian Journal of Zoology* 64: 2227-2245.
- Desbruyères D et Segonzac M.** 1997. *Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna*. IFREMER, Brest, France.
- Desbruyères D, Chevaldonné P, Alayse A-M, Jollivet D, Lallier FH, Jouin-Toulmond C, Zal F, Sarradin P-M, Cosson R, Caprais J-C, Arndt C, O'Brien J, Guezennec J, Hourdez S, Riso R, Gail F, Laubier L et Toulmond A.** 1998. Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-Sea Research Part II - Topical studies in Oceanography* 45: 383-422.
- Desbruyères D, Almeida A, Biscoito M, Comtet T, Khripounoff A, Le Bris N, Sarradin P-M, Segonzac M.** 2000. Distribution of hydrothermal vent communities along the Northern Mid-Atlantic Ridge. Dispersal vs. environmental controls: a review. *Hydrobiologia* 440: 201-216.

Desbruyères D, Biscoito M, Caprais J-C, Colaço A, Comtet T, Crassous P, Fouquet Y, Khripounoff A, Le Bris N, Olu K, Riso R, Sarradin P-M, Segonzac M et Vangriesheim A. 2001. Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge when approaching the Azores plateau. *Deep-Sea Research I* 48: 1325-1346.

Desbruyères D, Olu K, Colaço A, Comtet T, Sarradin P-M, Biscoito M et Fouquet Y. Sous presse. Composition et distribution des communautés associées à l'hydrothermalisme océanique au point triple des Açores sur la dorsale Médio-Atlantique. *Boletim do Museu Municipal do Funchal*.

Distel DL, Baco AR, Chuang E, Morrill W, Cavanaugh C et Smith CR. 2000. Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* 403: 725-726.

Drexel R, Siegmund S, Schneider HJ, Linzen B, Gielens C, Préaux G, Kellerman J et Lottspeich F. 1987. Complete amino acid sequence of a functional unit from mollscan hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biological and Chemical Hoppe-Seyler* 368: 617-635.

Edmond JM, Measures C, McDuff RE, Chan LH, Collier R, Grant B, Gordon LI et Corliss JB. 1979. Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor elements in the ocean: the Galápagos data. *Earth Planetary Science Letters* 46: 1-18.

Edmond JM, von Damm KL, McDuff RE et Measures CI. 1982. Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature* 297: 187-191.

Edmond JM et Van Damm KL. 1985. Chemistry of ridge crest hot springs. In: *Hydrothermal vents of the Eastern Pacific : an overview*. (Jones ML, ed): Bulletin of the Biological Society of Washington; 43-48.

Ellerton HD, Ellerton NF et Robinson HA. 1983. Hemocyanin: a current perspective. *Progress in Biophysical and Molecular Biology* 41: 143-248.

Enright JT, Newman WA, Hessler RR et McGowan JA. 1981. Deep-ocean hydrothermal vent communities. *Nature* 289: 219-221.

Fahey RC, Dorian R, Newton GL et Utley J. 1983. Radioprotectors and Anticarcinogens.

New York: Academic Press.

- Fahrenbach WH.** 1970. The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *Journal of Cellular Biology* 44: 445-453.
- Felbeck H.** 1981. Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213: 336-338.
- Feldman RA, Shank TM, Black MB, Baco AR, Smith CR et Vrijenhoek RC.** 1998. Vestimentiferan on a whale fall. *Biological Bulletin* 194: 116-119.
- Ferridge AG, Seddon MJ, Green BN, Jarvis SA et Skilling J.** 1992. Rapid Communication in Mass Spectrometry. 6: 707-711.
- Fiala-Médioni A et Métivier C.** 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent bivalve *Calymene magnifica*, with a discussion of its nutrition. *Marine Biology* 90: 215-222.
- Fiala-Médioni A, Cavanaugh C, Dando P et Van Dover CL.** 1996. Symbiotic mussels from the Mid-Atlantic ridge: adaptations to trophic resources. *Journal Conference Abstracts* 1(2): 788.
- Flegenhauer BE.** 1992. External anatomy and integumentary structures. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (Harrison FW, Humes AG, eds). New-York: Wiley-Liss; 7-43.
- Fonselius SH.** 1983. Determination of hydrogen sulphide. In: *Methods of Seawater Analysis*, Second ed (Grasshoff K. EM, Kremling K., ed): Verlag Chemie; 73-80.
- Fouquet Y, Auclair G, Cambon P et Etoubleau J.** 1988. Geological setting and mineralogical and geochemical investigations on sulfide deposits near 13°N on the East Pacific Rise. *Marine Geology* 84: 145-178.
- Fouquet Y, Wafik A, Cambon P, Mevel C, Meyer G et Gente P.** 1993. Tectonic setting and mineralogical and geochemical zonation in the Snake Pit sulfide deposit (Mid-Atlantic Ridge at 23°N). *Econ Geology* 88: 2018-2036.
- Fouquet Y, Charlou J-L, Costa I, Donval JP, Radford-Knoery J, Pellé H, Ondréas H,**

- Lourenço N, Segonzac M et Tivey MK.** 1994. A detailed study of the Lucky Strike hydrothermal vent site and discovery of a new hydrothermal site: Menez Gwen; preliminary results of the DIVA I cruise (2-29 May). *InterRidge News* 3(2): 14-17.
- Fouquet Y, Ondréas H, Charlou J-L, Donval JP, Radford-Knoery J, Costa I, Lourenço N et Tivey MK.** 1995. Atlantic lava lakes and hot vents. *Nature* 377: 201.
- Fouquet Y.** 1997. Geological setting and composition of hydrothermal sulfide deposits along the Mid-Atlantic Ridge. Volcanic control versus tectonic control of sulfide mineralisation. *Eos, Transactions, American Geophysical Union* 78: 832.
- Fouquet Y, Charlou J-L, Donval J-P, Radford-Knoery J, Ondréas H, Cambon P, Bougault H, Etoubleau J, Barriga F, Costa I, Lourenço N et Kingston-Tivey M.** Soumis. Hydrothermal processes on shallow volcanic segments: Mid-Atlantic Ridge near the Azores triple junction. *Marine Geology*.
- Frederich M, Sartoris FJ, Arntz WE et Pörtner H-O.** 2000. Haemolymph Mg^{2+} regulation in decapod crustaceans: physiological correlates and ecological consequences in polar areas. *Journal of Experimental Biology* 203: 1383-1393.
- Fredericq L.** 1878. Sur l'hémocyanine, substance nouvelle du sang de Poulpe (*Octopus vulgaris*). *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 87: 996-998.
- Fricke H, Giere O, Stetter K, Alfredsson GA, Kristjansson JK, Stoffers P et Svavarsson J.** 1989. Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic ridge. *Marine Biology* 102: 425-429.
- Fustec A, Desbruyères D et Juniper SK.** 1987. Deep-sea hydrothermal vent communities at 13° N on the East Pacific Rise: microdistribution and temporal variations. *Biological Oceanography* 4: 121-164.
- Gäde G.** 1983. Anaerobic metabolism of arthropods and mollusks during functional and environmental anaerobiosis. *Journal of Experimental Zoology* 228: 415-429.
- Gaykema WPJ, Hol WGJ, Vereijken JM, Soeter NM, Bak HJ et Beintema JJ.** 1984. 3.2Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Nature* 309: 23-29.

-
- Gebruk AV, Pimenov NV et Savvichev AS.** 1993. Feeding specialization of bresiliid shrimps in the TAG site hydrothermal community. *Marine Ecology - Progress Series* 98: 247-253.
- Geistdoerfer P.** 1994. *Pachycara thermophilum*, une nouvelle espèce de poisson Zoarcidae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-Atlantique. *Cybium* 18: 109-116.
- Geistdoerfer P.** 1996. Fishes of the ecosystems associated with oceanic hydrothermalism: state of knowledge and new results. *Oceanologica Acta* 19: 539-548.
- Geret F, Riso R, Sarradin P-M, Caprais J-C et Cosson RP.** Soumis. Metal compartmentalization and methallothioneins in the shrimp, *Rimicaris exoculata*, from the Rainbow hydrothermal field (Mid-Atlantic Ridge): preliminary approach to the fluid-organism relationship.
- German CR, Briem J et others.** 1993. Hydrothermal activity on the Reykjanes ridge: the Steinahóll vent field at 63°06'N. *Eos, Trans-Actions of the American Geophysical Union* 74: 360.
- German CR, Parson LM et team. Hs.** 1996. Hydrothermal exploration near the Azores Triple Junction : tectonic control of venting at slow-spreading ridges. *Earth and Planetary Science Letters* 138: 93-104.
- German CR et Parson LM.** 1998. Distributions of hydrothermal activity along the Mid-Atlantic Ridge: interplay of magmatic and tectonic controls. *Earth and Planetary Science Letters* 160: 327-341.
- Ghidalia W.** 1985. Structural and biological aspects of pigments. In: *The Biology of Crustacea, Vol. 9: Integument, Pigments and Hormonal Processes* (Bliss D. E. and Mantel L. H. eds). New York: Academic Press; 301-394.
- Ghiretti-Magaldi A, Milanesi C et Salvato B.** 1973. Identification of hemocyanin in the cyanocytes of *Carcinus maenas*. *Experientia* 29: 1265-1267.
- Ghiretti-Magaldi A, Milanesi C et Tognon G.** 1977. Hemopoiesis in Crustacea Decapoda: origin and evolution of hemocytes and cynocytes of *Carcinus maenas*. *Cell Differ* 6: 167-186.

-
- Goffredi SK, Childress JJ, Desaulniers NT, Lee RW, Lallier FH et Hammond D.** 1997. Inorganic carbon acquisition by the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* depends upon high external pCO₂ and upon proton-equivalent ion transport by the worm. *Journal of Experimental Biology* 200: 883-896.
- Goodman SH et Cavey MJ.** 1990. Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell & Tissue Research* 260: 495-505.
- Graham RA.** 1985. A model for L-lactate binding to *Cancer magister* hemocyanin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81B: 885-887.
- Grassle JF.** 1986. The ecology of deep-sea hydrothermal vent communities. *Advances in Marine Biology* 23: 301-362.
- Greaves J, Rainer JS et Mangum CP.** 1992. Size-exclusion high performance liquid chromatography of the dodecameric and hexameric forms of hemocyanin from *Callinectes sapidus*. *Marine Biology* 113: 33-36.
- Grieshaber MK et Völkel S.** 1998. Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annual Review of Physiology* 60: 33-53.
- Gru C, Sarradin P-M, Legoff H, Narcon S, Caprais J-C et Lallier FH.** 1998. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from *Riftia pachyptila*. *The Analyst* 123: 1289-1293.
- Guinot D.** 1988. Les crabes des sources hydrothermales de la dorsale du Pacifique oriental (campagne Biocyarise, 1984). *Oceanologica Acta* 8: 109-118.
- Hagerman L.** 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Marine Biology* 77: 11-17.
- Hagerman L et Uglow RF.** 1985. Effects of hypoxia on the respiratory and circulatory regulation of *Nephrops norvegicus*. *Marine Biology* 87: 273-278.
- Hagerman L et Vismann B.** 1999. Effects of thiosulfate on hemocyanin oxygen affinity in the isopod *Saduria entomon* (L.) and the brown shrimp *Crangon crangon* (L.). *Journal*

of Comparative Physiology 169B: 549-554.

- Hékinian R, Francheteau J, Renard V, Ballard D, Choukroune P, Cheminee L, Albarède F, Minster J-F, Charlou J-L, Marty JC et Boulègues J.** 1983. Intense hydrothermal activity at the axis of the East Pacific Rise near 13°N : submersible witnesses the growth of sulfide chimney. *Marine Geophysical Research* 6: 1-14.
- Hékinian R, Francheteau J et Ballard RD.** 1985. Morphology and evolution of hydrothermal deposits at the axis of the East Pacific Rise. *Oceanologica Acta* 8: 147-155.
- Hendrickson WA, Smith JL et Sheriff S.** 1985. Structure and function of hemerythrin. In: *Respiratory Pigments in Animals* (Lamy J, Truchot JP, Gilles R, eds). Berlin: Springer Verlag; 1-7.
- Hong SY.** 1988. Development of epipods and gills in some pagurids and brachyurans. *Journal of Natural History* 22: 1005-1040.
- Horn EC et Kerr MS.** 1963. Hemolymph protein and copper concentrations of adult blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun). *Biological Bulletin* 125: 499-507.
- IUPAC.** 1993. Commission on atomic masses and isotopic abundances. *Journal of Physical and Chemical References* 22: 1571-1584.
- Jacobs M-P, Lontie P et Préaux G.** 1984. Isolation of an active hemocyanin-mRNA-containing fraction from *Cancer pagurus*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 92: B30.
- Jeffrey PD, Shaw DC et Treacy GB.** 1978. Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Characterization of a dimeric subunit and its involvement in the formation of the 25S component. *Biochemistry* 17: 3078-3084.
- Jeffrey PD.** 1979. Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Electron microscopy of native and reassembled molecules. *Biochemistry* 18: 2508-2513.
- Johnson BA, Bonaventura C et Bonaventura J.** 1984. Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-lactate. *Biochemistry* 23: 872-878.

- Johnson L et Rees CJC.** 1988. Oxygen consumption and gill surface area in relation to habitat and lifestyle of four crab species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89A: 243-246.
- Johnston W et Barber AA.** 1969. Reconstitution of functional hemocyanin from apohemocyanin: the hepatopancreas as copper donor. *Comparative Biochemistry and Physiology* 28: 1259-1273.
- Jokumsen A, Wells RMG, Ellerton HD et Weber RE.** 1981. Hemocyanin of the giant antarctic isopod, *Glyptonotus antarcticus*: structure and effects of temperature and pH on its oxygen affinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 70A: 91-95.
- Jokumsen A et Weber RE.** 1982. Hemocyanin-oxygen affinity in hermit crab blood is temperature independent. *The Journal of Experimental Zoology* 221: 389-394.
- Jolles J, Jolles P, Lamy J et Lamy J.** 1979. Structural characterization of seven different subunits in *Androctonus australis* haemocyanin. *FEBS Letters* 106: 289-291.
- Jollivet D.** 1993. Distribution et évolution de la faune associée aux sources hydrothermales profondes à 13°N sur la dorsale du Pacifique oriental: le cas particulier des polychètes alvinellidae. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale.
- Jones ML.** 1981. *Riftia pachyptila*, new genus, new species, the vestimentiferan worm from the Galápagos Rift geothermal vents (Pogonophora). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 93: 1295-1313.
- Karl DM, Wirsen CO et Jannasch HW.** 1980. Deep-sea primary productivity at the Galápagos hydrothermal vents. *Science* 207: 1345-1347.
- Karmovskaya ES et Parin NV.** 1999. A new species of the genus *Ilyophis* (Synaphobranchidae, Anguilliformes) from the Broken Spur Hydrothermal vent field (mid-Atlantic Ridge). *Journal of Ichthyology* 39(5): 353-362. (Traduction de l'article original en russe publiée dans *Voprosy Ikhtiologii*. 1999 39(3): 316-325).
- Katz B.** 1936. Neuromuscular transmission in crabs. *Journal of Physiology* 87: 199-220.
- Kegeles G et Tai M-S.** 1973. Rate constants of the hexamer dodecamer reaction of lobster hemocyanin. *Biophysic and Biology* 1: 46-50.

- Kempter B.** 1983. Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*. *Naturwissenschaften* 70: 255-256.
- Kempter B, Markl J, Brenowitz M, Bonaventura C et Bonaventura J.** 1985. Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits II. Xiphosuran (*Limulus*) and spider (*Eurypelma, Cupiennus*) hemocyanin. *Biological Chemistry* 366: 77-86.
- Kenk VC et Wilson BR.** 1985. A new mussel (Bivalvia, Mytilidae) from hydrothermal vents in the Galápagos Rift zone. *Malacologia* 26: 253-271.
- Kurtz DM.** 1992. Molecular structure/function relationships of hemerythrins. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology* (Mangum CP, ed). Berlin: Springer Verlag; 151-171.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lallier FH, Boitel F et Truchot JP.** 1987. The effect of ambient oxygen and temperature on haemolymph L-lactate and urate concentrations in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 86A: 255-260.
- Lallier F.** 1988. Adaptation de la fonction de transport de l'oxygène par l'hémocyanine en milieu hypoxique : étude chez la crevette *Penaeus japonicus* et le crabe *Carcinus maenas*. Thèse de l'Université de Bordeaux I.
- Lallier FH et Truchot JP.** 1989a. Modulation of haemocyanin oxygen affinity by L-lactate and urate in the prawn *Penaeus japonicus*. *Journal of Experimental Biology* 147: 133-146.
- Lallier FH et Truchot JP.** 1989b. Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respiration Physiology* 77:323-336.
- Lallier FH et Truchot JP.** 1997. Hemocyanin oxygen-binding properties of a deep-sea hydrothermal vent shrimp: evidence for a novel cofactor. *Journal of Experimental Zoology* 277: 357-364.
- Lallier FH, Camus L, Chausson F et Truchot JP.** 1998. Structure and function of

- hydrothermal vent crustacean haemocyanin: an update. *Cahiers de Biologie Marine* 39: 313-316.
- Lalou C, Brichet E et Hekinian R.** 1985. Age dating of sulfide deposits from axial and off-axial structures on the East Pacific near 12°50'N. *Earth Planetary Science Letters* 75: 59-71.
- Lalou CG, Thompson M, Arnold E, Brichet E, Druffel E et Rona PA.** 1990. Geochronology of TAG and Snake-Pit hydrothermal fields, Mid-Atlantic Ridge: witness to a long and complex history. *Earth and Planetary Science Letters* 97: 113-128.
- Lalou C, Reyss J-L et Brichet E.** 1993a. Actinide-series disequilibrium as a tool to establish the chronology of deep-sea hydrothermal activity. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 57: 1221-1231.
- Lalou C, Reyss J-L, Brichet E, Arnold M, Thompson G, Fouquet Y et Rona PA.** 1993b. New age data for Mid-Atlantic Ridge hydrothermal sites: TAG and SnakePit chronology revisited. *Journal of Geophysical Research* 98B: 9705-9713.
- Lamy J, Lamy J, Baglin MC et Weill J.** 1977. Scorpion hemocyanin subunits: properties, dissociation, association. In: *Structure and Function Haemocyanin* (Bannister JV, ed). Berlin-Heidelberg: Springer; 37-49.
- Lamy J, Lamy J, Bonaventura J et Bonaventura C.** 1980. Structure, function, and assembly in the hemocyanin system of the scorpion *Androctonus australis*. *Biochemistry* 19: 3033-3039.
- Lamy JN, Green BN, Toulmond A, Wall JS, Weber RE et Vinogradov SN.** 1996. The giant hexagonal bilayer extracellular hemoglobins. *Chemical Review* 96: 3113-3124.
- Langmuir C, Charlou J-L, Colodner D, Corey S, Costa I, Desbruyères D, Desonies D, Emerson T, Fornari D, Fouquet Y, Humphris S, Fiala-Médioni A, Saldanha L, Sours-Page R, Thatcher M, Tivey MK, Van Dover CL, Von Damm K, Wiese K et Wilson C.** 1993. Lucky Strike: a newly discovered hydrothermal site on the Azores platform. *RIDGE Events* 4: 3-5.

- Langmuir C, Humphris S, Fornari D, Van Dover CL, Von Damm K, Tivey MK, Colodner D, Charlou J-L, Desonies D, Wilson C, Fouquet Y, Klinkhammer G et Bougault H.** 1997. Hydrothermal vents near a mantle hot spot: the Lucky Strike vent field at 37°N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* 148: 69-91.
- Laubier L.** 1993. Les oasis éphémères des abysses: la fin d'un paradigme. *La Recherche* 256: 855-862.
- Laverack MS et Barrientos Y.** 1995. Sensory and other superficial structures in living marine Crustacea. *Transaction of the Royal Society of Edimburg, Earth Sciences* 76: 123-136.
- Laverack MS et Saier B.** 1993. Morphology and ultrastructure of a presumptive oxygen receptor in the gills of the norway lobster *Nephrops norvegicus* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 13: 504-510.
- Le Bris N, Sarradin P-M, Birot D et Alayse-Danet A-M.** 2000. A new chemical analyzer for *in situ* measurement of nitrate and total sulfide over hydrothermal vent biological communities. *Marine Chemistry* 72: 1-15.
- Le Pichon X.** 1968. Sea-floor spreading and continental drift. *Journal of Geophysical Research* 73: 3661-3697.
- Lerch K, Huber M, Schneider HJ, Drexel R et Linzen B.** 1986. Different origins of metal binding sites in binuclear copper proteins, tyrosinases and hemocyanin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 26: 213-217.
- Lerch K et German UA.** 1988. Evolutionary relationship among copper proteins containing coupled binuclear copper sites. In: *Oxidases and Related Redox Systems*. New-York: Alan R Liss; 331-348.
- Linzen B.** 1983. Subunit heterogeneity in arthropodan hemocyanins. In: *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins* (Wood EJ, ed). London: Harwood; 27-38.
- Linzen B, Shartau W et Schneider HJ.** 1985a. Primary structure of arthropod hemocyanins.

- In: Respiratory Pigments in Animals (Lamy J, Truchot JP, Gilles R, eds). Berlin-Heidelberg: Springer; 59-72.
- Linzen B, Soeter NM, Riggs AF, Schneider HJ, Shartau W, Moore MD, Yokota E, Behrens PQ, Nakashima H, Tagaki T, Nemoto T, Vereijken JM, Bak HJ, Beintema JJ, Volbeda A, Gaykema WPJ et Hol WGJ.** 1985b. The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229: 519-524.
- Loewe R et Linzen B.** 1975. Hemocyanins in spiders. II. Automatic recording of oxygen binding curves, and the effect of Mg^{++} on oxygen affinity, cooperativity and subunit association of *Cupiennus salei* hemocyanin. *Journal of Comparative Physiology* 98: 147-156.
- Lonsdale PF.** 1977. Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Research* 24: 857-863.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lykkeboe G, Johansen K et Maloiy GMO.** 1975. Functional properties of hemoglobins in the teleost *Tilapia grahami*. *Journal of Comparative Physiology* 104: 1-11.
- Mangum CP et Johansen K.** 1975. The colloid osmotic pressures of the body fluids of invertebrates. *Journal of Experimental Biology* 63: 661-671.
- Mangum CP et Lykkeboe G.** 1979. The influence of inorganic ions and pH on the oxygenation properties of the blood in the gastropod mollusc *Busycon canaliculatum*. *Journal of Experimental Zoology* 207: 417-430.
- Mangum CP.** 1982. On the relationship between P_{50} and the mode of gas exchange in tropical crustaceans. *Pacific Science* 36: 403-410.
- Mangum CP.** 1983b. On the distribution of lactate sensitivity among the hemocyanins. *Marine Biological Letters* 4: 139-149.
- Mangum CP.** 1983c. The effect of hypoxia on hemocyanin-oxygen binding in the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Molecular Physiology* 3:217-224.

- Mangum CP.** 1983e. The influence of inorganic ions and pH on HcO₂ transport systems. In: Invertebrate oxygen-binding proteins: structure, active site and function (Lamy J, Lamy J, eds). New York: Marcel Decker; 811-822.
- Mangum CP, Scott JL, Black REL, Miller KI et Van Holde KE.** 1985b. Centipedal hemocyanin: its structure and its implications for arthropod phylogeny. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA 82: 3721-3725.
- Mangum CP.** 1986. Osmoregulation in marine and estuarine animals: its influence on respiratory gas exchange and transport. Bolletino di Zoologia 53: 1-7.
- Mangum CP et Burnett LE.** 1986. The CO₂ sensitivity of the hemocyanins and its relationship to Cl⁻ sensitivity. Biological Bulletin 171: 248-263.
- Mangum CP et Rainer JS.** 1988. The relationship between subunit composition and O₂ binding of blue crab hemocyanin. Biological Bulletin 174: 77-82.
- Mangum CP, Greaves J et Rainer JS.** 1991. Oligomer composition and oxygen binding of the hemocyanin of the blue crab *Callinectes sapidus*. Biological Bulletin 181: 453-458.
- Mangum CP.** 1992. Respiratory function of the molluscan hemocyanins. In: Blood and Tissues Oxygen Carriers (Mangum CP, ed). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 301-323.
- Mangum CP et Greaves J.** 1996. Hemocyanins of the genus *Uca*: structural polymorphisms and native oligomers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 199: 1-15.
- Mantel LH et Farmer LL.** 1983. Osmotic and ionic regulation. In: The Biology of Crustacea (Mantel LH, ed) Volume 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation. New York: Academic Press; 53-161.
- Markl J, Hofer A, Bauer G, Markl A, Kempter B, Brenzinger M et Linzen B.** 1979. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II. Crustacea. Journal of Comparative Physiology 133B: 167-175.
- Markl J.** 1980. Hemocyanins in spiders. XI. The quaternary structure of *Cupiennus* hemocyanin. Journal of Comparative Physiology 140B: 199-207.

- Markl J et Kempter B.** 1981. Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immuno electrophoresis. *Journal of Comparative Physiology* 140B: 495-502.
- Markl J, Decker H, Stöker W, Linzen B, Schutter WG et Van Bruggen EF.** 1981a. On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 362: 185-188.
- Markl J, Savel A et Linzen B.** 1981b. Hemocyanins in spiders. XIV. Subunit composition of dissociation intermediates, and its bearing on the quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 362: 1255-1262.
- Markl J, Decker H, Linzen B, Schutter WG et Van Bruggen EF.** 1982. Hemocyanins in spiders. XV. The role of individual subunits in the assembly of *Eurypelma* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 363: 73-87.
- Markl J.** 1986. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biological Bulletin* 171: 90-115.
- Markl J.** 1987. Der immunmodulator hämocyanin - ein multigener, allosterischer proteinkomplex. In: *Welche Chancen Hat Die Tumormunologie heute?* (Klippel KE, Harzmann R, eds). München-Planegg: SMV; 73-90.
- Markl J et Decker H.** 1992. Structure of Arthropod hemocyanins. In: *Blood and Tissues Oxygen Carriers* (Mangum CP, ed). Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 325-376.
- Marques A et Porteiro F.** 1998. Hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* (Bivalvia: Mytilidae): diet item of *Hydrolagus affinis* (Pisces, Chimeridae). *InterRidge News* 7: 21.
- Martin JW et Christiansen JC.** 1995. A new species of the shrimp genus *Chorocaris* Martin and Hessler, 1990 (Crustacea: Decapoda: Bresiliidae) from hydrothermal vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 108: 220-227.
- Martinez CBR, Alvares EP, Harris RR et Santos MCF.** 1999. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tissue & Cell* 31: 380-389.

- Mason RP, Mangum CP et Godette G.** 1983. The influence of inorganic ions and acclimation salinity on hemocyanin-oxygen binding in the blue crab *Callinectes sapidus*. Biological Bulletin 164: 104-123.
- Mauro NA et Mangum CP.** 1982a. The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. 1: intraspecific responses to seasonal differences in temperature. Journal of Experimental Zoology 219: 179-188.
- Michard G, Albarède F, Michard A, Minster J-F, Charlou J-L et Tan N.** 1984. Chemistry of solutions from the 13°N East Pacific Rise hydrothermal site. Earth and Planetary Science Letters 67: 297-307.
- Mickel TJ et Childress JJ.** 1982a. Effects of pressure and temperature on the EKG and heart rate of the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydron* (Brachyura). Biological Bulletin 162: 70-82.
- Mickel TJ et Childress JJ.** 1982b. Effects of temperature, pressure and oxygen concentration on the oxygen consumption rate of the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydron* (Brachyura). Physiological Zoology 55: 199-207.
- Miller KI et Mangum CP.** 1989. An investigation of the nature of Bohr, Root and Haldane effects in *Octopus dofleini* hemocyanin. The Journal of Comparative Physiology 158B: 547-552.
- Milne Edwards A et Bouvier M.** 1894. Description de *Chaceon affinis*. Crustacés décapodes provenant des campagnes du yacht l'Hirondelle (1886, 1887, 1888). Première partie. Brachyures et Anomoures. Résultats des campagnes scientifiques accomplies sur son yacht par Albert 1er Prince souverain de Monaco Fascicule 7:41-45; Fig. A-D; pl. 1-11.
- Morris S et Taylor AC.** 1983. Diurnal and seasonal variation in physico-chemical conditions within intertidal rock pools. Estuarine and Coastal Shelf Sciences 17: 339-355.
- Morris S et Bridges CR.** 1985. An investigation of haemocyanin oxygen affinity in the semi-terrestrial crab *Ocypode saratan* Forsk. Journal of Experimental Biology 117: 119-132.

-
- Morris S, Bridges CR et Grieshaber MK.** 1985a. A new role for uric acid : modulator of haemocyanin oxygen affinity in Crustaceans. *Journal of Experimental Zoology* 235: 135-139.
- Morris S, Taylor AC, Bridges CR et Grieshaber MK.** 1985b. Respiratory properties of the haemolymph of the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke). *The Journal of Experimental Zoology* 233: 175-186.
- Morris S, Bridges CR et Grieshaber MK.** 1986. The potentiating effect of purine bases and some of their derivatives on the oxygen affinity of haemocyanin from the crayfish *Austopotamobius pallipes*. *Journal of Comparative Physiology* 156B: 431-440.
- Morris S.** 1988. Effects of freezing on the function and association state of crustacean haemocyanins. *Journal of Experimental Biology* 138 :535-539.
- Morris S, Greenaway P et McMahon BR.** 1988a. Oxygen and carbon dioxide transport of an amphibious crab, *Holthuisana transversa*. *Journal of Comparative Physiology* 157B: 873-882.
- Morris S, Greenaway P et McMahon BR.** 1988b. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab, *Birgus latro*. I. An in vitro investigation of blood gas transport. *Journal of Experimental Biology* 140: 477-491.
- Morris S et McMahon BR.** 1989. Neurohumor effects on crustacean haemocyanin oxygen affinity. *Journal of Experimental Zoology* 249: 334-337.
- Morse MP, Meyhöfer E, Otto JJ et Kuzirian AM.** 1986. Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks. *Science* 231: 1302-1304.
- Murton BJ, Klinkhammer G, Becker K, Briais A, Edge D, Hayward N, Millard N, Mitchell I, Rouse I, Rudnicki M, Sayanagi K, Sloan H et Parson L.** 1994. Direct evidence for the distribution and occurrence of hydrothermal activity between 27°N - 30°N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* 125: 119-128.
- Murton BJ, Van Dover CL et Southward E.** 1995. Geological setting and ecology of the Broken Spur hydrothermal vent field: 29°10'N on the Mid-Atlantic ridge. *Geological Society Special Publication* 87: 33-41.

- Nelson DC et Fisher CR.** 1995. Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps. In: Microbiology of Deep - Sea Hydrothermal Vents (Karl DM, ed). Boca Raton: CRC Press Inc; 125-167.
- Newman WA.** 1985. The abyssal hydrothermal vent invertebrate fauna, a glimpse of antiquity ? Bulletin of the Biological Society of Washington 6: 231-242.
- Nickerson KW et Van Holde KE.** 1971. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanins. I. Circular dichroism and absorption spectra. Comparative Biochemistry and Physiology 39B: 855-872.
- Olson K, Terwilliger NB et McDowell J.** 1988. Structure of hemocyanin in larval and adult lobsters. American Zoologist 28: 47A.
- Page HM, Fiala-Médioni A, Fisher CR et Childress JJ.** 1991. Experimental evidence for filter-feeding by the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*. Deep-Sea Research 38: 1455-1461
- Piiper J, Dejourns P, Haab P et Rahn H.** 1971. Concepts and basic quantities in gas exchange physiology. Respiration Physiology 13: 292-304.
- Pilz J, Goral K, Hoylaerts M, Witters R et Lontie R.** 1980. Studies by small-angle X-ray scattering of the quaternary structure of the 24S-component of the hemocyanin of *Astacus leptodactylus* in solution. European Journal of Biochemistry 105: 539-543.
- Polz MF, Robinson JJ, Cavanaugh CM et Van Dover CL.** 1998. Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. Limnology & Oceanography 43: 1631-1638.
- Préaux G, Van Damme A, De Bethune B, Jacobs M-P et Lontie R.** 1986. Hemocyanin-mRNA-rich fractions of cephalopodan Decapod and of Crustacea, their *in vivo* and *in vitro* translation. In: Invertebrate Oxygen Carriers (Linzen B, ed). Berlin-Heidelberg: Springer; 485-488.
- Rahn H.** 1966. Aquatic gas exchange: theory. Respiration Physiology 1: 1-12.
- Ramirez Llodra E, Tyler PA et Copley JTP.** 2000. Reproductive biology of three caridean shrimp, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (Caridea:

- Decapoda), from hydrothermal vents. *Journal of Marine Biology of Association of United of Kingdom* 80:473-484.
- Renninger GH, Kass L, Gleeson RA, Van Dover CL, Battelle B-A, Jinks RN, Herzog ED et Chamberlain SC.** 1995. Sulfide as a chemical stimulus for deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Biological Bulletin* 189: 69-76.
- Reynolds ES.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
- Rieley G, Van Dover CL, Hedrick DB et Eglinton G.** 1999. Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Marine Biology* 133: 495-499.
- Riggs AF.** 1991. Aspects of the origin and evolution of non-vertebrate hemoglobins. *American Zoologist* 31: 535-545.
- Riso RD, Le Corre P et Chaumery CJ.** 1997. Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis. *Analytica Chimica Acta* 351: 83-89.
- Robertson JD.** 1953. Further studies on ionic regulation in marine invertebrates. *Journal of Experimental Biology* 30: 277-296.
- Rochu D et Fine JM.** 1984. *Cancer pagurus* hemocyanin: subunit arrangement and subunit evolution in functional polymeric forms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78B: 67-74.
- Rona PA, Klinkhammer G, Nelsen TA, Trefry JH et Elderfield H.** 1986. Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* 321: 33-37.
- Rosenblatt RH et Cohen DM.** 1986. Fishes living in deep-sea thermal vents in the tropical eastern Pacific, with descriptions of a new genus and two new species of eelpouts (Zoarcidae). *Transactions of the San Diego Society of National History* 21: 71-79.
- Rouat S.** 1999. Le trésor des abysses. *Science et Avenir* 633.
- Rtal A et Truchot JP.** 1996. Haemolymph transport and tissue accumulation of exogenous

- copper in the shore crab, *Carcinus maenas*. Marine Pollution Bulletin 32: 802-811.
- Rtal A, Nonnotte L et Truchot JP.** 1996. Detoxification of exogenous copper by binding to hemolymph proteins in the shore crab, *Carcinus maenas*. Aquatic Toxicology 36: 239-252.
- Saldanha L.** 1994. Fishes observed and collected during the Alvin dives at the Lucky Strike thermal vent site (Mid-Atlantic Ridge – 1993). Cybium 18: 460-462.
- Saldanha L et Biscoito M.** 1997. Fishes from the Lucky Strike and Menez Gwen hydrothermal vent sites (Mid-Atlantic Ridge). Boletim do Museu Municipal do Funchal 49: 189-206.
- Sanders NK, Arp AJ et Childress JJ.** 1988. Oxygen binding characteristics of the hemocyanins of two deep-sea hydrothermal vent crustaceans. Respiration Physiology 71: 57-68.
- Sanders NK.** 1989. Functional properties of hemocyanins from deep-sea Crustaceans. Thesis Chapters: I; III;:1-37; 93-146.
- Sanders NK et Childress JJ.** 1990a. Adaptations to the deep-sea oxygen minimum layer: oxygen binding by the hemocyanin of the bathypelagic mysid, *Gnathophausia ingens* Dohrn. Biological Bulletin 178: 286-294.
- Sanders NK et Childress JJ.** 1992. Specific effects of thiosulphate and L-lactate on hemocyanin-O₂ affinity in a brachyuran hydrothermal vent crab. Marine Biology 113: 175-180.
- Sarradin P-M et Caprais J-C.** 1996. Analysis of dissolved gases by headspace sampling, gas chromatography with columns and detectors commutation. Preliminary results. Analytical Communications 33: 371-373.
- Sarradin PM, Caprais JC, Briand P, Gaill F, Shillito B et Desbruyères D.** 1998. Chemical and thermal description of the environment of the Genesis hydrothermal vent community (13°N, EPR). Cahiers de Biologie Marine 39: 159-167.
- Sarradin PM, Caprais JC, Riso R, Kerouel R et Aminot A.** 1999. Chemical environment of the hydrothermal mussel communities in the Lucky Strike and Menez Gwen vent

- fields, Mid Atlantic Ridge. *Cahiers de Biologie Marine* 40: 93-104.
- Savel-Niemann A, Markl J et Linzen B.** 1988. Hemocyanins in spiders. XXII. Range of allosteric interaction in a four-hexamer hemocyanin. Cooperativity and Bohr effect in dissociation intermediates. *Journal of Molecular Biology* 204: 385-395.
- Schoffeniels E.** 1976. Adaptations with respect to salinity. *Symposium of Biochemical Society* 41: 179-204.
- Schönenberger N, Cox JA et Gabbiani G.** 1980. Evidence for hemocyanin formation in the compound eye of *Squilla mantis* (Crustacea: Stomatopoda). *Cell and Tissue Research* 205: 397-409.
- Segonzac M, de Saint Laurent M et Casanova B.** 1993. Enigma of the trophic adaptation of the shrimp Alvinocarididae in hydrothermal areas along the Mid-Atlantic Ridge. *Cahiers de Biologie Marine* 34: 535-571.
- Sempéré JC, Purdy GM et Schouten H.** 1990. Segmentation of the Mid-Atlantic Ridge between 24°N and 30°40'N. *Nature* 344: 427-431.
- Shank TM, Fornari DJ, Von Damm KL, Lilley MD, Haymon RM et Lutz RA.** 1998. Temporal and spatial patterns of biological community development at nascent deep-sea hydrothermal vents (9°50'N, East Pacific Rise). *Deep-Sea Research II* 45: 465-515.
- Sick H et Gersonde K.** 1969. Method of continuous registration of O₂ binding curves of hemoproteins by means of a diffusion chamber. *Analytical Biochemistry* 32: 362-376.
- Snyder GK et Mangum CP.** 1982. The relationship between the capacity for oxygen transport, size, shape, and aggregation state of an extracellular oxygen carriers. In: *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs* (Bonaventura J, Bonaventura C, Tesh S, eds). New-York: A. R. Liss; 173-188.
- Soeter NM, Jekel PA, Beintema JJ, Volbeda A et Hol WGJ.** 1987. Primary and tertiary structures of the first domain of *Panulirus interruptus* hemocyanin and comparison of arthropod hemocyanins. *European Journal of Biochemistry* 169: 323-332.
- Sokal RR et Rohlf FJ.** 1981. Linear regression. In: *Biometry*, second edition (Freedman, ed). New York; 454-560.

-
- Stöcker W, Raeder U, Bijlholt MMC, Wichertjes T, Van Bruggen EFJ et Markl J.** 1988. The quaternary structure of four crustacean two-hexameric hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits. *Journal of Comparative Physiology B* 158: 271-289.
- Taylor AC et Spicer JI.** 1896. Oxygen-transporting properties of the blood of two semi-terrestrial amphipods, *Orchestia gammarellus* (Pallas) and *O. mediterranea* (Costa). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 97: 135-150.
- Taylor AC, Johns AR, Atkinson RJA et Bridges CR.** 1999. Effects of sulphide and thiosulphate on the respiratory properties of the haemocyanin of the benthic crustaceans *Calocaris macandreae* Bell, *Nephrops norvegicus* (L.) and *Carcinus maenas* (L.). *Journal of Experimental Biology and Ecology* 233: 163-179.
- Taylor AC, Astall CM et Atkinson RJA.** 2000. A comparative study of the oxygen transporting properties of the haemocyanin of five species of thalassinidean mud-shrimps. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 244: 265-283.
- Tentori E et Lockwood APM.** 1990. Haemolymph magnesium levels in some oceanic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology* 95A: 545-548.
- Terwilliger NB.** 1982. Effect of subunit composition on the quaternary structure of isopod (*Ligia pallasii*) hemocyanin. *Biochemistry* 21: 2579-2586.
- Terwilliger NB et Terwilliger RC.** 1982. Changes in the subunit structure of *Cancer magister* hemocyanin during larval development. *Journal of Experimental Biology* 221: 181-191.
- Terwilliger NB.** 1992. Molecular structure of the extracellular heme proteins. In: *Oxygen Carriers in Blood and Tissues* (Mangum CP, ed). Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 193-229.
- Terwilliger NB, Dangott L et Ryan M.** 1999. Cryptocyanin, a crustacean molting protein: evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 96: 2013-2018.
- Toulmond A et Truchot J-P.** 1993. Les transporteurs d'oxygène. *La Recherche* 254: 562-

570.

- Truchot J-P.** 1975. Action de l'hypercapnie sur l'état acide-base du sang chez le crabe *Carcinus maenas* (L.) (Crustacé : Décapode). Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris 280: 311-314.
- Truchot J-P.** 1976. Carbon dioxide combining properties of the blood of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): CO₂ dissociation curves and Haldane effect. Journal of Comparative Physiology 112 B: 283-294.
- Truchot J-P.** 1980. Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. Journal of Experimental Zoology 214: 205-208.
- Truchot J-P et Duhamel-Jouve A.** 1980. Oxygen and carbon dioxide in the marine intertidal environment : diurnal and tidal changes in rockpools. Respiration Physiology 39: 241-254.
- Truchot J-P.** 1987. Comparative Aspects of Extracellular Acid-Base Balance. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 248 pages.
- Truchot J-P.** 1992. Respiratory function of arthropod hemocyanins. In: Blood and Tissues Oxygen Carriers (Mangum CP, ed). Berlin Heidelberg: Spinger Verlag; 377-410.
- Truchot JP et Lallier FH.** 1992. Modulation of the oxygen-carrying function of hemocyanin in the Crustaceans. News Physiol. Sci. 7: 49-52.
- Tunnicliffe V.** 1991. The biology of hydrothermal vents: ecology and evolution. Oceanography and Marine Biology - An Annual Review 29: 319-407.
- Tunnicliffe V, McArthur AG et McHugh D.** 1998. A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna. Advances in Marine Biology 34: 353-442.
- Valentine RG, Shapiro BM et Stadtman ER.** 1968. Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. Biochemistry 7: 2143-2152.
- Van Bruggen EF, Bijlholt MMC, Schutter WG, Wichertjes T, Bonaventura J, Bonaventura C, Lamy J, Lamy J, Leclerc M, Schneider H-J, Markl J et Linzen**

- B.** 1980. The role of structurally diverse subunits in the assembly of three cheliceratan hemocyanins. *FEBS Letter* 116: 207-210.
- Van Bruggen EF, Schutter WG, Breemen JFL, Bijlholt MC et Wichertjes T.** 1981. The hemocyanins. In: *Electron Microscopy of Proteins* (Harris JR, ed). London: Academic Press; 1-38.
- Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S et Rona PA.** 1988. Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology* 98: 209-216.
- Van Dover CL, Szuts EZ, Chamberlain SC et Cann JR.** 1989. A novel eye in "eyeless" shrimp from hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* 337: 458-460.
- Van Heel M et Dube P.** 1994. Quaternary structure of multi-hexameric arthropod hemocyanins. *Micron* 25: 387-418.
- Van Holde KE et Miller KI.** 1982. Haemocyanins. In: *Quarterly Reviews of Biophysics*. New-York: Cambridge University Press; 1-129.
- Van Holde KE et Miller KI.** 1995. Hemocyanins. In: *Advances in Protein Chemistry* (Anfinsen CBE, J.T.; Richards, F.M.; Eisenberg, D.S., ed). New-York: Academic Press; 1-81.
- Van Holde KE.** 1997/98. Respiratory proteins of invertebrates: structure, function and evolution. *Zoology* 100: 287-297.
- Vernet G et Charmantier-Daures M.** 1994. Mue, autotomie et régénération. In: *Traité de Zoologie, Crustacés Morphologie, Physiologie, Reproduction, Embryologie*. (Grassé P-P, ed). Paris: Masson; 107-194.
- Vetter RD, Matrai PA, Javor B. et O'Brien J.** 1989. Reduced sulfur compounds in the environment : analysis by HPLC. In: *Biogenic sulfur in the environment* (Saltzman ES, Cooper WJ, eds). Washington: American Chemical Society; 244-261.
- Vetter RD, Wells ME, Kurtsman AL et Somero GN.** 1987. Sulfide detoxification by the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydron* and other decapod crustaceans. *Physiological Zoology* 60: 121-137.

- Viarengo A et Nott JA.** 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104C: 355-372.
- Voit R et Schneider H-J.** 1986. Tarantula hemocyanin mRNA. *In vitro* translation, cDNA cloning and nucleotide sequence corresponding to subunit e. *European Journal of Biochemistry* 159: 23-29.
- Volbeda A et Hol WGJ.** 1989. Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 209: 249-279.
- Voll W et Voit R.** 1990. Characterization of the gene encoding the hemocyanin subunit e from the tarantula *Eurypelma californicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 87: 5312-5316.
- Von Cosel R, Comtet T et Krylova EM.** 1999. *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge. *Veliger* 42: 218-248.
- Von Damm KL.** 1983. Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21°North, East Pacific Rise and Guaymas Basin, Gulf of Mexico. University thesis MIT and WHOI
- Wache S, Terwilliger NB et Terwilliger RC** 1988. Hemocyanin structure changes during early development of the crab *Cancer productus*. *The Journal of Experimental Zoology* 247: 23-32.
- Walters NJ et Uglow RF.** 1981. Haemolymph magnesium and relative heart activity of some species of marine decapod crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 55: 255-265.
- Watling L.** 1989. A classification system for crustacean setae based on the homology concept. In: *Functional Morphology of Feeding and Grooming in Crustacean* (Felgenhauer BE, Watling L, Thistle AB, eds). Rotterdam, The Netherlands: Balkema A. A.; 15-26.
- Weber RE et Hagerman L.** 1981. Oxygen and carbon dioxide transporting qualities of hemocyanin in the hemolymph of a natant decapod *Palaemon adspersus*. *Journal of Comparative Physiology* 145B :21-27.

- Williams AB.** 1980. A new crab family from the vicinity of submarine thermal vents on the Galápagos Rift (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 93: 443-472.
- Williams AB.** 1988. New marine decapod crustaceans from waters influenced by hydrothermal discharge, brine, and hydrocarbon seepage. *Fishery Bulletin* 86: 263-287.
- Williams AB et Rona PA.** 1986. Two new caridean shrimps (Bresiliidae) from a hydrothermal field on the mid-atlantic ridge. *Journal of Crustacean Biology* 6: 446-462.
- Wood EJ et Bonaventura J.** 1981. Identification of *Limulus polyphenus* hemocyanin messenger RNA. *Journal of Biochemistry* 196: 653-656.
- Zal F, Lallier FH, Wall JS, Vinogradov SN et Toulmond A.** 1996. The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. 1. reexamination of the number and masses of its constituents. *Journal of Biological Chemistry* 271: 8869-8874.
- Zal F, Chausson F, Leize-Wagner E, Lallier FH et Green BN.** Soumis. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the native hemocyanin of the deep-sea crab, *Bythograea thermydron*: a mass weight record. *Journal of American Chemical Society*.

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Milieu et modèles biologiques

- Figure I-1: Répartition des zones hydrothermales présentant une faune associée.
- Figure I-2: Représentation schématique des processus de formation des fluides hydrothermaux.
- Figure I-3: Répartition des principales espèces inféodées à l'hydrothermalisme océanique de la ride du Pacifique oriental en fonction de la température.

-
- Figure I-4: Carte de localisation des sites sur le segment 13°N.
- Figure I-5: Carte de localisation des sites sur le segment 9°N.
- Figure I-6: Distribution des champs hydrothermaux et des failles transformantes le long de la ride médio-Atlantique.
- Figure I-7 : Evolution des communautés animales des sources hydrothermales de la ride médio-Atlantique.
- Figure I-8: Nombres relatifs d'espèces hydrothermales et d'espèces pénétrantes en fonction de la profondeur dans les zones soumises à l'activité hydrothermale.
- Figure I-9: Séparation de phases en fonction de la température, de la pression et de la profondeur .
- Figure I-10: Nature des roches du plancher océanique au niveau du point triple des Açores.
- Figure I-11 : Localisation du champ hydrothermal Rainbow (en haut) et des sites actifs de ce champ hydrothermal (en bas).
- Figure I-12: Localisation du champ hydrothermal Lucky Strike.
- Figure I-13: Coupe schématique d'une cheminée hydrothermale montrant les différents types de structure observés.
- Figure I-14: Carte de localisation du site hydrothermal Menez Gwen.
- Figure I-15 : *Bythograea thermydron* observé sur les alvinelles, sur le site ELSA (13°N, EPR). Photo réalisée durant la campagne HOPE'99.
- Figure I-16 : *Cyanograea praedator* prélevé au site M-Vent (9°N, EPR) lors de la campagne HOPE'99.
- Figure I-17 : *Segonzacia mesatlantica* photographié au laboratoire.
- Figure I-18 : Essaim de *Rimicaris exoculata*, photographié lors de la campagne PICO, au site Rainbow (ATJ, MAR).
- Figure I-19 : Spécimen de *Chorocaris chacei* photographié au laboratoire.
- Figure I-20 : *Mirocaris fortunata* photographié au laboratoire par Patrick Briand.
- Figure I-21 : *Chaceon affinis* observé lors de la campagne MARVEL, à proximité du site de Menez Gwen (ATJ, MAR).
- Figure I-22 : Navires océanographiques (Nadir (A) et L'Atalante (B)) et submersible (Nautile) (C) utilisés lors des différentes campagnes sur les dorsales de l'Atlantique et du Pacifique.

Figure I-23 : Appareils utilisés au fond pour le prélèvement des organismes.

Chapitre II : Localisation des espèces et micro-environnements

Figure II-1 : Analyseur *in situ* ALCHIMIST.

Figure II-2 : Cheminée recouverte de *Riftia* (A) et petits fumeurs recouverts d'Alvinellidae (B) sur le site Genesis

Figure II-3 : *Bythograea thermydron* observé sur un bouquet de *Riftia pachyptila* (A) et dans un TRAC (B), sur des *Alvinella sp.* au site Genesis (12°48'N, 103°56'W, 2 640 m de profondeur).

Figure II-4 : Cheminées expérimentales sur le site Elsa.

Figure II-5 : *Bythograea thermydron* observé sur un bouquet de *Riftia pachyptila* et sur des *Alvinella sp.* au site Elsa (12°48'N, 103°56'W, 2 630 m de profondeur).

Figure II-6 : Communauté animale observée sur le site Bio-Vent.

Figure II-7 : *Bythograea thermydron* au niveau d'une moulière de *Bathymodiolus thermophilus*, au site Bio-Vent (9°50'N, 104°17'W, 2 520 m de profondeur). *B. thermydron* est également présent au niveau de *Riftia pachyptila* (B).

Figure II-8 : Alignement des trois fumeurs du site M-Vent.

Figure II-9 : *Cyanagraea praedator* observé au site M-Vent (9°50'N, 104°17'W, 2 510 m de profondeur), au niveau de la base des cheminées (A), sur *Alvinella pompejana* (B) et près d'une émission de fluide noir (C).

Figure II-10: Tripode de sondes (A) et relevé de températures obtenus par ce tripode (B), déposé pendant 3 jours sur le massif à *Alvinella sp.*, au site Elsa de l'EPR.

Figure II-11 : Fumeurs noirs observés au site Rainbow.

Figure II-12 : *Rimicaris exoculata* au niveau des cuvettes, formant des essaims très denses (A), *Mirocaris fortunata* sur les zones réduites des cheminées (B) et *Segonzacia mesatlantica* à proximité d'un diffuseur et couvert de bactéries (C), au site Rainbow (36°14N, 33°54W, 2 300 m de profondeur).

Figure II-13 : *Segonzacia mesatlantica* présent au niveau de la base des cheminées (A), des moulières (B) et des émissions diffuses (C) (pattes couvertes de bactéries) au site PP24 de Lucky Strike (37°17'N, 32°17'W, 1 700 m de profondeur).

Figure II-14 : *Segonzacia mesatlantica* (A) au niveau des moulières de *Bathymodiolus azoricus*, et *Chaceon affinis* à proximité (B) et se nourrissant d'une moule (C), au site Menez Gwen (37°52'N, 31°31'W, 850 m de profondeur).

Figure II-15 : Séries de données des concentrations en sulfure et en nitrate et des températures enregistrées avec l'analyseur *in situ* ALCHIMIST.

Tableau II-1 : Traitement des échantillons et méthodes analytiques utilisées pour analyser les échantillons d'eau du fond et du fluide.

Tableau II-2 : Synthèse des valeurs limites des paramètres physico-chimiques de l'environnement des différentes espèces de crustacés décapodes.

Tableau II-3 : Synthèse sur la localisation des différentes espèces de crustacés décapodes, les espèces associées, leur régime trophique et quelques remarques sur leur localisation.

Chapitre III : Structure des branchies

Figure III-1 : Terminologie des branchies de décapodes et des structures associées en fonction de leur type d'insertion.

Photo III-1 : Vue en MEB d'une branchie de *Segonzacia mesatlantica* montrant l'empilement des lamelles branchiales autour du raphé médian et le vaisseau efférent.

Photo III-2 : Détail en MEB d'une lamelle branchiale de *Segonzacia mesatlantica*.

Photo III-3 : Section transversale d'une lamelle branchiale de *Segonzacia mesatlantica*, observée par MEB.

Photo III-4 : Différents types de bactéries épibiontes recouvrant certaines lamelles branchiales de *Segonzacia mesatlantica* (A) et de *Bythograea thermydron* (B).

Photo III-5 : Soies se trouvant alignées sur le vaisseau efférent des branchies de *Segonzacia mesatlantica* (A) et *Bythograea thermydron* (B).

Photo III-6 : Détail des soies se trouvant sur le vaisseau efférent des branchies de *Segonzacia mesatlantica* (A) et *Bythograea thermydron* (B) montrant leur base renflée.

Photo III-7 : Vue interne du vaisseau efférent montrant l'insertion de soies creuses (A). Vue interne de la soie, montrant des cellules sanguines (B).

Photo III-8 : Détail du pore apical chez *Bythograea thermydron* (B).

Photo III-9 : Coupe tangentielle en microscopie photonique (A) et MET (B) de la base d'une soie de *Cyanograea praedator* montrant les ondulations de la cuticule.

-
- Photo III-10 :** Coupes sagittale (A) et transversale (B) en microscopie photonique d'une soie de *Bythograea thermydron*.
- Photo III-11 :** Structure en microscopie photonique de l'épiderme d'une soie de *Bythograea thermydron*, séparé de la cuticule (C) par une couche membraneuse (cm).
- Photo III-12 :** Section basale de la soie montrant la succession des différentes couches de la cuticule et l'intérieur de la soie.
- Photo III-13 :** Structure nerveuse se trouvant en périphérie de la médulla de la soie (A). Grossissement de cette structure nerveuse, montrant la double membrane qui l'entoure (B).
- Tableau III-1 :** Formule branchiale des différentes espèces de crustacés décapodes brachyours des sources hydrothermales.

Chapitre IV : Respiration et pigments respiratoires

- Figure IV-1 : Distribution des pigments respiratoires dans les principaux phylums et classes du règne animal.
- Figure IV-2 : Structures quaternaires principales des hémocyanines.
- Figure IV-3 : Structure tri-dimensionnelle de la sous-unité II de l'hémocyanine de *Limulus polyphenus*.
- Figure IV-4 : Structures générées par l'auto-association des molécules d'hexamères d'hémocyanine d'arthropodes.
- Figure IV-5 : Modèles topographiques de la structure quaternaire des hémocyanines de quatre arthropodes.
- Tableau IV-1 : Propriétés des protéines de liaison de l'oxygène chez les Invertébrés.
- Tableau IV-2 : Sélection de valeurs décrivant l'affinité pour l'oxygène (P_{50}), la coopérativité de la liaison de l'oxygène (n_{50}) et les coefficients de Bohr ($\Delta \log P_{50} / \Delta pH$) pour les hémocyanines d'arthropodes.

Chapitre V : Composition de l'hémolymphe

- Figure V-1 : A : aquarium pressurisé IPOCAMP (Incubateur Pressurisé pour l'Observation en Culture d'Animaux Marins Profonds) utilisé pour la première fois lors de la campagne HOPE'99, conçu et géré par Bruce Shillito. B : montage expérimental utilisé pour étudier l'évolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Bythograea thermydron*.

Figure V-2 : Gammas des concentrations en ions majeurs dans l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux du Pacifique (*Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*) et de l'Atlantique (*Rimicaris exoculata*, *Segonzacia mesatlantica*, *Mirocaris fortunata*, *Chorocaris chacei*) et du crabe bathyal de l'Atlantique (*Chaceon affinis*).

Figure V-3 : Evolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de six individus de *Bythograea thermydron* maintenus dans un aquarium contenant de l'eau de mer de surface à 15°C et à pression atmosphérique.

Tableau V-1 : Composition en ions majeurs de l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux du Pacifique, *Cyanagraea praedator* et *Bythograea thermydron* et des concentrations relatives en magnésium, chacune basée pour une valeur relative en ion chlore hémolympatique de 100.

Tableau V-2 : Composition en ions majeurs de l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux de l'Atlantique, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* et *Segonzacia mesatlantica* et du crabe bathyal, *Chaceon affinis* et des concentrations relatives en magnésium, chacune basée pour une valeur relative en ion chlore hémolympatique de 100.

Tableau V-3 : Teneurs en protéines, hémocyanine, lactate et urate et pourcentage d'hémocyanine en fonction des protéines totales dans l'hémolymphe des crustacés décapodes hydrothermaux du Pacifique (*Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*) et de l'Atlantique (*Rimicaris exoculata*, *Segonzacia mesatlantica*, *Mirocaris fortunata*, *Chorocaris chacei*) et du crabe bathyal de l'Atlantique (*Chaceon affinis*).

Tableau V-4 : Teneurs en composés soufrés dans l'hémolymphe de six espèces de crustacés décapodes hydrothermaux et d'une espèce bathyale.

Tableau V-5 : Evolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de trois individus de *Cyanagraea praedator* maintenus dans un aquarium contenant de l'eau de mer de surface à 15°C et à pression atmosphérique.

Tableau V-6 : Evolution de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de crabes *Bythograea thermydron* maintenus dans des boîtes isolées contenant 0,5 l d'eau de mer de surface à 15°C, soit à pression atmosphérique (normobare), soit à 260 bars (hyperbare) et de la diminution de la teneur en O₂ dans le milieu.

Tableau V-7 : Composition ionique de l'eau du fond et du fluide hydrothermal émis au niveau des dorsales du Pacifique oriental (EPR) et de l'Atlantique (MAR).

Chapitre VI : Structure quaternaire des hémocyanines

Figure VI-1 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse.

- Figure VI-2 :** Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type Z Spray™-QToF-MS.
- Figure VI-3 :** Molécules d'hémocyanine de *Cyanagraea praedator* observées en microscopie électronique à transmission en contraste négatif.
- Figure VI-4 :** Profils d'élution d'hémolymphe native de *Cyanagraea praedator* (A), *Bythograea thermydron* (B), *Chaceon affinis* (C), *Rimicaris exoculata* (D) et *Chorocaris chacei* (E).
- Figure VI-5 :** Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Cyanagraea praedator*.
- Figure VI-6 :** Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Bythograea thermydron*.
- Figure VI-7 :** Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Rimicaris exoculata*.
- Figure VI-8 :** Profils obtenus en SDS-PAGE (A) ou en PAGE natif (B) sur le sérum natif, les dodécamères et les hexamères d'hémocyanine de *Chorocaris chacei*.
- Figure VI-9 :** Spectre obtenu en Z spray-QToF-MS avec de l'hémolymphe native de *Bythograea thermydron*.
- Figure VI-10 :** Spectres obtenus par ESI-MS avec les sous-unités monomériques des dodécamères et des hexamères d'hémocyanine de *Cyanagraea praedator*.
- Figure VI-11 :** Schéma présentant les différentes formes d'hémocyanine mises en évidence par Z spray-Q-ToF-MS.
- Tableau VI-1 :** Apports, avantages et inconvénients de chacune des techniques utilisées pour étudier la structure quaternaire des hémocyanines de crustacés décapodes hydrothermaux et bathyal.
- Tableau VI-2 :** Masses (Da) des sous-unités d'hémocyanines dodécamériques et hexamériques de *Cyanagraea praedator* déterminées par ESI-MS.
- Tableau VI-3 :** Masses (Da) des sous-unités d'hémocyanines dodécamériques et hexamériques de *Rimicaris exoculata* déterminées par ESI-MS.
- Tableau VI-4 :** Synthèse des résultats obtenus par FPLC, SDS-PAGE, PAGE natif, ESI-MS et Z Spray-QToF-MS avec les différentes espèces de crustacés décapodes.

Chapitre VII : Propriétés fonctionnelles des hémocyanines

- Figure VII-1 :** Appareillage pour la mesure des courbes de dissociation

Figure VII-2 : Exemple de tracé obtenu sur l'enregistreur graphique et calcul de paliers de saturation lors de l'étude de la liaison de l'oxygène à l'hémocyanine à l'aide de la chambre de diffusion.

Figure VII-3 : Exemple de traitements graphiques réalisés avec les données obtenues sur le sérum dialysé de *Cyanagraea praedator* à 15°C pour calculer P_{50} et n_{50} .

Figure VII-4 : Schéma du protocole opératoire utilisé pour étudier les propriétés fonctionnelles des hémocyanines de crustacés décapodes.

Figure VII-5 : Effet de la dialyse et de l'ajout de lactate au sérum dialysé sur la liaison de l'oxygène à l'hémocyanine (15°C).

Figure VII-6 : Effet de la dialyse sur l'affinité de l'hémocyanine vis-à-vis de l'oxygène chez *Cyanagraea praedator*, *Bythograea therydron* et *Chaceon affinis*.

Figure VII-7 : Effets de la température sur l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène chez *Cyanagraea praedator*, *Bythograea therydron*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis*.

Figure VII-8 : Diagramme d'Arrhénius montrant la variation de l'affinité de l'hémocyanine pour l'oxygène en fonction de la température chez *Cyanagraea praedator*, *Bythograea therydron*, *Segonzacia mesatlantica* et *Chaceon affinis*.

Tableau VII-1 : Affinité (P_{50}), et coopérativité (n_{50}) des hémocyanines mesurées à pH 7,5 et 15°C sur de l'hémolymphe native. L'effet des protons ou effet Bohr ($\Delta \log P_{50} / \Delta pH$) est mesuré à 15°C pour une gamme de pH comprise entre 7,2 et 7,8.

Tableau VII-2 : Variations de la P_{50} et du $\log P_{50}$ à deux pH différents en fonction de la concentration en lactate dans l'hémolymphe de *C. praedator*.

Tableau VII-3 : Variations de la P_{50} et du $\log P_{50}$ à deux pH différents en fonction de la concentration en lactate chez *B. therydron*.

Chapitre VIII : Adaptations à l'hypercapnie

Figure VIII-1 : Variations de la teneur en lactate dans l'hémolymphe de *Rimicaris exoculata* maintenues à pression atmosphérique et à 15°C en conditions normocapniques (v : air) ou hypercapniques (v : 1% CO₂).

Figure VIII-2 : Diagramme de Davenport représentant les variations de l'équilibre acido-basique *in vivo* dans l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata* pendant une exposition normocapnique, qui sert de contrôle.

Figure VIII-3: Diagramme de Davenport représentant les variations de l'équilibre acido-basique *in vivo* dans l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata* pendant une exposition hypercapnique (υ : 1% CO₂) et après récupération sous normocapnie (λ).

Figure VIII-4 : Diagramme de Davenport représentant notre interprétation des variations acido-basiques dans l'hémolymphe de la crevette *Rimicaris exoculata*.

Tableau VIII-1 : Pouvoir tampon spécifique (β), concentration en protéines, concentration en hémocyanine et pouvoir tampon ramené à la concentration en protéines et à la concentration en hémocyanine pour *Cyanagraea praedator*, *Bythograea thermydron*, *Segonzacia mesatlantica*, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* et *Chaceon affinis*.