



HAL
open science

Adaptations respiratoires des annélides polychètes de milieux abyssaux hypoxiques

Stéphane Hourdez

► **To cite this version:**

Stéphane Hourdez. Adaptations respiratoires des annélides polychètes de milieux abyssaux hypoxiques. Ecologie, Environnement. Paris 6, 2000. Français. NNT: . tel-01115532

HAL Id: tel-01115532

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115532v1>

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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE, PARIS VI**

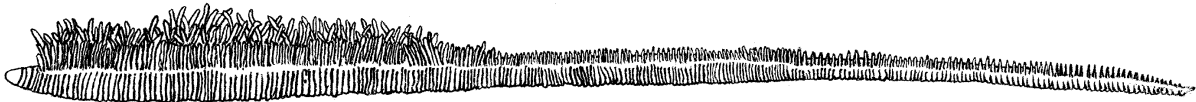
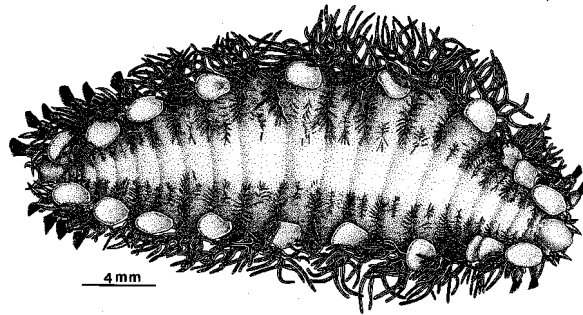
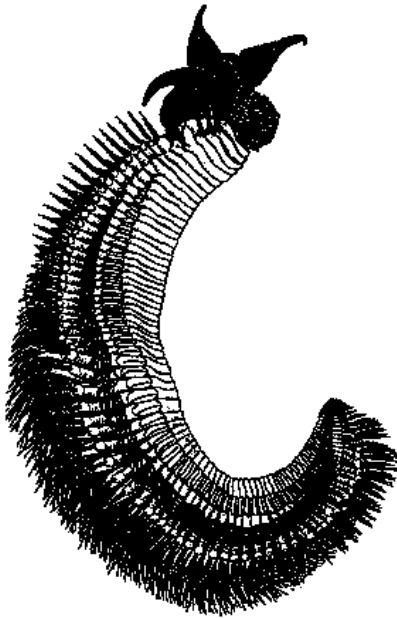
**Spécialité
Océanologie Biologique**

Présentée par M. Stéphane HOURDEZ

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

sujet de la thèse :

**Adaptations respiratoires des annélides polychètes
de milieux abyssaux hypoxiques**



Soutenue le 13 Juin 2000 devant le jury composé de :

Dr Daniel Desbruyères
Pr Roy E Weber
Pr Charles R Fisher
Pr Paul Nival
Pr André Toulmond

Centre Ifremer de Brest, France
University of Aarhus, Danemark
Pennsylvania State University, USA
Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Résumé : *Adaptations respiratoires des annélides polychètes de milieux abyssaux hypoxiques.*

Les animaux vivant au niveau des sources hydrothermales et des suintements froids se trouvent dans des conditions contraignantes pour la respiration (peu d'oxygène, présence d'importantes quantités de sulfures et de dioxyde de carbone). Nous nous sommes intéressés aux annélides polychètes de ces milieux, prenant trois modèles : *Alvinella pompejana*, du pôle chaud hydrothermal, *Branchipolynoe* spp., commensal des moules du pôle froid des sources hydrothermales et un Orbiniidé provenant des suintements froids du Golfe du Mexique. Nous avons recherché les adaptations anatomiques et physiologiques facilitant les échanges gazeux chez ces trois espèces.

Du point de vue anatomique, ces adaptations sont une augmentation des surfaces branchiales et une réduction des distances de diffusion au niveau de branchies. *Branchipolynoe* présente la particularité de posséder des branchies, structure anatomique absente chez les espèces littorales de la même famille. Ces branchies sont perfusées par du liquide coelomique et non du sang comme c'est le cas pour les deux autres espèces. Chez l'Orbiniidé, les échanges gazeux se situent principalement au niveau des branchies situées dans la partie antérieure du ver.

Les trois espèces possèdent de l'hémoglobine, encore une caractéristique distinguant *Branchipolynoe* des Polynoidés littoraux. Si les deux autres espèces possèdent des hémoglobines "classiques" pour les annélides, les hémoglobines de *Branchipolynoe* sont tout à fait originales : elles correspondent à des dimères ou des trimères de globines tétradomaines.

Les fluides corporels d'*A. pompejana* et de *Branchipolynoe* sont capables de limiter les effets des variations de concentration en dioxyde de carbone. Toutes les espèces étudiées possèdent des hémoglobines à très forte affinité pour l'oxygène qui permettent une bonne extraction de l'oxygène du milieu environnant hypoxique. Chez *A. pompejana*, il y a un système de transfert gazeux interne qui permet de stocker de l'oxygène quand les conditions sont favorables et de le relarguer dans la circulation quand il manque dans le milieu environnant.

Mots-clés : polychètes, hypoxie, hypercapnie, respiration, adaptations anatomiques, physiologie, hémoglobine (structure, fonction).

Abstract: *Respiratory adaptations in deep-sea polychaetes from hypoxic environments.*

The animals living near hydrothermal vents and cold-seeps experience environmental conditions which are challenging for respiration (little oxygen, presence of large amounts of sulfide and carbon dioxide). We used polychaetes from these two environments : *Alvinella pompejana*, from the hot part of the hydrothermal vent ecosystem, *Branchipolynoe* spp., commensal with the mussels found in the cold part of hydrothermal vents and an orbiniid from the Gulf of Mexico cold-seeps. We investigated the anatomical and physiological adaptations facilitating gas exchange in these three species.

The anatomical adaptations are an increase of the gill surface area and a decrease of the diffusion distance at the level of these gas exchange organs. *Branchipolynoe* is unusual in having gills, an anatomical feature lacking in littoral species of the same family. These gills are perfused by the coelomic fluid instead of the blood as in the other species. In the orbiniid, most of the gas exchanges take place in the anterior part of the body.

The three species possess hemoglobin, another feature distinguishing *Branchipolynoe* from the littoral polynoids. While the two other species exhibit typical annelid hemoglobins, the coelomic hemoglobins of *Branchipolynoe* are very unusual: they are dimers and trimers of tetradomain globins.

The body fluids of *A. pompejana* and *Branchipolynoe* are able to buffer the effects of the variations of carbon dioxide concentration. All the the species studied possess hemoglobins with very high oxygen affinities, allowing a good extraction of the oxygen from their hypoxic environment. In *A. pompejana*, there is an internal gas transfer system allowing the worm to store oxygen when the conditions are good and to release it into the vascular system when its environmental concentration is too low.

Key-words: polychaetes, hypoxia, hypercapnia, respiration, anatomical adaptations, physiology, hemoglobin (structure, function).

Cette thèse est l'aboutissement de trois ans de travail à Roscoff et de un an et demi dans l'équipe de Chuck Fisher à PennState University, lors de mon Service National dans le cadre de la coopération.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de collaborer avec beaucoup de personnes sans qui je n'aurais pas pu aller aussi loin dans mon étude. Je tiens à les remercier ici.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Paul Nival, responsable du DEA et de la formation doctorale d'Océanologie Biologique, de m'avoir accepté au sein de cette formation. Ceci m'a permis d'accomplir mon rêve d'étudiant : faire de la recherche en biologie marine. Je voudrais aussi remercier deux personnes indispensables à la formation d'Océanologie Biologique pour tout leur travail qui facilite grandement la vie des doctorants : Juliette Corre, partie à la retraite et maintenant remplacée par Alain Nierga. Sans eux, la vie d'étudiant en thèse de Paris 6 en Station Marine serait beaucoup plus difficile.

Je voudrais remercier Daniel Desbryères d'avoir accepté d'être rapporteur pour cette thèse dédiée à des organismes qu'il aime, provenant d'un milieu qu'il affectionne. Merci aussi de m'avoir permis de me lancer dans la taxonomie avec toi j'espère que notre collaboration donnera naissance à de nombreux articles.

Je voudrais aussi remercier Roy Weber de faire partie de ce jury en tant que rapporteur. Notre collaboration, qui a débuté par un séjour dans son équipe au Danemark, n'a pas cessé de m'apporter, tant du point de vue personnel que professionnel. J'en profite pour remercier tous les gens de son laboratoire, en particulier Vibeke, Anny et Angela. Merci à toutes les personnes du département de Zoophysologie pour leur accueil chaleureux.

Chuck Fisher est aussi une personne que j'apprécie d'avoir dans mon jury : quand, il y a de cela trois ans, il m'a accueilli dans son laboratoire pour effectuer mon Service National en coopération, il a ouvert beaucoup de portes devant moi. Le séjour d'un an et demi dans son laboratoire a été riche en expériences et en rencontres. Merci Steve Schaeffer et Kim Nelson de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pour me laisser prendre mes premiers contacts avec la taxonomie moléculaire.

Je suis très heureux d'en être ici aujourd'hui André, tes cours ont fait naître en moi une passion pour la physiologie comparée et les pigments respiratoires. Ma réputation de vampire s'est établie des deux cotés de l'Atlantique : "tout ce qui a du sang m'intéresse !", armé d'une seringue, je prélève sur tous types d'animaux. Merci d'avoir toujours su trouver un moment pour discuter de mes résultats quand j'en avais besoin, malgré un emploi du temps surchargé. Merci de tout coeur d'avoir été mon mentor pendant cette thèse.

Même si André Toulmond est mon directeur de thèse, sa tâche a été grandement partagée par François Lallier, responsable de l'équipe Ecophysologie. Merci François pour toutes ces longues soirées passées devant un ordinateur pour corriger un article ou, plus récemment, une thèse ! Cette thèse, c'est en grande partie à toi que je la dois.

J'ai aussi eu la chance de profiter d'une troisième personne pour m'encadrer au cours de ma thèse : Claude Jouin-Toulmond. Claude, tu m'as tout appris ce que je connais de la microscopie électronique et de l'ultrastructure des annélides. Je me souviens très bien des TP/TD de zoologie et de la façon dont tu rendais tout si passionnant. Tu mérites bien plus qu'une espèce à ton nom, Claude. Merci de tout coeur !

Je tiens aussi à remercier Brian Green, artiste de la spectrométrie de masse et auteur de tous les résultats que j'ai publiés qui impliquent cette technique. Cette collaboration a beaucoup apporté à l'équipe en général et à moi en particulier.

Merci à Jean Deutsch et aux personnes de son laboratoire m'avoir accueilli pendant un mois pour me donner une formation de base en techniques de biologie moléculaire.

Sans Nathalie Zorn (Laboratoire de Spectrométrie de masse Bio-organique, dirigé par Alain Van Dorsselaer), je n'aurais pas pu entamer l'étude de la séquence primaire des hémoglobines de *Branchipolynoe*. Un grand merci toi pour avoir passé tant de temps à essayer de lever le voile sur un petit bout de ces hémoglobines parfois tellement récalcitrantes !

Je voudrais aussi remercier Didier Jollivet, mon interlocuteur pour toutes mes expériences de biologie moléculaire. Merci aussi d'avoir relu ce "fameux" Chapitre III, dont la biologie moléculaire est une partie.

Merci à Franck Zal d'avoir relu une partie de cette thèse et de m'avoir permis de l'améliorer, de la rendre plus claire. Merci à Ann pour les petites choses à manger qui "apparaissent" régulièrement dans son bureau et qu'elle partage de bon coeur (pas de chocolat avant 14h, il faut le savoir !).

La purification des hémoglobines est un processus qui prend beaucoup de temps et qui est très répétitif. Tout le travail présenté dans cette thèse a été rendu possible grâce au travail de Dominique Le Guen, technicienne dans l'équipe Ecophysiologie. Merci d'avoir passé tout ce temps à m'aider.

Vous l'aurez compris, l'équipe Ecophysiologie est grande et pleine de gens avec qui il est bon de pouvoir discuter et interagir. Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe que je n'ai pas encore cités : Marie-Cécile, Fabienne, Manu, Guy et Xavier.

Je voudrais aussi remercier tous les personnes de l'URM7 pour leurs questions et leur intérêt lors de nos réunions.

Toute personne qui a passé quelque temps à la Station Biologique de Roscoff en garde un très bon souvenir (à part peut-être la météo ... !). Ces sentiments sont en grande partie dus au amis qu'on s'y fait. Je tiens à les remercier tous ici : Floflo, Gwen (un petit week-end en Virginie de l'Ouest, ça te dit ?!), Annabelle, Stéphan, FYB, Arnaud. Il y a eu bien des étudiants à la Station et je les remercie de la bonne ambiance qu'ils produisent. Merci à toi Véro pour ton amitié et cette collaboration sur les acides aminés des hémoglobines de *Branchipolynoe*. Je n'oublie pas Chrichri pour son amitié qui résiste au temps et à la distance.

Un grand merci aux documentalistes qui nous facilitent tant la vie en nous trouvant toujours ces fameux articles, dans des journaux parfois exotiques ou de vraies pièces de collection !

S'il fait si bon travailler à la Station, c'est aussi parce que beaucoup de gens nous rendent la vie plus facile et j'ai à coeur de leur témoigner ma reconnaissance : ce sont toutes les personnes de l'administration, de l'entretien, de la restauration et de l'accueil. Un grand merci à tous, pour toutes ces années.

Lors de mon séjour aux Etats-Unis, j'ai rencontré beaucoup de gens dont certains sont devenus des amis : Erin, Gioia, KT and Ruth, Melanie, Shari, Kerry, Tracy, Kim, Jenny, Jenn, Istvan, Derk, John, Jason A, Jason F, Miro, Hany, Brian, Steve, Dan. Merci à tous d'avoir rendu mon séjour si agréable.

Merci aussi à mes amis de Fac pour leur patience ... je ne donne pas souvent des nouvelles mais je ne vous oublie pas ! Merci Marie(-Aline), Philippe, Damien et Rose.

A toute ma famille pour son soutien sans faille au cours de ce long périple. Je vous ai tous négligés pour cette oeuvre un peu folle qui me tenait à coeur et j'espère que vous voudrez bien me pardonner. A ceux qui nous ont quittés avant la fin de ce travail : mon oncle Jean-Pierre, ma grand-tante Maryvonne, et Laurent Marin.

TABLE DES MATIERES

Chapitre I : Modèles et milieux	
I.1. Les sources hydrothermales	1
I.1.1. Historique	2
I.1.2. Conditions environnementales	3
I.1.3. La faune hydrothermale	5
I.2. Les suintements froids du Golfe du Mexique	7
I.3. Les modèles biologiques étudiés et leur milieu de vie	8
I.3.1. <i>Alvinella pompejana</i>	9
I.3.2. <i>Branchipolynoe</i> spp.	11
I.3.3. Orbiniidé du Golfe du Mexique	13
I.4. Adaptations respiratoires	14
I.4.1. Les facteurs environnementaux et leurs effets sur la respiration	14
I.4.2. Adaptations respiratoires	15
I.5. Plan du manuscrit	21
Chapitre II : Adaptations anatomiques	
II.1. Introduction	23
II.1.1. Les organes d'échanges gazeux des Alvinellidés (Ordre des Terebellida)	26
II.1.2. Echanges gazeux chez les Polynoidés (Ordre des Phyllodocida)	27
II.1.3. Les organes d'échanges gazeux des Orbiniidés (Ordre des Orbiniida)	27
II.2. Matériel et méthodes	29
II.2.1. Récolte des animaux	29
II.2.2. Calcul des surfaces branchiales spécifiques	30
II.2.3. Microscopie optique	31
II.2.4. Microscopie électronique	32
II.2.5. Système circulatoire d' <i>Alvinella pompejana</i>	33
II.3. Résultats	34
II.3.1. Etude de <i>Branchipolynoe</i> spp.	34
II.3.1.1. Surface branchiale spécifique	35
II.3.1.2. Ultrastructure des branchies de <i>Branchipolynoe seepensis</i>	36
II.3.2. Etude de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique	42
II.3.2.1. Morphologie générale du ver	42
II.3.2.2. Morphologie des branchies	42
II.3.2.3. Surface branchiale spécifique	44
II.3.2.4. Ultrastructure des branchies	44
II.3.2.5. Anatomie du système circulatoire branchial	49
II.3.3. Etude du système circulatoire de la partie antérieure d' <i>Alvinella pompejana</i>	50
II.4. Discussion.	52
II.4.1. Structure générale des branchies	52
II.4.2. Ultrastructure des branchies	53
II.4.3. Surface branchiale spécifique	54
II.4.4. Aspect fonctionnel : échanges gazeux	55
II.4.5. Detoxication des sulfures	56
Chapitre III : Caractérisation et structure des hémoglobines	
III.1. Introduction	59
III.1.1. Qu'est-ce que l'hémoglobine ?	59
III.1.2. L'unité de base : la globine	59
III.1.3. Hémoglobines extracellulaires d'invertébrés	62
III.1.4. Structure des hémoglobines d'Annélides	63
III.1.5. Les hémoglobines des animaux des milieux réduits	65

III.2. Matériel et méthodes	67
III.2.1. Collecte des fluides corporels	67
III.2.2. Purification des hémoglobines	68
III.2.3. Estimation des masses natives	68
III.2.4. Etude de la structure des hémoglobines	69
III.2.4.1. Contenu en acides aminés	69
III.2.4.2. Rapport hème/protéine	70
III.2.4.3. Electrophorèse	71
III.2.4.4. Spectrométrie de masse	72
III.2.5. Digestion des hémoglobines par la subtilisine	78
III.2.6. Structure primaire des hémoglobines de <i>Branchipolynoe symmytilida</i> .	80
III.2.6.1. Extraction des ARN totaux et purification des ARN messagers (ARNm)	80
III.2.6.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	82
III.2.6.3. Microséquençage de l'extrémité N-terminale	83
III.2.6.4. Amplification par PCR	83
III.2.6.5. Amplification de l'extrémité 5' des ADNc par RACE-PCR	85
III.2.6.6. Séquençage des fragments amplifiés	86
III.2.6.7. Hybridation des ARN sur membrane (Northern Blot)	87
III.2.6.8. Structure des gènes de globine	88
III.2.7. Caractéristiques spectrophotométriques des hémoglobines	89
III.3. Résultats	91
III.3.1. Structure des hémoglobines coelomiques HbC1 et HbC2 de <i>Branchipolynoe</i> spp.	91
III.3.1.1. Purification des hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i> spp.	91
III.3.1.2. Spectrométrie de masse	92
III.3.1.3. Etude de la structure des sous-unités des hémoglobines de <i>B. symmytilida</i>	93
III.3.1.4. Caractéristiques spectrophotométriques des hémoglobines coelomiques de <i>Branchipolynoe</i> spp.	95
III.3.1.5. Contenu en acides aminés des hémoglobines coelomiques de <i>Branchipolynoe</i>	97
III.3.2. Structure primaire des hémoglobines coelomiques de <i>Branchipolynoe symmytilida</i>	98
III.3.3. Structure de l'hémoglobine intracellulaire d' <i>Alvinella pompejana</i>	103
III.3.4. Structure de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique	105
III.3.4.1. Purification par FPLC	105
III.3.4.2. Etude en spectrométrie de masse de la composition en sous-unités	105
III.4. Discussion.	108
III.4.1. Structure de l'hémoglobine intracellulaire d' <i>Alvinella pompejana</i>	108
III.4.2. Structure de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique	109
III.4.3. Les hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i> spp.	110
III.4.3.1. Caractéristiques spectrophotométriques	110
III.4.3.2. Structure quaternaire des hémoglobines	110
III.4.3.3. Contenu en acides aminés	114
III.4.3.4. Structure primaire	115
Chapitre IV : Physiologie de la respiration	
IV.1. Introduction	118
IV.1.1. Résistance aux sulfures	119
IV.1.2. Résistance à l'hypoxie et à l'anoxie	120
IV.1.3. Adaptations aux concentrations variables de CO ₂	122
IV.1.4. Systèmes de transfert de l'oxygène	123

IV.2. Matériel et méthodes	125
IV.2.1. Collecte des animaux	125
IV.2.2. Collecte du sang et du liquide coelomique	126
IV.2.3. Purification des hémoglobines pour l'étude des propriétés fonctionnelles	127
IV.2.4. Contenu en hème	127
IV.2.5. Résistance à l'anoxie et aux sulfures	127
IV.2.6. Respirométrie	129
IV.2.7. Pouvoir tampon des fluides corporels de <i>Branchipolynoe symmytilida</i>	131
IV.2.8. Pouvoir tampon des fluides corporels d' <i>Alvinella pompejana</i>	132
IV.2.9. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines	133
IV.3. Résultats	138
IV.3.1. Respirométrie	138
IV.3.2. Contenu en hémoglobine	140
IV.3.3. Pouvoir tampon du liquide coelomique de <i>Branchipolynoe symmytilida</i>	141
IV.3.4. Effets du CO ₂ sur les fluides corporels d' <i>Alvinella pompejana</i>	142
IV.3.5. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines de <i>Branchipolynoe symmytilida</i>	143
IV.3.6. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines d' <i>Alvinella pompejana</i> .	144
IV.3.7. Propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique.	146
IV.3.8. Résistance à l'anoxie et aux sulfures	148
IV.4. Discussion	150
IV.4.1. Comportement des fluides corporels face aux variations de concentration en CO ₂	150
IV.4.2. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines	152
IV.4.3. Système de transfert de gaz d' <i>Alvinella pompejana</i>	159
IV.4.4. Maintien de l'apport d'oxygène aux organes	161
IV.4.5. Résistance à l'anoxie et aux sulfures	164
Chapitre V : Discussion générale et perspectives	
V.1. <i>Branchipolynoe</i> spp.	166
V.2. <i>Alvinella pompejana</i>	170
V.3. L'Orbiniidé du Golfe du Mexique	171
V.4. Diversité des adaptations	164
Références bibliographiques	173
Index des figures et tableaux	198

Liste des abréviations utilisées :

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : ARN messenger

DTT : dithiothréitol

ESI-MS : ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry

FPLC : Fast Protein Liquid Chromatographie

Hb : Hémoglobine, déoxyhémoglobine

HbC1 : Hémoglobine coelomique 1 de *Branchipolynoe*

HbC2 : Hémoglobine coelomique 2 de *Branchipolynoe*

HbC3 : Hémoglobine coelomique 3 de *Branchipolynoe*

HbCO : Hémoglobine ayant fixé du monoxyde de carbone

HbO₂ : Hémoglobine oxygénée

Hi : Methémoglobine

HiCN : Cyanmethémoglobine

HPLC : High Performance Liquid Chromatographie

MALLS : MultiAngle Laser Light Scattering

MaxEnt : Système d'analyses de données ESI-MS basé sur le maximum d'entropie

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

m/z : rapport masse sur charge

PCO₂ : Pression partielle de dioxyde de carbone

PMSF: PhenylMethylSulfonyl Fluoride, inhibiteur de protéases à spectre large

PO₂ : Pression partielle d'oxygène

RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends (amplification des régions 5' et 3' UTR des ARNm)

SDS : Sodium dodécyl sulfate, détergent

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

TCEP : tris-(2-carboxyethyl)-phosphine

UTR : région des ARNm qui n'est pas traduite en protéine

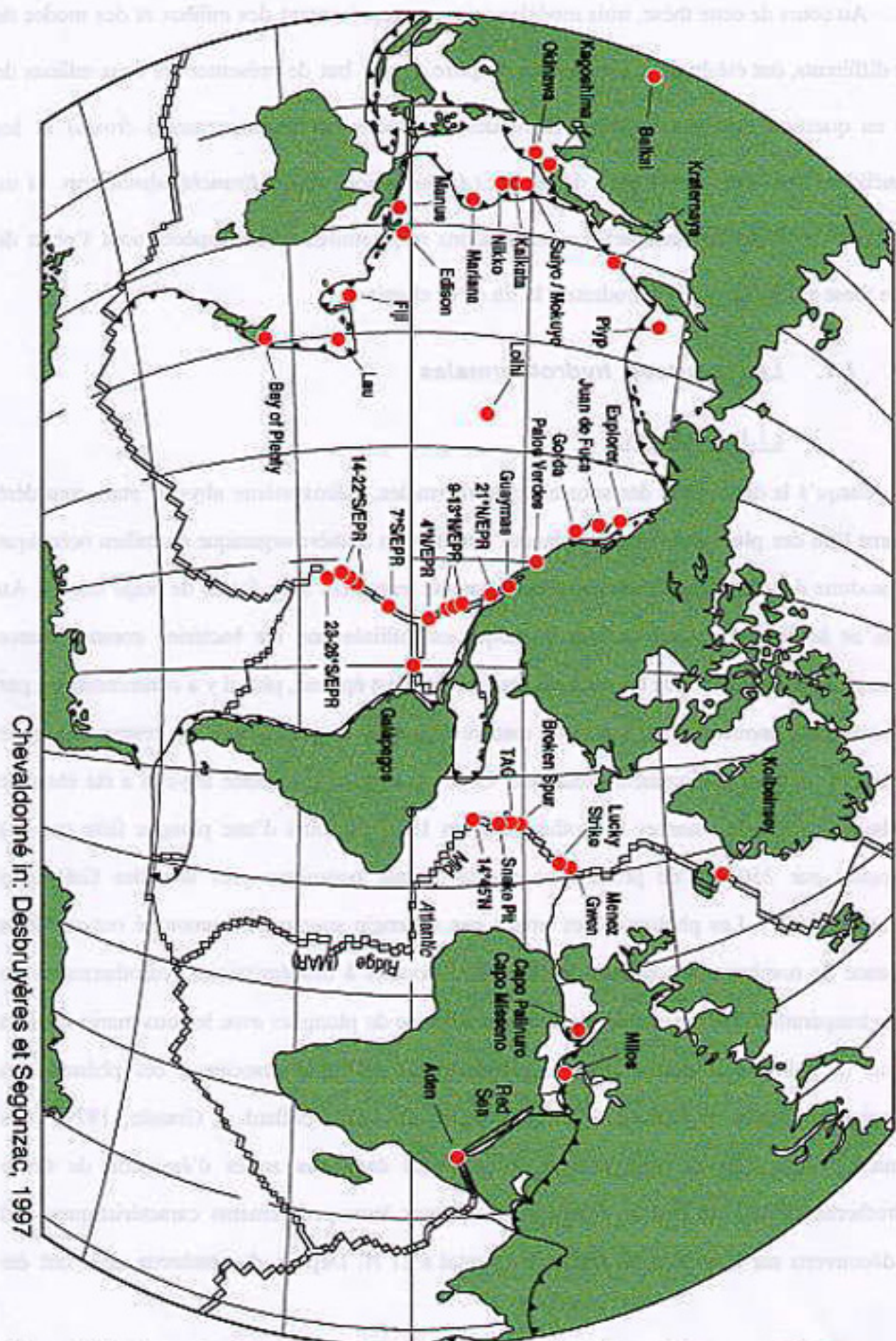
Chapitre 1

Introduction



Modèles Biologiques et Contraintes Environnementales

<i>Chapitre 1</i>	Introduction
<i>Chapitre 2</i>	Anatomie
<i>Chapitre 3</i>	Biochimie
<i>Chapitre 4</i>	Physiologie
<i>Chapitre 5</i>	Conclusion



Chevaldonné in: Desbruyères et Segonzac, 1997

Figure I.1 : Carte des sites hydrothermaux connus (Desbruyères et Segonzac, 1997)

Au cours de cette thèse, trois modèles animaux, représentant des milieux et des modes de vie différents, ont été étudiés. Ce premier chapitre a pour but de présenter les deux milieux de vie en question (les sources hydrothermales profondes et les suintements froids) et les Annélides Polychètes qui ont servi de modèle (*Alvinella pompejana*, *Branchiopolynoe* spp. et un Orbiniidé du Golfe du Mexique). Les adaptations respiratoires de ces espèces sont l'objet de cette thèse et leur étude est introduite à la fin de ce chapitre.

1.1. Les sources hydrothermales

I.1.1. Historique

Jusqu'à la découverte des sources hydrothermales, l'écosystème abyssal était considéré comme l'un des plus pauvres de la planète. En effet, la matière organique en milieu océanique est produite dans la couche euphotique et sédimente lentement sous forme de neige marine. Au cours de la descente, cette matière organique est utilisée par les bactéries comme source d'énergie et de matière. Plus la couche d'eau traversée est épaisse, plus il y a consommation par les bactéries et moins il restera de cette matière organique disponible pour le réseau trophique abyssal et plus particulièrement benthique. Cette conception du monde abyssal a été ébranlée par la découverte des sources hydrothermales en 1976 au cours d'une plongée faite par des géologues par 2500 m de profondeur sur la dorsale océanique près des Iles Galápagos (Lonsdale, 1977). Les photographies prises par un engin sous-marin remorqué ont révélé la présence de nombreuses coquilles de bivalves, associées à des émissions hydrothermales de faible température. Par la suite, une mission américaine de plongées avec le sous-marin Alvin a permis de collecter et décrire pour la première fois la faune associée à ces phénomènes géologiques (Corliss et Ballard, 1977; Corliss *et al.*, 1979; Ballard et Grassle, 1979). Les animaux connus à ce moment avaient été collectés dans des zones d'émission de fluide hydrothermal dilué. Les premiers fumeurs actifs, avec leurs peuplements caractéristiques, ont été découverts sur la dorsale du Pacifique oriental à 21°N. Depuis, de nombreux sites ont été

découverts, non seulement sur la dorsale du Pacifique Oriental mais aussi sur les dorsales de Gorda, Explorer, Juan de Fuca, Médio-atlantique, Sud-Pacifique, ainsi qu'au niveau des bassins arrière-arc du Pacifique occidental (Figure I.1).

D'autres sources hydrothermales peuvent potentiellement être découvertes au niveau des dorsales tout autour du globe terrestre. Certaines zones sont déjà très prometteuses : des dragages au niveau des dorsales sud-ouest de l'Océan Indien (SWIR) ont permis de remonter des organismes hydrothermaux. L'Atlantique sud serait aussi une zone intéressante à explorer. Les latitudes plus polaires posent le problème des conditions climatiques ne permettant pas de mettre des engins à l'eau mais le développement d'engins autonomes (AUV : autonomous underwater vehicle) devrait à l'avenir étendre les zones explorées.

Le fluide hydrothermal présente des propriétés très différentes de celles de l'eau de mer de fond (Tableau I.1). Un schéma de fonctionnement d'une cellule hydrothermale a été proposé par Massoth et al. (Massoth *et al.*, 1989) (Figure I.2). L'eau de mer de fond s'infiltrerait par des fissures et se modifierait à l'approche d'une source de chaleur (chambre magmatique). Les sulfates de l'eau de mer sont totalement réduits et forment des sulfures, l'oxygène est utilisé, l'eau se charge en différents métaux par lavage de la roche. De plus, le fluide se charge en CO₂ et le pH baisse jusqu'à atteindre des valeurs de 3,2. Le fluide résultant est complètement anoxique, acide et très riche en CO₂, en sulfures et en métaux lourds, remonte à l'axe de la dorsale et ressort dans l'océan, soit sous forme de geyser (cheminée ou fumeur), soit par diffusion à travers les porosités de la roche (émission diffuse).

I.1.2. Conditions environnementales

Autour des sources hydrothermales, les caractéristiques de l'eau de mer environnante sont dramatiquement changées par l'apport et le mélange de fluide hydrothermal en proportion variable. La position des organismes autour de la source de fluide reflète qu'une proportion plus ou moins importante de fluide est mélangée avec l'eau de mer environnante. Quelle que soit cette position, l'apport de fluide est très variable dans le temps (Johnson *et al.*, 1988a; Chevaldonné *et al.*, 1991; Chevaldonné, 1996; Sarradin *et al.*, 1998).

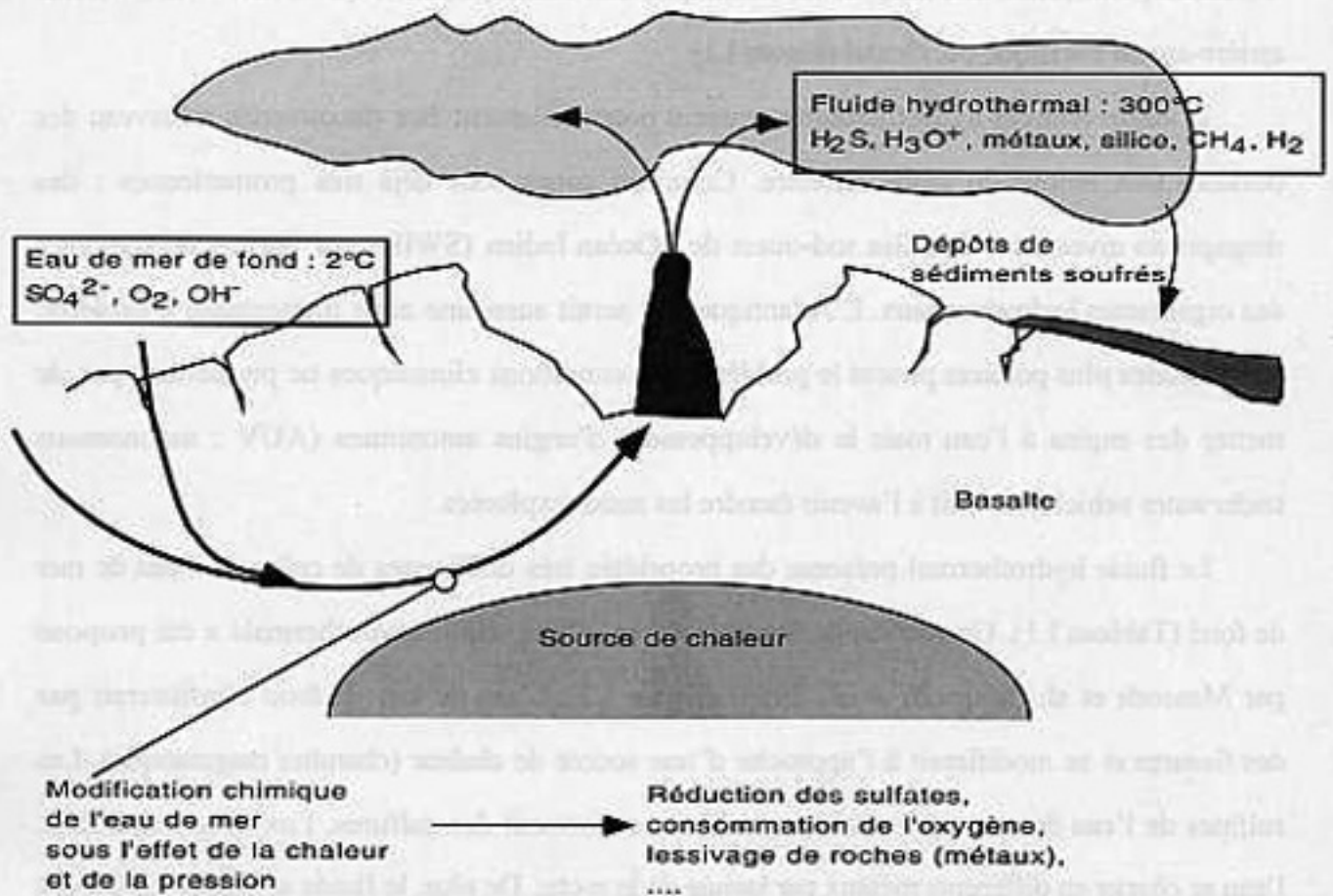


Figure 1.2 : Schéma du fonctionnement d'une cellule hydrothermale (Redessiné d'après Massoth *et al.* (1989))

1.1.2. Les milieux extraterrestres

Avant des années hydrothermales, les caractéristiques de l'eau de mer environnante sont généralement caractérisées par l'apport de la recharge de l'eau hydrothermale et produisent un fluide. La fonction des organismes autour de la source de fluide est de produire plus de moles importantes de fluide est recharge avec l'eau de mer environnante. Quelle que soit cette position, l'apport de fluide est très variable dans le temps (Johnson *et al.*, 1988).

Johnson *et al.*, 1991; Johnson, 1996; Johnson *et al.*, 1988

Tableau I.1 : Caractéristiques physiques et chimiques du fluide hydrothermal de fumeurs noirs de différentes dorsales comparées à celles de l'eau de mer de fond (d'après Von Damm, 1990, modifiées par Magenheim et Gieskes, 1992).

Paramètres physico-chimique	Dorsale Sud Juan de Fuca	Dorsale du Pacifique Oriental 21°N	Dorsale du Pacifique Oriental 13°N	Eau de mer abyssale
Température (°C)	224-285	273-355	317-380	2
pH	3,2	3,3-3,8	3,2	7,8
Alcalinité	0	-0,50 à -0,19	-0,74 à -0,40	2,3
Li (mM)	110-1810	891-1322	688	26
Na (mM)	700-800	432-510	560	464
K (mM)	37,3-51,6	23,2-25,8	29,6	9,8
Rb (mM)	28-37	27-33	14,1	1,3
Be (nM)	95-150	10-37	-	0
Mg (mM)	0	0	0	52,7
Ca (mM)	77,3-96,4	11,7-20,8	55	10,2
Sr (mM)	230-312	65-97	175	87
Al (mM)	1,9	4,0-5,2	-	0,020
Cl (mM)	896-1090	489-579	740	541
SiO ₂ (mM)	22,7-23,3	15,6-19,5	22	0,16
SO ₄ (mM)	0	0	0	27,9
H ₂ S (mM)	3-4,4	6,6-8,4	4,0	0
Mn (mM)	2,61-4,48	0,7-1,0	0,8-1,2	<0,001
Fe (mM)	10,3-18,7	0,75-2,42	1,05-1,85	<0,001
Cu (mM)	<2	<2-44	-	0,007
Zn (mM)	<900	40-106	-	0,01
Se (mM)	<1	<1-73	-	2,5
As (nM)	0	<30-452	-	27
NH ₃ (mM)	0	0	-	<0,01

Certains des composés présents dans le fluide sortant de la cheminée sont toxiques : les sulfures (sous forme H₂S, HS⁻ et S²⁻), les métaux lourds (Cd, Hg, Pb, Cu), les composés à base d'arsenic. De plus la présence d'oxygène est indispensable pour tous les métazoaires à métabolisme aérobie et cette molécule est absente du fluide pur. Par contre, le dioxyde de carbone (CO₂) est présent en grande quantité, ce qui diminue le pH.

Nous nous trouvons donc en face d'un paradoxe : la biomasse est ici 1000 à 10000 fois plus importante qu'en milieu abyssal non hydrothermal alors que les conditions environnementales sont très contraignantes. Ce sont précisément ces conditions dites "extrêmes" et les adaptations que les organismes ont développées qui nous intéressent en tant que physiologiste.

I.1.3. La faune hydrothermale

A proximité des cheminées hydrothermales, on trouve une faune très abondante (Figure I.3). Cette faune comprend environ 445 espèces décrites à ce jour, dont 95% sont endémiques de ce biotope (Tunnicliffe *et al.*, 1998). Chaque grand système géologique de dorsale présente une faune associée particulière. Une faune opportuniste, typiquement abyssale est aussi trouvée à proximité des sources, probablement pour profiter de la source de nourriture abondante, et ne reste que peu de temps dans le milieu hydrothermal.

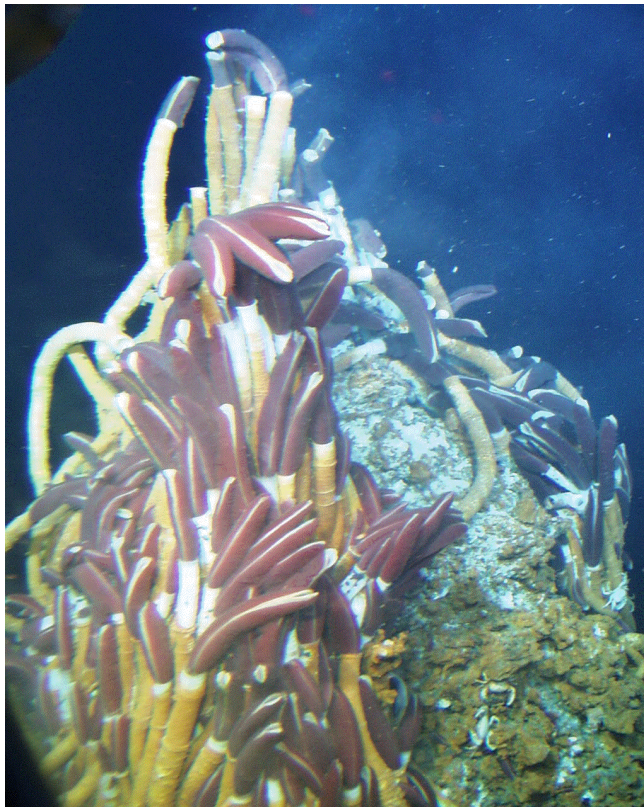


Figure I.3 : Groupe de vestimentifères *Riftia pachyptila* sur le site M-vent, Dorsale du Pacifique Oriental à 9°50'N. Photo Ifremer, mission HOPE'99.

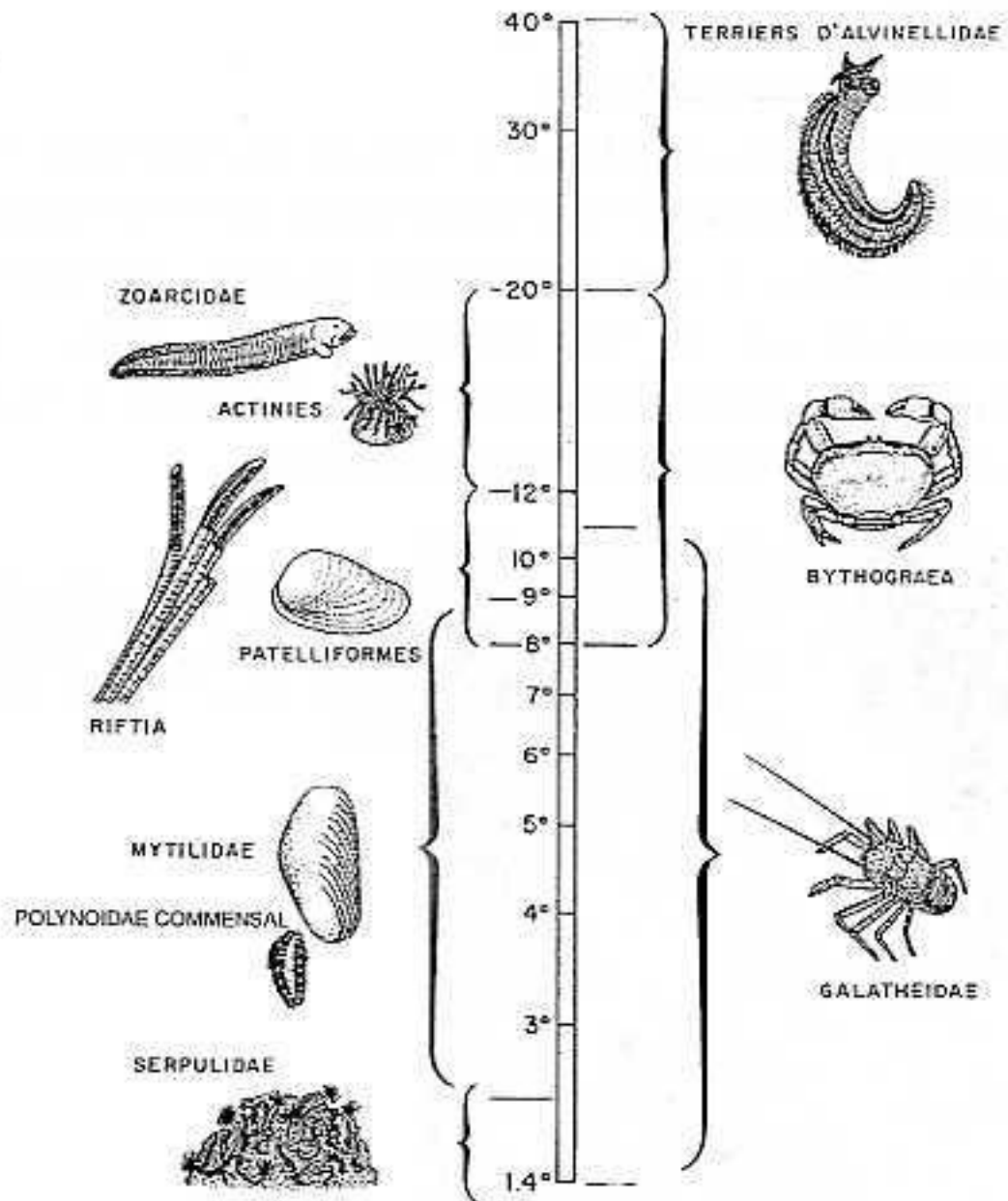


Figure I.4 : Répartition des principales espèces hydrothermales en fonction de la température. Modifié d'après Desbruyères et al., 1982.

Les espèces endémiques se répartissent en auréoles concentriques autour des émissions hydrothermales, en fonction de leurs capacités de résistance aux conditions environnementales et de leurs besoins trophiques (Figure I.4; Desbruyères *et al.*, 1982). Au niveau de la Dorsale du Pacifique Oriental, au plus proche de la sortie de fluide (et donc à la plus haute température, 20-40°C), on trouve les Polychètes Alvinellidés (genres *Alvinella* et *Paralvinella*), avec *Hesiolyra bergi* (Hesionidé) et le crabe *Cyanagraea praedator* puis, plus bas sur les cheminées et à des températures plus basses (8-20°C), on trouve la majorité de la faune avec les Vestimentifères, les poissons Zoarcidés, le céphalopode *Vulcanoctopus hydrothermalis*, de nombreuses espèces de Polychètes (Polynoidés, Alvinellidés du genre *Paralvinella*, Phyllodocidés, *Nereis*, etc ...), des patelles ainsi que le crabe *Bythograea thermidron* et de nombreux petits crustacés. Encore plus loin, la température est comprise entre 2 (température de l'eau de fond) et 8°C. On y trouve des moules du genre *Bathymodiolus* avec leur commensal *Branchipolynoe*, ainsi que différentes espèces de patelles.

Si loin de la surface, une source abondante de composés organiques est nécessaire au maintien d'une biomasse de cette importance. La production primaire est assurée par des bactéries chimioautotrophes, tirant leur énergie de l'oxydation de composés réduits comme les sulfures (H₂S) et le méthane (CH₄). Ces bactéries peuvent être libres ou associées en symbiose aux grands consommateurs primaires de ce milieu, tels que les vestimentifères (*Riftia*, *Tevnia*, *Oasisia*, *Alaysia*, *Ridgeia*) ou les mollusques bivalves (*Calypptogena*, *Bathymodiolus*) et gastéropodes (*Ifremeria*, *Alviniconcha*). Les bactéries, afin de pouvoir oxyder les composés réduits énergétiques, ont besoin d'un accepteur final d'électrons tel que l'oxygène ou les nitrates. Ceci implique que ces bactéries chimioautotrophes doivent vivre dans une zone d'interface où les deux types de composés (composés réduits et accepteurs finaux d'électrons) sont présents en même temps. Les animaux symbiotiques doivent donc vivre dans les zones de mélange actif.

La très forte dépendance des organismes hydrothermaux vis à vis de l'émission des fluides est révélée par l'extinction massive et rapide des populations d'espèces endémiques sessiles

lorsque l'émission de fluide cesse. La production bactérienne cesse, les organismes symbiotiques consomment vite leurs réserves et meurent. Les autres organismes, prédateurs des premiers ou brouteurs de bactéries, disparaissent ensuite rapidement quand leur source de nourriture disparaît. Cette interdépendance est aussi montrée par les valeurs d'isotopes stables en ^{13}C , plus négatives que les valeurs des organismes abyssaux non hydrothermaux (Fisher *et al.*, 1994; Kennicutt et Burke, 1995).

1.2. Les suintements froids du Golfe du Mexique

Dans le Golfe du Mexique, des communautés animales basées sur une production locale de matière organique par des bactéries chimioautotrophes ont été découvertes au niveau de l'escarpement de Floride, au niveau du talus de Louisiane et sur le site d'Alaminos Canyon (Figure I.5). Ces communautés animales présentent de nombreuses analogies avec celles des sources hydrothermales (Carney, 1994).

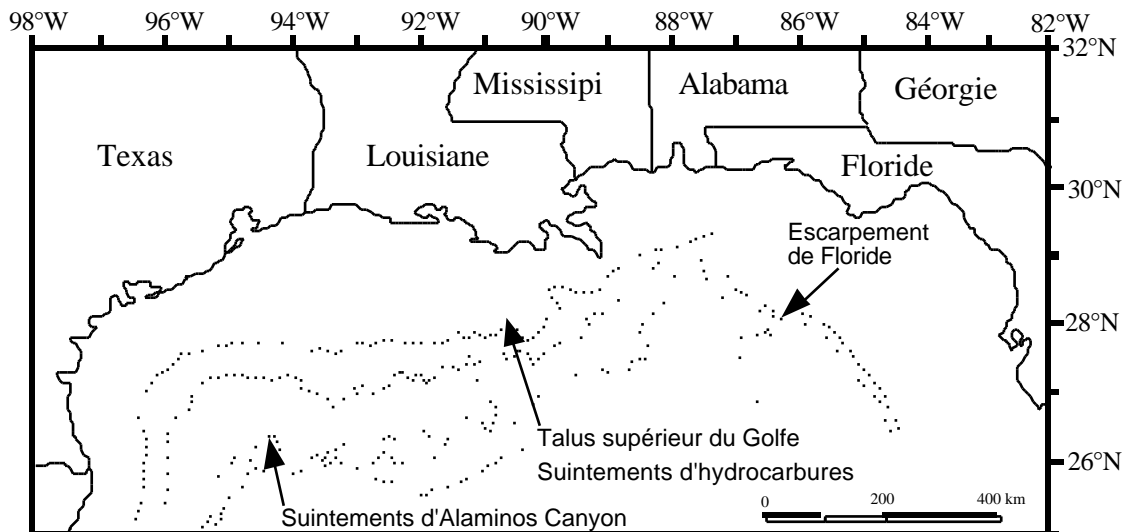


Figure I.5 : Carte du Golfe du Mexique. Les zones principales où des communautés basées sur la chimiosynthèse ont été découvertes sont indiquées.

Au niveau du talus de Louisiane, des communautés basées sur une production chimiosynthétique locale se développent par 600-800 m de profondeur (MacDonald *et al.*, 1989; MacDonald *et al.*, 1990c; MacDonald *et al.*, 1990b; Macdonald *et al.*, 1990c). Ces communautés sont caractérisées par des Vestimentifères du genre *Lamellibrachia* (Figure I.6) et d'un genre proche d'*Escarpia*, et les moules *Bathymodiolus childressi* et *Tamu fisheri*.



Figure I.6 : Vestimentifères du genre *Lamellibrachia* recouvrant une importante surface sur le site Bush Hill (Golfe du Mexique, talus de Louisiane). Photo C.R. Fisher, PennState University.



Figure I.7 : Photo mosaïque de Brine Pool prise par le sous-marin NR-1. Les dimensions du bassin sont d'environ 10x20 m. L'aspect granuleux sur les bords du bassin est dû aux moules. Photo I.R. MacDonald, Texas A&M University.

Bathymodiolus childressi contient des bactéries méthanotrophes et peut former de larges bancs, notamment autour d'un bassin de saumure de 10 m sur 20 m appelé "Brine Pool NR-1" (Figure I.7). Les autres espèces associées sont en cours d'étude par différents spécialistes. Les sulfures, au contraire des sources hydrothermales, ne sont pas d'origine minérale. Ils sont produits par les bactéries utilisant les hydrocarbures comme source d'énergie et le sulfate de l'eau de mer comme accepteur final d'électrons.

Les suintements froids s'opposent aux sources hydrothermales par leur stabilité dans le temps (plusieurs centaines d'années contre 10 ans en moyenne pour les sources hydrothermales de la Dorsale du Pacifique Oriental, par exemple). La température à ces profondeurs est constante, d'une valeur de 8°C. La saumure du bassin de Brine Pool est quant à elle à 29°C mais les échanges avec l'eau de mer de fond sont limités et très lents, au contraire du mélange dynamique et turbulent du fluide hydrothermal avec l'eau de mer de fond sur les dorsales océaniques. Les conditions de vie beaucoup plus stables n'obligent pas les animaux à des croissances rapides et des cycles de vie courts. Par exemple, les vestimentifères *Lamellibrachia* sp. qu'on trouve sur le talus de Louisiane ont une très longue durée de vie, de l'ordre de 250 ans pour une taille de 2 m de long (ces vers peuvent atteindre 3 m) (Bergquist *et al.*, 2000). La faune qu'on y trouve est principalement endémique mais les conditions de vie moins contraignantes permettent à de nombreuses espèces bathyales et abyssales "opportunistes" de visiter les sites pour s'y nourrir.

1.3. Les modèles biologiques étudiés et leur milieu de vie

A la fois au niveau des sources hydrothermales et au niveau du site Brine Pool, les Annélides Polychètes représentent une part importante de la diversité spécifique. Dans leur récente synthèse sur la biogéographie de la faune hydrothermale, Tunnicliffe *et al.* répertorient 102 espèces de Polychètes parmi les quelques 445 espèces de métazoaires (Tunnicliffe *et al.*, 1998). Sur la Dorsale Juan de Fuca, au sein d'un seul buisson du Vestimentifère *Ridgeia piscesae*, pas moins de 24 espèces de Polychètes ont été identifiées, représentant près de 30% du total des espèces présentes (Eckner *et al.*, soumis). Au niveau des sources hydrothermales,

ils occupent des niches écologiques très diverses et se trouvent soumis à des pressions environnementales variables. Notre choix pour les études respiratoires s'est donc naturellement porté sur ce groupe d'animaux. *Alvinella pompejana* a été choisi pour représenter le mode de vie libre dans le pôle chaud et *Branchiopolynoe* pour le mode de vie commensal dans la partie froide de l'écosystème. Au cours d'un séjour aux Etats-Unis j'ai eu l'opportunité de travailler sur des organismes des suintements froids du Golfe du Mexique, un milieu chimiquement semblable aux sources hydrothermales. Les fortes abondances d'un Orbiniidé de grande taille ont fait porter notre choix sur ce polychète pour étudier ses adaptations respiratoires.

I.3.1. *Alvinella pompejana*

Les Alvinellidés (Annélides Polychètes) sont strictement endémiques des sources hydrothermales du Pacifique. Deux genres sont représentés, *Alvinella* et *Paralvinella*, occupant des niches écologiques différentes. Le genre *Alvinella* (deux espèces, *A. caudata* et *A. pompejana*) occupe le pôle le plus chaud des sources, à même la cheminée, près de la sortie du fluide hydrothermal. Les individus de ce genre, et en particulier *A. pompejana* (Figure I.8), sont le plus souvent exposés à des températures variant entre 20 et 40°C (Desbruyères *et al.*, 1982), avec des expositions temporaires à des températures plus importantes, le record enregistré étant de 105°C (Chevaldonné *et al.*, 1992). Cette espèce est certainement l'un des Métazoaires les plus thermotolérants sur Terre.

Alvinella pompejana est probablement une des espèces hydrothermales les plus étudiées, avec le Vestimentifère *Riftia* et le mytilidé *Bathymodiolus*. Sa biologie et son écologie ont récemment fait l'objet d'une synthèse (Desbruyères *et al.*, 1998). Les températures rencontrées par cette espèce sont extrêmement variables dans le temps (Johnson *et al.*, 1988; Chevaldonné *et al.*, 1991; Chevaldonné, 1996). Les températures de vie de cette espèce rapportées dans la littérature correspondent à des températures à l'ouverture du tube. Récemment, Cary *et al.*, (1998) ont mesuré une température fluctuant peu autour de 80°C à l'intérieur du tube d'*Alvinella pompejana*. Cependant, des études biochimiques suggèrent que des expositions prolongées à des températures plus importantes que 40-50°C sont peu probables (Terwilliger et

Terwilliger, 1984; Toulmond *et al.*, 1990; Dahlhoff *et al.*, 1991; Gaill, 1991; Gaill *et al.*, 1995). Les difficultés de mesure *in situ* avec les bras télémanipulés du submersible sont probablement à l'origine des hautes températures mesurées par Cary *et al.* (sonde de température enfoncée dans la paroi de la cheminée, en dehors du tube ?).

A



B



Figure I.8 : A. *Alvinella pompejana* sortie de son tube (Photo C. Cary). B. Sommet d'une cheminée couverte de tubes d'*Alvinella*.

Bien qu'il existe de nombreuses données dans la littérature concernant les caractéristiques chimiques du fluide hydrothermal émis au niveau de différentes zones d'hydrothermalisme dans le monde, les données précises relatives à l'environnement immédiat de la faune hydrothermale sont beaucoup plus rares. Deux articles récents décrivent l'environnement chimique d'*Alvinella pompejana* (Desbruyères *et al.*, 1998; Sarradin *et al.*, 1998). Autour de ces vers, la concentration des sulfures varie de 3 à 300 $\mu\text{mol l}^{-1}$, celle du CO_2 de 3,5 à 6 mmol l^{-1} , pour un pH variant de 5,7 à 7,5 et des températures de 7 à 91°C. A des températures plus élevées que 20°C, le milieu est très fortement hypoxique ou anoxique.

S'il est difficile de mesurer directement les paramètres *in situ*, nombre d'indices biochimiques viennent confirmer que cette espèce vit probablement la plupart du temps en hypoxie sévère. La prolyl-hydroxylase est une enzyme qui a une fonction importante dans la modification post-traductionnelle des chaînes de collagène. L'hydroxylation des prolines de ces

protéines a pour effet d'augmenter la thermostabilité de la molécule, très forte chez *Alvinella pompejana* ([Gaill, 1991; Gaill *et al.*, 1995). L'activité de cette enzyme est dépendante de la concentration en oxygène, son activité étant maximale à très forte concentration en oxygène pour l'enzyme extraite d'embryons de poulet. Chez *Alvinella*, il y a un pic d'activité pour des concentrations en oxygène de l'ordre de 10% de la quantité d'oxygène atmosphérique (Kaule *et al.*, 1998). De plus, des enzymes impliquées dans le métabolisme anaérobie des Polychètes comme la phosphoénol-pyruvate-carboxykinase, l'alanopine déshydrogénase, la strombine déshydrogénase et la lactate déshydrogénase ont été détectées à de fortes concentrations chez cette espèce (Desbruyères *et al.*, 1998). Enfin, l'hémoglobine extracellulaire d'*Alvinella pompejana* présente une forte affinité pour l'oxygène, suggérant que celui-ci est présent en quantité limitée autour des branchies (Terwilliger et Terwilliger, 1984; Toulmond *et al.*, 1990; Toulmond, 1990).

I.1.2. *Branchipolynoe* spp.

Les espèces de la sous-famille des Branchipolynoïnae Pettibone 1984 (Polychaeta, Polynoidae) vivent en commensal avec des Mytilidés contenant des bactéries sulfoxydantes symbiotiques dans leurs branchies et vivant près des sources hydrothermales et des suintements froids (Pettibone, 1984; Pettibone, 1986; Miura et Hashimoto, 1991). Les trois espèces de cette famille décrites à ce jour appartiennent au genre *Branchipolynoe* : *B. symmytilida* Pettibone 1984 (Figure I.9A), est commensal avec *Bathymodiolus thermophilus* sur la Ride Est Pacifique. *Branchipolynoe seepensis* Pettibone 1986 vit avec *Bathymodiolus heckerae* et *Tamu fisheri*, dans le Golfe du Mexique, et avec *Bathymodiolus puteoserpentis* et *B. azoricus* sur la Ride Médio-Atlantique (Figure I.9B). Enfin, *Branchipolynoe pettiboneae* Miura & Hashimoto 1991 vit en commensal avec *Bathymodiolus brevior* et *B. elongatus* dans le Pacifique Ouest. Le mode de vie commensal implique que ces vers se trouvent dans les mêmes conditions environnementales que leurs hôtes quand les valves sont ouvertes et sont de surcroît isolées de l'environnement extérieur quand les moules se referment.

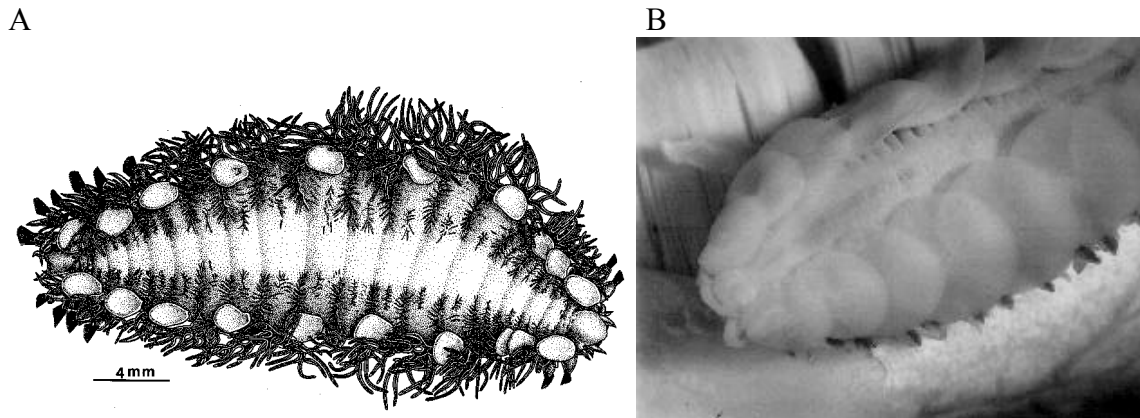


Figure I.9 : *Branchipolynoe*. A. *B. symmytilida* en vue dorsale (d'après Desbruyères et Segonzac, 1997). B. *B. seepensis* de la Dorsale Médio-Atlantique dans sa moule *Bathymodiolus azoricus* dont on voit une partie des branchies en arrière-plan du ver (Photo A. Colaço).

Malgré sa relative abondance, *Branchipolynoe* a fait l'objet de peu d'études depuis la découverte des sources hydrothermales. Les rapports isotopiques en ^{13}C et ^{15}N mesurés chez ce commensal sont très proches de ceux de la moule hôte (Fisher *et al.*, 1988). Il y a donc un lien nutritionnel étroit entre les deux espèces, sans qu'on sache si cette relation est due à une prédation du ver sur la moule ou au fait que leur source de nourriture est la même. Desbruyères *et al.* (Desbruyères *et al.*, 1985) ont analysé le contenu du tube digestif de *B. symmytilida* et y ont trouvé des fragments de branchie de moule, des cellules coccoïdes et filamenteuses ressemblant à des bactéries, des mues de crustacés, des soies de polychètes, des frustules de diatomées et de la matière organique amorphe. Ceci suggère que le ver se nourrit des fèces et pseudofèces de son hôte ainsi que de morceaux de ses branchies. Des études récentes se sont portées sur les relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Branchipolynoe* (Chevaldonné *et al.*, 1998) et sur le ver et son hôte (Jollivet *et al.*, 1998; Jollivet *et al.*, en préparation). Ces espèces présentent des stratégies de reproduction originales. Une étude de l'espèce de la Dorsale Médio-Atlantique (*B. seepensis*) a révélé des caractéristiques suggérant une pseudocopulation : stockage du sperme par les femelles et stockage des gros ovocytes (jusqu'à 450 μm de diamètre) dans une poche incubatrice (Jollivet *et al.*, 2000).

Une étude effectuée sur le site Rose Garden, sur la ride des Galápagos apporte des informations sur l'environnement physico-chimique des moules et donc de leur commensal

(Fisher *et al.*, 1988). Cette étude fait la distinction entre les zones actives où les moules sont en bonne santé ("happy mussels") et les zones de plus faible diffusion où les moules sont en moins bonne santé ("unhappy mussels"). Les commensaux sont beaucoup plus abondants et de plus grande taille dans les moules des zones actives. Pour ces moules, des valeurs de température de 2-14 °C et des valeurs de concentration en oxygène de 0 à 110 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ont été rapportées (Fisher *et al.*, 1988).



Figure I.10 : Groupe d'Orbiniidés sur le site Brine-Pool dans le Golfe du Mexique. Photo C.R. Fisher.

I.1.3. Orbiniidé du Golfe du Mexique

Sur le site Brine Pool NR-1, on trouve en abondance une espèce d'Orbiniidé en cours de description, (J.M. Blake, communication personnelle) parmi les moules *Bathymodiolus childressi*. Cette espèce est aussi présente sur d'autres sites mais en densité moindre (Smith *et al.*, 2000). Dans ce milieu, les vers de cette espèce rencontrent des concentrations en oxygène descendant jusqu'à 60 μM et des concentrations en sulfures atteignant des valeurs de 13 mM (Smith *et al.*, 2000). Les températures sont relativement constantes, avec une valeur de 8°C. Sur le site Brine Pool, on peut trouver des individus isolés mais le plus souvent, ils sont en groupes comprenant jusqu'à 150 individus (Figure I.10) (Smith *et al.*, 2000; observations personnelles). Ils peuvent former des amas globulaires, seule la partie antérieure des vers dépassant. Ils

peuvent aussi être trouvés individuellement, la partie postérieure enfouie dans le sédiment meuble et la partie antérieure étendue dans le milieu environnant.

Nous nous trouvons donc en présence de trois "espèces", potentiellement confrontées à un environnement fortement hypoxique et riche en sulfures, représentant différents modes de vie : une espèce tubicole du pôle chaud hydrothermal, *Alvinella pompejana*, une espèce commensale du pôle froid hydrothermal, *Branchiopolynoe* spp. et une espèce libre des zones de suintements froids, l'Orbiniidé

1.4. Adaptations respiratoires

I.4.1. Les facteurs environnementaux et leurs effets sur la respiration

Comme nous l'avons vu les sources hydrothermales et les suintements froids du Golfe du Mexique constituent des environnements pauvres en oxygène et pouvant présenter des concentrations élevées en sulfures et en dioxyde de carbone. Ces caractéristiques sont très contraignantes pour des organismes aérobies. En effet, le manque d'oxygène induit un passage au métabolisme anaérobie dont le rendement est moindre que le métabolisme aérobie. De plus, les sulfures sont des poisons métaboliques qui inhibent la chaîne respiratoire et engendrent donc également un recours au métabolisme anaérobie. Enfin, le dioxyde de carbone est non seulement présent dans le milieu environnant mais aussi produit par la respiration. Des pressions partielles de dioxyde de carbone élevées dans le milieu extérieur peuvent affecter les échanges respiratoires, soit directement en limitant la diffusion, soit indirectement par l'acidification de l'eau environnante et du milieu intérieur avec des conséquences probables sur les propriétés fonctionnelles des protéines.

En plus de cela, les sources hydrothermales peuvent exposer les organismes à des variations importantes de température, qui peuvent aussi affecter la respiration. Les organismes des sources hydrothermales sont en effet poïkilothermes : leur température interne suit les variations de la température extérieure. A cette simple variation d'un paramètre physique, la

température, s'associent des variations des paramètres chimiques. Il y a en effet une corrélation directe entre la température et les caractéristiques de l'eau environnante car la température est un indicateur de la proportion de fluide hydrothermal mélangée à l'eau de fond : plus l'eau est chaude, plus ses caractéristiques chimiques sont contraignantes pour la respiration. Les données physico-chimiques du milieu environnant disponibles pour chaque espèce sont résumées dans le tableau I.2.

Tableau I.2 : Caractéristiques chimiques de l'environnement de chaque espèce étudiée. Seuls les facteurs pouvant influencer sur la respiration sont présentés. (D'après Fisher *et al.*, 1988; Sarradin *et al.*, 1998a; Sarradin *et al.*, 1999; Sarradin, 1998b; Smith *et al.*, 2000).

Modèle biologique	Oxygène (μM)	CO₂ (mM)	Sulfures (μM)	pH
<i>Branchiopolynoe</i> EPR	0-110	?	0-325	?
<i>Branchiopolynoe</i> MAR	?	?	<0.5-62	6.2-8
<i>Alvinella</i>	0-200	3.5-6	3-300	5.7-7.5
Orbiniidé	57-200	?	0-13000	?

Tous ces organismes se trouvent donc dans un environnement très contraignant en ce qui concerne la respiration. Pourtant, les animaux abyssaux, y compris ceux des sources hydrothermales, ont une consommation d'oxygène normale comparée à celle des organismes littoraux (Weber, 1978a; Childress et Mickel, 1985; ce travail, Chapitre IV). Nous sommes donc en présence d'animaux vivant dans un milieu pauvre en oxygène et dont les besoins métaboliques sont comparables à ceux des organismes littoraux vivant dans un milieu plus riche en oxygène.

I.1.2. Adaptations respiratoires.

a) Cas général : exemple de l'oxygène

En physiologie respiratoire, il est désormais classique de conceptualiser les échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone selon le schéma présenté en figure I.11 (Dejours, 1981). Les gaz dissous se propagent le long d'un gradient de pression soit par des processus diffusifs au travers des membranes cellulaires (branchies, tissus), soit par des processus convectifs

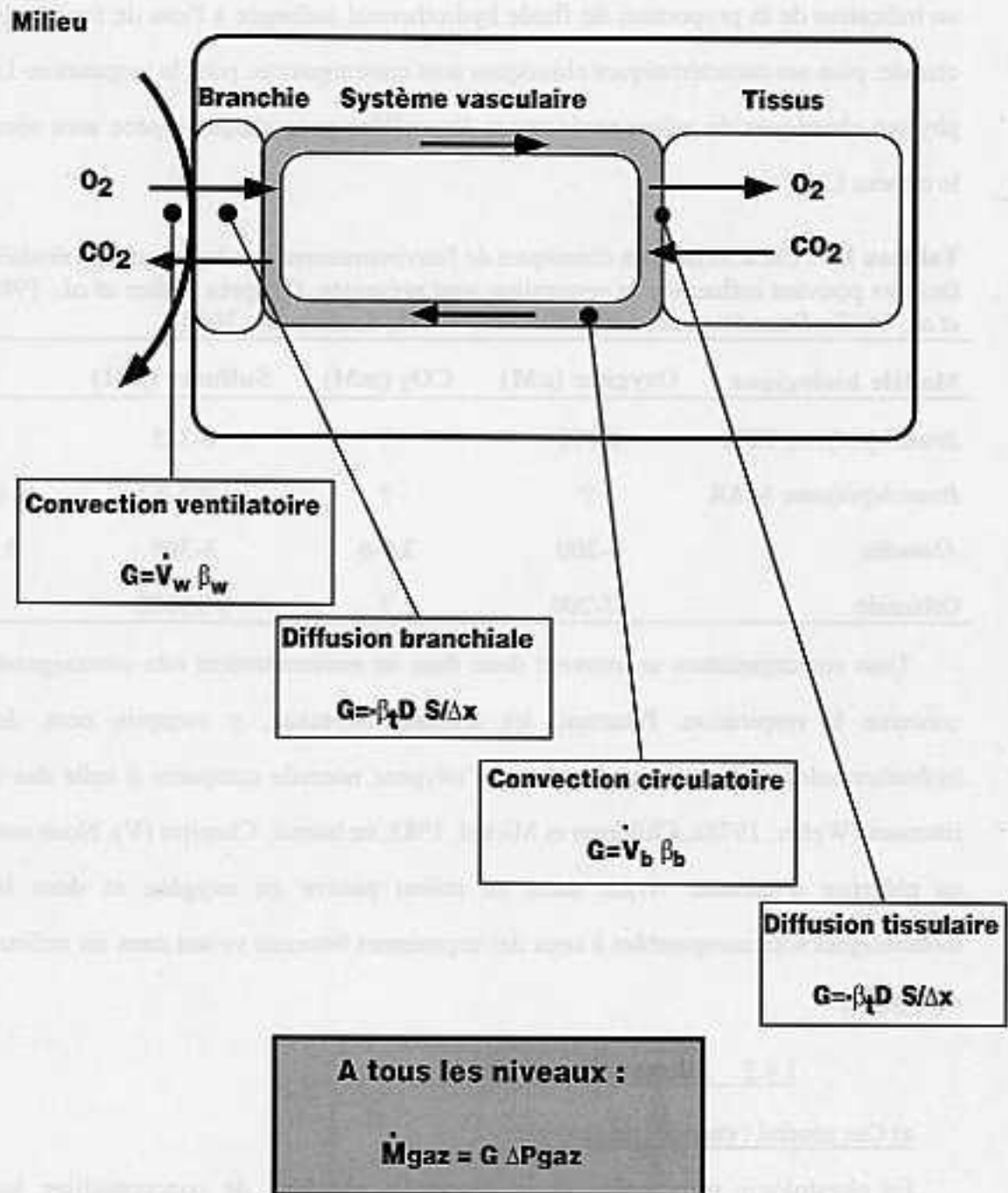


Figure I.11 : Schéma conceptuel des échanges gazeux pour un organisme animal (Etabli à partir de Dejours, 1981).

(ventilation branchiale, circulation sanguine). A tous les niveaux, le débit des gaz peut être exprimée par l'équation :

$$\dot{M}_{\text{gaz}} = G \Delta P_{\text{gaz}} \quad (\text{Equation 1})$$

où G est la conductance du niveau considéré et ΔP la différence de pression partielle du gaz considéré entre les deux compartiments mitoyens.

Ainsi, au niveau des surfaces d'échanges (branchies chez les annélides), il peut y avoir une convection ventilatoire renouvelant le fluide à leur surface. Dans l'équation 1, la conductance convective G peut alors être exprimée sous la forme :

$$G = \dot{V}_w \beta_w$$

où V_w est le volume d'eau ventilé, et β_w la capacitance de l'eau de mer ($\beta_w = \frac{dC_{\text{gaz}}}{dP_{\text{gaz}}}$,

variation de la concentration d'un gaz donné en fonction de sa pression partielle). La capacitance de l'eau de mer dépend pour un gaz donné de sa constante de solubilité, étant fonction du gaz considéré, de la salinité, du pH, de la composition ionique et de la température (et dans une moindre mesure de la pression). Seul V_w peut varier mais dans le cas de nos vers, les branchies baignent directement dans le milieu extérieur et la seule possibilité de modifier ce paramètre est le battement des cils à la surface de ces surfaces d'échanges. Il est possible que la moule contenant *Branchipolynoe* régule le débit d'eau entrant et donc le volume ventilé au dessus des branchies du ver. Les études effectuées au cours de cette thèse se sont limitées à mettre en évidence la présence de cils sur les branchies des vers. Nous n'avons pas étudié les possibles variations des battements ciliaires en fonction de la pression ambiante en oxygène.

Il y a ensuite diffusion au niveau des branchies et la conductance diffusive G de l'équation 1 peut alors s'écrire sous la forme :

$$G = -\beta_t D \frac{S}{\Delta x}$$

S est l'aire de la surface d'échanges gazeux (surface branchiale), β_t est la capacitance des tissus (ici le milieu intracellulaire et les membranes), D est le coefficient de diffusion du gaz dans le milieu limitant la diffusion et Δx est l'épaisseur du compartiment limitant la diffusion (distance de diffusion). Le produit $\beta_t D$ est souvent appelé constante de Krogh. Les termes S et Δx sont les

deux termes sur lesquels on peut observer des modifications à caractère adaptatif. Pour augmenter la conductance et donc les échanges au niveau des branchies, on peut avoir une augmentation de S et/ou une diminution de Δx . En ce qui concerne les annélides, plusieurs exemples d'une telle adaptation peuvent être cités, bien que les espèces chez lesquelles la surface de diffusion ait été effectivement mesurée sont plutôt rares. Une augmentation de la surface d'échanges gazeux pour faciliter la diffusion des gaz a été observée chez des Ampharétidés (Polychètes, Terebellida) qui ont été récoltés sur la cote ouest de l'Afrique par Fauvel (Fauvel, 1958). Ces vers se trouvent en effet dans une zone où un "up-welling" induit une très forte production primaire en surface. Il s'ensuit une sédimentation de grandes quantités de matière organique sous forme de neige marine. Ceci permet une très forte activité bactérienne benthique, consommant une grande partie de l'oxygène disponible. Des branchies très développées ont aussi été observées chez les Alvinellidés (Polychaeta, Terebellida), endémiques des sources hydrothermales (Jouin et Gaill, 1990). La réduction de la distance de diffusion entre le milieu environnant et les fluides corporels a aussi été observée chez les Alvinellidés (Jouin et Gaill, 1990). Ces deux paramètres ont été mesurés chez les autres modèles biologiques de cette étude.

Au niveau du système circulatoire, la convection donne une conductance convective G décrite par l'équation :

$$G = \dot{V}_b \beta_b$$

où V_b est le débit sanguin et β_b la capacitance du sang pour le gaz considéré. Une augmentation du débit sanguin permet d'amener plus de sang aux organes et donc d'amener plus d'oxygène et d'éliminer plus de dioxyde de carbone, au prix d'une dépense énergétique importante. Ce paramètre n'a pas été mesuré sur les organismes de cette étude à cause des difficultés techniques que cela représente, même sur les espèces littorales. Cependant, nous avons étudié les facteurs permettant d'accroître la capacitance des fluides corporels β_b : outre la forme dissoute, l'oxygène peut également exister sous forme combinée à un pigment respiratoire. L'importance des pigments respiratoires est frappante au niveau des sources hydrothermales où la couleur dominante est le rouge (panache des vestimentifères comme *Riftia*

pachyptila, branchies de *Calypptogena*, branchies des Alvinellidés, ...), en raison de la présence d'hémoglobine. Cette capacitance peut aussi être augmentée, à pression partielle en oxygène constante, à la fois par la concentration des pigments respiratoires dans les fluides circulants et par leur forte affinité permettant de lier de l'oxygène sur ces molécules, même en cas de faibles concentrations et pressions partielles extérieures. L'affinité des hémoglobines des organismes vivant en milieu très pauvre en oxygène est élevée (Toulmond *et al.*, 1990; Toulmond, 1991).

Le dernier niveau d'échanges gazeux est celui de la diffusion tissulaire. Ce niveau n'a pas été étudié du tout sur les espèces modèles mais les termes de la diffusion sont approximativement les mêmes que pour la diffusion branchiale. La diffusion dépend de la surface d'échanges, de la capacitance des tissus pour le gaz et de la distance de diffusion.

b) Cas du dioxyde de carbone.

Le dioxyde de carbone dissous réagit avec l'eau pour arriver à l'équilibre suivant :



On le trouve donc non seulement sous forme de gaz mais aussi sous forme d'ions bicarbonate (HCO_3^-) et carbonate (CO_3^{2-}). Les molécules chargées diffusent très peu à travers les membranes plasmiques. Les adaptations morphologiques facilitant l'élimination de la forme gazeuse du dioxyde carbone sont les mêmes que celles facilitant le transfert de l'oxygène. En plus de ces adaptations, il faut que l'organisme présente des adaptations d'ordre physiologique pour l'élimination de formes ioniques du dioxyde de carbone. Une façon d'augmenter cette élimination est de faire intervenir des systèmes enzymatiques comme l'anhydrase carbonique pour catalyser la formation de CO_2 qui peut alors diffuser au niveau des branchies. La présence d'un échangeur anionique de type "band-3" ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) pourrait aussi augmenter l'élimination du dioxyde de carbone au niveau des branchies.

Les concentrations externes importantes en dioxyde de carbone et leur fluctuations ne permettent pas de maintenir les concentrations de ce composé constantes dans les fluides

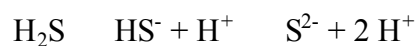
corporels. Une façon de limiter l'effet du CO₂ est de posséder des protéines insensibles aux effets directs (par liaison de la molécule sur les protéines) ou indirects du dioxyde de carbone (par l'action du CO₂ sur le pH). La quantité de molécules concernées est probablement trop importante. Une autre possibilité est de réduire les effets du CO₂ soit en possédant des fluides corporels présentant un effet tampon important, soit en fixant le CO₂ à des molécules pour le neutraliser. Chez *Riftia pachyptila*, le liquide coelomique et le sang sont capables d'accumuler d'importantes quantités de CO₂ dont 10-30% sont liés aux fractions de poids moléculaire contenant les hémoglobines, présentes dans ces deux fluides corporels. Le reste est fixé par une ou des molécules de poids moléculaire inférieur à 2000 Da (Toulmond *et al.*, 1994).

c) Les sulfures

Les sulfures ne sont ni produits ni utilisés par le métabolisme normal des espèces étudiées. Ces composés peuvent atteindre de très fortes concentrations dans certains environnements (Grieshaber et Völkel, 1998) et notamment celui des modèles de cette étude (Tableau I.2). Ils sont très toxiques, même pour les organismes vivant en permanence dans des milieux réduits. Les animaux de ces environnements doivent donc détoxifier ces composés.

Les concentrations en sulfures et en oxygène sont généralement inversement corrélées. Le temps de demi-vie des sulfures dans une eau contenant de l'oxygène dissous est de l'ordre de quelques heures, ce qui permet leur présence simultanée dans certains environnements dynamiques comme les sources hydrothermales.

Dans l'eau, H₂S est en équilibre avec HS⁻ et S²⁻ :



Plus loin dans le texte, "sulfures" se rapporte à l'ensemble de ces espèces chimiques, le sulfure gazeux dissous (H₂S), l'anion bisulfure (HS⁻, pK₁ 7.02) et l'anion sulfure (S²⁻, pK₂ >12). Dans l'eau de mer (pH 8), la forme prépondérante est l'anion bisulfure. Les espèces hydrothermales vivent dans une eau plus acide et c'est alors H₂S qui est le plus abondant.

Les sulfures traversent facilement les tissus vivants, préférentiellement sous la forme gazeuse H_2S (Julian et Arp, 1992). Ce composé est généralement considéré comme très fortement toxique, affectant principalement la fonction respiratoire chez les mammifères et inhibant puissamment la cytochrome *c* oxydase en se liant réversiblement à l'hème sur le cytochrome *aa3* (Nicholls, 1975). Cette inhibition stoppe la voie aérobie de production d'énergie, les produits du métabolisme anaérobie s'accumulent alors. De plus, les sulfures sont des nucléophiles forts, réduisant les ponts disulfures et se liant aux noyaux tétrapyrrole de l'hème (Nichol *et al.*, 1968; Park et Nagel, 1984). Enfin, l'hémoglobine peut réagir avec les sulfures pour former de l'hématine qui peut ensuite catalyser l'oxydation des sulfures (Patel et Spencer, 1963; Vismann, 1990). Dans leur revue, Grieshaber et Völkel (1998) proposent plusieurs mécanismes de tolérance et de protection vis-à-vis des sulfures :

- exclusion de ces composés grâce à l'imperméabilité de la paroi du corps ou à la présence d'une épaisse couverture de bactéries sulfoxydantes;
- cytochrome *c* oxydase insensible aux sulfures;
- liaison réversible à des composés du sang ou liquide coelomique;
- oxydation des sulfures par les mitochondries pour former des composés moins toxiques et synthèse simultanée d'ATP;
- recours à l'anaérobiose quand les concentrations en sulfures sont trop élevées;
- oxydation par des bactéries symbiotiques et utilisation par l'invertébré hôte des métabolites formés par les bactéries.

En présence d'oxygène, les sulfures réagissent spontanément pour former divers produits d'oxydation comme le soufre élémentaire (S^0), du sulfite (SO_3^{2-}), du thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) et du sulfate (SO_4^{2-}) (Cline et Richards, 1969). Les sulfures peuvent aussi être oxydés par des ions métalliques comme Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+} (Grieshaber et Völkel, 1998).

L'oxydation des sulfures est aussi réalisée par les animaux, comme cela a été démontré chez des bivalves, des polychètes et des crustacés (Grieshaber et Völkel, 1998). Le produit formé est généralement du thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$), la formation de ce composé consommant un minimum

d'oxygène (1.5 mole d'oxygène pour 1 mole de sulfures). Chez les bivalves symbiotiques *Solemya reidi* et *Lucinoma aequizonata*, la formation de thiosulfate est la première étape de l'oxydation des sulfures que les bactéries poursuivront afin de produire de la matière organique (O'Brien et Vetter, 1990; Cary *et al.*, 1989).

L'oxydation des sulfures par les mitochondries a été démontrée dans un premier temps chez *Solemya reidi* (Powell, 1986b) puis chez *Arenicola marina* (Völkel et Grieshaber, 1996). Chez *Solemya*, le sulfure entrerait dans la chaîne respiratoire au niveau du cytochrome *c* alors que chez *Arenicola*, cette entrée se ferait soit au niveau de l'ubiquinone, soit au niveau du complexe III. Dans les deux cas, de fortes concentrations en sulfures inhibent le complexe IV de la chaîne respiratoire mais chez *Arenicola*, l'oxydation du sulfure se poursuit par passage une voie impliquant une possible oxydase alternative.

Une synthèse d'ATP en utilisant les sulfures comme source d'énergie inorganique au cours de l'oxydation des sulfures par les mitochondries a été montrée chez le bivalve *Solemya reidi*, chez les poissons *Fundulus parvipinnis* et *Citharichthys stigmaeus* et chez les polychètes *Heteromastus filiformis* et *Arenicola marina* (Grieshaber et Völkel, 1998).

1.5. Plan du manuscrit

Nous avons étudié les adaptations respiratoires à différents niveaux chez les trois modèles : au niveau anatomique, au niveau de la structure des pigments respiratoires et au niveau de la physiologie respiratoire.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit présente les résultats de l'étude anatomique de *Branchiopolynoe* spp. et de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique. L'étude de l'anatomie et de l'ultrastructure de l'appareil respiratoire d'*Alvinella pompejana* a été publiée par Jouin et Gaill (1990) et Jouin-Toulmond et al. (1996). Dans ce chapitre, nous dégageons les grands types d'adaptations rencontrées chez les trois modèles d'étude.

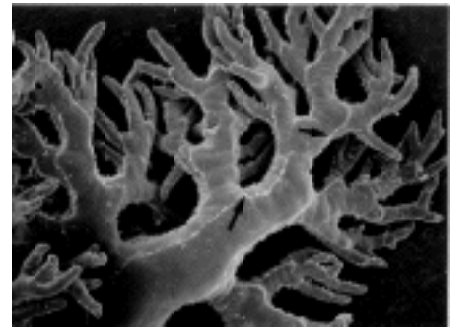
Dans le troisième chapitre, nous présentons les résultats de la caractérisation et de l'étude de la structure des pigments respiratoires des modèles étudiés. Aucune hémoglobine n'avait été signalée auparavant chez les Polynoidae ou chez les Orbiniidés. *Alvinella pompejana* possède une hémoglobine extracellulaire dans son système circulatoire et une hémoglobine intracellulaire dans son compartiment coelomique. Son hémoglobine extracellulaire a fait l'objet de plusieurs études (Terwilliger et Terwilliger, 1984; Toulmond *et al.*, 1989; Zal *et al.*, 1997) mais son hémoglobine intracellulaire n'a été que signalée (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996).

Le quatrième chapitre concerne la physiologie de la respiration, notamment les propriétés fonctionnelles des hémoglobines. Pour l'Orbiniidé du Golfe du Mexique et pour *Branchipolynoe*, les résultats obtenus *in vitro* ont pu être mis en relation avec des mesures effectuées sur des animaux vivants au cours de missions. Cela n'est malheureusement pas possible pour *Alvinella*, compte tenu de son état physiologique à l'arrivée au laboratoire après récolte sur le fond. Ce chapitre fait intervenir les données et les conclusions des deux chapitres précédents pour les intégrer et essayer de comprendre le fonctionnement de chaque modèle dans son milieu.

Le cinquième chapitre conclut le travail en résumant les adaptations respiratoires de chaque espèce et présente les perspectives d'études sur d'autre modèles ou d'expériences sur les modèles déjà étudiés dans ce travail.

Chapitre 2

Anatomie



Adaptations des Systèmes Respiratoire et Circulatoire

<i>Chapitre 1</i>	Introduction
<i>Chapitre 2</i>	Anatomie
<i>Chapitre 3</i>	Biochimie
<i>Chapitre 4</i>	Physiologie
<i>Chapitre 5</i>	Conclusion

II.1. Introduction

Les organismes vivant dans un milieu pauvre en oxygène (comme les sources hydrothermales ou le site Brine Pool NR-1) doivent présenter des adaptations anatomiques qui touchent principalement au système d'échanges gazeux et ont pour effet de faciliter ces échanges.

Chez de nombreuses polychètes, les échanges gazeux s'effectuent par diffusion à travers l'épiderme de la paroi du corps, sans qu'il y ait des organes respiratoires spécialisés. Cependant, chez certaines polychètes errantes et la plupart des formes sédentaires les échanges respiratoires se font au niveau d'organes spécialisés, les branchies. La forme de ces branchies est très variée, allant d'appendices filiformes chez certaines formes errantes (*Eunice*), et sédentaires (*Polycirrus*), à des organes ramifiés (*Arenicola*, *Amphitrite*) ou constitués de lamelles parallèles (*Pectinaria*, *Alvinella*). Chez les espèces errantes, la plupart des segments du corps portent des branchies sur la rame dorsale des parapodes. Certaines espèces peuvent avoir quelques segments sans branchies près du prostomium. Chez certaines espèces, les segments postérieurs n'ont pas de branchies. Chez les espèces sédentaires, les branchies sont limitées à un petit nombre de segments (généralement constant), normalement situées dans la partie antérieure du corps (famille des Terebellidés, par exemple).

Une observation sur le vivant montre que les branchies sanguines de certaines polychètes sont des organes contractiles abondamment irrigués et jouant ainsi le rôle de coeur accessoire. La présence de cils est fréquente, les mouvements ciliaires permettant de maintenir un flux d'eau sur la surface branchiale.

La couronne de tentacules des Sabellida et les tentacules filiformes des Terebellida sont principalement des organes de collecte de nourriture ayant aussi une fonction respiratoire.

II.1.1. Les organes d'échanges gazeux des Alvinellidés (Ordre des Terebellida)

Les Alvinellidés font partie de l'ordre des Terebellida et, comme la plupart des espèces de cet ordre, possèdent des branchies développées sur les premiers segments du corps

(Desbruyères et Laubier, 1991). Ces branchies représentent la structure d'échanges gazeux principale, bien que des échanges, plus limités, puissent avoir lieu à travers la paroi du corps et les tentacules péribuccaux. Les deux genres d'Alvinellidés (*Alvinella* et *Paralvinella*) possèdent quatre paires de branchies, de taille similaire. Chez *Alvinella*, des lamelles en forme de faucille sont attachées de part et d'autre de l'axe central alors que chez *Paralvinella*, ce sont des filaments. Une étude de la structure et de l'ultrastructure des branchies des Alvinellidés *Alvinella pompejana* et *Paralvinella grasslei* a révélé certaines caractéristiques intéressantes (Jouin et Gaill, 1990). Ces branchies représentent une importante surface branchiale (12 et 47 cm² g⁻¹ poids frais, pour *A. pompejana* et *P. grasslei* respectivement), plus importante que celle des annélides littoraux comme *Arenicola marina* (4 cm² g⁻¹ poids frais). De plus, la distance de diffusion est très réduite grâce à la présence de boucles sanguines intra-épidermiques (Jouin et Gaill, 1990), ce qui facilite la diffusion des gaz au travers de l'épithélium branchial.

Les Alvinellidés, en plus de leurs branchies bien développées, possèdent un système d'échanges gazeux interne (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998). Il s'agit d'un réseau de capillaires, très développé, localisé autour de l'oesophage et entouré d'un dissépiement formant la paroi d'une poche. Cette poche périoesophagienne contient non seulement un important réseau de capillaires sanguins mais aussi de très nombreux érythrocytes (coelomocytes contenant de l'hémoglobine). Au niveau de la poche, la distance de diffusion entre les capillaires, contenant une hémoglobine extracellulaire, et les érythrocytes, contenant une hémoglobine intracellulaire, est réduite à 0,5 µm, ce qui permet des échanges importants et rapides entre les deux pigments respiratoires.

Les tentacules péribuccaux pourraient aussi avoir un rôle dans les échanges gazeux étant donné que de nombreux érythrocytes circulent à l'intérieur de ces structures tubulaires dépourvues de vaisseaux sanguins. La cavité coelomique de ces tentacules est en communication directe avec la cavité coelomique générale du corps et plus particulièrement celle de la partie antérieure du corps, limitée par la paroi de la poche périoesophagienne (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998).

II.1.2. Echanges gazeux chez les Polynoidés (Ordre des Phyllodocida)

Chez les polynoidés littoraux, il n'y a pas de branchies et les échanges gazeux se font à travers la surface des parapodes. L'eau à leur surface est renouvelée par le mouvement des élytres et des cils épidermiques (Lwebuga-Mukasa, 1970). Une caractéristique importante de certains Polynoidés des sources hydrothermales est la présence de branchies ramifiées insérées sur les parapodes (Tableau II.1). Les branchies existent non seulement chez les espèces commensales de moules *Branchipolynoe* spp. mais aussi chez des espèces libres, non commensales comme toutes les espèces de Branchinotogluminae (*Branchinotogluma* spp., *Opisthotrochopodus* spp. et *Peinaleopolynoe* spp.), l'unique espèce de Branchiplicatinae (*Branchiplicatus cupreus*) et une seule des espèces de Lepidonotopodinae (*Thermopolynoe branchiata*). Ceci représente 17 des 45 espèces hydrothermales de polynoidés décrites à ce jour. Les branchies sont absentes chez les espèces littorales, à l'exception de l'espèce *Arctonoe vittata*, commensale des patelles, qui possède des petites branchies (Martin et Britayev, 1998). La présence de branchies augmente la surface d'échanges respiratoires. Jusqu'ici, rien n'était connu sur la structure et l'ultrastructure des branchies chez les Polynoidés.

II.1.3. Les organes d'échanges gazeux des Orbiniidés (Ordre des Orbiniida)

Un des caractères distinctifs de la famille des Orbiniidés est la présence de branchies sur tous les segments du corps, après quelques segments antérieurs qui en sont dépourvus. Les branchies sont dorsales, simples, de taille homogène le long du corps et fortement ciliées. Eisig (Eisig, 1914) a publié une importante étude sur cette famille et décrit la structure des branchies de quelques espèces littorales. Au niveau des sources hydrothermales, quatre espèces ont été décrites à ce jour, toutes de petite taille (longueur <10 mm). Une espèce de *Scoloplos*, probablement nouvelle et de plus grande taille (jusqu'à environ 3 cm), est trouvée parmi les vestimentifères des sources hydrothermales du segment Endeavor de la Dorsale Juan de Fuca (observation personnelle). A ce jour, aucune étude ne porte sur ces espèces mais leurs branchies semblent comparables à celle des Orbiniidés littoraux.

CHAPITRE II - Adaptations anatomiques -

Tableau II.1: Liste des espèces connues de Polynoidés hydrothermaux et présence ou absence de branchies.

Sous-famille	Espèce	Branchies	Auteur(s)
Branchiplicatinae	<i>Branchiplicatus cupreus</i>	Sacs	Pettibone 1985a
Branchinotogluminae	<i>Branchinotogluma grasslei</i>	Ramifiées	Pettibone 1985b
	<i>Branchinotogluma sandersi</i>	Ramifiées	Pettibone 1985b
	<i>Branchinotogluma hessleri</i>	Ramifiées	Pettibone 1985b
	<i>Branchinotogluma burkensis</i>	Ramifiées	Pettibone 1989a
	<i>Opisthotrochopodus tunnicliffae</i>	Ramifiées	Pettibone 1988
	<i>Opisthotrochopodus alvinus</i>	Ramifiées	Pettibone 1985b
	<i>Opisthotrochopodus japonicus</i>	Ramifiées	Miura et Hashimoto 1991
	<i>Opisthotrochopodus segonzaci</i>	Ramifiées	Miura et Desbruyères 1995
	<i>Opisthotrochopodus marianus</i>	Ramifiées	Pettibone 1989a
	<i>Opisthotrochopodus trifurcus</i>	Ramifiées	Miura et Desbruyères 1995
	<i>Peinaleopolynoe santacatalina*</i>	Ramifiées	Pettibone 1993
<i>Peinaleopolynoe sillardi*</i>	Ramifiées	Desbruyères et Laubier 1988	
Branchipolynoïnae	<i>Branchipolynoe symmytilida</i>	Ramifiées	Pettibone 1984
	<i>Branchipolynoe seepensis</i>	Ramifiées	Pettibone 1986
	<i>Branchipolynoe pettiboneae</i>	Ramifiées	Miura et Hashimoto 1991
Iphioninae	<i>Thermiphionoe tufari</i>	Absentes	Hartman-Shroeder 1992
	<i>Thermiphionoe fijiensis</i>	Absentes	Miura 1994
	<i>Iphionella risensis</i>	Absentes	Pettibone 1985d
Lepidonotopodinae	<i>Lepidonotopodium fimbriatum</i>	Absentes	Pettibone 1983
	<i>Lepidonotopodium williamsae</i>	Absentes	Pettibone 1984a
	<i>Lepidonotopodium riftense</i>	Absentes	Pettibone 1984a
	<i>Lepidonotopodium piscesae</i>	Absentes	Pettibone 1988
	<i>Lepidonotopodium minutum</i>	Absentes	Pettibone 1989a
	<i>Lepidonotopodium atalantae</i>	Absentes	Desbruyères et Hourdez, 2000
	<i>Lepidonotopodium jouinae</i>	Absentes	Desbruyères et Hourdez, accepté
	<i>Thermopolynoe branchiata</i>	Ramifiées	Miura 1994
Macellicephalinae	<i>Levensteiniella kincaidi</i>	Absentes	Pettibone 1985c
	<i>Levensteiniella intermedia</i>	Absentes	Pettibone 1990
	<i>Levensteiniella raisae</i>	Absentes	Pettibone 1989a
	<i>Levensteiniella plicata</i>	Absentes	Hourdez et Desbruyères, sous pr.
	<i>Macellicephaloides alvini</i>	Absentes	Pettibone 1989b
	<i>Bathycatalina filamentosa</i>	?	Pettibone 1994
	<i>Bathylevensteinia bicornis*</i>	Absentes	Pettibone 1993
	<i>Bathykurila guaymasensis</i>	Absentes	Pettibone 1989b
Mecellicephaloidinae	<i>Macellicephaloides galapagensis</i>	Absentes	Pettibone 1985c
Arctonoinae	<i>Parabathynoe brisinga</i>	Absentes	Pettibone 1990
Harmothoinae	<i>Harmothoe globosa</i>	Absentes	Pettibone 1990
	<i>Harmothoe gordae</i>	Absentes	Pettibone 1990
	<i>Harmothoe craigsmithi*</i>	Absentes	Pettibone 1993
	<i>Harmothoe hollisi</i>	Absentes	Pettibone 1989c
	<i>Harmothoe macnabi</i>	Absentes	Pettibone 1985c
	<i>Eunoe alvinella</i>	Absentes	Pettibone 1989c
	<i>Gesiella jameensis*</i>	Absentes	Pettibone 1993
	<i>Natopolynoe kensmithi</i>	Absentes	Pettibone 1985c
	<i>Subadyte mexicana*</i>	Absentes	Pettibone 1993

* espèces décrites de milieu enrichi, non typiquement hydrothermales

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Récolte des animaux

Les animaux ont été récoltés au cours de différentes missions sur des zones d'hydrothermalisme profond sur les Dorsales du Pacifique Oriental et Médio-Atlantique, et dans le Golfe du Mexique.

Les spécimens de *Branchipolynoe symmytilida* ont été récoltés au cours des missions HERO'94 (1994, Dorsale du Pacifique Oriental, 9°50N 104°W et 13°N 104°W) et HOT'96 (1996, mêmes sites), par une profondeur de 2650 m. Les spécimens de *Branchipolynoe seepensis*, quant à eux, ont été récoltés aux cours des missions DIVA2 (1994, Dorsale Médio-Atlantique, site Lucky Strike, 37°N 32°W) et MARVEL (1997, mêmes sites), à une profondeur de 1700 m. Dans les deux cas, les vers ont été récoltés lors de l'échantillonnage de moules (*Bathymodiolus thermophilus* et *B. azoricus*, sur la Dorsale du Pacifique Oriental et sur la Dorsale Médio-Atlantique, respectivement) à l'aide du bras manipulateur du sous-marin habité Nautille ou Alvin.

Les spécimens d'*Alvinella pompejana* ont été récoltés pendant la mission HOT'96 (1996, Dorsale du Pacifique Oriental, 9°50N 104°W et 13°N 104°W), par une profondeur de 2650 m, à l'aide du bras manipulateur du sous-marin habité Nautille.

Les spécimens d'Orbiniidés du Golfe du Mexique ont été récoltés au cours de la mission de Juillet 1998 sur le talus de Louisiane. Ils ont été récoltés en même temps que les moules *Bathymodiolus childressi* au site dit "Brine Pool NR-1" (23°43'24"N 91°16'30"W), à une profondeur de 650 m à l'aide de la pince du sous-marin habité Johnson-Sea-Link I. Les animaux ont ensuite été ramenés à bord du R/V Edwin Link dans une boîte thermiquement isolée fixée sur une plateforme à l'avant du sous-marin. Une fois à bord, ils ont été transférés dans des seaux d'eau de mer froide (8°C) et triés avant d'être transférés dans un aquarium maintenu à 8°C leur étant exclusivement destiné.

II.2.2. Calcul des surfaces branchiales spécifiques

Les surfaces branchiales spécifiques ont été calculées sur des spécimens fixés au formol neutre pour histologie à 10% dans l'eau de mer. Un individu de chaque espèce de *Branchipolynoe* (*B. symmytilida*, *B. seepensis* et *B. pettiboneae*) a été utilisé pour ces calculs. Chaque spécimen a tout d'abord été essuyé le mieux possible en le tamponnant avec du papier absorbant, puis pesé. Les branchies sur 4 parapodes (deux avec élytre, deux sans élytre) ont été coupées à leur base et pesées. Les branchies ont ensuite été découpées en fragments et montées entre lame et lamelle sans compression et en prenant soin de ne pas avoir de parties se recouvrant. Observées à un grossissement constant au microscope optique, leurs contours ont été dessinés à l'aide d'une chambre claire. La surface ainsi dessinée a été mesurée à l'aide d'un planimètre; un carré de 1 mm de côté, dessiné d'après un micromètre objectif dans les mêmes conditions a permis de calculer la surface réelle. En multipliant par π , nous obtenons la surface totale de chaque branchie coupée. Nous pouvons alors calculer un rapport surface/poids pour chacune des branchies. Toutes les branchies restantes ont alors été coupées et pesées. En utilisant le rapport calculé auparavant, nous obtenons la surface branchiale totale du ver et, en divisant par le poids du ver, nous trouvons la surface branchiale spécifique (en cm^2 par g de poids frais = $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$).

Pour l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, plus abondant numériquement, la surface branchiale a été estimée sur 6 individus, ayant des poids de 0,47 à 1,47 g. Ceci a permis d'étudier un éventuel effet de la taille des vers sur la surface branchiale spécifique. La surface dessinée, cette fois, n'a pas été mesurée à l'aide d'un planimètre. Après découpage de la forme dessinée, chaque morceau de papier a été pesé. La projection au même grossissement d'une surface de 1 mm^2 , découpée et pesée a permis de calculer la surface réelle. Le rapport poids des branchies/surface a été calculé pour chaque ver séparément.

II.2.3. Microscopie optique

Les spécimens ont été fixés à bord des navires avec du formol neutre pour histologie (Merck) en solution à 10% dans l'eau de mer et conservés dans cette solution jusqu'à leur utilisation. Une fois au laboratoire, les spécimens ont été coupés (transversalement et sagittalement), déshydratés à l'éthanol puis au toluène et inclus dans la paraffine. Des coupes transversales et parasagittales de 6 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées soit au trichrome en un temps (selon Gabe, 1968), soit à l'hématoxyline de Groot-acide periodique Schiff (APS)-picro-indigo-carmin. Les coupes ainsi colorées ont ensuite été montées à l'histolaque et observées au microscope optique.

II.2.4. Microscopie électronique

Les pièces de *Branchipolynoe* pour microscopie électronique ont été fixées à bord au glutaraldéhyde à 2% dans une solution tampon 0,4 M de cacodylate de sodium pH 7,4. L'osmolarité de la solution fixatrice ainsi que des tampons de rinçage a été ajustée à 1200 mOsm à l'aide de NaCl. Après fixation, les échantillons ont été transférés dans une solution à 5% de formol neutre pour histologie dans l'eau de mer pour leur conservation et leur transport. Une fois de retour au laboratoire, les branchies ont été découpées, rincées et ensuite post-fixées pendant 1 heure dans une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% dans du tampon cacodylate 0,2 M, pH 7,4. Après rinçage au tampon, les pièces ont été déshydratées dans une série d'alcool éthylique de concentration croissante, puis traitées différemment pour les études ultérieures au microscope électronique.

Les pièces d'Orbiniidé pour microscopie électronique ont été fixées au glutaraldéhyde à 3% dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 contenant 0,35 M de sucrose. Les pièces ont été conservées dans ce fixateur à 4°C pendant une période pouvant atteindre 2 semaines. Une fois de retour au laboratoire, les branchies ont été découpées, rincées dans le même tampon phosphate-sucrose et ensuite post-fixées pendant 1 heure dans une solution de tétr oxyde

d'osmium à 1% dans le même tampon. Elles ont ensuite été rincées et déshydratées dans une série d'alcools de concentration croissante.

Pour la microscopie électronique à transmission, les pièces ont ensuite été incluses dans une résine (Epon pour *Branchipolynoe* et Spurr pour l'Orbiniidé) en les imprégnant graduellement (25%, 50%, 75% et 100% de résine). Les branchies ont été laissées dans le dernier bain de résine pendant une nuit puis transférées dans une résine fraîche et mises à l'étuve (48 h à 60°C pour l'Epon et 24 heures à 50°C pour le Spurr). Les pièces ont ensuite été coupées à l'aide d'un ultramicrotome Ultratom III (LKB) et d'un couteau diamant. Les coupes ultrafines obtenues (60 nm), déposées sur des grilles en cuivre, ont été contrastées par l'acétate d'uranyle à 2% en solution alcoolique (50°) puis le citrate de plomb. Elles ont été observées à l'aide d'un microscope Jeol JEM-1200EX.

Pour la microscopie électronique à balayage, les échantillons déshydratés dans l'alcool absolu ont ensuite été traités par la technique du point critique: l'alcool absolu, baignant les échantillons, est graduellement remplacé par du CO₂ liquide. Ce dernier est ensuite évaporé par diminution lente de la pression et augmentation de la température. Après ce traitement les pièces sont entièrement déshydratées et gardent leur forme. Les pièces ont ensuite été recouvertes d'une couche d'or-palladium pour augmenter la quantité d'électrons renvoyés vers le détecteur du microscope électronique à balayage et limiter l'émission d'électron secondaires par l'échantillon ("charge" de l'échantillon). Les pièces ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage Jeol JSM-5200.

II.2.5. Système circulatoire d'*Alvinella pompejana*.

Afin d'étudier plus précisément le système circulatoire au niveau de la poche péri-oesophagienne d'*Alvinella pompejana*, nous avons disséqué deux animaux fixés au formol neutre pour histologie à 10% dans l'eau de mer. La dissection s'est faite par ouverture de la paroi dorsale du corps à peu près au niveau du coeur. En suivant les différents vaisseaux

CHAPITRE II - Adaptations anatomiques -

sanguins, nous nous sommes dirigés vers la partie antérieure du ver, arrivant au ganglion cérébroïde.

II.3. Résultats

II.3.1. Etude de *Branchipolynoe* spp.

III.1.1. Morphologie des branchies

Le corps des trois espèces de *Branchipolynoe* est composé de 21 segments (le premier est achète et les 20 autres sont sétigères). Les segments 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 et 19 portent des élytres. Les branchies sont présentes sur tous les segments sétigères à partir du segment 2 chez *B. symmytilida* et 3 chez *B. seepensis* et *B. pettiboneae* (Pettibone, 1984, 1986; Miura et Hashimoto, 1991) (Figure II.1). Les branchies sont situées sur la face dorsale des parapodes, qu'ils portent des élytres ou non. Elles se présentent sous forme de deux troncs bien séparés émergeant de chaque parapode. Chez toutes les espèces, elles sont ramifiées et portent des fines lignes de cils le long des branches (Figure II.2). Le nombre de ramifications est important (5 ou 6 divisions) chez *B. seepensis* (Figure II.2a) et *B. pettiboneae* alors que ce nombre est plus faible chez *B. symmytilida* (Figure II.2c), où les branches terminales sont longues. Chez *B. symmytilida*, les branchies sont plus grosses et les branches terminales sont de taille relativement constante alors que chez *B. seepensis*, les branches sont de taille différente.

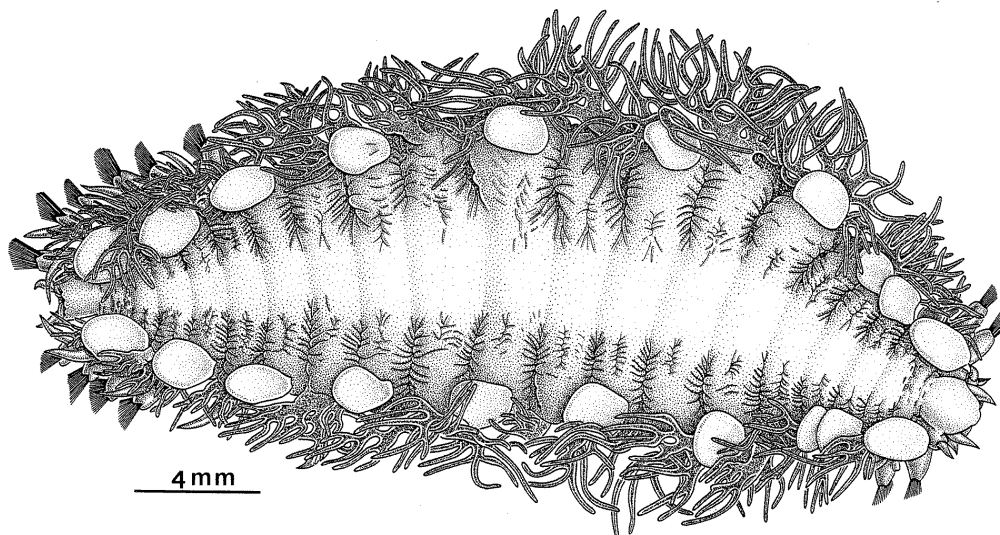


Figure II.1 : Spécimen adulte de *Branchipolynoe symmytilida*, vue dorsale. D'après Desbroyères et Segonzac, 1997.

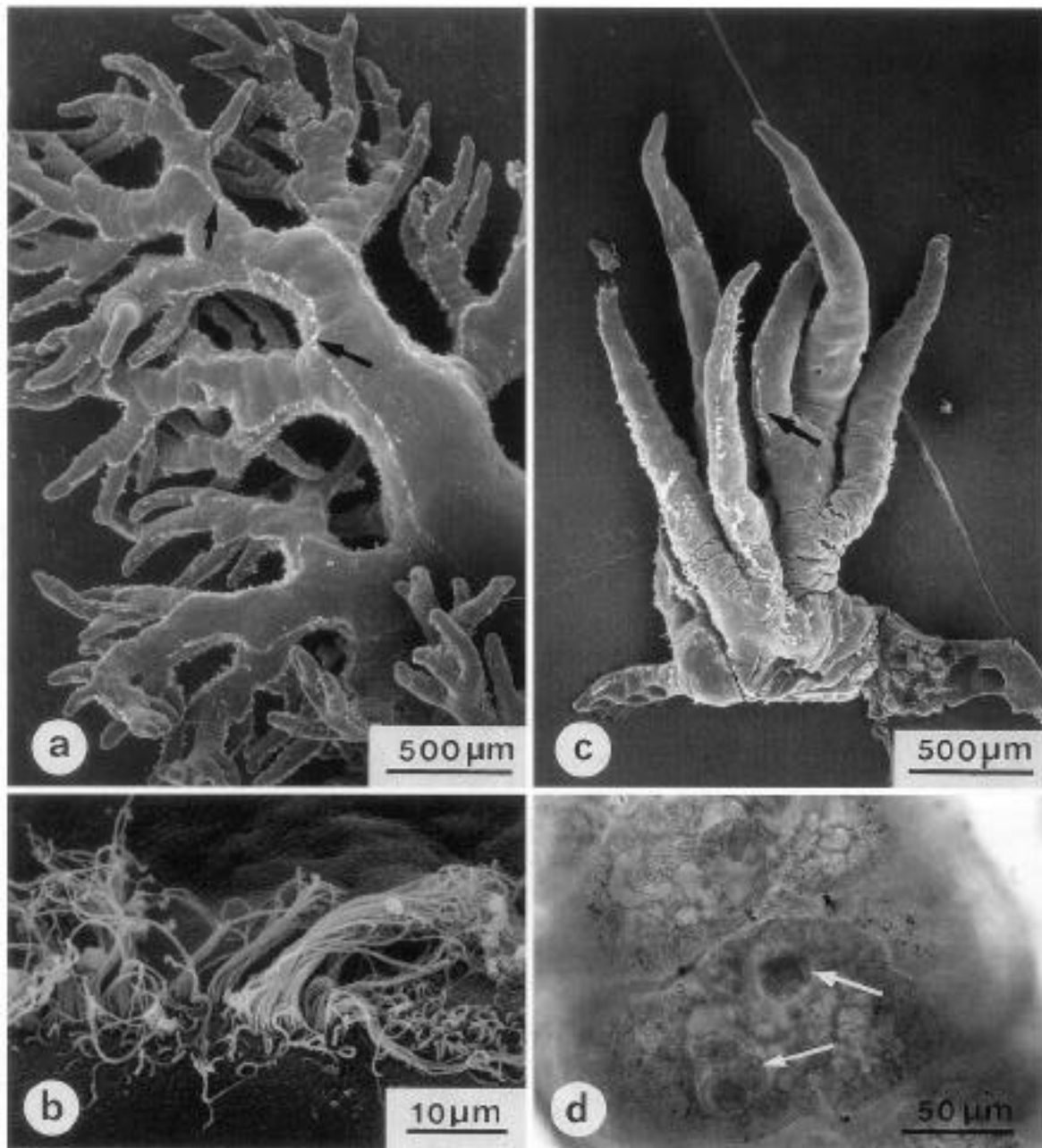


Figure II.2 : Photos de branchies en microscopie électronique à balayage (a-c) et en microscopie photonique (d). **a** Branchie de *Branchipolynoe seepensis*. La flèche indique les bandes de cils. **b** Détail de la ciliature épidermique. **c** Fragment de branchie de *B. symmytilida*. **d** Lysosomes composés de grande taille (flèches) dans une cellule épidermique vacuolaire de branchie de *B. symmytilida*.

II.3.1.1. Surface branchiale spécifique

Les mesures ont été réalisées sur un adulte de chaque espèce. Les valeurs sont données dans le Tableau II.2. *Branchipolynoe symmytilida* présente la plus forte surface branchiale

spécifique avec $14,2 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ poids frais, suivi de *B. seepensis* avec $10,3 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ poids frais et de *B. pettiboneae* avec $7,7 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ poids frais.

Tableau II.2 : Mesures de poids (g), taille (mm), surface branchiale (cm^2) et surface branchiale spécifique ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$ poids frais) obtenues sur un individu adulte de chaque espèce.

Espèce	Poids frais	Longueur	Surface branchiale	Surface branchiale spécifique
<i>B. symmytilida</i>	1,05	38	14,9	14,2
<i>B. seepensis</i>	0,65	33	6,7	10,3
<i>B. pettiboneae</i>	0,86	34	6,6	7,7

II.3.1.2. Ultrastructure des branchies de *Branchipolynoe seepensis*

Seules les coupes réalisées sur des individus de *B. seepensis* sont présentées ici, la qualité de la fixation n'étant pas aussi bonne chez *B. symmytilida* et *B. pettiboneae*. Cependant, les coupes ultrafines chez ces deux espèces ont montré que la structure générale des branchies est la même que chez *B. seepensis*.

L'épiderme branchial mesure de 9 à 12 μm d'épaisseur sur la plupart de la surface mais peut parfois atteindre 30 μm (Figure II.3a). Pour comparaison, l'épaisseur de l'épiderme dorsal varie de 40 à 80 μm . L'épiderme branchial est couvert d'une cuticule très fine (0,5-0,8 μm), traversée par les microvillosités épidermiques dont l'extrémité forme une couche épicuticulaire (sections rondes visibles à la surface de la cuticule) (Figures II.3b, e).

L'épiderme est constitué de cellules de soutien avec un noyau rond, d'environ 7 μm de diamètre, quelques citernes de reticulum endoplasmique et, dans le cytoplasme situé au dessus du noyau, quelques citernes d'appareil de Golgi ainsi que de nombreuses mitochondries à matrice dense (Figures II.3b, c, e). Les cellules épidermiques sont unies entre elles du côté apical par des zonulae adherens; au dessous, les jonctions septées n'ont pas pu être discernées. Des lysosomes secondaires avec un contenu dense aux électrons (environ 1 μm de diamètre)

sont abondants dans ces cellules de soutien ainsi que de gros lysosomes composés d'un diamètre de 12 μm qui semblent résulter de la fusion de lysosomes plus petits (Figures II.3, 4). Ils contiennent des dépôts circulaires denses aux électrons, inclus dans une matrice moins dense. Des éléments de l'appareil de Golgi entourent ces lysosomes composés qui peuvent remplir complètement une grande vacuole dans une cellule probablement en voie d'expulsion à la surface de la branchie. Chez *B. symmytilida* et *B. seepensis*, ces lysosomes peuvent être vus sur des montages *in toto* de branchies et apparaissent comme des grosses vésicules jaunâtres (15-20 μm de diamètre) situées dans des vacuoles épidermiques (jusqu'à 40 μm de diamètre) (Figure II.2). Sur des animaux vivants fraîchement récoltés, des points noirs sur les branchies pourraient correspondre à ces lysosomes composés (observation personnelle).

Des cellules portant des cils d'environ 30 μm de long sont arrangées en lignes longitudinales sur les branches et permettent la circulation de l'eau de la cavité palléale de la moule à la surface des branchies. Les cils émergent de corpuscules basaux sur lesquels sont insérées de longues racines ciliaires (environ 6 μm de long) (Figure II.3c). La partie basale de l'épiderme branchial contient un réseau nerveux (Figure II.3d). Cependant, aucune cellule sensorielle n'a été observée au cours de notre étude. Des espaces intercellulaires gonflés dans la partie basale de l'épiderme correspondent probablement à un choc osmotique lors de la fixation. La lame basale de l'épiderme est séparée de la lame basale de l'épithélium coelomique par une fine couche de matrice extracellulaire (Figures II.3b, d, 4c).

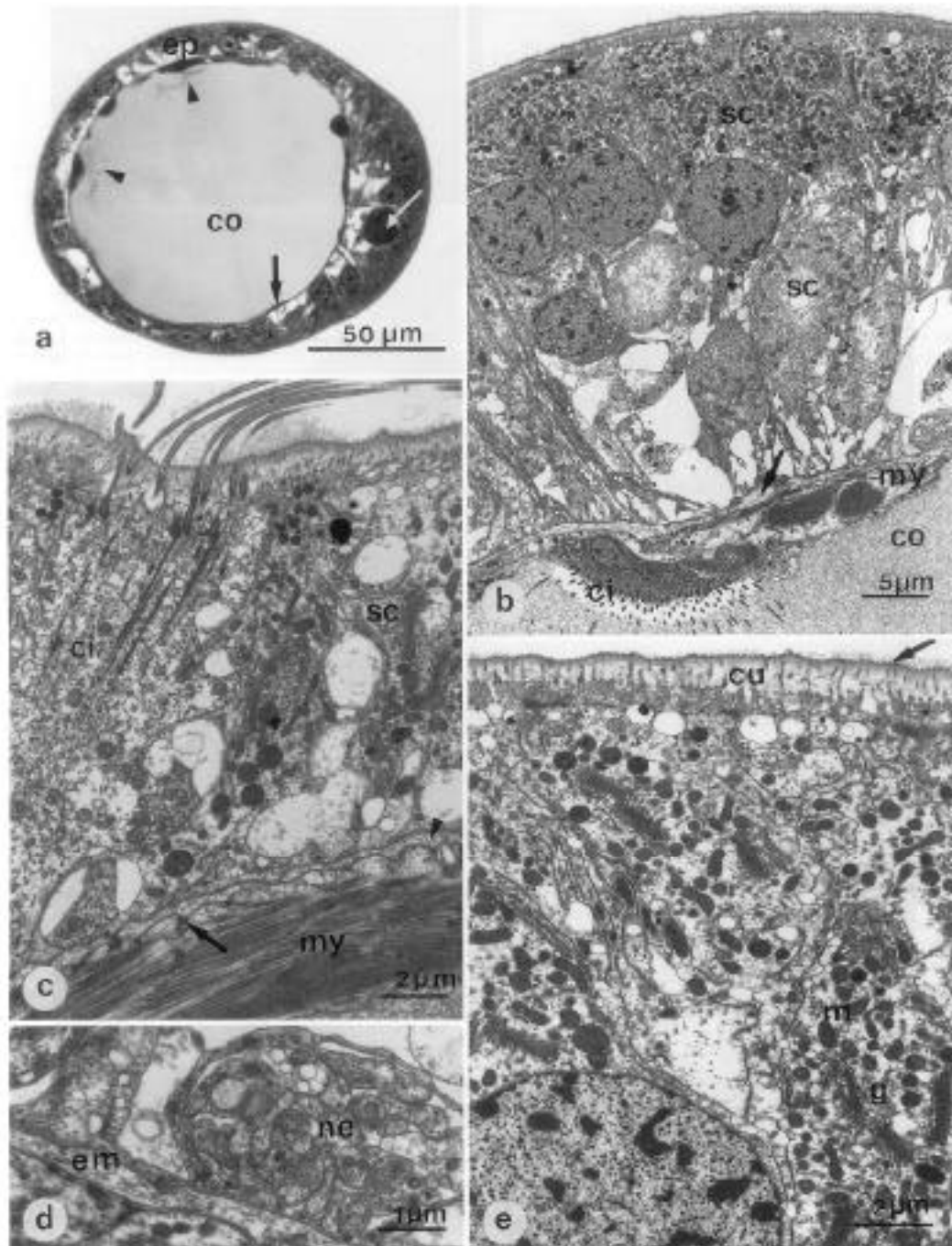


Figure II.3 : *B. seepensis*. **a** Coupe transversale semi-fine d'une ramification branchiale montrant l'épiderme (*ep*), l'épithélium coelomique fin (*flèche*) et la cavité coelomique centrale (*co*), pleine d'un liquide coelomique contenant une hémoglobine extracellulaire. La flèche blanche indique un lysosome composé, les têtes de flèche indiquent les cils. **b** Epiderme branchial, avec les cellules de soutien (*sc*), reposant sur la lame basale de l'épithélium coelomique. Du côté du coelome, les cellules myo-épithéliales (*my*) et ciliées (*ci*) bordent la cavité coelomique (*co*). **c** Cellule épidermique ciliée (*ci*) et cellules de soutien (*sc*). Du côté du coelome, les myofilaments des cellules myo-épithéliales (*my*) sont attachés par des hémidesmosomes (*flèche*) à la membrane cellulaire et à la lame basale. La tête de flèche indique la matrice extracellulaire. **d** Coupe transversale d'un petit nerf (*ne*), avec des neurites de diamètre variable, au niveau de la base de l'épiderme. *em* Matrice extracellulaire. **e** région au dessus du noyau d'une cellule de soutien montrant de nombreuses mitochondries (*m*) avec une matrice dense, un appareil de Golgi bien développé (*g*), et la cuticule (*cu*) traversée par des microvillosités formant une couche épicuticulaire (*flèche*).

CHAPITRE II - Adaptations anatomiques -

Il n'y a pas de système vasculaire dans les branchies, le seul espace correspond à la cavité coelomique qui est bordée par l'épithélium coelomique (Figures II.3b, c, 4c). Cet épithélium est composé de cellules myo-épithéliales et de cellules ciliées. Les cellules myo-épithéliales ont chacune une portion épithéliale mince (0,8 μm d'épaisseur) et une partie musculaire d'épaisseur variable (jusqu'à 6 μm) contenant des myofilaments. Les corps cellulaires font saillie dans la cavité coelomique (Figures II.3b, 4c). Les myofilaments s'attachent par des hémidesmosomes sur la lame basale du myoépithélium. Quelques cellules ciliées apparaissent en 3 ou 4 endroits le long de la paroi coelomique. Ces cellules possèdent de nombreux cils droits, jusqu'à 20 μm de long, se projetant dans la cavité coelomique. Les corps cellulaires contiennent des racines ciliaires ainsi que des mitochondries à matrice dense aux électrons. Quand les deux types de cellules sont présents au même endroit, la cellule ciliée recouvre toujours la cellule myoépithéliale, de telle sorte que les cils se projettent librement dans la cavité coelomique où ils assurent un brassage du liquide coelomique.

Le liquide coelomique se présente comme une substance finement granuleuse, modérément dense aux électrons (Figures II.3b, 4c). Il contient une hémoglobine et les coelomocytes y sont très rares. Cependant, des vésicules rondes (coelomocytes résiduels ?), d'environ 12 μm de diamètre, ont parfois été observées dans les branchies. En microscopie optique, ils apparaissent comme des vésicules remplies d'une substance jaunâtre et ressemblent par leur morphologie aux vésicules contenues dans les cellules vacuolaires de l'épiderme branchial.

La distance de diffusion entre le milieu extérieur et l'hémoglobine contenue dans le liquide coelomique au niveau des branchies est d'environ 10 μm chez *B. symmytilida* et *B. pettiboneae*, et de 7 μm chez *B. seepensis* (Figures II.3a, b, 4a).

L'observation de coupes histologiques et ultrafines, ainsi que d'échantillons pour microscopie électronique à balayage a révélé une structure très similaire chez *B. symmytilida* avec deux types cellulaires dans l'épiderme (cellules de support et cellules ciliées) ainsi que dans l'épithélium coelomique (cellules myo-épithéliales et cellules ciliées). Sur des coupes histologiques de

branchies et au niveau de l'épiderme dorsal des élytres de *B. symmytilida*, de nombreux lysosomes secondaires ont été observés alors qu'ils sont absents de l'épiderme du reste du corps. Tout comme chez *B. seepensis*, les coelomocytes sont très rares. Au cours de cette étude des branchies, nous n'avons pas observé de bactéries dans la cuticule, ni dans l'épiderme ou l'épithélium coelomique de *B. seepensis* et *B. symmytilida*.

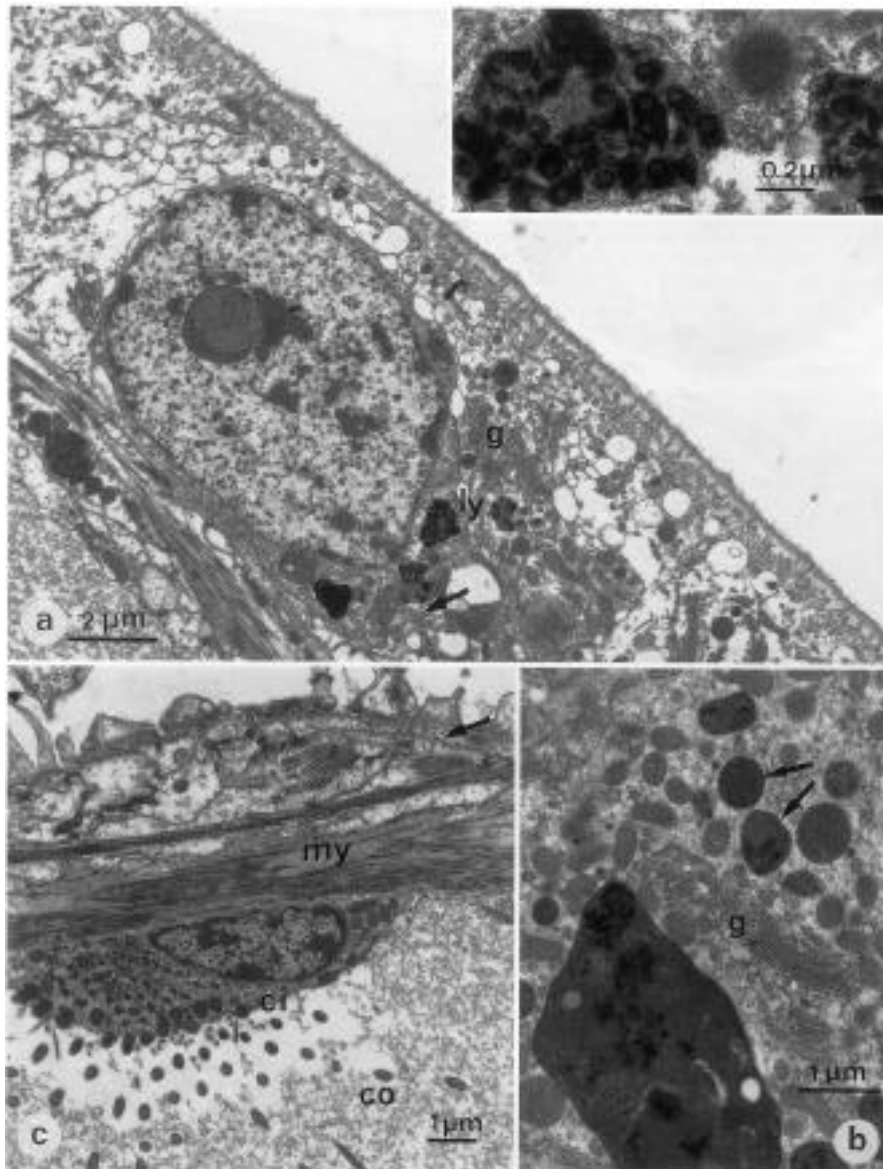


Figure II.4 : *B. seepensis*. **a** Lysosome composé (*ly*), entouré de citernes de reticulum endoplasmique rugueux (*flèche*) et de l'appareil de Golgi (*g*). Insert : Agrandissement de lysosomes contenant des dépôts denses aux électrons et entourés d'une membrane. **b** Au milieu d'une cellule de soutien, plusieurs lysosomes secondaires (*flèches*) avec des inclusions denses aux électrons et un gros lysosome contenant des dépôts similaires, sont entourés par des éléments de Golgi (*g*). **c** Une cellule ciliée (*ci*) de l'épithélium coelomique dépasse dans la cavité coelomique (*co*), et recouvre une cellule myo-épithéliale (*my*). La flèche indique la matrice extracellulaire entre les deux lames basales.

CHAPITRE II - Adaptations anatomiques -

Dans le corps, la cavité coelomique générale dans chaque segment est bien séparée des autres par des septums qui apparaissent très sinueux car ils suivent la surface des caecums digestifs métamériques, expansions latérales de l'intestin, qui sont très ramifiés. La cavité coelomique est remplie d'un liquide coelomique contenant de l'hémoglobine; dans chaque branchie, la cavité coelomique est une extension de la cavité coelomique générale (Figure II.5). L'épithélium bordant cette cavité générale possède aussi des touffes de cils qui aident à la circulation du liquide coelomique.

Le système vasculaire est très réduit chez les trois espèces de *Branchiopolynoe*. Il est typiquement constitué de deux vaisseaux longitudinaux, un ventral, un dorsal et de vaisseaux métamériques transversaux. Il y a une légère dilatation du vaisseau dorsal à la limite estomac/oesophage, qui pourrait être un coeur permettant d'accroître le flux de sang vers la partie antérieure de l'animal. Les vaisseaux métamériques sont présents à la surface de l'intestin et dans les septums.

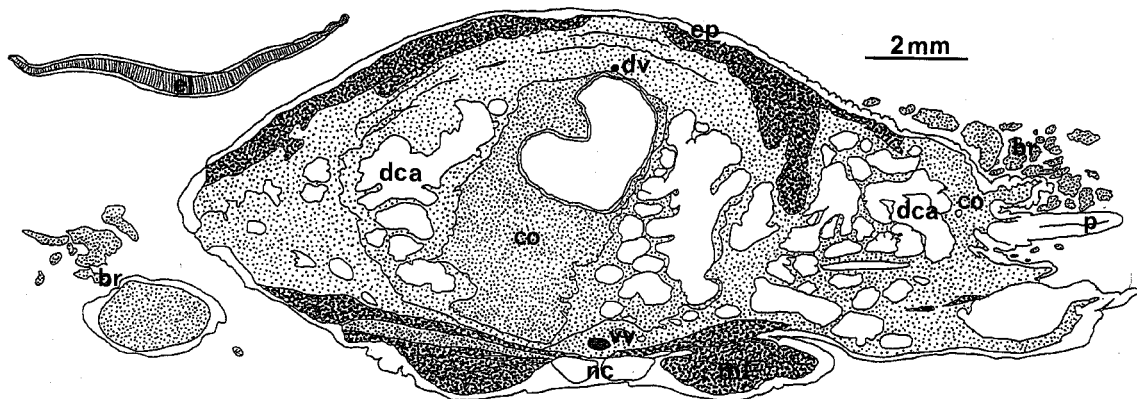


Figure II.5 : *B. symmytilida*. Dessin d'une coupe histologique transversale du corps. En dessous de la paroi du corps avec son épiderme (*ep*), sa couche de muscles (*ml*) et la chaîne nerveuse (*nc*), on trouve un vaste compartiment coelomique (*co*), contenant une hémoglobine extracellulaire, et un système vasculaire réduit contenant du sang (*dv*, vaisseau dorsal; *vv*, vaisseau ventral). Les caecums digestifs ramifiés (*dca*) s'étendent dans la cavité coelomique. Les branchies (*br*) s'étendent latéralement à partir des parapodes (*p*). On peut aussi voir une élytre (*el*).

II.3.2. Etude de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique

II.3.2.1. Morphologie générale du ver

L'Orbiniidé du Golfe du Mexique dont l'espèce n'est pas encore décrite à ce jour peut atteindre 150 mm de long, pour environ 290 segments. Ses branchies situées latéro-dorsalement le long du corps, très développées dans sa partie antérieure, forment un chevelu dense (Figure II.6), plus réduit dans la partie postérieure du corps. Les branchies s'étendent le long du corps depuis le segment 6 (sétigère 5). Les branchies antérieures (segments 6-90) sont plus développées et complexes que les branchies postérieures (segments 90-290), plus petites.

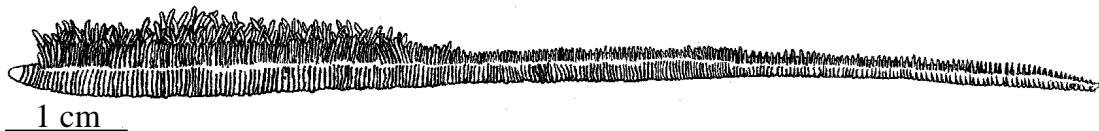


Figure II.6 : Morphologie générale de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique. La partie antérieure est à gauche.

II.3.2.2. Morphologie des branchies.

Les branchies antérieures sont grandes, chaque branchie comprenant 4 à 5 branches à peu près cylindriques qui naissent d'un tronc unique rattaché à la paroi du corps latérodorsalement au dessus des parapodes (Figure II.7). Sur les branchies les plus antérieures, les branches peuvent se diviser à leur extrémité alors que les branchies plus postérieures ne se redivisent pas. Chaque branche mesure de 1,3 à 3 mm de long dans cette partie du corps et possède deux rangées longitudinales de cils diamétralement opposées (Figures II.7A, C, E). Par ailleurs, l'épiderme du ver n'est pas cilié dans cette région du corps.

Les branchies postérieures sont plus petites, plus aplaties, et seulement deux branches (une grande et une petite) naissent de la division du tronc qui sort au dessus des parapodes. Les branches mesurent de 0,5 à 1 mm de long et ne sont pas ciliées (Figures II.7B, D, F).

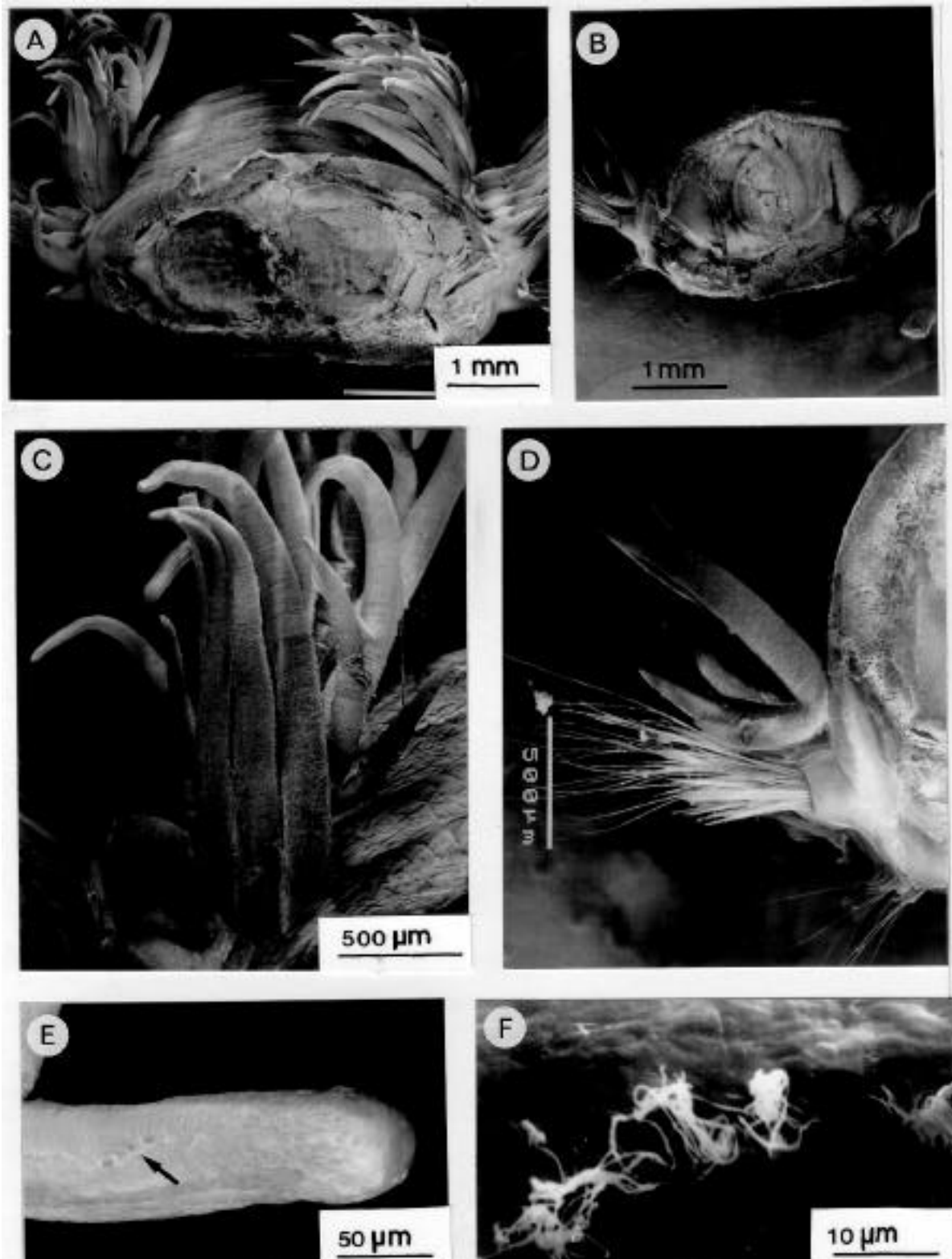


Figure II.7 : Branchies d'Orbiniidé observées en microscopie électronique à balayage. **A** Morceau de la partie antérieure du corps. **B** Morceau de la partie postérieure du corps. **C** Détail de A montrant les branchies antérieures très développées. **D** Détail de B montrant les branchies postérieures, moins développées. **E** Extrémité d'une branchie antérieure. La flèche indique une bande ciliée. **F** Détail des cils sur l'extrémité d'une branchie antérieure.

II.3.2.3. Surface branchiale spécifique.

La surface branchiale spécifique varie de 5,03 à 9,88 cm² g⁻¹ de poids frais pour des animaux respectivement de 0,48 à 1,47 g poids frais. Il y a une tendance à une augmentation de la surface spécifique avec le poids frais de l'animal ($p < 0.1$) (Figure II.8). Les branchies antérieures (segments 6-90) représentent la majorité de cette surface; les branchies postérieures, situées sur les 200 segments restants, ne représentent que 5 à 10% de la surface totale.

II.3.2.4. Ultrastructure des branchies

La figure II.9 est un montage mosaïque d'images de microscopie électronique à transmission d'une coupe transversale de branchie antérieure. Deux vaisseaux sanguins sont présents; l'un est central, bordé par l'épithélium coelomique et accolé au nerf, l'autre est intra-épidermique et plus superficiel. Le sang vasculaire contient une hémoglobine extracellulaire, modérément dense aux électrons. La distance de diffusion la plus courte entre le sang et le milieu extérieur est de 20 µm pour le vaisseau central et de 3 µm pour le vaisseau intra-épidermique

Figure II.8 : Variation de la surface branchiale spécifique de l'Orbiniidé en fonction du poids frais de l'animal.

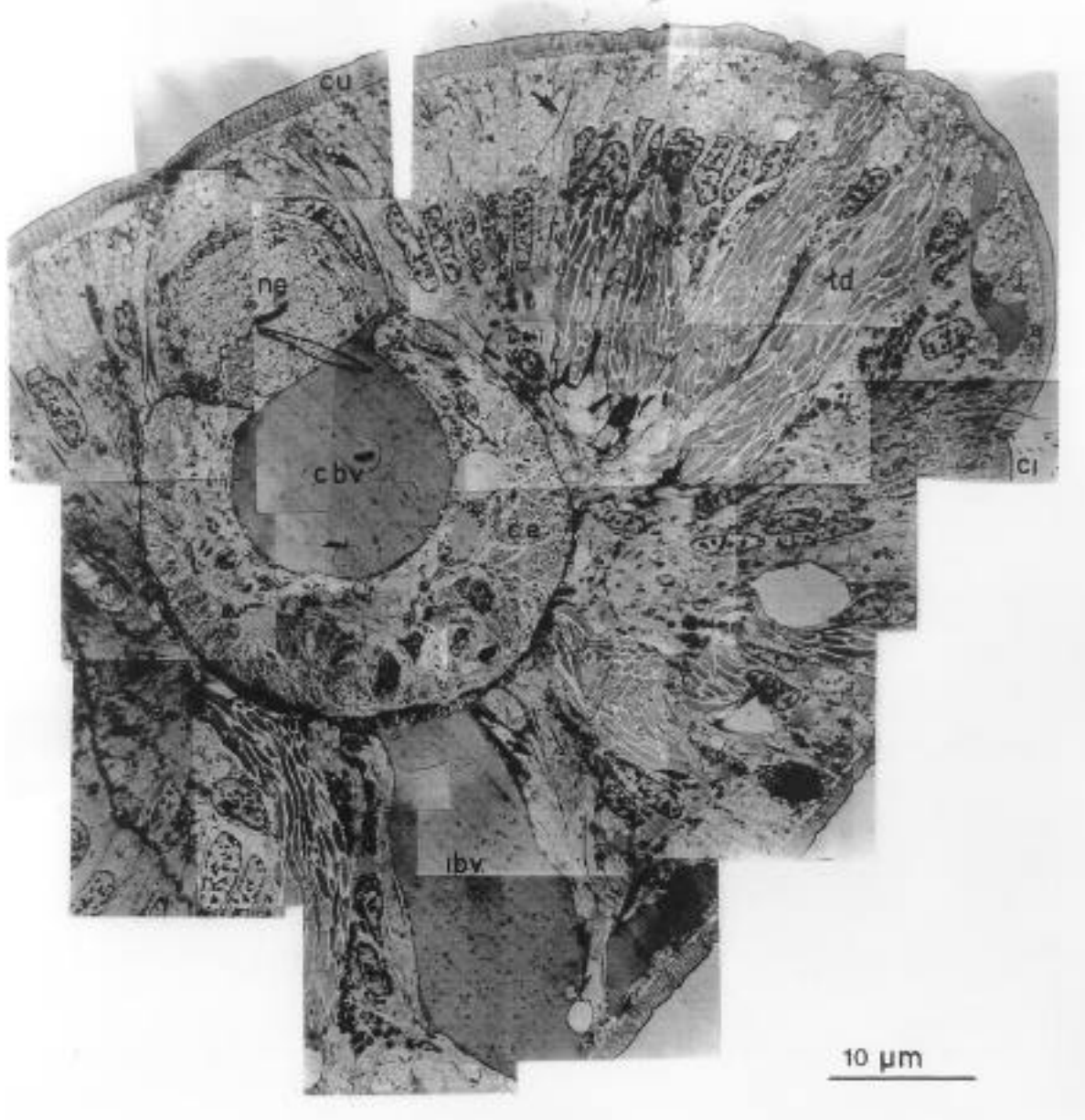


Figure II.9 : Montage mosaïque d'une coupe transversale dans une branchie antérieure de l'Orbiniidé. On voit deux vaisseaux sanguins (intraépidermique (*ibv*) et central (*cbv*)), séparés par l'épithélium coelomique (*ce*). *td* cellule piriforme; *cu* cuticule; *ci* cils. Les flèches indiquent les tonofilaments.

L'épithélium coelomique est un myo-épithélium et contient trois types de cellules (Figure II.10B). La couche de cellules la plus proche de l'épiderme contient des myofilaments longitudinaux (coupés transversalement ici) alors que les cellules de la couche interne contiennent des tonofilaments (Figure II.10B). Un troisième type cellulaire contenant des granules denses aux électrons est présent parmi les cellules contenant des tonofilaments ainsi

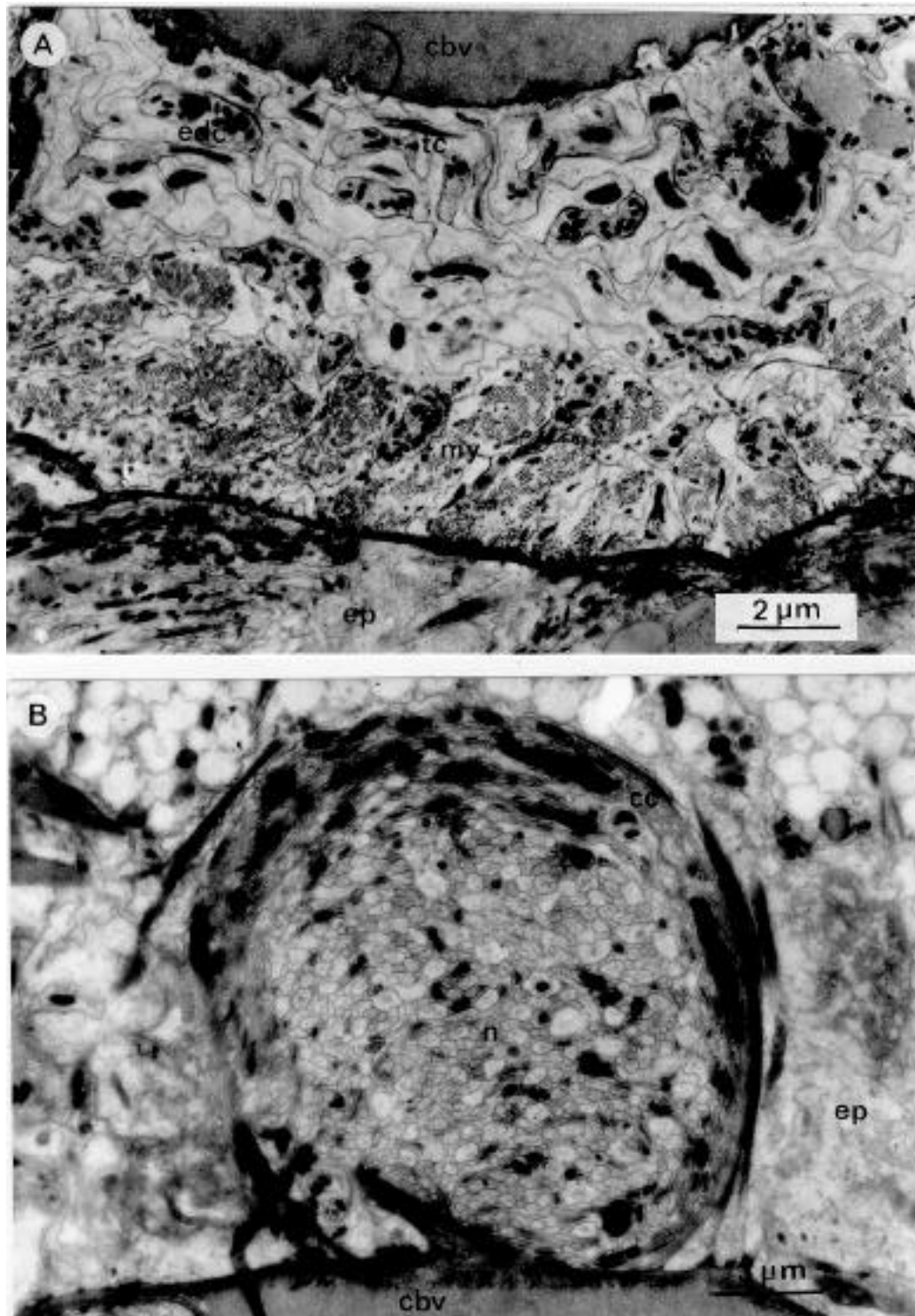


Figure II.10 : Détails d'une branchie antérieure de l'Orbiniidé. **A** Epithélium coelomique montrant les trois types de cellules. Le myoépithélium (*my*), proche de l'épiderme (*ep*), les cellules contenant des tonofilaments (*tc*), plus proches du vaisseau sanguin central (*cbv*) et les cellules avec des granules denses (*edc*). **B** Nerf avec ses neurites (*n*). *cbv* Vaisseau sanguin central; *cc* cellules corticales; *ep* épiderme.

que parmi les cellules musculaires. Les deux lames basales de l'épiderme et de l'épithélium coelomique sont accolées.

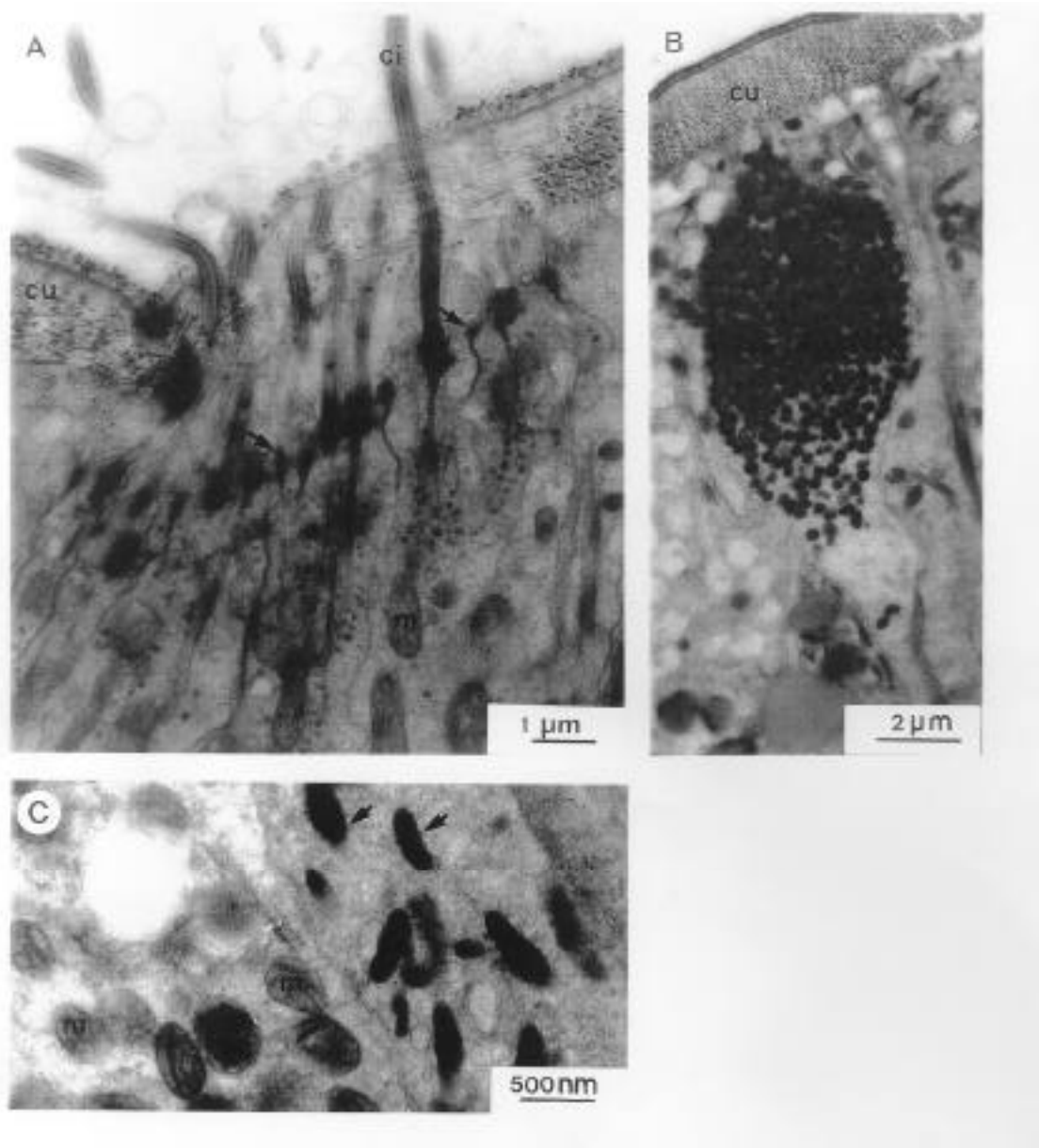


Figure II.11 : Détails d'une branche antérieure de l'Orbiniidé. **A** Apex d'une cellule épithéliale ciliée. On voit les racines (*r*) des cils (*ci*), de nombreuses mitochondries et des zonulae adherens (flèches). *cu*, cuticule. **B** Groupe de granules denses aux électrons (granulocytes de type II ?), proches de la cuticule (*cu*), traversant l'épiderme. **C** Granules denses aux électrons, avec leur double membrane (flèches), et mitochondries (*m*) dans l'épiderme.

Un seul nerf (15 μm de diamètre) est présent dans l'épiderme, en contact avec le vaisseau sanguin central (Figures II.9, 10B). Il contient de nombreux axones, et est enveloppé par des prolongements cellulaires contenant des granules denses aux électrons qui seraient probablement des cellules gliales.

L'épiderme est composé de cellules de soutien traversées de tonofilaments et contenant de nombreuses mitochondries dans leur partie apicale. Deux groupes de cellules ciliées sont diamétralement opposés sur la branchie, correspondant aux lignes longitudinales observées en microscopie électronique à balayage (Figure II.7). Les cils ont de longues racines striées (4 μm), avec de nombreuses mitochondries à proximité (Figure II.11). Les cellules sont unies dans leur région apicale par des zonulae adherens. Des cellules piriformes peu denses aux électrons sont aussi présentes dans l'épiderme (Figure II.7). Elles contiennent des paquets de matériel légèrement filamenteux, clair aux électrons, et correspondent probablement à des cellules muqueuses.

L'épiderme branchial est recouvert d'une cuticule de 2 μm d'épaisseur, traversée par des microvillosités dont l'apex forme une couche épicuticulaire (Figures II.11A, B). Entre les microvillosités, le réseau de fibres de collagènes coupées longitudinalement et transversalement est bien visible. Sur aucune des coupes examinées, des bactéries n'ont été observées dans l'épiderme ou dans la cuticule.

Des granules denses aux électrons, de taille semblable aux mitochondries (500x200 nm), mais de forme plus allongée sont présents dans les cellules épidermiques (Figure II.11C). Ces inclusions sont parfois trouvées en plus gros agrégats, rappelant les granulocytes de type II (Gardiner, 1992), et semblant traverser l'épiderme (Figure II.11B). De nombreuses mitochondries sont trouvées à proximité de ces inclusions denses aux électrons et proche de la partie apicale des cellules épidermiques (Figure II.11).

Les branchies postérieures présentent le même type d'organisation (Figure II.12): deux vaisseaux sanguins, ayant, à la différence des branchies antérieures, une position presque identique entre l'épiderme et l'épithélium coelomique. Un nerf est aussi en contact avec le vaisseau sanguin central, dans l'épiderme. Cependant, la plus courte distance de diffusion entre le milieu extérieur et le sang est de 20 μm pour le vaisseau intra-épidermique et 35 μm pour le vaisseau central. L'espace entre les deux vaisseaux sanguins est réduit ici (environ 1 μm). Les deux couches de cellules de l'épithélium coelomique apparaissent ici bien séparées par une petite

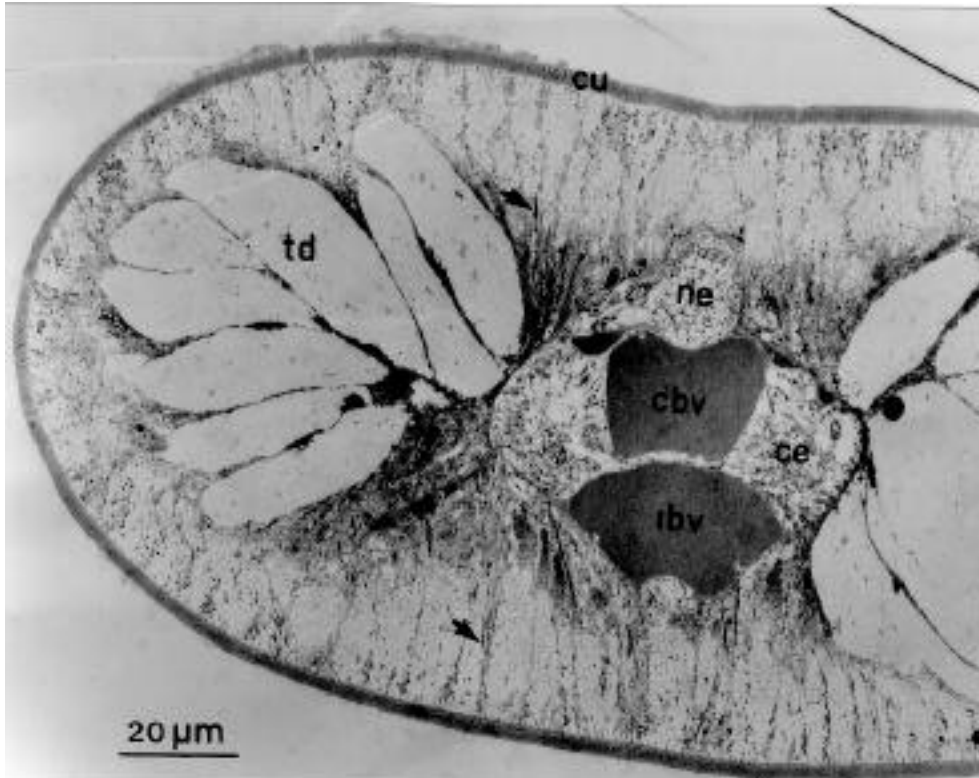


Figure II.12 : Coupe transversale d'une branchie postérieure de l'Orbiniidé. On voit les deux vaisseaux sanguins (intraépidermique *ibv* et central *cbv*), le nerf (*ne*), l'épithélium coelomique (*ce*), les cellules piriformes (*td*), la cuticule (*cu*) et les tonofilaments (*flèches*)

cavité coelomique (Figure II.12). On trouve aussi des cellules piriformes dans les branchies postérieures. Aucune cellule ciliée n'a été observée sur les coupes de branchies postérieures, ce qui confirme que leur absence au microscope électronique à balayage n'est pas un artefact.

II.3.2.5. Anatomie du système circulatoire branchial

Sur des animaux de petite taille, la paroi fine du corps nous avons permis d'observer que le sang est propulsé vers l'avant de l'animal par le vaisseau dorsal. Des coupes histologiques transversales du corps et des dissections ont permis de préciser les relations des vaisseaux branchiaux avec les vaisseaux sanguins principaux (dorsal et ventral) (Figure II.13). Dans tous les segments, le vaisseau central des branchies est connecté au vaisseau dorsal par des vaisseaux segmentaires (= vaisseaux afférents) et le vaisseau intraépidermique des branchies est connecté au vaisseau ventral par l'intermédiaire de vaisseaux segmentaires (= vaisseaux efférents). Cette organisation est conservée tout le long du corps.

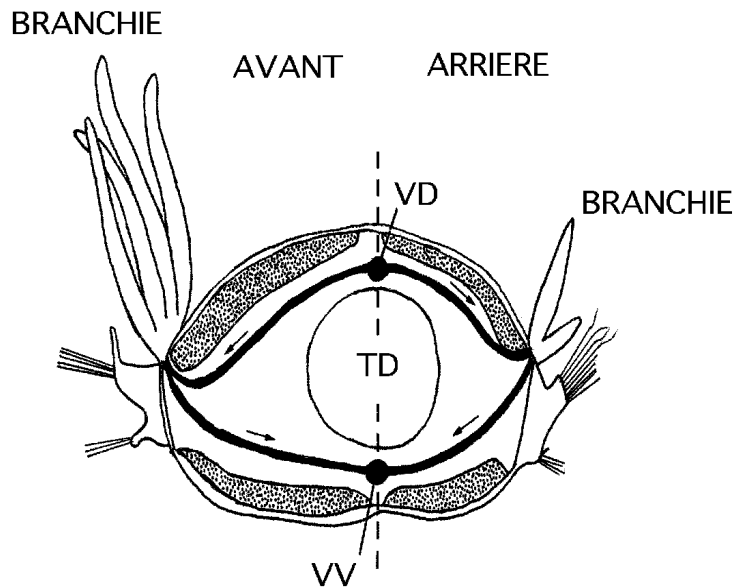


Figure II.13 : Dessin schématique de la circulation sanguine au niveau des segments de l'Orbiniidé dans la partie antérieure (à gauche) et postérieure du corps (à droite). *VD*, vaisseau dorsal; *VV*, vaisseau ventral; *TD*, tube digestif.

II.3.3. Etude du système circulatoire de la partie antérieure d'*Alvinella pompejana*

En disséquant *Alvinella pompejana* dans sa partie antérieure, nous avons pu suivre les différents vaisseaux sanguins de cette région pour en établir les relations (Figure II.14). Au niveau de la jonction oesophage-estomac, le vaisseau dorsal se sépare en un coeur et un vaisseau sus-oesophagien, de plus petite taille et collé à l'oesophage. Ces deux vaisseaux traversent la paroi d'une poche formée par l'expansion d'un dissépinement des premiers segments vers l'arrière du corps. Dans sa partie antérieure, le coeur donne naissance à 4 paires de vaisseaux branchiaux afférents qui alimentent les 4 paires de branchies en sang. De ces branchies partent des vaisseaux efférents qui se réunissent ventralement pour former le début du vaisseau ventral. Le vaisseau sus-oesophagien se ramifie à la fois dans sa partie antérieure, au niveau du ganglion cérébroïde, et dans sa partie postérieure, au niveau du réseau de capillaires. Du ganglion cérébral, un vaisseau efférent rejoint le sinus formé par la réunion des vaisseaux efférents branchiaux. De ce sinus sort le vaisseau sous-oesophagien qui rejoint la face ventrale de l'oesophage et se ramifie dans la partie postérieure de la poche péri-oesophagienne.

CHAPITRE II - Adaptations anatomiques -

Nous avons donc deux circuits de circulation dans cette partie du corps, l'un alimentant les branchies et un autre, formant un "shunt" du premier et alimentant la partie antérieure de l'animal et notamment le ganglion cérébral.

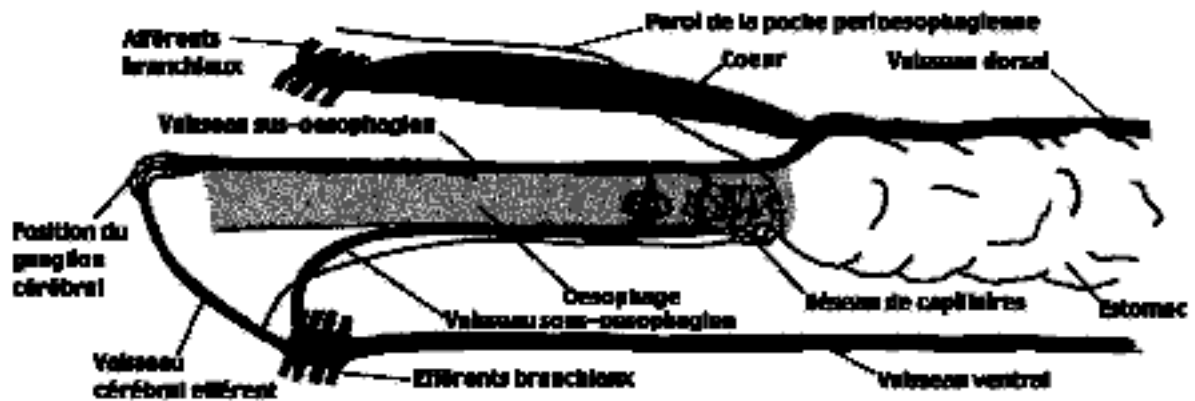


Figure II.14 : Dessin schématique du système circulatoire dans la partie antérieure du corps d'*Alvinella pompejana*.

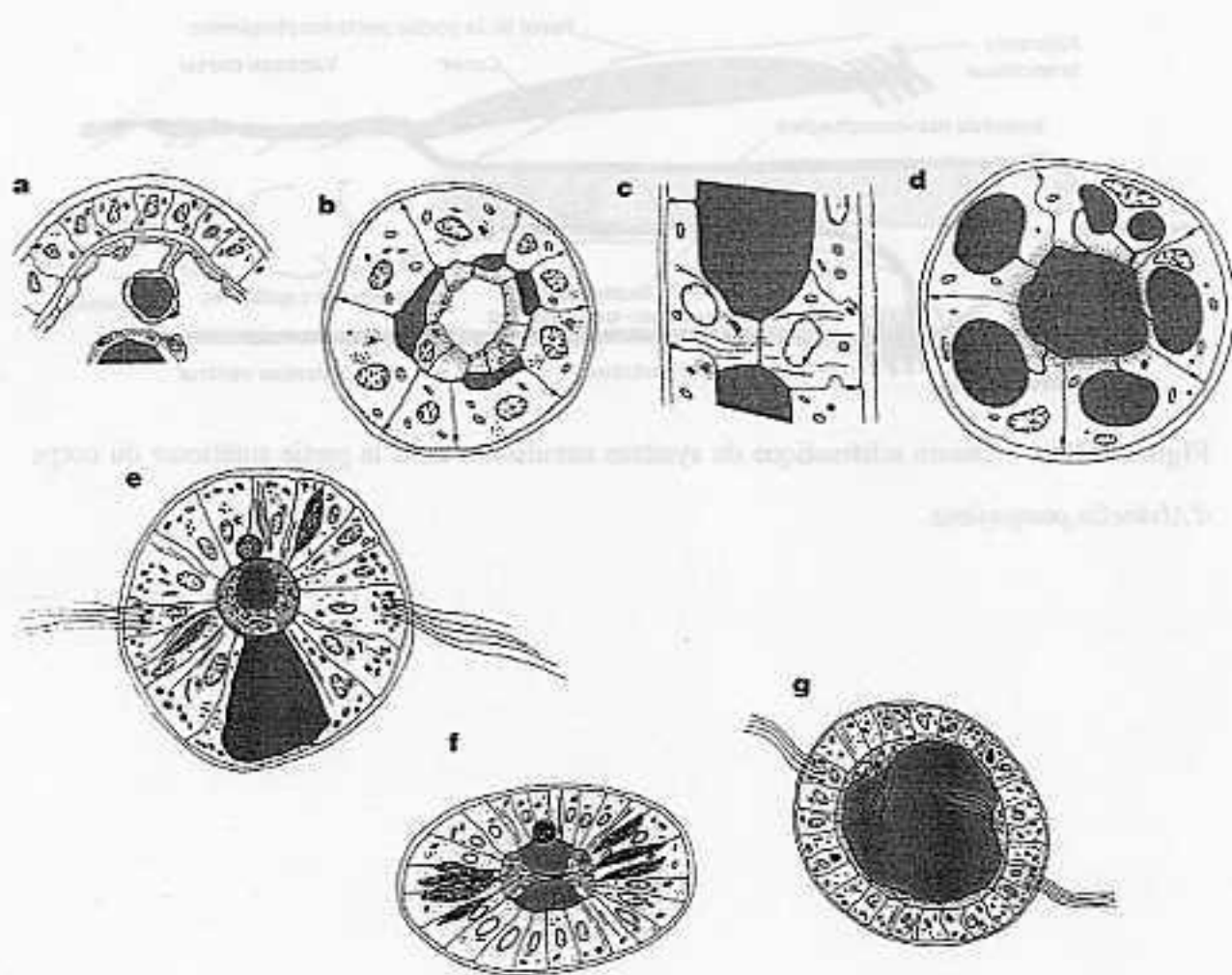


Figure II.15 : a-d Les différents types de structure de branchies selon Storch et Alberti (1978) (voir texte). e Branche antérieure de l'Orbiniidé. f Branche postérieure de l'Orbiniidé. g Branche de *Branchipolynoe*. Les espaces grisés correspondent aux espaces contenant de l'hémoglobine (vaisseaux sanguins pour a-f et cavité coelomique pour g).

II.4. Discussion.

II.4.1. Structure générale des branchies.

Storch et Alberti (Storch et Alberti, 1978) ont proposé une classification des "branchies véritables" des Polychètes. Par "branchies véritables", ces auteurs entendent les branchies possédant des vaisseaux sanguins. Ils distinguent 4 grands types de branchies à partir des espèces qu'ils ont étudiées (Figure II.15) :

- **type a-** branchies avec des vaisseaux sanguins vrais, bordés par un myo-épithélium coelomique, sans contact direct du sang avec l'épiderme (Figure II.15a)
- **type b-** branchies avec des vaisseaux sanguins en partie ouverts, limités par le myo-épithélium coelomique et par l'épiderme (Figure II.15b)
- **type c-** branchies avec des espaces sanguins directement sous l'épiderme, non limités par un myo-épithélium coelomique (Figure II.15c)
- **type d-** branchies sans myo-épithélium coelomique, avec des espaces sanguins intra-épidermiques (Figure II.15d).

Dans cette classification, les branchies de *Glycera* ne se trouvent pas représentées car elles ne contiennent pas de vaisseau sanguin mais une cavité coelomique dans laquelle se trouve l'hémoglobine. C'est aussi le cas de *Branchipolynoe* (Figure II.15e). Les branchies dans les deux cas correspondent à des expansions de la paroi du corps dont l'épiderme est aminci et dans lesquelles pénètre la cavité coelomique. *Glycera* et *Branchipolynoe* diffèrent par le fait que l'hémoglobine est intracellulaire chez la première alors qu'elle est extracellulaire chez la deuxième. Toutes deux possèdent des cils à l'intérieur des branchies pour faire circuler le liquide coelomique.

L'Orbiniidé du Golfe du Mexique a des branchies de type b modifiées. Dans les branchies antérieures (Figure II.15f), la cavité coelomique a complètement disparu, les deux feuillets coelomiques se trouvent accolés et diffèrent pas leurs types cellulaires (cellules musculaires en

contact avec l'épiderme et cellules à tonofilaments en contact avec le sang). Dans les branchies postérieures (Figure II.15g), la cavité coelomique est réduite mais présente entre les deux feuillets. Dans les branchies antérieures et postérieures de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, il n'y a que deux vaisseaux, l'un afférent (le vaisseau central) et l'autre efférent (le vaisseau intraépidermique). Les Alvinellidés ont aussi une structure de type b (avec une cavité coelomique centrale) et les vaisseaux principaux se ramifient en boucles intra-épidermiques (Jouin and Gaill, 1990).

II.4.2. Ultrastructure des branchies

La finesse de la cuticule branchiale de *Branchipolynoe* (0,5-0,8 μm), comparée à celle des espèces libres comme l'Orbiniidé (2 μm), *Alvinella pompejana* (1,5 μm), *Paralvinella grasslei* (2-3 μm) et *Arenicola marina* (3 μm) (Jouin et Toulmond, 1989; Jouin et Gaill, 1990), est une caractéristique qui favorise la diffusion des gaz mais qui est plus probablement à mettre en relation avec le mode de vie en commensal étant donné que d'une manière générale toute la cuticule corporelle de *Branchipolynoe* est plus fine que celle des espèces libres. Comme chez toutes les annélides étudiées à ce jour, l'épiderme ne présente pas les caractéristiques d'un épithélium transporteur (Gardiner, 1988; Storch et Alberti, 1978; Jouin et Toulmond, 1989) et les branchies ont donc uniquement un rôle respiratoire, à la différence des branchies de crustacés par exemple qui ont à la fois un rôle respiratoire, osmorégulateur et excréteur (Mangum, 1994).

Chez les Orbiniidés, la distance de diffusion entre le sang et le milieu environnant peut être réduite à 3 μm seulement, ce qui facilite la diffusion des gaz. Cette très petite barrière est due à la présence de vaisseaux intra-épidermiques, semblables à ceux observés chez les Alvinellidés (Jouin et Gaill, 1990) et chez *Amphitrite ornata* et *Pectinaria gouldii* (Gardiner, 1992). Cependant, chez ces espèces, ce sont de petites ramifications du vaisseau branchial principal qui sont intra-épidermiques alors que chez l'Orbiniidé, c'est l'un des deux vaisseaux qui est intra-épidermique. Le vaisseau sanguin central est séparé du milieu extérieur par une barrière de 20

Tableau II.3 Comparaison des caractéristiques fonctionnelles des branchies de différentes espèces de Polychètes.

Espèce	Type de branchie	Type d'hémoglobine	Surface branchiale spécifique (cm ² .g ⁻¹ PF)	Distance diffusion minimale (µm)
<i>Branchipolynoe symmytilida</i>	Coelomique, ramifiée	Extracellulaire	14,2 ^a	10
<i>Branchipolynoe seepensis</i>	Coelomique, ramifiée	Extracellulaire	10,3 ^a	9
<i>Branchipolynoe pettiboneae</i>	Coelomique, ramifiée	Extracellulaire	7,7 ^a	10
<i>Glycera convoluta</i>	Coelomique, non ramifiée	Intracellulaire	1,5-2	?
<i>Paralvinella grasslei</i>	Vasculaire (filaments)	Extracellulaire	47 ^{a,b}	4
<i>Alvinella pompejana</i>	Vasculaire (lamelles)	Extracellulaire	12 ^{a, b}	1-3
<i>Arenicola marina</i>	Vasculaire, ramifiée	Extracellulaire	4 ^c	8-14
Orbiniidé	Vasculaire, ramifiée	Extracellulaire	8	4

^a Espèces hydrothermales, ^b Jouin et Gaill (1990), ^c Jouin et Toulmond (1989)

µm, ce qui correspond à une position "normale" pour une branchie de polychète (Storch et Alberti, 1978).

Des nerfs branchiaux ont été observés chez les deux groupes de polychètes étudiés, mais aucun récepteur sensoriel n'a pu être mis en évidence au cours de cette étude. Les nerfs pourraient contrôler la contraction des muscles de l'épithélium coelomique et, par là, l'extension des branchies dans l'eau. Nous avons observé que lorsque les Orbiniidés sont dérangés, tout le corps se contracte, y compris les branchies.

II.4.3. Surface branchiale spécifique.

La présence de branchies est un caractère inhabituel chez les Polynoidés, puisqu'on ne les observe que chez certaines espèces hydrothermales. Les trois espèces de *Branchipolynoe*, ainsi que l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, ont une surface branchiale spécifique élevée, comparable à celle d'*Alvinella pompejana* (Jouin et Gaill, 1990) et plus importante que celle d'*Arenicola marina* (espèce littorale; Jouin and Toulmond, 1989) (Tableau II.3). Cependant, la distance de diffusion reste élevée pour *Branchipolynoe* alors qu'elle est réduite pour le vaisseau intra-épidermique des branchies antérieures de l'Orbiniidé. Ses branchies postérieures et le vaisseau central des branchies antérieures ont une distance de diffusion relativement élevée, comparable à celle des branchies d'*Arenicola marina* (Tableau II.3). Les valeurs données dans cette étude sont très probablement des sous-estimations des valeurs réelles car les animaux n'ont pas été anesthésiés avant leur fixation au formol et une contraction musculaire a probablement eu lieu. Toutes les espèces hydrothermales ainsi que l'Orbiniidé, qui vit dans un milieu hypoxique, ont des surfaces branchiales spécifiques qui sont les plus élevées publiées à ce jour. Cette particularité directement liée à une augmentation des échanges gazeux pourrait être une adaptation à un milieu hypoxique. De telles branchies hypertrophiées ont aussi été observées chez plusieurs espèces d'Ampharetidés (Terebellida) vivant dans un environnement hypoxique de la côte de l'Afrique de l'ouest (Fauvel, 1958).

II.4.4. Aspect fonctionnel : échanges gazeux.

Les trois espèces de *Branchipolynoe* étudiées ont en commun une réduction des élytres. Chez les polynoidés littoraux, dépourvus de branchies, les élytres sont utilisées pour faire circuler l'eau à la surface du corps qui sert de surface d'échanges gazeux (Lwebuga-Mukasa, 1970). *Branchipolynoe* se trouve en permanence dans un courant d'eau entretenu par la ciliature branchiale de la moule et celle du ver. Ceci pourrait expliquer la taille réduite des élytres chez ces espèces commensales. Chez les espèces non commensales, les élytres sont généralement épaisses et auraient un rôle de protection contre les prédateurs. La cavité palléale de la moule est un lieu protégé, autorisant donc un développement plus limité de ces organes. Une petite taille des élytres est aussi observée chez d'autres espèces de Polynoidés commensales : *Arctonoe vittata*, *Lepidasthenia mossambica*, *L. microlepis* et *L. stylolepis* (Martin et Britayev, 1998). Chez cette dernière espèce, les élytres sont à peine discernables.

Sur des Orbiniidés vivants, la fine paroi du corps des petits spécimens permet de voir les principaux vaisseaux sanguins par transparence. Comme chez les autres polychètes, le sang est poussé vers l'avant dans le vaisseau dorsal. Cette observation nous permet de proposer un sens dans la circulation sanguine branchiale. A partir du vaisseau dorsal, le sang passe dans le vaisseau branchial central qui serait ainsi le vaisseau afférent; le sang quitte les branchies, chargé en oxygène, par le vaisseau intra-épidermique efférent et rejoint le vaisseau ventral. En suivant ce trajet, dans les branchies, le sang est ainsi exposé en dernier dans le vaisseau efférent à la plus petite distance de diffusion, ce qui permet des échanges gazeux efficaces.

Bien que la structure générale des branchies antérieures et postérieures soit semblable, les différences observées ont sûrement une répercussion sur les échanges gazeux qui peuvent se produire soit à l'avant, soit à l'arrière du corps des Orbiniidés. Bien que les deux types de branchies semblent fonctionnels, plusieurs aspects de la morphologie et de l'ultrastructure des branchies antérieures suggèrent qu'elles sont probablement plus importantes pour le transport de l'oxygène que les branchies postérieures. Tout d'abord, la distance de diffusion entre le milieu environnant et le sang est beaucoup plus réduite dans les branchies antérieures que dans les

postérieures. Deuxièmement, 90-95% de la surface branchiale totale est représentée par les branchies antérieures. Enfin, les cils des branchies antérieures permettent probablement de renouveler l'eau à la surface de l'épiderme branchial et ainsi d'améliorer la diffusion des gaz. Ces données corroborent le comportement des vers *in situ* en relation avec les caractéristiques chimiques de l'eau de mer environnante. Sur le talus de Louisiane, l'oxygène est souvent limité dans l'eau entre les moules mais sa pression partielle augmente quand on s'élève au dessus du lit de moules (Nix *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000). Les vers sont souvent observés avec la partie antérieure de leur corps étendue bien au dessus des moules (Figure I.10 et observations personnelles).

La présence d'un système d'échanges gazeux interne au niveau de l'oesophage était déjà connue chez *Alvinella pompejana* (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998). Cependant, le devenir du vaisseau sus-oesophagien n'était pas très clair. Notre travail révèle la présence d'un "shunt" dans cette partie du corps, avec une boucle permettant d'alimenter la région cérébrale. Afin de comprendre les transferts gazeux qui se produisent dans cette région, il est indispensable d'étudier les propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine vasculaire et de l'hémoglobine coelomique (voir Chapitre IV).

II.4.5. Détoxification des sulfures.

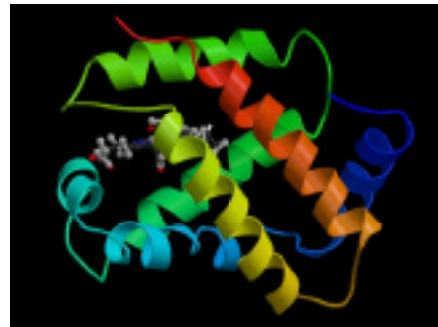
Une grande surface branchiale et une distance de diffusion réduite permettent de bons échanges respiratoires et une bonne diffusion de l'oxygène vers les liquides corporels qui perfusent les branchies. Cependant, cette diffusion n'est pas sélective et les sulfures, présents en très grande quantité aussi bien au niveau des sources hydrothermales que du site Brine Pool NR-1 (Von Damm, 1990; Sarradin *et al.*, 1998; Sarradin *et al.*, 1999; Martineu *et al.*, 1997; Nix *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000), peuvent aussi entrer massivement dans le corps de l'animal. Les sulfures peuvent compromettre la respiration de la plupart des animaux en inhibant la respiration mitochondriale au niveau de la cytochrome *c* oxydase et la fixation de l'oxygène sur la plupart des hémoglobines (Somero *et al.*, 1989). Les organismes qui vivent dans des milieux

riches en sulfures présentent des mécanismes de détoxification des sulfures (Grieshaber et Völkel, 1998). Certains animaux ayant des symbiontes sulfoxydants transportent les sulfures jusqu'à leurs symbiontes en les fixant de manière réversible dans leur sang, les symbiontes oxydant ces sulfures pour leurs besoins métaboliques (Arp et Childress, 1983; Arp *et al.*, 1984). Une telle symbiose est inconnue chez *Branchipolynoe* et chez l'Orbiniidé, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de défense contre les sulfures. Il a été démontré chez deux animaux exposés à de fortes concentrations en sulfures, *Arenicola marina* et le bivalve *Solemya reidi*, qui contient des symbiontes sulfoxydants, que leurs mitochondries sont capables d'oxyder les sulfures en thiosulfate et d'en tirer de l'énergie (Grieshaber et Völkel, 1998; Powell et Somero, 1985; Powell et Somero, 1986a; Powell et Somero, 1986b).

Une caractéristique commune aux cellules branchiales de *Branchipolynoe* et de l'Orbiniidé est la présence de nombreuses mitochondries et de granules denses aux électrons. Ce phénomène a aussi été observé chez les Alvinellidés, au niveau des organes exposés en premier aux sulfures (Jouin et Gaill, 1990; Jouin-Toulmond *et al.*, 1996). Ces granules ont été interprétés comme des lysosomes secondaires et ils paraissent similaires aux organites appelés "sulfide oxidizing bodies" (=corps oxydant les sulfures) trouvées chez *Urechis caupo* et qui contiennent des quantités importantes de soufre (Menon et Arp, 1992; Menon et Arp, 1993).

Chez l'Orbiniidé tout particulièrement, ces granules denses ont une taille très voisine de celle des mitochondries. Un mécanisme possible, qui reste à tester, est le suivant : 1- les mitochondries oxydent les sulfures ce qui leur donne un aspect plus dense aux électrons, 2- les lysosomes élaborés par l'appareil de Golgi fusionnent avec ces mitochondries transformées, formant des lysosomes secondaires, 3- plusieurs de ces lysosomes secondaires peuvent ensuite fusionner et former de gros lysosomes comme ceux observés chez *Branchipolynoe* et l'Orbiniidé, 4- ces gros lysosomes seraient expulsés par exocytose au niveau de l'épiderme branchial.

Chapitre 3 **Biochimie**



Caractérisation et Structure des Hémoglobines

<i>Chapitre 1</i>	Introduction
<i>Chapitre 2</i>	Anatomie
<i>Chapitre 3</i>	Biochimie
<i>Chapitre 4</i>	Physiologie
<i>Chapitre 5</i>	Conclusion

Introduction

III.1.1. Qu'est-ce que l'hémoglobine ?

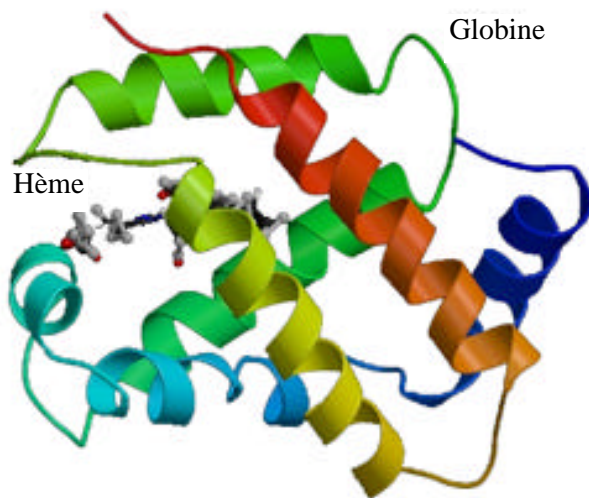
L'hémoglobine est une protéine circulante, intra- ou extracellulaire, capable de lier réversiblement l'oxygène et donc de le transporter. Une protéine très proche, la myoglobine, est également capable de lier réversiblement l'oxygène mais cette molécule se trouve dans des cellules non circulantes et ne peut par conséquent avoir un rôle de transport. L'unité de base de toutes les hémoglobines est une partie protéine, la globine, d'environ 140 acides aminés qui, en se repliant, forme une poche où l'hème, l'autre partie de la molécule, est inséré (Figure III.1A). L'hème est une molécule prosthétique composée d'un atome de fer (à l'état ferreux Fe^{2+} dans la molécule fonctionnelle) et d'un noyau tétrapyrolique, la porphyrine IX (figure III.1B). Il est lié à l'hémoglobine par liaison de coordinence entre l'atome de fer et une histidine, appelée histidine proximale ou histidine F8. Sur l'autre face du plan formé par le noyau tétrapyrolique, la liaison de l'oxygène se fait par l'intermédiaire de la dernière liaison de coordinence du fer et est stabilisée par interaction avec un acide aminé, en général une histidine, qui est appelée histidine distale ou histidine E7 (Figure III.1C).

III.1.2. L'unité de base : la globine.

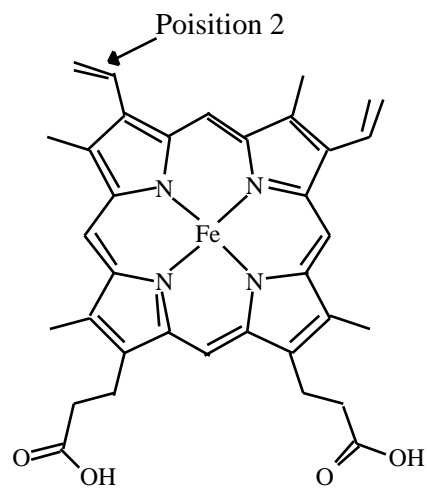
Toutes les hémoglobines connues sont des monomères ou des polymères d'une structure de base : la globine. L'hémoglobine au sens large (c'est à dire comprenant les analogues de myoglobine) est une molécule très répandue dans le monde vivant. On la trouve chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries (Terwilliger, 1992; Vinogradov *et al.*, 1993). La structure primaire des globines de nombreux organismes a été étudiée. Vinogradov *et al.* (1993) ont fait une étude des relations entre ces séquences. Ils ont montré que la structure tertiaire du domaine globine est conservée (appelée "globin fold"), à quelques variations près dans la présence et la longueur de certaines hélices . Des séquences ayant aussi peu d'homologies que celles des bactéries et des vertébrés induisent un repliement similaire de la protéine. Goodman *et al.* (1988) ont proposé un arbre évolutif pour les séquences de globine

d'invertébrés. En se basant sur une hypothèse d'horloge moléculaire constante, ils ont pu donner des temps de divergence des hémoglobines des annélides, arthropodes, mollusques et vertébrés. Toutes ces hémoglobines se seraient séparées il y a 610 à 680 millions d'années, soit avant ou pendant l'explosion Cambrienne, selon les estimations. Dans la lignée des hémoglobines d'annélides, les hémoglobines extracellulaires seraient apparues il y a environ 570 millions d'années pour donner une lignée comprenant plusieurs gènes.

A



B



C

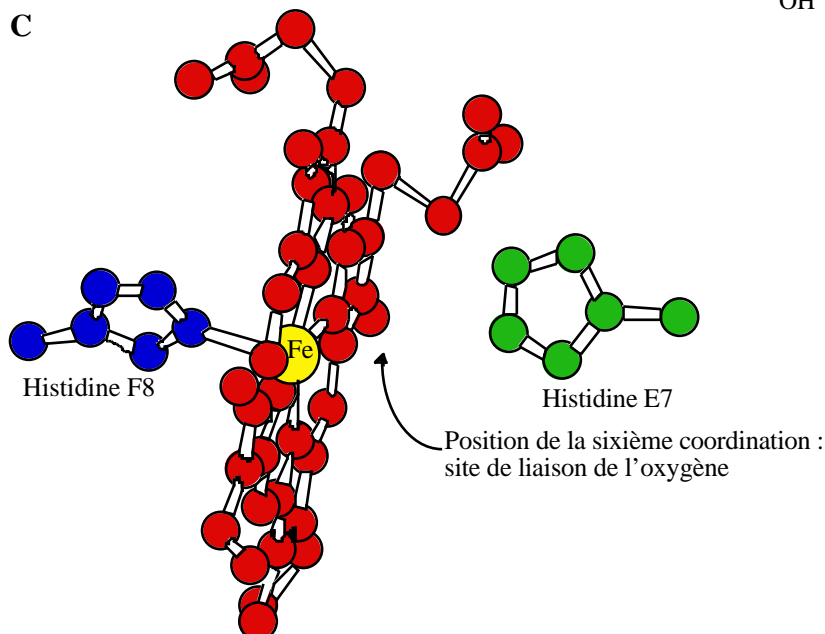


Figure III.1 : **A** Modèle de l'hémoglobine monomérique de *Glycera dibranchiata*. **B** Structure de l'hème (Porphyrine IX). **C** L'hème dans son environnement protéique (Redessiné d'après Stryer, 1988).

Figure III.2 : Evolution des gènes de globines et de leurs introns (Selon Hardisson, 1996).

En se basant sur une comparaison des structures des gènes d'hémoglobine et notamment de la position des introns, Hardisson (1996) propose une histoire de l'hémoglobine au cours de l'évolution des bactéries, protozoaires, champignons, plantes et animaux (Figure III.2). Depuis, de nouvelles précisions ont été apportées. Dewilde *et al.* (1996) ont séquencé une myoglobine particulièrement exprimée dans les cellules de la chaîne nerveuse d'*Aphrodite aculeata*, une espèce de la famille des Aphroditidés, proche des Polynoidés. Ce gène a perdu le premier intron et ne présente que le dernier. Le séquençage d'autres gènes d'hémoglobine chez *Chironomus* a révélé que certains gènes auraient acquis un intron ultérieurement (Gruhl *et al.*, 1997, Kao *et al.*, 1994), contrairement à ce qui est indiqué sur la figure III.2.

On voit donc que les globines, avec une très longue histoire évolutive, sont toujours exprimées dans la quasi-totalité des embranchements actuels, avec de multiples variations dans la structure quaternaire.

III.1.3. Hémoglobines extracellulaires d'invertébrés.

Les invertébrés, au contraire des vertébrés, ne possèdent pas que des hémoglobines intracellulaires mais aussi parfois des hémoglobines extracellulaires (Terwilliger, 1992). Les hémoglobines intracellulaires d'invertébrés peuvent être monomériques ou former des polymères comptant jusqu'à 8 sous-unités (Royer, 1992, Terwilliger *et al.*, 1985). Les globines sont les seules chaînes protéiques constituant ces molécules.

Les hémoglobines extracellulaires d'invertébrés présentent des structures très variables et sont généralement de très haut poids moléculaire (résultant de la polymérisation, covalente ou non, de chaînes polypeptidiques de type globine), à l'exception des insectes qui possèdent des molécules d'hémoglobine de faible poids moléculaire (monomères, dimères et parfois tétramères de globine) (Tableau III.1) (Terwilliger, 1992). Les Annélides, possèdent des hémoglobine de $3-4 \cdot 10^6$ Da et parfois une autre de 400 kDa (leur structure est revue plus en détail un peu plus loin dans le texte). Il existe d'autres types d'hémoglobine extracellulaire qui ont été identifiés dans d'autres embranchements. Toutes ces autres hémoglobines, à part celle d'insecte et de cirripède, sont multi-domaines, c'est à dire que plusieurs motifs globine (=domaines) se trouvent enchaînés dans une même chaîne polypeptidique. Elles sont présentes chez les Nématodes (2 domaines), les Branchiopodes (8-9 domaines pour les Anostracés, deux pour les Conchostracés, les Cladocères et les Notostracés), les Malacostracés (10 domaines) et les mollusques (10-12 domaines pour les Gastéropodes et 2 ou 18-20 pour les Bivalves) mais pas chez les Annélides (Terwilliger, 1992). Selon le groupe considéré, le nombre de domaines varie de 2 à 20 et la molécule native a un poids moléculaire variant de 220 à 12 000 kDa. L'hémoglobine d'*Ascaris* (Nématode), par exemple, est une molécule de 330 kDa, composée de 8 sous-unités de 38 kDa. Chacune de ces sous-unités correspond en fait à deux domaines globine associés dans une même chaîne polypeptide.

Tableau III.1 : Hémoglobines extracellulaires. Modifié d'après Terwilliger (1992). Les annélides incluent les Vestimentifères et les Pogonophores avec leur hémoglobine de 400 kDa (en plus de celle en double hexagone chez les Vestimentifères).

Phylum	Mass native (kDa)	Sous-unités monomériques (kDa)	Domaines/sous-unité
Annelida	3000-4000	15-17	1
		30-38	2
Nematoda	400 330	15-17	1
		38	2
Arthropoda			
Insecta	15 et 30	15	1
Crustacea			
Branchiopoda			
Anostraca	260	130	9
Conchostraca	220-300	30-40	2
Cladocera	420-670	30-40	2
Notostraca	600-800	30-40	2
Cirripedia	1000-4000	17	1
Malacostraca	1800	175	10?
Mollusca			
Gastropoda	1750	175	10-12
Bivalvia	8000-12000	240-320	18-20

III.1.4. Structure des hémoglobines d'Annélides.

Chez les Annélides (comprenant les Vestimentifères et les Pogonophores, regroupés dans la famille des Siboglinidés (Polychaeta) par Rouse and Fauchald, 1995), l'hémoglobine peut être intracellulaire (contenue dans des coelomocytes nucléés circulants ou érythrocytes) ou extracellulaire, dissoute dans le sang, contenu dans les vaisseaux sanguins, ou dans le liquide coelomique (cas de *Nephtys* sp.).

a) Hémoglobines intracellulaires d'Annélides.

Certaines espèces d'annélides possèdent des hémoglobines intracellulaires circulantes dans des cellules appelées erythrocytes (Weber, 1978b). Ces cellules ne sont pas contenues dans le système circulatoire mais dans la cavité coelomique où elles sont brassées par les contractions de la paroi du corps et les battements ciliaires de cellules de l'épithélium coelomique. Les

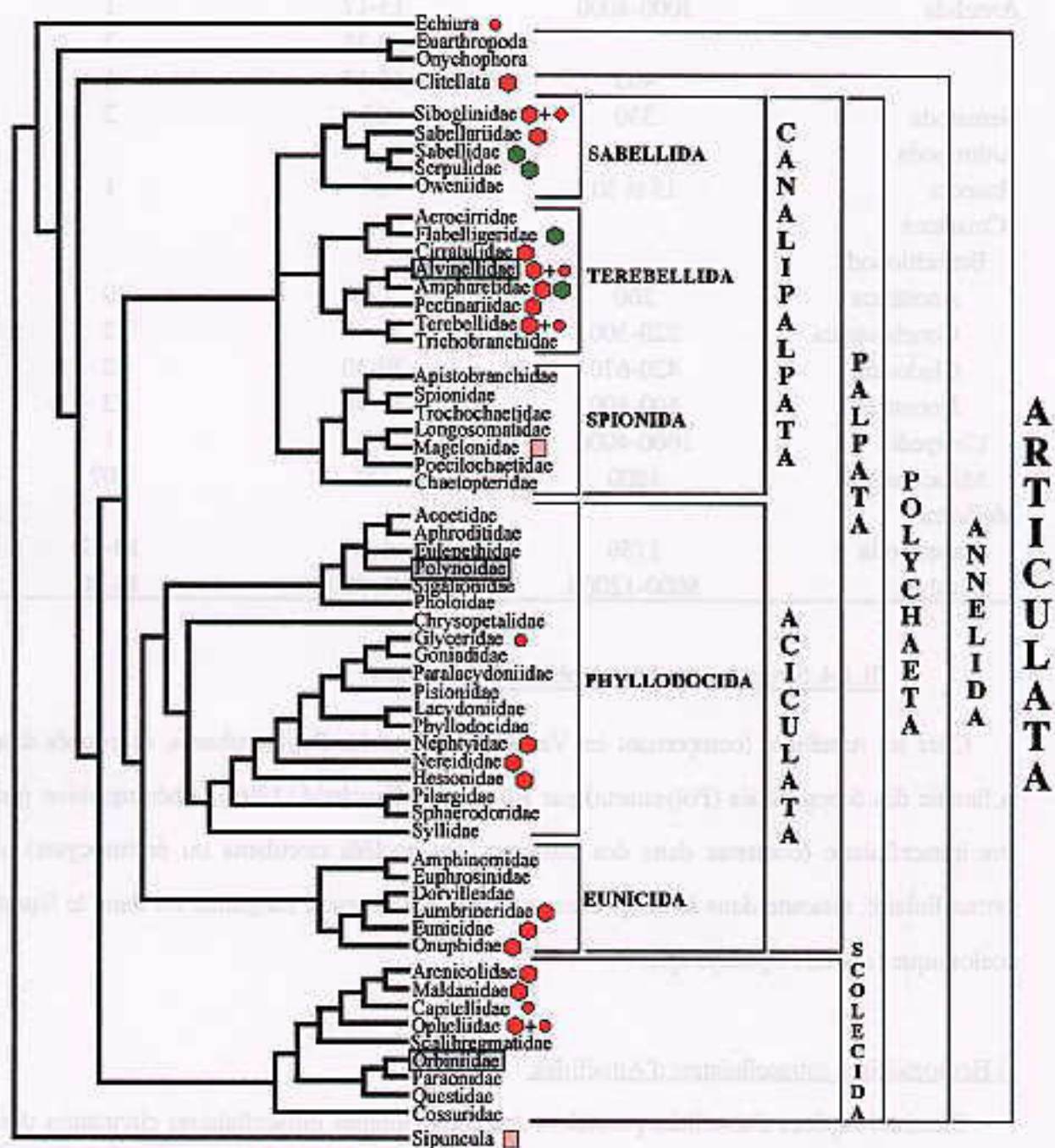


Figure III.3 : Présence de pigments respiratoires chez les familles d'annélides (phylogénie selon Rouse et Fauchald, 1997). Hémoglobine extracellulaire en double couche hexagonale : hexagone rouge; Chlorocruorine : hexagone vert; Hémoglobine extracellulaire de 400 kDa : losange rouge; Hémoglobine intracellulaire : rond rouge; Hémérythrine : carré rose. Les trois familles étudiées au cours de cette thèse apparaissent entourées de gris.

hémoglobines intracellulaires d'Annélides peuvent être monomériques, dimériques, tétramériques ou octamériques (Royer, 1992, Terwilliger *et al.*, 1985, Weber, 1978b).

b) Hémoglobines extracellulaires d'Annélides.

Les hémoglobines extracellulaires des Annélides sont des biopolymères géants de 3-4 10^6 Da, impliquant non seulement des chaînes portant un hème de type "globine" mais aussi des chaînes ayant pour rôle de maintenir la structure de la macromolécule (chaînes de type structure ou "linker"). La molécule correspond en fait à un ensemble apparaissant en microscopie électronique à transmission comme deux hexagones superposés. Les chaînes de structure se trouvent principalement situées au centre de la molécule et permettent de maintenir cette architecture caractéristique (Lamy *et al.*, 1996).

Les Siboglinidés (Vestimentifères et Pogonophores) possèdent également une hémoglobine extracellulaire de 400 kDa. Cette dernière, qui est présente en plus de l'hémoglobine géante décrite ci-dessus chez les Vestimentifères, en diffère par l'absence de chaînes de structure, étant constituées uniquement par l'assemblage de chaînes polypeptidiques de type globine.

Les molécules d'hémoglobine extracellulaire des Annélides sont très grosses et peuvent être observées en microscopie électronique. La cryo-électro-microscopie est une technique qui permet de reconstruire le volume tri-dimensionnel de macromolécules, à partir d'images de celles-ci congelées et hydratées, en microscopie électronique à transmission. Cette technique a été appliquée à des hémoglobines d'Annélides et a permis d'obtenir de nombreux détails de leur structure quaternaire (De Haas *et al.*, 1996a, De Haas *et al.*, 1997, De Haas *et al.*, 1996b, De Haas *et al.*, 1996c, De Haas *et al.*, 1996d).

La figure III.3 montre la présence de pigments respiratoires et leur type (selon Weber, 1978b et observations personnelles) sur une phylogénie des familles d'Annélides selon Rouse et Fauchald (Rouse et Fauchald, 1995). L'hémoglobine est présente dans de nombreuses familles, son absence pouvant être due au fait qu'elle n'y a pas été recherchée. On remarque la présence d'une molécule proche : la chlorocruorine. La structure de base de cette molécule est la même que celle de l'hémoglobine extracellulaire, seul le groupement héminique est légèrement différent. Sur une des chaînes latérales, le groupement vinyl en position 2 est remplacé par un

formyl, lui conférant sa couleur verte particulière (Vinogradov *et al.*, 1982, Vinogradov *et al.*, 1980). La famille des Ampharetidés semble posséder soit de l'hémoglobine (*Amphisamytha galapagensis*, observation personnelle), soit de la chlorocruorine (*Ampharete acutifrons*, observation personnelle). La chlorocruorine est aussi présente chez les Sabellidés, les Serpulidés et les Flabelligeridés. Dans certaines familles, on ne trouve que de l'hémoglobine circulante extracellulaire (Arenicolidés, Eunicidés, Onuphidés, Lumbrineridés, Nephthyidés, Nereididés, Pectinariidés, etc ...) alors que dans d'autres, l'hémoglobine n'est trouvée que sous forme intracellulaire (Glyceridés, Capitellidés). Enfin, chez d'autres familles, on trouve les deux types d'hémoglobine (Terebellidés, Alvinellidés, Opheliidés), ce qui ouvre la possibilité de transferts d'oxygène entre ces molécules.

La présence de la molécule complexe qu'est l'hémoglobine en bicouche hexagonale dans de nombreuses familles de polychètes ainsi que chez les Clitellata suggère que celle-ci est un caractère ancestral, perdu ou silencieux chez certaines familles. Elle pourrait avoir été perdue au niveau de certaines branches basales : celle menant à toutes les familles à élytres, y compris les Polynoidés, et celle des Spionida. Dans cette dernière branche, les Magelonidés présentent la particularité de posséder de l'hémérythrine, un pigment rare respiratoire rencontré essentiellement chez les Sipuncles. Au sein de ce groupe des Spionida, il semble que de l'hémoglobine soit présente dans le système circulatoire de *Nerine cirratulus* et *Polydora* sp. (famille de Spionidés). Il serait intéressant de l'étudier pour en comparer la structure à celle des autres hémoglobines d'annélides.

III.1.5. Les hémoglobines des animaux des milieux réduits

L'hémoglobine est une molécule très fréquente chez les animaux des sources hydrothermales et des suintements froids, deux milieux hypoxiques. Pour s'en convaincre, il suffit de regarder des photos de la faune hydrothermale prises sur le fond par les sous-marins : la couleur rouge est très fréquente, souvent caractéristique de la présence d'hémoglobine. C'est le cas au niveau du panache branchial de *Riftia pachyptila*, des Polynoidés libres et des branchies des Alvinellidés.

Plusieurs de ces hémoglobines ont fait l'objet d'études détaillées : l'hémoglobine des Vestimentifères *Riftia pachyptila* (Arp and Childress, 1983, Arp *et al.*, 1987, Arp *et al.*, 1990, De Haas *et al.*, 1996c, Wittenberg *et al.*, 1981a, Wittenberg *et al.*, 1981b, Zal, 1998, Zal *et al.*, 1998a, Zal *et al.*, 1996a, Zal *et al.*, 1996b, Zal *et al.*, 1998b, Zal *et al.*, 1997c) et *Lamellibrachia* sp., des suintements froids (Suzuki *et al.*, 1993, Suzuki *et al.*, 1988, Suzuki *et al.*, 1990a, Suzuki *et al.*, 1990b), celle du bivalve géant *Calyptogena magnifica* (Arp *et al.*, 1984, Terwilliger *et al.*, 1985, Terwilliger *et al.*, 1983, Wittenberg, 1985; Zal *et al.*, soumis), et de l'espèce des suintements froids *C. soyoae* (Suzuki, 1989, Suzuki *et al.*, 1989), celle du gastéropode *Alviniconcha hessleri* (Wittenberg and Stein, 1995) et l'hémoglobine extracellulaire vasculaire des Polychètes Alvinellidés *Alvinella pompejana* (De Haas *et al.*, 1996d, Terwilliger and Terwilliger, 1984, Toulmond, 1990, Zal *et al.*, 1997a), *A. caudata*, *Paralvinella grasslei* et *P. palmiformis* (Toulmond *et al.*, 1990; Zal *et al.*, accepté).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'hémoglobine intracellulaire des Alvinellidés mais également au cas de deux groupes plus discrets mais dont la couleur rouge ne pouvait manquer d'attirer notre attention : les Polynoidés, et plus spécifiquement le genre *Branchipolynoe*, et les Orbiniidés, représentés par une espèce des suintements froids du Golfe du Mexique.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Récolte des fluides corporels

a) *Alvinella pompejana*

Une fois remontés à bord, les spécimens d'*Alvinella pompejana*, conservés dans une boîte de Pétri sur la glace, ont été ouverts dorsalement, légèrement sur le coté de façon à endommager le moins possible les vaisseaux sanguins. Le liquide coelomique a ensuite été récolté à l'aide d'une pipette. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 2 minutes, les cellules ont été lavées trois fois avec de l'eau de mer filtrée (0,45 µm). Après le dernier lavage un volume équivalent d'eau distillée a été ajouté au culot, provoquant la lyse des cellules par choc osmotique. Après élimination des débris cellulaires, le surnageant a été congelé dans l'azote liquide avec 1 µmol l⁻¹ de PMSF (Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride, inhibiteur de protéases à spectre large), jusqu'à son utilisation. Le sang a été prélevé directement dans le coeur à l'aide d'une seringue et congelé après addition de PMSF à une concentration finale de 1 µmol l⁻¹.

b) *Branchiopolyne* spp.

Les spécimens de *Branchiopolyne*, extraits de la cavité paléale des modioles *Bathymodiolus*, ont été ouverts de la même façon que les spécimens d'*Alvinella pompejana* dans une boîte de Pétri sur la glace. Le liquide coelomique s'écoule alors et peut être récupéré à la pipette. Il ne contient pas de cellules et a donc été congelé directement après centrifugation et addition de PMSF à une concentration finale de 1 µmol l⁻¹.

c) Orbiniidé du Golfe du Mexique

L'Orbiniidé du Golfe du Mexique ne présente pas de vaisseaux assez gros pour pouvoir prélever du sang pur. Il a donc fallu congeler des individus entiers qui ont ensuite été broyés dans un tampon d'extraction (Tris 100 mmol l⁻¹, pH 8, EDTA 1 mmol l⁻¹ et PMSF 1 µmol l⁻¹). Le produit du broyage a ensuite été centrifugé à 10 000 g pendant dix minutes afin d'éliminer les plus gros débris cellulaires. Le surnageant a été soumis à une première ultracentrifugation à 100 000 g et 4 °C pendant une heure, ce qui a permis d'éliminer les débris de taille moindre. L'hémoglobine a ensuite été précipitée par ultracentrifugation à 100 000 g et 4 °C pendant 6

heures. Le culot ainsi obtenu a été resuspendu dans du tampon d'extraction. A partir de cette solution, l'hémoglobine a pu être purifiée.

III.1.2. Purification des hémoglobines

Les hémoglobines ont été purifiées par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) en utilisant une colonne Superose 6 (gamme de séparation 5-5000 kDa) connectée à un système Pharmacia-LKB. Une pompe permet de maintenir un flux constant de 0,5 ml de tampon par minute à travers la colonne. L'échantillon est appliqué en haut de la colonne et l'élution est suivie à deux longueurs d'onde (280 nm longueur d'onde caractéristique des protéines et 414 nm, caractéristique de l'hème) par l'intermédiaire d'un détecteur placé en ligne en sortie de colonne. Le tampon utilisé, nommé tampon *Riftia* dans la suite du texte, est composé de 50 mmol l⁻¹ Bis-Tris Propane, 400 mmol l⁻¹ NaCl, 2,95 mmol l⁻¹ KCl, 32 mmol l⁻¹ MgSO₄ and 11 mmol l⁻¹ CaCl₂. Le pH est ajusté à 7,0 avec de l'acide chlorhydrique. Pour l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, le Bis-Tris Propane a été substitué par de l'HEPES.

Les fractions absorbant à la fois à 280 et 414 nm ont été récoltées puis concentrées à l'aide de tubes Centricon 10 (point de coupure de masse 10 000 Da), et réinjectées pour vérifier ou améliorer leur pureté. Ce processus a été répété au moins deux fois pour obtenir des fractions pures.

III.1.3. Estimation des masses natives

Les masses natives des hémoglobines ont été estimées par FPLC. La colonne Superose 6 a été calibrée en utilisant des protéines standard de poids moléculaire connu (Gel Filtration calibration kit, Pharmacia). Les protéines utilisées sont la ribonucléase A (13,7 kDa), le chymotrypsinogène A (25 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'albumine de serum bovine (67 kDa), l'aldolase (158 kDa), la catalase (232 kDa), la ferritine (440 kDa), la thyroglobuline (669 kDa) . En plus de ces protéines commercialisées, les hémoglobines de *Riftia* HbV1 (3,6.10⁶ Da), HbV2 (400 kDa), HbV3 (200 kDa) et HbV4 (80 kDa) ont été utilisées (Zal *et al.*, 1996b). Une courbe d'étalonnage représentant le volume d'élution des protéines de poids moléculaire connu en fonction du logarithme de leur masse moléculaire permet d'estimer la masse des hémoglobines

purifiées, de masse inconnue. La précision de masse mesurée est, au mieux, de l'ordre de 10%. Cette mesure peut être grandement affectée par les interactions possibles des protéines avec la matrice du gel.

Pour les hémoglobines de *Branchipolynoe symmytilida*, nous avons également utilisé la technique du MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering ou diffusion de la lumière laser à plusieurs angles) (Wyatt, 1993). Cette technique permet de mesurer la taille de particules en solution (ici des protéines) dans des conditions natives par la diffraction de la lumière que ces particules engendrent, à différents angles. Cette technique permet, à partir du rayon de gyration des particules analysées, d'obtenir des données sur leur forme. Cet instrument est placé en série après le détecteur UV-Visible. Nous avons utilisé un détecteur Dawn DSP et les données ont été récoltées et analysées par le logiciel Astra. Ce système permet la détermination de masses comprises entre 1 et 500 000 kDa. Nous avons ainsi accès à une mesure précise de la masse moléculaire de molécules dans des conditions natives et ce sans détruire l'échantillon qui peut être réutilisé pour d'autres expériences. Dans de bonnes conditions, la précision de masse mesurée est de l'ordre de 1-2%.

III.1.4. Etude de la structure des hémoglobines

III.1.4.1. Contenu en acides aminés

Le contenu en acides aminés des hémoglobines de *Branchipolynoe symmytilida* et *B. seepensis* a été mesuré. Cette analyse s'est faite en collaboration avec le Dr. Véronique Martin-Jézéquel, travaillant alors à la Station Biologique de Roscoff et maintenant à l'IUEM de Brest (Institut Universitaire Européen de la Mer). Les fractions issues de la purification et correspondant à des hémoglobines ont été hydrolysées. L'hydrolyse complète des hémoglobines, avec protection du tryptophane, a été réalisée par traitement avec de l'acide méthanesulfonique contenant 0,2% (w/v) de tryptamine pendant 24 heures en conditions anaérobiques à 120°C (Simpson *et al.*, 1976). A la fin de l'hydrolyse, la solution a été neutralisée par addition de NaOH 4N, contenant 0.5% de thiodiglycol afin d'éviter l'oxydation du produit d'hydrolyse (Moore and Stein, 1951). Le contenu en acides aminés a été estimé par

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) selon la méthode de Lindroth et Mopper (Lindroth and Mopper, 1979). La chaîne analytique était composée d'une pompe LDC Constametric 4100 couplée à un mélangeur de solvant avec un dégazeur à vide, un injecteur automatique LDC Autometric 4100 avec une valve Valco, et un fluoromètre LDC III, ajusté à une longueur d'onde d'excitation de 370 nm, et 418-700 nm pour l'émission. La colonne de séparation était une colonne ODS C18 Ultratechsphere avec sa précolonne ODS C18. La phase de séparation était composée d'un mélange de A (90/10 Tampon Na-citrate pH 7,21/MeOH) et B (MeOH). Le réactif pour la dérivation a été préparé frais chaque jour, avec 660 µl de tampon borate (0,8 M; pH 10,3), 200 µl d'OPA (25 mg d'orthophtaldialdéhyde dans 500 µl de méthanol) et 20 µl de -mercaptoéthanol. Le dérivé de cystéine a été préparé avant dérivation en utilisant une modification de la procédure de Cooper et Turnell (Cooper and Turnell, 1982) et Cooper *et. al* (Cooper *et al.*, 1984) avec de l'acide iodo-acétique (2 g d'acide iodo-acétique dans 50 ml de tampon borate, 400 mM, pH 9,5). Les réactions de dérivation ont été laissées évoluer pendant 4 minutes puis injectées en utilisant une boucle de 100 µl. Des solutions d'acide-aminés de référence et d'acide -amino-n-butyrique (Sigma) ont été utilisées comme standard interne. Chaque étape de la préparation a été réalisée sous hotte microbiologique anaérobie pour éviter une contamination des échantillons ou des standards.

III.1.1.2. Rapport hème/protéine

La concentration en hème a été mesurée par la méthode de la pyridine hémochromogène (Gallacher et Elliott, 1965, Paul *et al.*, 1953). Trois volumes de pyridine alcaline ont été ajoutés à un volume d'hémoglobine préalablement dialysée contre de l'eau distillée pendant une nuit. L'hème, dans ces conditions, est extrait de son environnement protéique et forme le dérivé pyridine hémochromogène en réagissant avec deux molécules de pyridine (une de chaque côté du noyau tétrapyrrolique). Un excès de dithionite de sodium est alors ajouté et on obtient le dérivé pyridine hémochromogène réduit qui a un coefficient d'absorption millimolaire de 32,0 mmol⁻¹ l cm⁻¹ à 595 nm.

Sur un sous-échantillon de la même solution d'hémoglobine, la concentration en protéines a été mesurée par la méthode de Lowry (1951). Cette méthode repose sur la formation d'un

complexe entre la protéine et les ions cuivre contenus dans les réactifs. Le réactif de Folin-Ciocalteu phénol (phosphomolybdate-phosphotungstate) est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines et on obtient une couleur bleue. L'absorbance est mesurée à 695 nm. La solution standard utilisée était une solution d'hémoglobine bovine (Sigma), ce qui a permis de faire intervenir une quantité comparable de fer dans les solutions standard et à mesurer. Ces deux mesures ont été réalisées en quatre réplicats. Le rapport hème/protéine peut ainsi être calculé.

III.1.1.3. Electrophorèse

La structure des hémoglobines a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis), après traitement des protéines par le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Cette technique sépare principalement les protéines en fonction de leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Le SDS est une molécule détergente qui se fixe le long de la chaîne protéique, en quantité proportionnelle à la longueur de celle-ci. Ceci engendre un excès de charges négatives (masquant toute charge naturelle, positive ou négative, de la protéine) qui permet de faire migrer la protéine, en fonction de son poids moléculaire, sous l'effet d'un champ électrique. Par ailleurs, le SDS dénature la protéine en perturbant les liaisons faibles, ce qui permet de limiter l'effet de la forme de la protéine sur sa migration. L'utilisation du mercapto-éthanol permet de réduire les ponts disulfures entre deux cystéines qui sont impliqués dans la formation de polymères de polypeptides (ponts disulfures intercaténaux). Les ponts disulfures peuvent aussi être intracaténaux et maintenir un repliement de la chaîne polypeptidique, d'où une différence dans la migration d'une même chaîne polypeptidique avec ou sans réduction.

La technique de Laemmli a été utilisée, avec un gel de compression de 5% en acrylamide et un gel de séparation de 10% en acrylamide. Cette technique de séparation permet d'obtenir des bandes protéiques très fines en raison de la compression du matériel protéique à l'interface des deux gels.

Le système utilisé est un système à migration verticale LKB, avec des gels de 16 x 18 cm, d'une épaisseur de 1,5 mm. Les échantillons ont été mis à migrer pendant environ 3 heures à

100 mA. Puis le gel a été fixé pendant une nuit dans une solution fixatrice (mélange de 15 ml d'acide acétique, 45 ml d'éthanol et 75 µl de formol). Après réhydratation progressive, le gel a été coloré à l'argent. Les protéines sont réduites avec une solution d'hyposulfite 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 coloration, très sensible, présente trois avantages :

- très peu de matériel est nécessaire (typiquement dix fois moins que pour une coloration au bleu de Coomassie, une technique de coloration classiquement utilisée)
- la faible quantité de matériel permet une migration plus régulière et donc l'obtention de bandes très fines
- même les chaînes très peu représentées sont détectables.

Il est possible d'estimer la masse moléculaire des chaînes protéiques par SDS-PAGE en étalonnant le gel avec des protéines de poids moléculaire connu (Silver Stain Wide Molecular Weight Standard, Sigma). Ces protéines sont: 2-Macroglobuline (180 kDa), -Galactosidase (116 kDa), Phosphorylase *b* (97,4 kDa), Serum Albumine Bovine (66 kDa), Fumarase (48,5 kDa), Anhydrase Carbonique (29 kDa), -Lactoglobuline (18,4 kDa), -Lactalbumine (14,2 kDa) et Aprotinine (6,5 kDa).

III.1.1.4. Spectrométrie de masse

Cette étude a été effectuée en collaboration avec le Dr. Brian N. Green (Micromass, Altrincham, UK) l'un des spécialistes mondiaux ayant développé la technique de spectrométrie de masse que nous avons utilisée. La structure des hémoglobines que nous avons purifiées a été étudiée par Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS) ou spectrométrie de masse à nébulisation électrique. Deux types d'analyses ont été effectuées: expériences en conditions dénaturantes et en conditions non-dénaturantes.

a) Principe de l'appareil

Le mécanisme de l'electrospray n'est pas encore bien élucidé mais le processus peut être décrit comme suit. Une solution de l'échantillon à étudier est introduite dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire

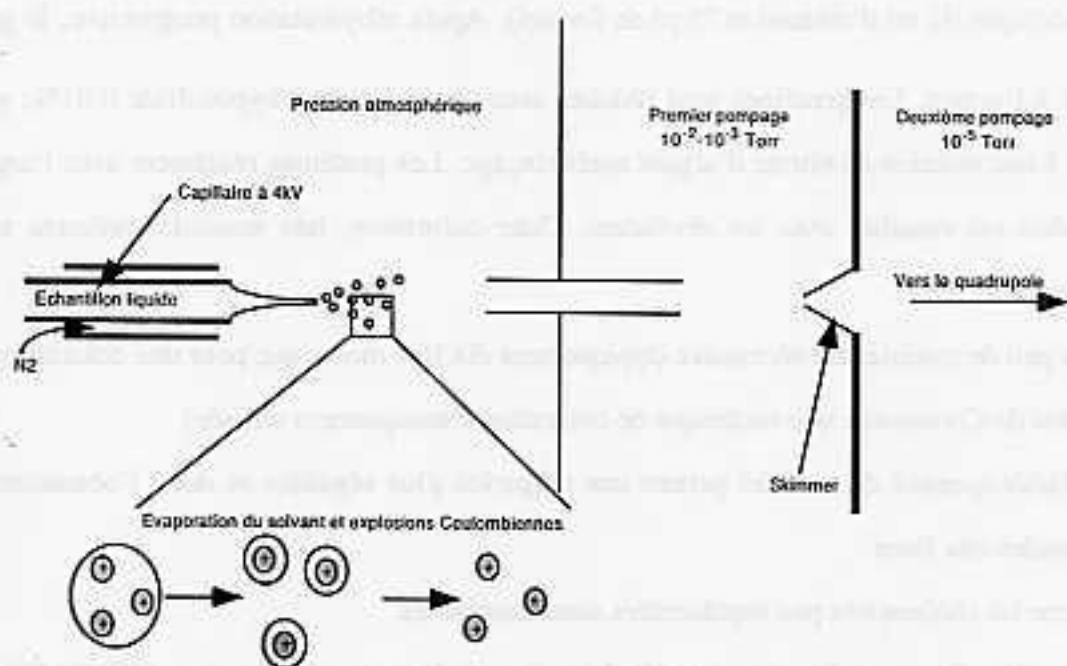


Figure III.4 : Principe d'une source electrospray (voir le texte pour les détails).

provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse (Figure III.4). Durant ce trajet, la taille des gouttelettes diminue par évaporation par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites et provoquées par une charge surfacique très élevée. L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant. L'évaporation du solvant est aussi facilitée par un flux de gaz (généralement de l'azote) à l'interface qui peut aussi être chauffée. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs (orifices sous pompage) vers l'analyseur où règne un vide poussé. Dans nos études, l'analyseur était un quadropole, suivi d'un détecteur.

Les spectres ESI obtenus en mode positif présentent en général un ensemble de pics (Figure III.5) correspondant aux ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ où M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée, n au nombre de charges portées par cette molécule ionisée (spectres m/z) et H la masse d'un proton (1,00794 Da). La masse M peut être déterminée par déconvolution du spectre et transformation de ce dernier en courbe masse-intensité. Par exemple, pour deux pics successifs de rapport m/z mesurés sur le spectre m_1 et m_2 (avec $m_1 < m_2$), et de charge n_1 et n_2 (avec $n_1 = n_2 + 1 = n + 1$), nous savons que :

$$m_1 = \frac{M + H n_1}{n_1} = \frac{M + H (n + 1)}{n + 1}$$

et

où H est la masse d'un proton (1.00794).

$$m_2 = \frac{M + H n_2}{n_2} = \frac{M + H n}{n}$$

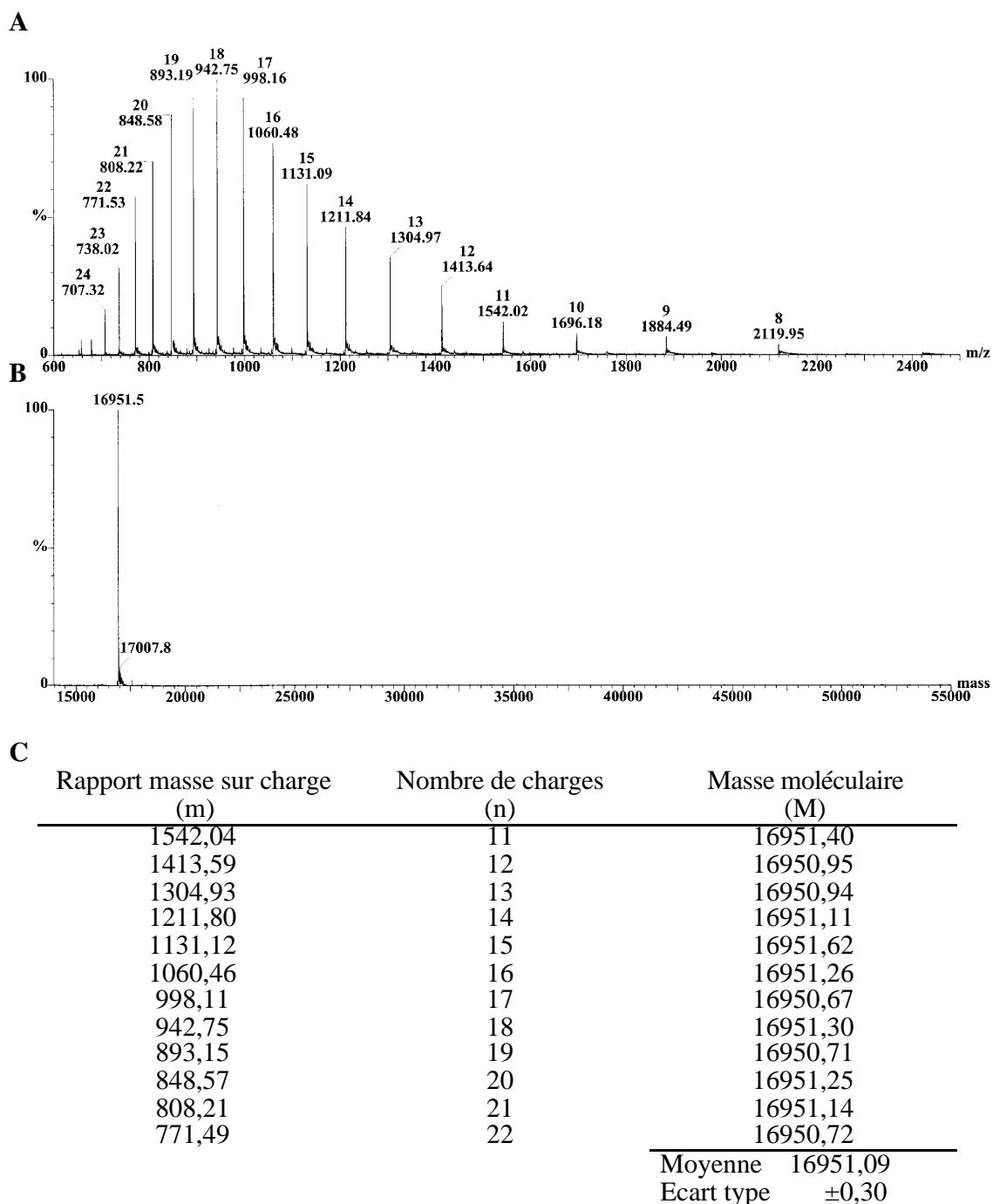


Figure III.5 : **A** Spectre de masse brut de la myoglobine de cheval. **B** Spectre de masse déconvolué par le logiciel MaxEnt. **C** Calculs du nombre de charges et de la masse (voir texte pour les détails des calculs).

On peut donc calculer l'état de charge n et la masse moléculaire M :

$$n = \frac{m_1 - H}{m_2 - m_1}$$

et

$$M = n(m - H)$$

Dans le cas de la myoglobine de cheval, exemple illustré dans la figure III.5, pour les pics de rapport m/z 1211,80 et 1131,12, on peut ainsi calculer que l'ion correspondant porte 14 charges ($n = \frac{1131,12 - 1,00794}{1211,80 - 1131,12} = 14$) et que la masse du composé est de 16951,09 Da ($M = 14 (1211,80 - 1,00794) = 16951,09$).

On peut donc déterminer le nombre de charges et calculer une masse pour chaque pic et une masse moyenne du composé analysé. La précision de masse obtenue est de l'ordre de 0,01%, soit 1 Dalton pour une protéine de 10 000 Da.

Puisque l'électrospray fournit des ions multichargés, l'analyse de protéines de haute masse moléculaire peut être réalisée avec des analyseurs de gamme de taille limitée (faible rapport m/z). L'électrospray a donc souvent été couplé à un analyseur quadrupole pour son faible coût et sa simplicité d'utilisation.

La précision des masses obtenues par spectrométrie offre la possibilité d'obtenir des données de structure sur les molécules jusque là difficiles à atteindre. Ces données sont par exemple le nombre de cystéines libres ou impliquées dans des ponts disulfures, la glycosylation et l'identification des sous-unités impliquées dans des édifices supramoléculaires liées par ponts disulfure (Figure III.6).

Les échantillons sont dans un premier temps analysés en conditions non réductrices, nous donnant accès aux masses brutes des différents constituants liés par des liaisons faibles. Dans un deuxième temps, l'échantillon est réduit par le DTT (dithiothréitol) ou le TCEP (tris-(2-carboxyethyl)-phosphine) avant d'être injecté dans le spectromètre de masse. En conditions réductrices, nous avons accès au nombre total de sous-unités impliquées dans la molécule ainsi qu'à leurs masses précises. A partir des données de masse en conditions non réduites et en conditions réduites, la précision des mesures permet de déterminer avec exactitude quelles chaînes étaient impliquées dans les multimères de la molécule native.

On peut également comparer les masses obtenues par spectrométrie de masse avant et après traitement d'un échantillon protéique par la N-glycosidase F (Boehringer). La différence de masse entre les deux séries d'expériences permet de déterminer si la molécule est glycosylée et,

dans ce cas, le nombre de sucres qui se trouvent sur la molécule protéine étudiée (multiple de 162,1424, la masse d'un hexose et 161,1577, la masse d'un hexosamine).

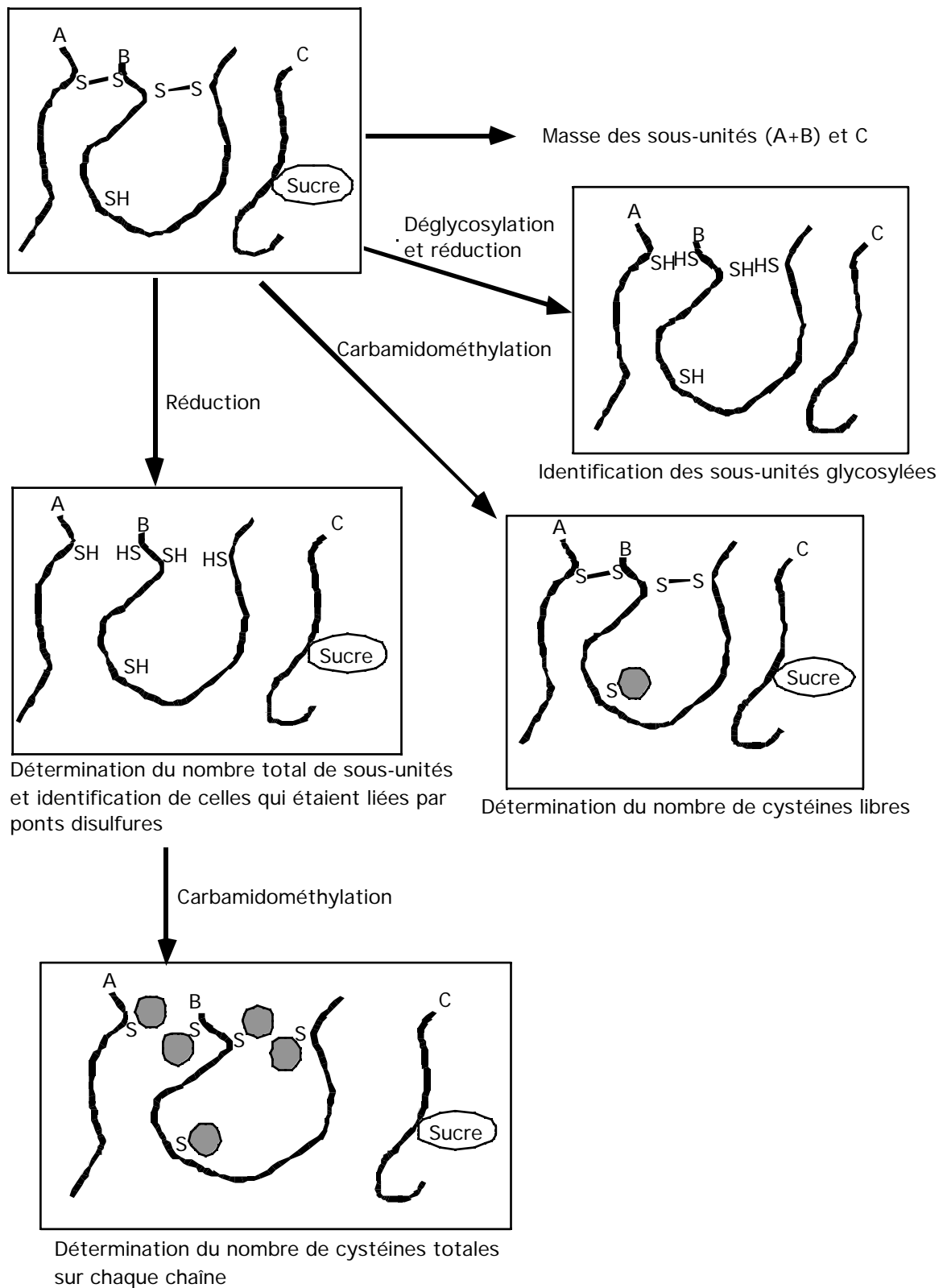


Figure III.6 : Principe des mesures effectuées par spectrométrie de masse. Les ronds gris représentent des groupement carbamidométhyl.

L'iodoacétamide est un composé chimique qui réagit avec les cystéines libres (qui sont réduites) et permet de fixer un carboxyméthyl sur ces résidus. Il s'ensuit une différence de masse de 57,05 Da par cystéine libre sur la molécule. La dérivatisation des molécules par l'iodoacétamide avant injection puis subtraction de la masse avant dérivatisation permet de trouver le nombre de cystéines libres (multiple entier de 57 Da). Si on réduit les peptides avant dérivatisation, on a accès au nombre total de cystéines et, par différence, à celles d'entre elles qui étaient impliquées dans des ponts disulfures.

b) Conditions dénaturantes

En conditions dénaturantes, les liaisons faibles d'une protéine sont déstabilisées par la présence de solvants inorganiques (acétonitrile et acide formique). Les interactions faibles sont alors rompues, les chaînes polypeptidiques qui ne sont pas associées par des ponts disulfure se séparent et l'hème est extrait de sa poche. Les chaînes polypeptidiques peuvent se charger un grand nombre de fois.

Les conditions expérimentales de notre étude étaient les suivantes : domaine de balayage m/z 600-2500, voltage de cône (entre la contre-électrode et le "skimmer") de 30 V à m/z 600 à 100 V à m/z 2500. La concentration de l'échantillon était de $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ dans un mélange 1:1 (en volume) acétonitrile:eau contenant 0,2% d'acide formique. L'échantillon a été injecté avec un débit de $5 \mu\text{l min}^{-1}$.

c) Conditions non dénaturantes

En conditions non dénaturantes, nous essayons de maintenir les interactions faibles entre les molécules. On peut ainsi mesurer la masse des chaînes avec les molécules qui y sont associées par interaction faible et, par différence, connaître la masse de ces petites molécules. On peut également faire de la spectrométrie de masse en tandem (Figure III.7) et séparer les ions par un premier quadrupole, sélectionner un de ces ions et, après collision moléculaire modérée avec des molécules de gaz et analyser les produits de cette collision à l'aide d'un deuxième analyseur monté en série avec le premier.

Dans le cas de l'hémoglobine de *Branchipolynoe*, nous avons voulu compter les molécules d'hème associées à chaque sous-unité. Pour cela, deux conditions ont été testées : l'échantillon a

été dilué soit dans de l'eau distillée (pH = 7), soit dans de l'eau avec de l'acide formique (pH 3). Un des ions les plus abondants a été sélectionné (ion parent) et, après collision avec du méthane, les nouveaux ions ainsi formés (ions fils) ont été séparés par un deuxième analyseur. Le décrochage d'une molécule d'hème répond aux lois de la statistique et on obtient ainsi un ensemble de pics portant la même charge mais différant par la masse des éléments perdus (préalablement maintenus associés à l'ion parent par des liaisons faibles).

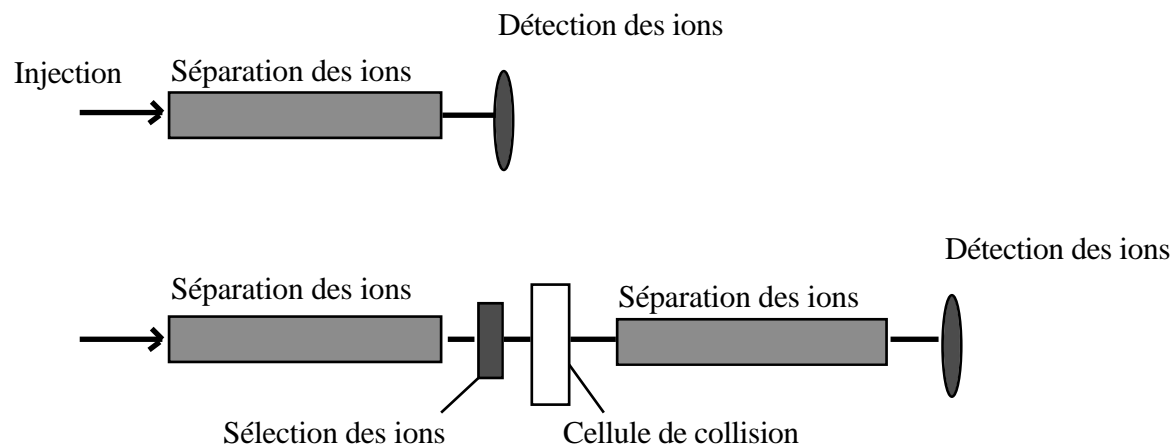


Figure III.7 : Principe du spectromètre de masse en tandem (en bas) par rapport à la spectrométrie de masse à un seul séparateur (en haut).

III.1.5. Digestion des hémoglobines par la subtilisine.

Afin de déterminer le nombre de domaines dans chacune des sous-unités composant les hémoglobines de *Branchipolynoe*, la méthode de la digestion par la subtilisine a été utilisée. Cette méthode repose sur le fait que la subtilisine est une protéase non spécifique. Statistiquement, elle hydrolyse préférentiellement les parties de protéine les plus exposées, ici entre les domaines (Figure III.8). Plusieurs articles rapportent son utilisation pour l'étude d'hémoglobines multidomaines (Grinich and Terwilliger, 1980, Terwilliger and Terwilliger, 1978, Terwilliger *et al.*, 1976, Terwilliger *et al.*, 1977). La méthode choisie est celle utilisée par Terwilliger et Terwilliger (1978).

La réaction se fait dans un tampon 0,01 M glycinate pH 9,5 à température ambiante. La solution d'hémoglobine pure est dialysée contre ce tampon pendant une nuit puis la concentration en hémoglobine est mesurée par la méthode de Lowry. A 500 µl de cette solution d'hémoglobine,

un volume de 500 μ l de tampon glycinate contenant de la subtilisine est ajouté, de telle sorte que le rapport hémoglobine:subtilisine soit de 50:1. Après 1 heure de digestion, la réaction est arrêtée par ajout de 1 μ l PMSF 1 mM.

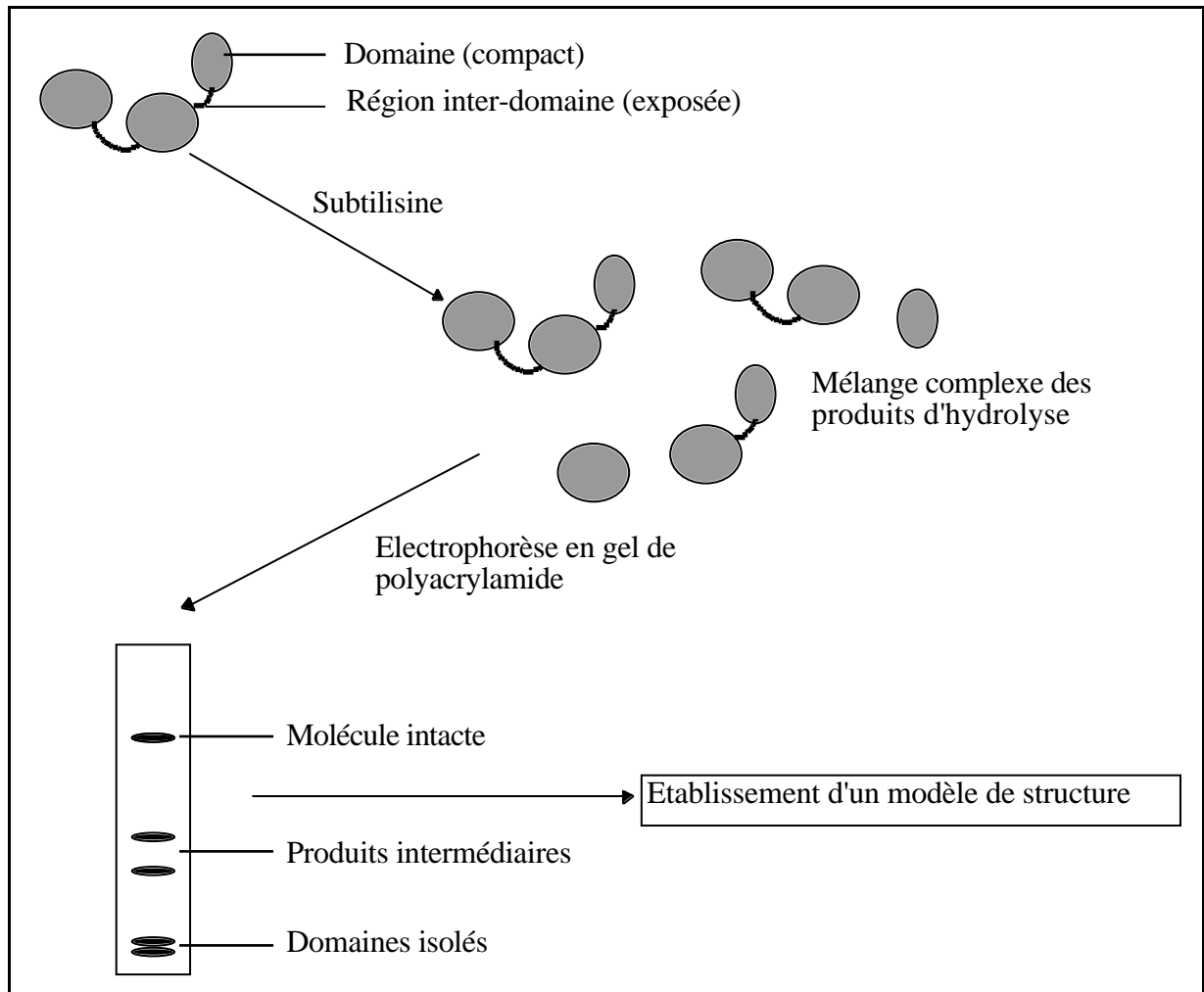


Figure III.8 : Principe de l'étude des hémoglobines multidomaines par la digestion avec la subtilisine.

Le produit de digestion est ensuite purifié sur une colonne Superose 12 (gamme de séparation 1-300 kDa) avec du tampon *Riftia* comme tampon d'éluion. Le spectre d'éluion est enregistré à 414 et 280 nm, et les fractions sont récoltées toutes les minutes. Les protéines contenues dans ces fractions sont ensuite séparées et identifiées sur un gel SDS-PAGE après réduction par le β -mercaptoéthanol. Le gel a été coloré à l'argent pour visualiser les produits d'hydrolyse.

III.1.6. Structure primaire des hémoglobines de *Branchipolynoe symmytilida*.

III.1.6.1. Extraction des ARN totaux et purification des ARN messagers (ARNm)

L'extraction des ARN totaux s'est faite par précipitation sélective par rapport à l'ADN selon un protocole dérivé de celui de Chomzynski et Sachi (Chomzinski and Sacchi, 1987).

a- Extraction des ARN

Un individu entier congelé dans l'azote liquide est transféré dans un mortier préalablement traité pour se débarrasser des RNAses et contenant de l'azote liquide. Il est broyé à l'aide d'un pilon jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Des sous-échantillons d'environ 150 mg de cette poudre sont ajoutés à 1 ml de RNable (Eurobio). L'ensemble est homogénéisé par inversion. Quand le liquide devient visqueux, 100 µl de chloroforme sont ajoutés au mélange. La solution est vortexée pendant 15 secondes, puis laissée 15 minutes dans la glace. Le mélange est ensuite centrifugé à 13000 g pendant 15 minutes à 4°C.

b- Précipitation des ARN

La phase aqueuse (environ 500 µl) est transvasée dans un autre tube et les ARN sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol froid. Le mélange obtenu est laissé une heure à -20°C. puis centrifugé à 13000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé délicatement avec 600 µl d'éthanol à 75%. Après centrifugation à 13000 g pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant est éliminé remplacé par 500 µl d'éthanol 100%. Après 5 minutes, ce dernier est éliminé et le culot est séché sous vide (SpeedVac) pendant 5 minutes. Le culot est ensuite repris dans 50 µl d'eau traitée au DEPC.

c- Vérification de la qualité et quantification des ARN

Les ARN sont ensuite soumis à électrophorèse sur gel d'agarose 1% (1 µl par puits) pour en vérifier la qualité : présence d'une bande correspondant aux ARN 18S (l'ARN 28S est très peu visible chez les polychètes) et absence d'une trainée de dégradation des ARN de haut poids moléculaire. Une fois la qualité vérifiée, les tubes sont regroupés et les ARN quantifiés par

mesure d'absorption à une longueur d'onde de 260 nm. Cinq microlitres de l'échantillon d'ARN sont dilués dans 495 μl d'eau. Un coefficient d'absorption de 40 $\mu\text{g}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$ à 260 nm est utilisé.

d- Purification des ARN messagers (ARNm)

Les ARN messagers ont été purifiés par chromatographie d'affinité. Cette méthode repose sur le fait que la vaste majorité des ARNm des Eucaryotes sont caractérisés par la présence d'une queue poly(A) en extrémité 3'. La purification se fait par application de l'échantillon d'ARN totaux sur une colonne contenant des billes de cellulose sur lesquelles des oligo(dT) ont été fixés. Les queues poly(A) des ARNm s'hybrident aux oligo(dT) et sont retenus dans la colonne alors que les autres ARN sont élués. Les ARN polyA+ sont ensuite décrochés des oligo(dT) de la colonne par addition d'un tampon chauffé à 65°C et élués.

La procédure suivie est celle préconisée avec le kit de purification utilisé (mRNA purification kit, Pharmacia). Brièvement, 1 mg d'ARN totaux ont été dilués dans 1 ml de tampon d'éluion du kit. Après chauffage à 65°C pendant 5 minutes pour déstabiliser les structures secondaires de l'ARN, l'échantillon est mis dans la glace et 0,2 ml de tampon pour échantillons fourni avec le kit sont ajoutés. L'échantillon est appliqué en haut du lit de cellulose de la colonne préalablement équilibrée avec du tampon à forte concentration en sels. La colonne est ensuite centrifugée à 350 g pendant 2 minutes. Deux lavages successifs avec 250 μl de tampon à forte concentration en sels sont effectués. Entre chaque application, la colonne est centrifugée pendant 2 minutes à 350 g. De la même façon, la colonne est lavée trois fois avec 250 μl de tampon à faible concentration sels. Tous ces lavages permettent d'éliminer les ARN non spécifiquement liés à la cellulose-(dT). L'éluion des ARN messagers se fait par application de 4 fois 250 μl de tampon d'éluion préalablement chauffé à 65°C.

Les ARNm sont ensuite précipités : 100 μl de tampon pour échantillons et 10 μl de glycogène sont ajoutés à l'éluat (1 ml), suivi de l'ajout de 2,5 ml d'éthanol froid. Les ARN sont laissés à précipiter une nuit à -20°C. Le mélange est ensuite centrifugé à 13000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 75% puis 100% et séché 5 minutes au SpeedVac. Les ARNm purifiés sont ensuite conservés sous forme précipitée à -80°C jusqu'à leur utilisation.

III.1.1.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

La synthèse des ADNc a été réalisée par transcription inverse en utilisant la MMLV-Reverse Transcriptase. Le mélange était le suivant : 2 µl de tampon de réaction 5X, 1 µl de BSA (5µg/µl), 1 µl d'ARNm (1-2 µg/µl), 1µl de dNTP (10 mM), 1µl d'amorce (150 ng/µl) et 3 µl d'eau DEPC. Le volume de 9 µl ainsi obtenu est chauffé 5 minutes à 80°C puis mis dans la glace. La Reverse Transcriptase est ensuite ajoutée (1 µl) et le mélange est incubé pendant 1 heure à 42°C dans un bain-marie. Le produit de la réaction est ensuite mis sur la glace et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Deux amorces différentes ont été utilisées, soit un oligo(dT)₁₈, soit un oligo(dT)₁₆ attaché à une ancre qui permet une amplification à plus haute température que l'oligo(dT) seul :



L'amorce se fixe sur l'extrémité 3' de l'ARNm (sur la queue poly(A)) et permet à l'enzyme de synthétiser un brin d'ADN complémentaire à celui de l'ARN (Figure III.10).

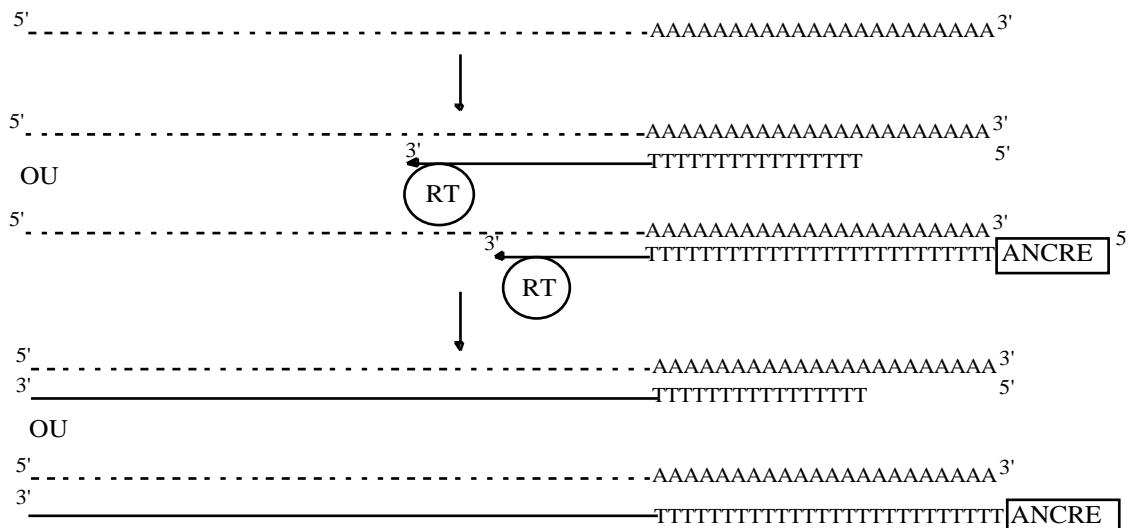


Figure III.9 : Principe de la synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse, en utilisant un oligo(dT) ou un oligo(dT) ancré.

III.1.1.3. Microséquence de l'extrémité N-terminale

L'extrémité N-terminale de l'hémoglobine C2 de *Branchipolynoe symmytilida* a été séquencée par Nathalie Zorn (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique,

ιfffffffffffffffffffffffffffffffffÿ (128)

I	D	A	L	A	H	R
5 ' ATN	GAC	GCN	CTN	GCN	CAC	AGA
	GAT		TTA		CAT	AGG
			TTG			CGN

ιfffffffffffffffffffffffffffffffffÿ (768)

F	T	A	E	A	R	
5 ' TTC	GGN	GCN	GAA	GCN	AGA	3 '
TTT			GAG		AGG	
					CGN	

ιfffffffffffffffffffffffffffffffffÿ (256)

F	G	A	E	A	R	
5 ' TTC	ACN	GCN	GAA	GCN	AGA	3 '
TTT			GAG		AGG	
					CGN	

ιfffffffffffffffffffffffffffffffffÿ (256)

A partir de ces amorces, des amplifications par PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été réalisées. Après de nombreuses tentatives infructueuses, nous avons décidé d'utiliser une polymérase de type "Hot Start" (QIAGEN HotStarTaq DNA polymerase). Ce type d'enzyme nécessite un passage prolongé à 95°C afin d'être activée (15 minutes). Ce passage permet d'éviter les amplifications non spécifiques qui peuvent se produire lors de la montée en température à la première dénaturation avec des polymérases classiques. Les problèmes d'amplification avec les polymérases classiques peuvent s'expliquer par la proportion importante de G et C due à la fréquence des acides aminés Alanine (codé par GCN) et Glycine (codé par GGN).

Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

Mélange réactionnel :	Tampon 10X	5 µl
	Ancre (10 µM)	5 µl

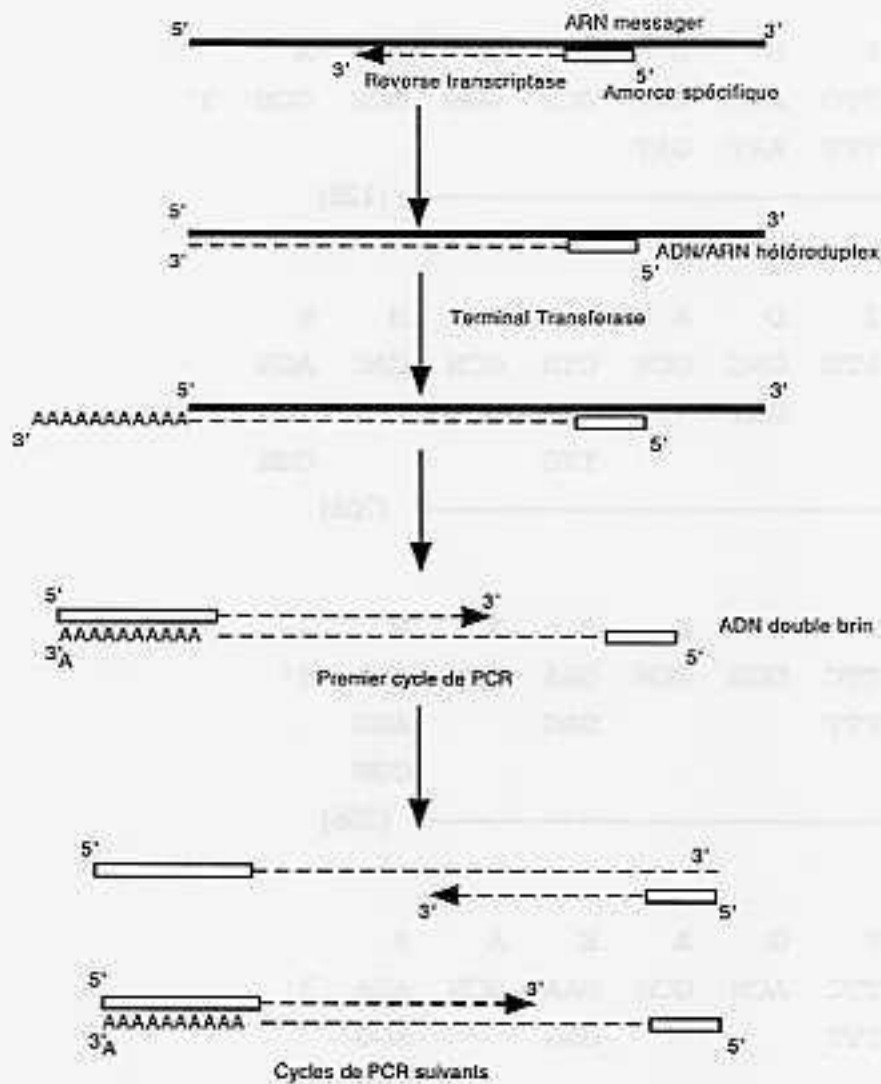


Figure III.10 : Principe de la RACE-PCR. Pour les détails, se reporter au texte.

Amorce dégénérée (10 µM)	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Hot Start Taq (5U/µl)	0,25 µl
H ₂ O distillée stérile	27,75 µl
ADN matrice*	1 µl

* 1 µl d'une dilution 1/10 du produit de reverse transcription (voir plus haut).

Cycles d'amplification :	1 cycle	95°C	15 minutes
		95°C	1 minute
	30 cycles	48°C	45 secondes
		72°C	2 minutes
	1 cycle	72°C	10 minutes

III.1.1.5. Amplification de l'extrémité 5' des ADNc par RACE-PCR

La RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) est une technique très utilisée, surtout pour amplifier les extrémités 5' des ADNc et pouvoir les séquencer complètement sans utiliser une banque d'ADNc (Schaefer, 1995). Le principe consiste à ajouter une séquence connue à l'extrémité 5' qui servira de cible à une amorce universelle qui, couplée à une amorce spécifique de la séquence, permettra de l'amplifier par PCR. Cette approche est possible quand la séquence est bien conservée ou quand une partie de la séquence du côté 3' est disponible. Dans notre cas, une séquence en 3' a été obtenue par amplification et séquençage d'un fragment de l'ADNc (voir point précédent). Il est possible d'obtenir une séquence connue en 5' de différentes façons : ligation d'une amorce en extrémité 5' de l'ARNm, ou synthèse d'un brin d'ADNc complémentaire de l'ARNm par l'intermédiaire d'une amorce spécifique et ajout d'une série de nucléotides identiques en 3' de ce brin nouvellement synthétisé en utilisant l'enzyme Terminal Transferase. Cette dernière méthode a été choisie et des A ont été ajoutés en 3' de l'ADNc (Figure III.10). Cette réaction génère une extrémité poly(dA) en 3' du brin nouvellement synthétisé (soit du côté 5' de l'ARNm), ce qui permet d'utiliser un oligo(dT) comme amorce non spécifique, en même temps que l'amorce spécifique à l'autre extrémité (obtenue par séquençage et utilisée pour la synthèse d'ADNc).

Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

Mélange réactionnel :	Tampon 10X	5 µl
	Oligo(dT) (10 µM)	5 µl
	Amorce spécifique (10 µM)	5 µl

	dNTPs (10 mM)	1 µl	
	Hot Start Taq (5U/µl)	0,25 µl	
	H ₂ O distillée stérile	32,75 µl	
	ADN matrice	1 µl	
Cycles d'amplification :	1 cycle	95°C	15 minutes
		95°C	1 minute
	30 cycles	48°C	45 secondes
		72°C	2 minutes
	1 cycle	72°C	10 minutes

III.1.1.6. Séquençage des fragments amplifiés

Les fragments amplifiés par PCR ont été clonés grâce au kit "TOPO-TA Cloning" (Invitrogen). Ce kit permet une ligation très rapide (5 minutes) des produits de PCR grâce à la topoisomérase qui est liée de façon covalente aux extrémités présentant un T sortant du vecteur (TOPO-PCR II). En effet, la Taq Polymerase utilisée ajoute des A sortants sur les fragments, cet ajout étant assuré par les 10 dernières minutes à 72°C. Il y a complémentarité entre les A sortants des inserts et les T sortants du vecteur puis ligation par la topoisomérase. Le vecteur contient un gène de résistance à l'ampicilline et le gène *LacZ* permettant une sélection blanc/bleu des colonies possédant l'insert.

Le produit de ligation a servi à transformer des bactéries compétentes "One-Shot cells". Les colonies blanches ont été testées pour la présence d'un insert par PCR en utilisant les amorces universelles T7 et M13Rev, sites que l'on trouve de part et d'autre du site d'insertion sur le vecteur TOPO-PCR II. L'absence d'insert se manifeste par un produit de PCR de 180 paires de bases et la présence d'insert par un produit de PCR de 180+X paires de bases, où X est le nombre de paires de bases de l'insert.

Le séquençage des clones positifs dans la gamme de taille attendue a été réalisé par séquençage cyclique sur un séquenceur automatique (Vistra DNA sequencer 725), avec le kit de séquençage "Thermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit" (Amersham). Ce kit utilise la technique des didéoxynucleotides, la molécule marquée (ici le TexasRed) étant liée à l'amorce universelle utilisée pour le séquençage (T7 ou M13Rev).

III.1.1.7. Hybridation des ARN sur membrane (Northern Blot)

Les ARN ont été mis à migrer sur un gel dénaturant constitué, pour 150 ml, de 1,5 g d'agarose, 109 ml d'eau distillée stérile, 25,5 ml de formaldéhyde et 15 ml de tampon MEN 10X (MOPS 200 mmol l⁻¹ pH 7,0, EDTA 10 mmol l⁻¹, acétate d'ammonium 50 mmol l⁻¹). Le marqueur de taille Millenium Marker a été utilisé. Les échantillons étaient les suivants : 20 µg d'ARN totaux, 1 µg d'ARNm et 3 µg d'ARNm. A un volume de ces échantillons, 1,6 volumes de tampon de charge (mélange de 570 µl de formamide désionisé, 170 µl de formaldéhyde 37% et 150 µl de MEN 10X) ont été ajoutés. Ce mélange est dénaturé par chauffage à 65°C pendant 5 minutes puis mis dans la glace. Les échantillons ont ensuite été chargés et la migration a été réalisée en tampon MEN 1X, à 60 V pendant environ 4 heures.

Les ARN ont ensuite été transférés sur membrane Hybond N à l'aide d'un Vacuum Blotter dans du tampon SSC 20X (Standard Sodium Citrate) et liés à la membrane par irradiation sous UV. A partir des fragments amplifiés par PCR et clonés, des sondes spécifiques de 350 bases ont été produites et marquées au ³²P en utilisant le kit Megaprime DNA labelling system (Amersham). Ce kit permet de synthétiser des fragments d'ADN grâce au fragment Klenow de la DNA polymérase. Dans le milieu réactionnel, du dCTP³² est ajouté et se trouve donc incorporé dans les brins synthétisés.

L'hybridation s'est faite selon la méthode de Church (Church and Gilbert, 1984). Après une préhybridation de 1 heure à 42°C dans le tampon Church (albumine de sérum bovine 1%, EDTA 1 mmol l⁻¹, NaHPO₄ pH 7,2 0,5 mol l⁻¹ et 7% SDS), la sonde est ajoutée à une concentration finale de 1 million de coups par minute et par millilitre et laissée à hybrider pendant une nuit. Après un lavage rapide dans du tampon 2X SSC (Standard Sodium Citrate) pour éliminer le tampon de Church et les restes de sonde non hybridée, la membrane est lavée à 42°C pendant 15 minutes dans du tampon 2X SSC puis 15 minutes dans du tampon 1X SSC. La membrane est alors placée dans une pochette plastique scellée et l'écran recouvert d'une couche de cristaux sensibles aux émissions radioactives est exposé. Après 4 heures d'exposition, l'écran est scanné à l'aide d'un STORM Phosphor-Fluor Imager.

III.1.1.8. Structure des gènes de globine

Afin d'étudier la structure des gènes de l'hémoglobine de *Branchipolynoe symmytilida*, nous avons amplifié et comparé les séquences obtenues à partir de cDNA d'une part, et d'ADN génomique d'autre part.

a- Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique de *Branchipolynoe symmytilida* et de *B. seepensis* a été extrait par la méthode classique de séparation de phases par le phénol/chloroforme après digestion par la protéinase K (Sambrook *et al.*, 1989). Brièvement, 0,5 ml de tampon PK (Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM et SDS 1%, NaCl 100 mM) sont ajoutés au tissu (environ 0,1 g) dans un tube Eppendorf, 20 µl de protéinase K (20 mg/ml) sont ajoutés et le tout est mis à incuber pendant 6-12 heures à 55°C (jusqu'à ce que tous les tissus soient digérés). A ce mélange, on ajoute alors 500 µl de phénol tamponné pH 8,0. Après une émulsion douce par inversion, l'échantillon est centrifugé à 5000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est prélevé est utilisé volume à volume avec un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) puis du chloroforme seul pour précipiter les protéines et les lipides. Le dernier surnageant est prélevé et 2,5 ml d'éthanol 100 glacé sont ajoutés précipiter l'ADN à -20°C pendant une nuit. Une centrifugation à 10000g à 4°C pendant 30 minutes permet alors de culoter l'ADN génomique. Le culot est enfin lavé avec de l'éthanol 70 puis séché. Il est repris dans 20 µl de tampon TE (Tris EDTA) dans lequel il peut être conservé. Pour être utilisé dans des réactions de PCR, l'ADN est dilué au 1/20^{ème} et utilisé à raison de 1µl par mélange réactionnel de 50 µl.

b- Amplification du gène

A partir des séquences obtenues par amplification de l'ADNc, nous avons dessiné des amorces spécifiques des différentes globines amplifiées. Ces amorces ont été utilisées en PCR pour amplifier la séquence correspondante sur l'ADN génomique.

Mélange réactionnel : Tampon 10X	5 µl
Amorce F (10 µM)	5 µl
Amorce R (10 µM)	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Hot Start Taq (5U/µl)	0,25 µl
H ₂ O distillée stérile	32,75 µl
ADN matrice	1 µl

Cycles d'amplification :	1 cycle	95°C	15 minutes
		95°C	1 minute
	30 cycles	56°C*	45 secondes
		72°C	2 minutes
	1 cycle	72°C	10 minutes

* valeur approximative, dépendant des couples d'amorces utilisé.

Le produit de cette PCR a été visualisé sur gel d'agarose et la différence de taille entre l'amplifié sur l'ADNc et l'ADN génomique a pu être estimée.

c- Localisation des introns

Le fragment amplifié a été cloné grâce au kit TOPO TA Cloning, puis séquencé comme décrit plus haut. La séquence obtenue a été alignée avec la séquence obtenue à partir de l'ADNc et la position des introns a été établie.

III.1.7. Caractéristiques spectrophotométriques des hémoglobines

Dans le but de caractériser les différentes hémoglobines de *Branchipolynoe* purifiées, les caractéristiques spectrophotométriques ont été déterminées pour les dérivés oxy-hémoglobine (Hb-O₂), deoxy-hémoglobine (Hb), carboxy-hémoglobine (Hb-CO), met-hémoglobine (Hi) et cyanmet-hémoglobine (Hi-CN).

La deoxy-hémoglobine a été obtenue par ajout d'un excès de dithionite de sodium (NaS₂O₄) à l'hémoglobine obtenue après purification. Le dérivé oxy-hémoglobine a été obtenu par séparation sur colonne G25 (Pharmacia) du dithionite de l'hémoglobine puis oxygénation sous UV pour empêcher la fixation de monoxyde de carbone.

Le dérivé met-hémoglobine a été obtenu par addition de 10 µl d'une solution à 10 mM de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) à 2 ml d'une solution d'oxy-hémoglobine d'environ 20 µM. Le dérivé cyan-met-hémoglobine a été obtenu par addition de 10 µl d'une solution à 50 mM de cyanure de potassium (KCN) à une solution de met-hémoglobine.

Le dérivé carboxy-hémoglobine a été obtenu par bullage de monoxyde de carbone (CO) dans une solution d'oxy-hémoglobine. L'affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde de carbone étant beaucoup plus élevée que celle pour l'oxygène, le monoxyde de carbone remplace ce dernier et reste fixé.

Les spectres ont été obtenus sur un spectrophotomètre Spectronic 2000. L'absorbance a été mesurée tous les 0,5 nm, entre 250 et 700 nm.

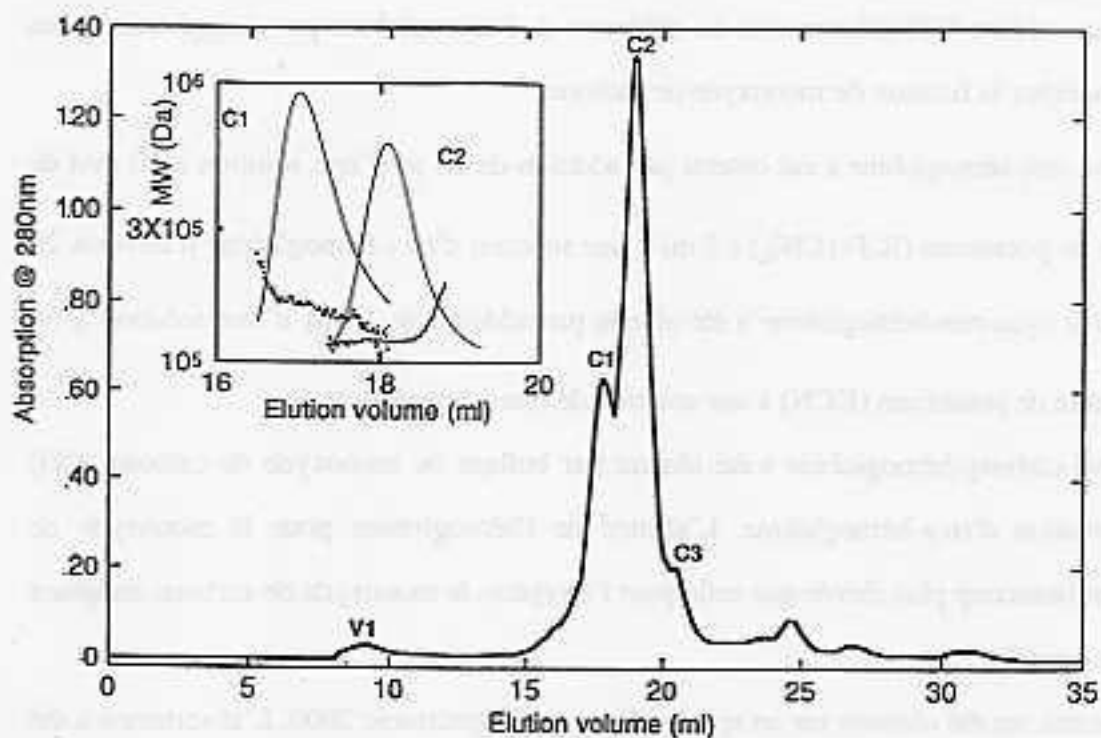


Figure III.11 : Spectre d'éluion du liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida* sur une colonne Superose 6. Les pics absorbant à la fois à 414 et 280nm sont nommés (V1, C1-C3). Insert : Spectre MALLS pour les hémoglobines HbC1 et HbC2.

III.3. Résultats.

III.3.1. Structure des hémoglobines coelomiques HbC1 et HbC2 de *Branchipolynoe* spp.

La structure des hémoglobines C1 et C2 a été étudiée chez *Branchipolynoe symmytilida* et *B. seepensis*. Les résultats sont présentés en détail pour *B. symmytilida* et de façon plus succincte pour *B. seepensis*.

III.3.1.1. Purification des hémoglobines de *Branchipolynoe* spp.

Les liquides coelomiques de *B. symmytilida* et *B. seepensis* contenaient 2.5 et 3.0 mM d'hème, respectivement. Dans ce fluide corporel, nous avons isolé 4 pics ayant une absorbance à la fois à 414 et 280 nm (Figure III.11). Par chromatographie d'exclusion par la taille, nous avons estimé la masse native de ces pics à 3.10^6 Da pour le premier pic, et 110 kDa, 55 kDa et 23 kDa pour les suivants, les deux pics médians étant largement majoritaires (Figure III.11). Les pics correspondant à de plus faibles poids moléculaires n'absorbent pas à 414 nm et ne correspondent donc pas à des hémoglobines. En raison de sa masse et de sa faible abondance, le premier pic correspond vraisemblablement à une contamination du liquide coelomique par du sang vasculaire au moment du prélèvement. Il a donc été appelé V1 pour "Vasculaire première fraction". Les autres pics correspondent plus probablement à des hémoglobines coelomiques et ont été par conséquent appelés HbC1, HbC2 et HbC3 en suivant leur ordre d'élution (C pour "Coelomique"). Les expériences ultérieures ont été réalisées sur les deux hémoglobines les plus abondantes (HbC1 et HbC2), sauf autrement précisé. L'analyse par MALLS a été limitée au centre des pics d'élution correspondant à une solution homogène de molécules (pour éviter les effets de variations de masses dus à des phénomènes d'association/dissociation). Les valeurs obtenues pour les hémoglobines de *B. symmytilida* sont de 152900 ± 16000 Da pour HbC1 et 123600 ± 1900 Da pour HbC2 (Figure III.11).

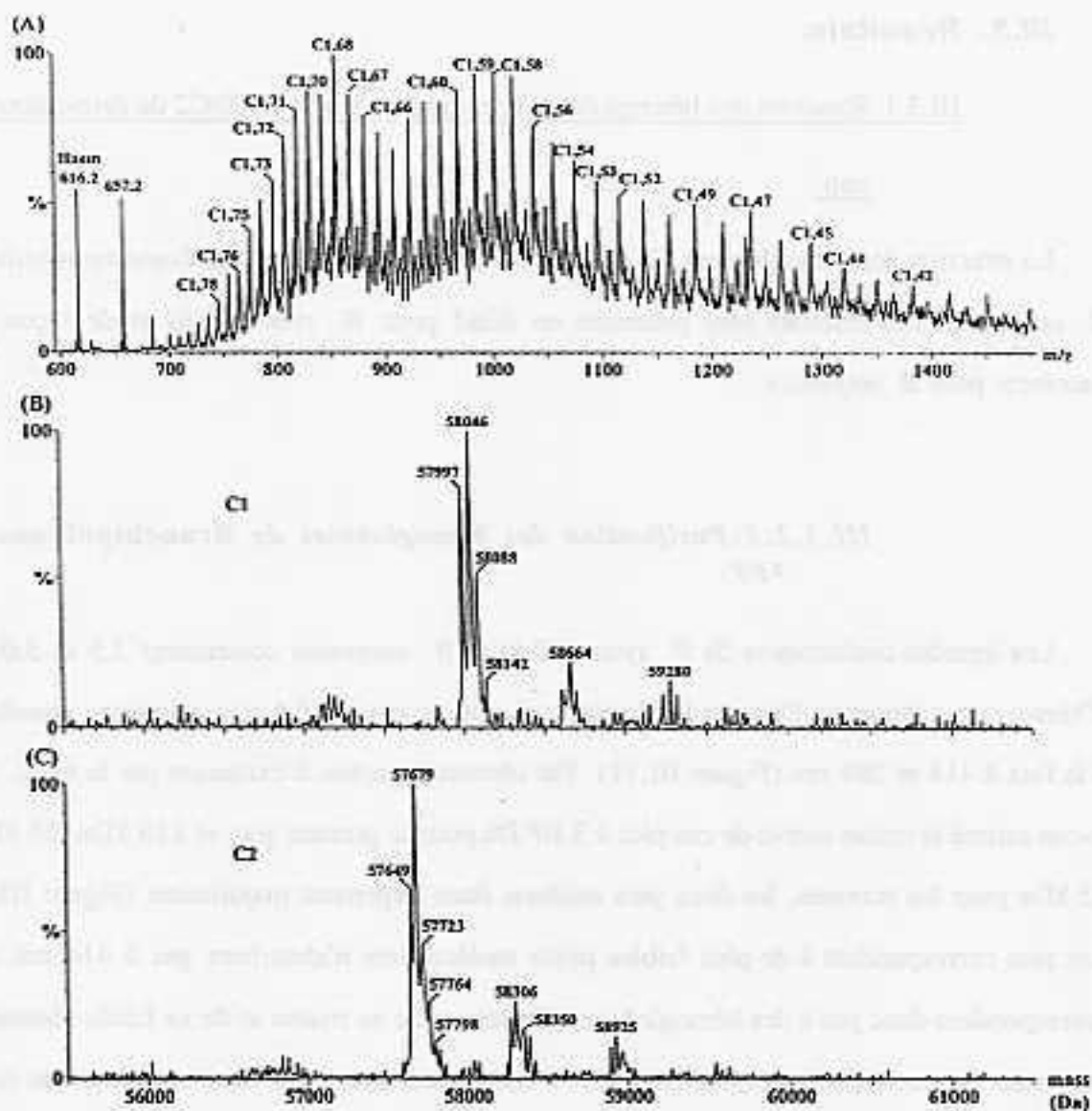


Figure III.12 : Analyse ESI-MS des deux hémoglobines majeures de *Branchipolynoe symmytilida* en conditions dénaturantes. A Hémoglobine HbC1, données brutes. B Hémoglobine HbC1, données analysées par MaxEnt. C Hémoglobine HbC2, données analysées par MaxEnt. Les nombres indiqués au dessus des pics en A correspondent au nombre de charges.

III.3.1.2. Spectrométrie de masse

La composition en sous-unités des hémoglobines coelomiques HbC1 et HbC2 de *Branchipolynoe symmytilida* et *B. seepensis* a été étudiée par spectrométrie de masse. La figure III.12A montre le spectre multichargé (spectre m/z) de l'hémoglobine HbC1 de *B. symmytilida* obtenu en conditions dénaturantes. La figure III.12B montre le résultat après déconvolution de ce spectre brut par le logiciel MaxEnt. La figure III.12C correspond au spectre de masse de l'hémoglobine HbC2 de cette même espèce. Le nombre de charges sur chaque molécule varie de 40 à 80. Chacun des deux spectres traités par MaxEnt montrent plusieurs groupes de pics pouvant correspondre à des chaînes différentes mais aussi à un seul type de chaîne avec des adduits (sels métalliques, Ca²⁺, K⁺ ou Na⁺, par exemple). Nous avons supposé qu'il y avait une seule chaîne pour chaque hémoglobine et que sa masse correspondait à celle du pic le plus léger. Nous avons obtenu des masses de 57996 Da (n=6) pour la chaîne C1 et 57648 Da (n=2) pour la chaîne C2 (Tableau II.1). L'erreur sur ces mesures a été estimée à ±10 Da. Ces deux masses sont significativement différentes l'une de l'autre, impliquant que C1 et C2 correspondent à des chaînes polypeptidiques différentes.

Lorsque HbC1 et HbC2 ont été réduites (par le DTT ou le TCEP) avant analyse par spectrométrie de masse, les masses de C1 et C2 sont restées dans les limites de l'erreur expérimentale associée à la mesure des masses en conditions non réductrices. De plus, la réduction de HbC1 et HbC2 n'a pas entraîné l'apparition de pics de masse plus petite. Ceci implique que C1 et C2 correspondent à des chaînes polypeptidiques uniques et non pas à des trimères ou tétramères de globines de 14-19 kDa liées par des ponts disulfure. Le traitement par la N-glycosidase F n'a pas eu d'effet sur les masses de C1 et C2, indiquant que ces chaînes ne sont pas glycosylées.

Une étude similaire de spectrométrie de masse sur HbC1 et HbC2 de *B. seepensis* a donné des masses de 57728±10 pour C1 et 57670±10 Da pour C2. Les masses correspondant à C2 ne sont pas significativement différentes entre les deux espèces mais celles correspondant à C1 le sont. Le Tableau III.2 réunit les données de masse des hémoglobines de *B. symmytilida* et *B. seepensis*.

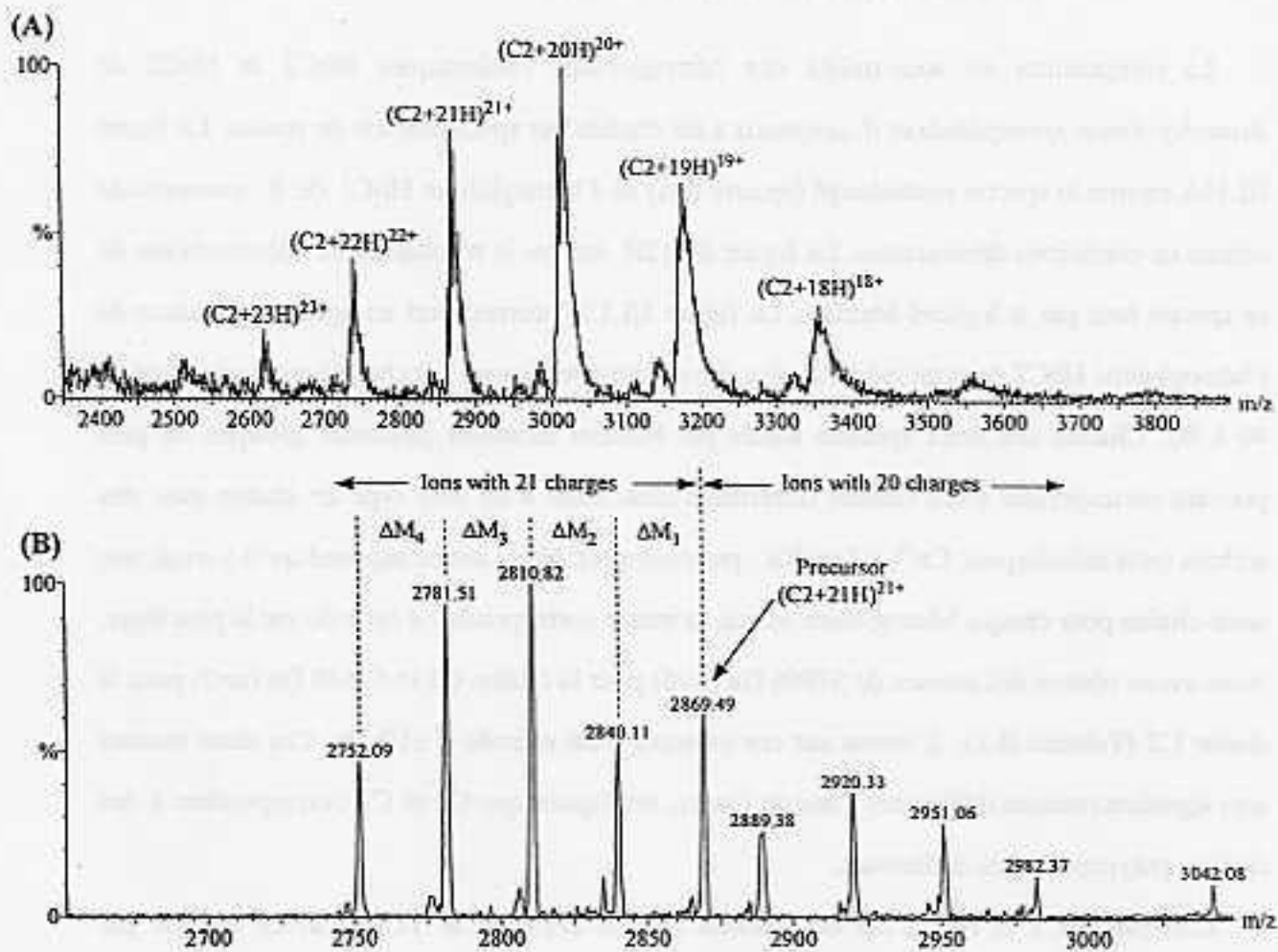


Figure III.13 : Analyse de l'hémoglobine HbC2 en spectrométrie de masse en tandem. A Spectre multichargé m/z en conditions non dénaturantes. B Spectre de masse des produits de collision de l'ion $(C2+21H)^{21+}$ montrant la perte progressive de 4 hèmes. H correspond au proton.

Tableau III.2 : Récapitulatif des données de masses moléculaires (Mr) des molécules natives et des sous-unités pour les hémoglobines de *B. symmytilida* et *B. seepensis*.

	<i>B. symmytilida</i>		<i>B. seepensis</i>	
	Mr native (Da)	Mr sous-unité (Da)	Mr native (Da)	Mr sous-unité (Da)
V1	3 10 ⁶ ^a	nd	3 10 ⁶ ^a	nd
HbC1	110 000 ^a 152 900 ± 16000 ^b	57 996 ± 10 ^c	110 000 ^a	57 728 ± 10 ^c
HbC2	55 000 ^a 123 600 ± 1900 ^b	57 648 ± 10 ^c	55 000 ^a	57 670 ± 10 ^c
HbC3	23 000 ^a	nd	23 000 ^a	nd

^a masse déterminée par FPLC, ^b masse déterminée par MALLS, ^c masse déterminée par ESI-MS, nd non déterminé.

III.3.1.3. Etude de la structure des sous-unités des hémoglobines de *B. symmytilida*.

L'étude de la structure des sous-unités des hémoglobines de *B. symmytilida* a été effectuée à l'aide de deux techniques : la spectrométrie de masse en tandem et la digestion par la subtilisine.

En ce qui concerne la spectrométrie de masse en conditions non-dénaturantes, l'échantillon n'est pas dissout dans un mélange d'acétonitrile et d'acide formique avant injection dans le spectromètre de masse mais dans de l'eau. Lorsqu'elle a été dissoute dans de l'eau à pH 7, l'hémoglobine C2 se chargeait significativement moins qu'en conditions dénaturantes (16 à 20 charges au lieu de 40 à 80). Ceci indique un certain maintien du repliement de la protéine. La masse mesurée dans ces conditions était un peu plus élevée que celle de la chaîne C2 plus 4 hèmes. Dans l'eau à pH ~3, le nombre de charges était un peu plus élevé qu'à pH 7, avec 18 à 23 charges (Figure III.13A). Ceci suggère une certaine dénaturation de la protéine mais le nombre est toujours très inférieur à celui obtenu en conditions dénaturantes, indiquant que le repliement de la protéine n'est pas totalement éliminé. La masse obtenue dans ces conditions (60114, n=2) correspond à celle de la chaîne C2 dénaturée plus 4 hèmes (57648 + 4 x 616.5 = 60114). A partir de ce résultat, on peut en déduire que HbC2 possède 4 molécules d'hème.

La spectrométrie de masse en tandem a permis de confirmer ce résultat. La figure III.13B montre le spectre de masse (m/z) obtenu après collision de l'ion (C2+21H)²¹⁺, sélectionné après passage de HbC2 dissoute dans de l'eau à pH ~3 sur le premier quadrupole (figure III.13A).

Sur ce spectre, on voit l'ion précurseur de rapport $m/z = 2869,47$ et quatre autres pics caractérisés par des rapports m/z plus petits, séparés par $M1- M4$. Ces pics (avec 21 charges) peuvent être attribués à des ions provenant du précurseur qui ont perdu jusqu'à 4 fois une unité de masse très proche de celle d'une molécule d'hème (616,5 Da). Les quatre pics avec des rapports m/z supérieurs à celui du précurseur correspondent à des ions avec 20 charges (provenant du pic voisin du précurseur avant sélection). Les résultats de cinq analyses répétées sur les ions précurseurs avec 20 et 21 charges sont rassemblés dans le Tableau III.3. On remarque la très bonne adéquation entre les valeurs obtenues et celle correspondant à la masse d'une molécule d'hème.

Les mesures du rapport hème/protéine par la méthode de la pyridine hémochromogène et la méthode de Lowry a donné une valeur de $13410,2 \pm 866,9$ g de protéine/mole d'hème pour HbC1 (n=5) et $13731,5 \pm 641,8$ pour HbC2 (n=5). En utilisant les masses des sous-unités C1 et C2 obtenues par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes (57996 ± 10 Da et 57648 ± 10 Da, respectivement), nous obtenons $4,33 \pm 0,28$ molécules d'hème par chaîne polypeptidique pour C1 et $4,20 \pm 0,20$ pour C2. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par spectrométrie de masse en tandem.

Tableau III.3 : Différences de masse entre pics adjacents par spectrométrie de masse en tandem sur les ions C2 de *B. symmytilida*. M1- M4 correspondent aux différences de masse indiquées sur la figure III.13. Moyenne \pm écart type.

Ion précurseur	Différence de masse (Da)			
	$\Delta M1$	$\Delta M2$	$\Delta M3$	$\Delta M4$
(M+20H)²⁰⁺ (n=5)	617,0 \pm 2,6	614,6 \pm 2,1	617,4 \pm 2,0	615,7 \pm 2,9
(M+21H)²¹⁺ (n=5)	614,4 \pm 5,6	617,5 \pm 3,8	615,9 \pm 0,6	617,2 \pm 5,6
Moyenne générale (n=10)	615,7 \pm 4,3	616,0 \pm 3,3	616,6 \pm 1,6	616,4 \pm 4,3

La digestion par la subtilisine a été réalisée sur HbC1 et HbC2 de *Branchipolynoe symmytilida*. Les résultats sont similaires pour les deux molécules et seuls ceux obtenus pour HbC1 sont présentés. La figure III.14 montre un spectre d'élution du produit de digestion de HbC1 par la subtilisine pendant une heure, ainsi que le gel obtenu en faisant migrer les

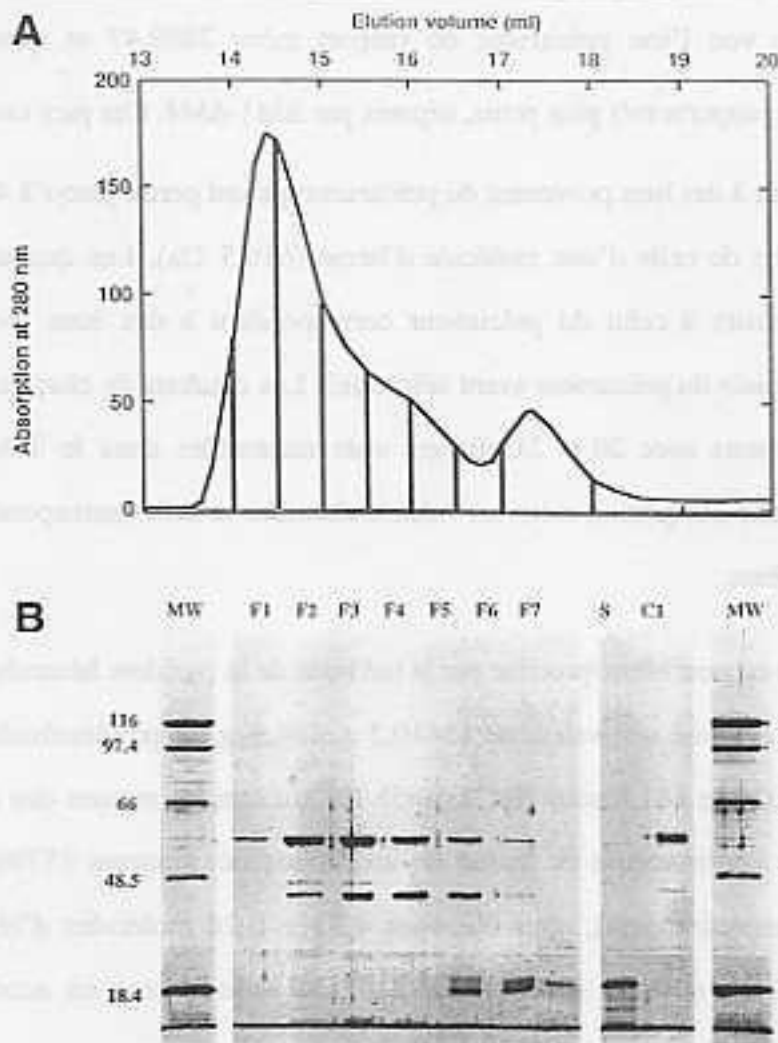


Figure III.14 : Analyse des produits de digestion de HbC1 de *Branchipolynoe symmytilida* par la subtilisine. **A** Profil d'éluion sur colonne Superose 12. **B** Analyse des fractions collectées en A par SDS-PAGE. MW, marqueurs de poids moléculaire; S, subtilisine; C1, HbC1 purifiée, non traitée.

Fraction	116	97.4	66	48.5	18.4
F1	+	+	+	+	+
F2	+	+	+	+	+
F3	+	+	+	+	+
F4	+	+	+	+	+
F5	+	+	+	+	+
F6	+	+	+	+	+
F7	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	+
C1	+	+	+	+	+

différentes fractions récoltées. Toutes les fractions récoltées absorbent simultanément à 280 et 414 nm, ce qui montre que ces fractions protéiques contiennent aussi de l'hème. Dans la première fraction, une bande unique est présente à environ 54 kDa. Dans les fractions 2 et 3, la bande à 54 kDa devient plus épaisse et une autre bande bien nette apparaît à 37,3 kDa. Par ailleurs, deux bandes, moins visibles, sont situées à environ 40,8 et 25 kDa. Un peptide de très petite taille est également visible au bas du gel, proche du front de migration. Dans les fractions suivantes, les bandes les moins visibles disparaissent alors que dans les fractions 5 et 6, d'autres bandes apparaissent à des masses comprises entre 19,7 et 21,3 kDa. Dans la fraction 7, une bande unique est visible à environ 21 kDa. A la concentration utilisée (1/50^{ème} de la quantité d'hémoglobine), la subtilisine n'est pas visible sur le gel et ne peut donc pas correspondre à l'une de ces bandes observées.

III.1.1.4. Caractéristiques spectrophotométriques des hémoglobines coelomiques de *Branchipolynoe spp.*

Les caractéristiques spectrophotométriques des formes oxyhémoglobine (HbO₂), carboxyhémoglobine (HbCO), déoxyhémoglobine (Hb), méthémoglobine (Hi) et cyanmethémoglobine (HiCN) ont été étudiées pour les deux hémoglobines les plus abondantes (HbC1 et HbC2) de *Branchipolynoe symmytilida* et *B. seepensis*. Les spectres obtenus sont bien typiques des hémoglobines. On distingue deux pics entre 500 et 600 nm pour HbO₂ et HbCO et un seul pour les dérivés Hb, Hi et HiCN. Entre 400 et 430 nm (bande de Soret), on voit un pic dont la position varie avec le dérivé d'hémoglobine considéré (Figure III.15A et B). Il ne semble pas y avoir de différence notable entre les deux hémoglobines, ni entre les deux espèces (*B. symmytilida* et *B. seepensis*) du point de vue de leurs caractéristiques spectrophotométriques. La position des pics, les coefficients millimolaires d'extinction et les rapports informatifs sont résumés dans les tableaux III.4.A (*B. symmytilida*) et III.4.B (*B. seepensis*). Les quatre hémoglobines présentent un rapport / voisin de 0.9, plus petit que 1.

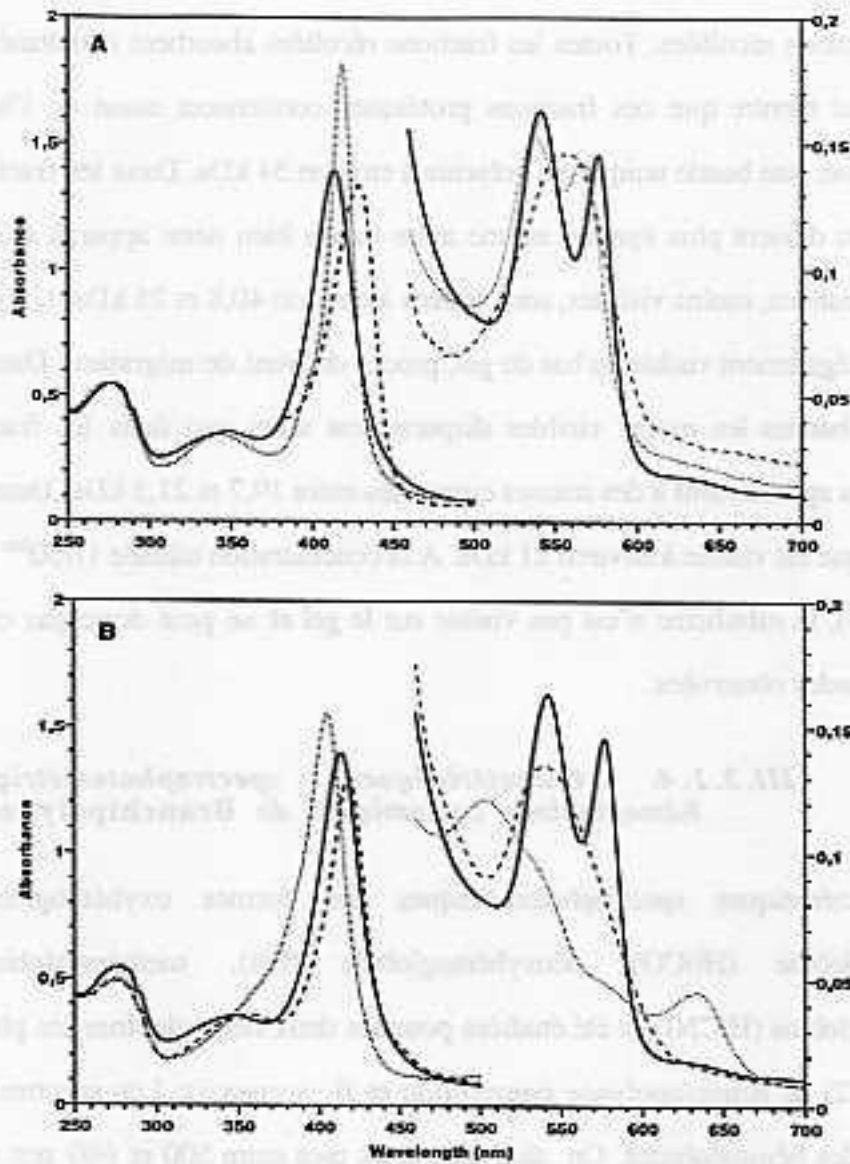


Figure III.15 : Spectres d'absorption UV/Visible des dérivés de l'hémoglobine HbC2 de *Branchipolynoe symmytilida*. A HbO₂ (---), Hb (—) et HbCO (·-·). B HbO₂ (---), Hi (-·-·) et HiCN (·-·).

Tableau III.4 : Position des pics, coefficients d'extinction millimolaire () et rapports pour les cinq dérivés des deux hémoglobines majoritaires du coelome. **A.** *B. symmytilida*. **B.** *B. seepensis*. * Valeur de référence prise comme base pour les calculs. ** Les valeurs données ont été obtenues après ajout de dithionite de sodium on ne peut pas étudier la partie dans l'UV car le dithionite y a une forte absorption (on n'a donc pas le pic correspondant aux protéines). **nd** = non détecté.

A		Pic (nm)		(l.mmol ⁻¹ .cm ⁻¹)		Rapports		
Dérivés	nom	HbC1	HbC2	HbC1	HbC2		HbC1	HbC2
Hb O ₂	(Soret) protéine	576,5	577	11,9	11,9	/	0,89	0,92
		542	542	13,3	12,9	/	0,10	0,10
		414	412	114,1	113,8	/	0,12	0,11
		347,5	348,5	29,0	29,7	/prot	2,54	2,53
		278,5	278	44,9	44,9			
Hi	pic protéine	nd	633,5	-	3,8			
		502,5	503	9,9	10,3	pic/ /prot	0,08	0,08
		405	404,5	127,1	132,0		3,13	2,96
		274	278,5	40,5	44,6	Hi/ HbO ₂	1,11	1,16
HiCN	pic protéine	540,5	540,5	11,0*	11,0*			
		418,5	418,5	106,2	111,1	pic/ /prot	0,10	0,10
		358	357,5	29,4	30,6		2,64	2,51
		273,5	278	40,3	44,2	HiCN/ HbO 2	0,93	0,98
HbCO	protéine	567	567	11,7	11,4	/	0,94	0,94
		538	537,5	12,5	12,1	/	0,08	0,08
		418,5	418	148,7	143,1	/	0,08	0,08
		343,5	346	27,9	27,8	/prot	3,31	3,27
		274	274	44,9	43,8			
Hb**	pic	555	556	12,0	11,0	pic/ Hb/ HbO ₂	0,11	0,11
		428,5	429	109,3	104,6		1,03	0,94

B		Pic (nm)		(l.mmol ⁻¹ .cm ⁻¹)		Rapports		
Dérivés	nom	HbC1	HbC2	HbC1	HbC2		HbC1	HbC2
Hb O ₂	(Soret) prot	576,5	576,5	12,6	12,7	/	0,90	0,93
		541	542	13,9	13,7	/	0,11	0,11
		412,5	413,5	117,5	117,6	/	0,12	0,12
		353,5	346,5	35,8	34,1	/prot	2,32	2,34
		276,5	278,5	50,6	50,3			
Hi	pic prot	630,5	631,5	4,1	3,7			
		501,5	503	10,8	10,2	pic/ /prot	0,09	0,09
		404,5	404,5	115,7	114,1		2,49	2,41
HiCN	pic prot	277	274	46,5	46,3	Hi/ HbO ₂	1,11	1,16
		538	538,5	11,0*	11,0*			
		418	418	106,2	111,1	pic/ /prot	0,11	0,11
		359	358	29,4	30,6		2,13	2,19
HbCO	prot	273,5	278	40,3	44,2	HiCN/ HbO 2	0,93	0,98
		567,5	567	11,4	12,7	/	0,92	0,97
		537	538,5	12,4	13,2	/	0,08	0,08
		418	418	149,3	157,1	/	0,08	0,08
		349	344,5	33,0	33,5	/prot	3,03	3,03
Hb**	pic	275,5	274,5	49,3	51,8			
		559	556	12,1	11,0	pic/ Hb/ HbO ₂	0,10	0,10
		428,5	428,5	119,4	114,7		1,02	0,98

III.1.1.5. Contenu en acides aminés des hémoglobines coelomiques de Branchipolynoe

Le contenu en acides aminés des trois hémoglobines coelomiques de *Branchipolynoe symmytilida* et *B. seepensis* a été étudié. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le Tableau III.5. Ces hémoglobines sont caractérisées par une forte teneur en alanine et glycine, deux acides aminés apolaires qui représentent 40% des acides aminés de HbC1 de *B. symmytilida*, 28 % de HbC2 et 37% de HbC3. Chez *B. seepensis*, ils représentent 41% de HbC1, 34% de HbC2 et 40% de HbC3. Curieusement, aucun résidu tryptophane n'a été détecté dans ces hémoglobines. Par ailleurs, HbC1 des deux espèces contient très peu de cystéines (de l'ordre de 1%) alors que cet acide aminé peut représenter jusqu'à 13.4% des acides aminés de HbC2 de *B. symmytilida*.

Tableau III.5 : Contenu en acides aminés des différentes hémoglobines coelomiques de *B. symmytilida* et de *B. seepensis* (en pourcentages).

Acides aminés	<i>Branchipolynoe symmytilida</i>			<i>Branchipolynoe seepensis</i>		
	HbC1	HbC2	HbC3	HbC1	HbC2	HbC3
Asp+Asn	9,0	9,8	11,2	12,6	7,4	12,1
Glu+Gln	5,5	5,6	5,4	5,2	4,1	5,0
Cyst	0,8	13,4	4,6	1,1	4,2	2,9
Ser	8,3	4,9	6,8	7,2	6,3	6,7
His	2,2	4,8	2,8	2,5	3,1	2,2
Gly	17,8	10,6	12,1	17,4	10,3	15
Thr	3,8	4,4	4,4	3,8	3,8	3,6
Arg	1,8	1,9	1,3	1,8	2,5	1,4
Ala	22,4	17,4	24,5	23,9	23,3	24,9
Tyr	3,4	2,5	3,1	3,5	4,6	3,2
Met	3,8	3,4	3,8	2,6	4,2	2,5
Trp	0	0	0	0	0	0
Val	4,8	4,7	4,6	4,6	6,8	5,1
Phe	4,5	4,2	4,1	4,4	6,0	4,1
Ile	2,2	3,3	2,0	1,9	3,2	1,9
Leu	5,8	5,4	5,8	5,1	6,6	5,8
Lys	3,9	3,8	3,4	2,3	3,7	3,5

III.1.2. Structure primaire des hémoglobines coelomiques de *Branchipolynoe symmytilida*.

Le séquençage des hémoglobines coelomiques a été entrepris chez *Branchipolynoe symmytilida*. Les résultats présentés ici sont préliminaires et font en ce moment l'objet d'un travail plus approfondi (obtention des domaines D1 et D2, localisation des introns dans C1 et C2).

a) Amplification, séquençage et hybridation des ARNm

L'amplification avec l'ancre d'un côté et l'amorce dégénérée de l'autre côté a généré plusieurs bandes de différente taille et l'ensemble des produits de PCR a été cloné. Le séquençage des clones contenant les différents fragments a permis d'identifier 6 séquences correspondant à de l'hémoglobine. Certaines de ces séquences (91 et 93) contenaient un domaine globine puis une séquence 3'UTR et d'autres deux domaines globine (appelés D3 et D4 de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3') et une séquence 3'UTR (séquences 92, 94, 97). Cette dernière variait en longueur de 71 à 205 nucléotides auxquels s'ajoute une queue poly(A) de 15 à 21 nucléotides (Figure III.16). Les séquences 3'UTR des séquences 97 et 92 sont parfaitement identiques, celle de 94 ne diffère que par quelques nucléotides à son extrémité 3' et les autres sont très différentes. La séquence 91C est le résultat d'une amplification interne et correspond à un domaine complet plus un quart du domaine suivant.

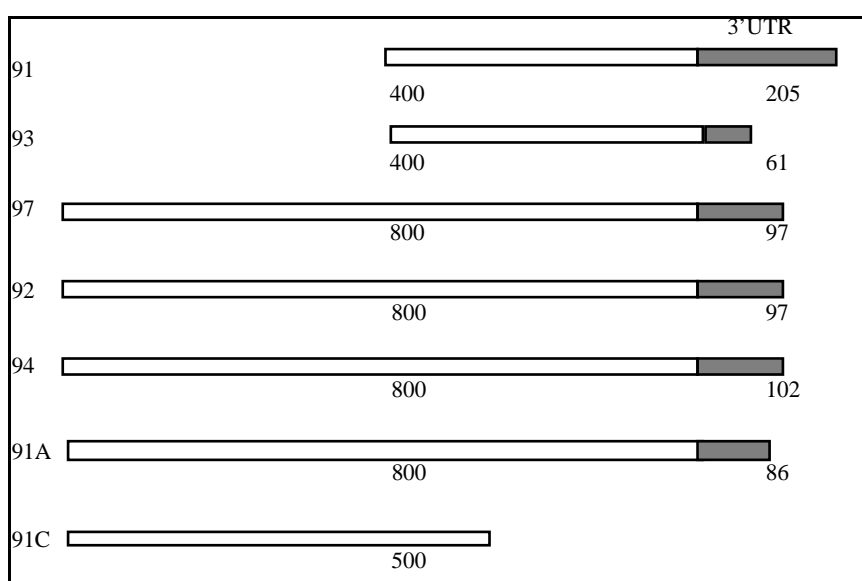


Figure III.16 : Structure schématique des séquences obtenues. La séquence codante apparaît en blanc.

L'hybridation des ARNm avec des sondes correspondant aux séquences 93 et 97 a été effectuée. La sonde 93 a révélé une seule bande située à environ 610 bases, de la taille d'un ARN de myoglobine (figure III.17). Par contre, la sonde 97 a révélé la présence une bande de 1980 bases. Cette taille correspond très probablement à un ARN messager codant une hémoglobine à 4 domaines, comme attendu pour les hémoglobines extracellulaires de *B. symmytilida*.

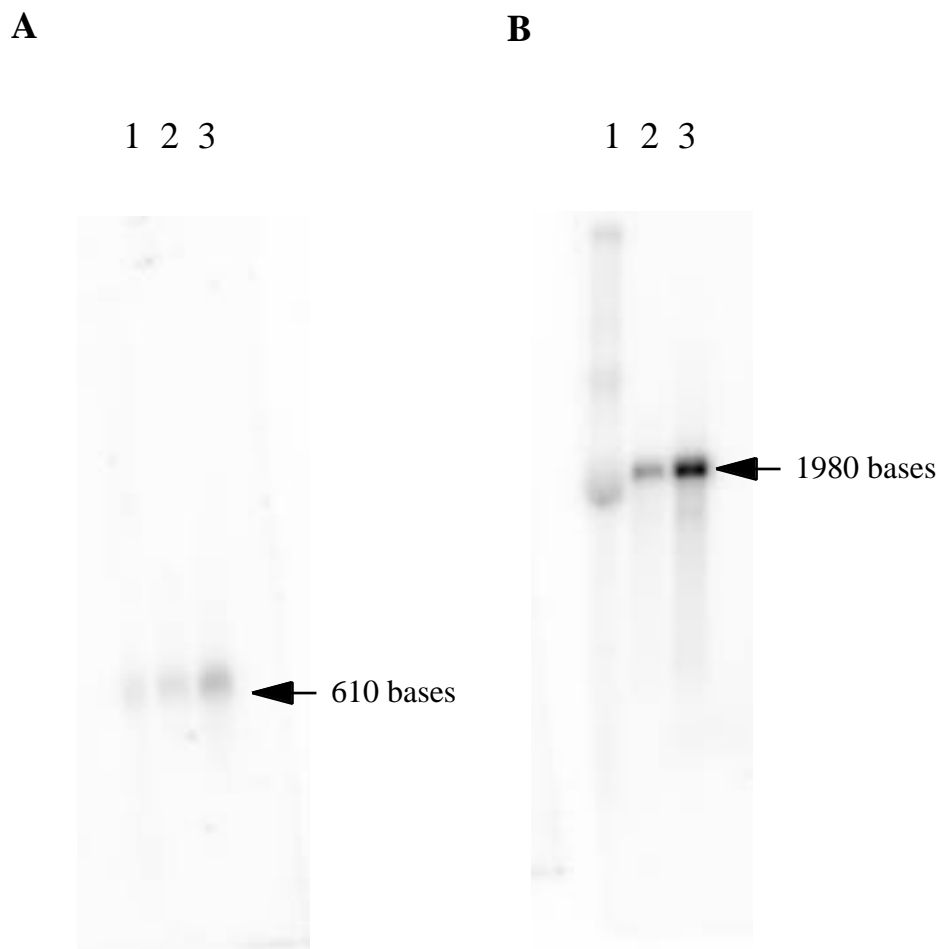


Figure III.17 : Résultat de l'hybridation d'un gel d'ARN par une sonde issue de la séquence 93 (A) ou 97 (B). La taille des bandes est donnée (estimation par une échelle marqueurs de poids moléculaires). 1 : 20 µg d'ARNtt; 2 : 1 µg d'ARNm; 3 : 3 µg d'ARNm.

b) Analyse des séquences

Les séquences codantes des globines de *Branchipolynoe symmytilida* ont été alignées entre elles pour définir leur degré d'apparentement et retracer l'évolution moléculaire de cette famille de gènes (Figure III.18). Un arbre de distances en a été tiré, en utilisant la distance Kimura 2-paramètres et la technique du neighbor-joining pour reconstruire l'arbre. Un ré-

échantillonnage automatique des bases a été effectué (bootstrap) sur 1000 répliquats avant le calcul des distances et la construction de l'arbre. Le nombre de fois où un même branchement est retrouvé est fourni pour chaque branches de l'arbre. Cet arbre montre que les domaines D3 et D4 sont regroupés en deux clades distincts, ce qui suggère l'existence d'une duplication ancienne. Les séquences 93 et 91 présentent quant à elles peu d'homologie avec les domaines D3 et D4. Quand les séquences de *B. symmytilida* sont alignées avec celle de la neuroglobine d'*Aphrodite aculeata*, la topologie de l'arbre n'est pas changée.

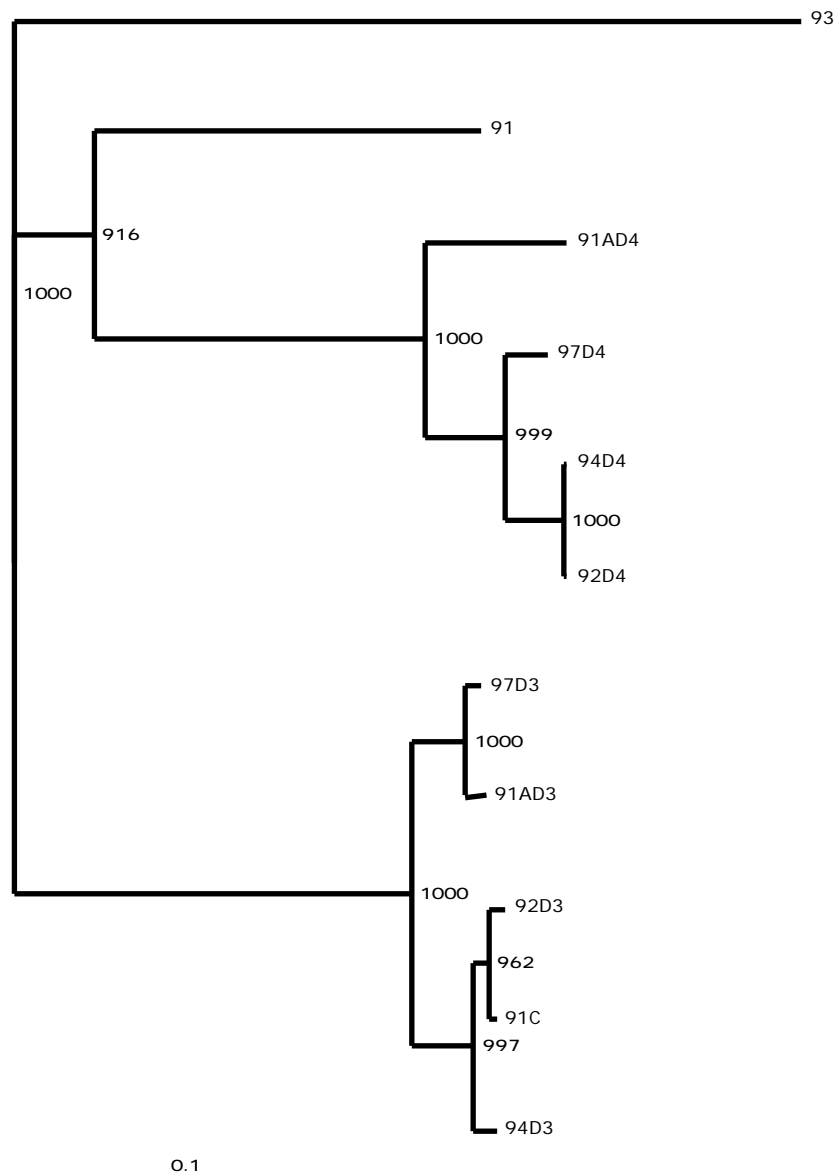


Figure III.18 : Phylogénie des séquences de globines de *Branchipolynoe symmytilida* entre elles. Les séquences du domaine 3 portent le suffixe D3 et celles du domaine 4 portent le suffixe D4. 91C est un produit d'amplification interne, ce qui ne permet pas de savoir avec certitude à quel domaine cette séquence correspond. Arbre reconstruit par la méthode du Neighbor Joining à partir des données de distance calculées par la méthode de Kimura 2 paramètres. Les valeurs indiquées aux branches sont des valeurs de bootstrap sur 1000 répliquats.

CHAPITRE III-*Caractérisation et structure des hémoglobines-*

Quand les séquences des ADNc sont traduites en acides aminés, on peut aligner les séquences obtenues entre elles (Figure III.19). Bien que l'alignement soit clair, il existe de nombreuses substitutions entre les domaines D3 et D4 des chaînes séquencées. Un arbre de distances réalisé à partir de cet alignement conduit au même résultat que celui obtenu à partir des séquences en acides nucléiques.

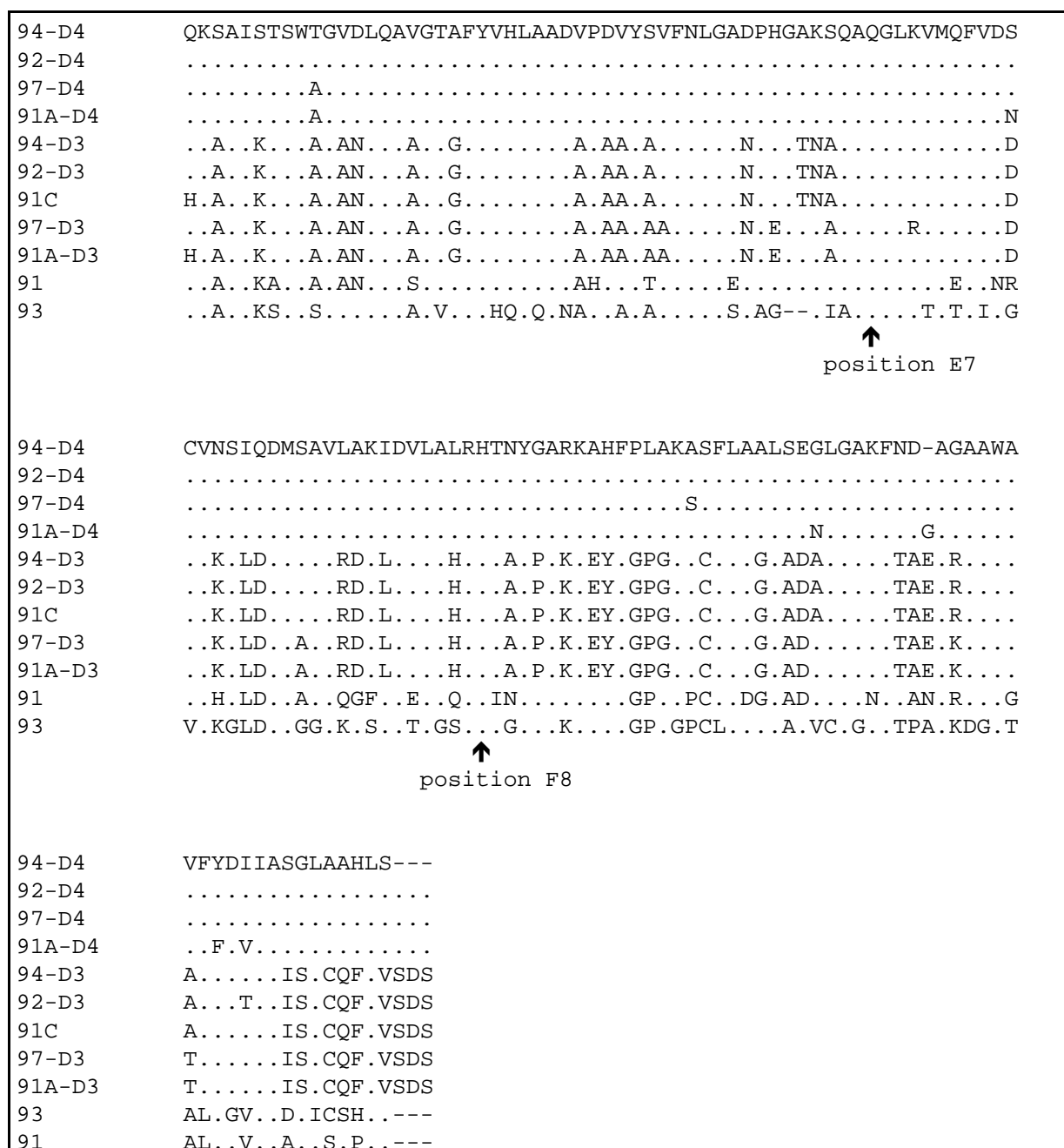


Figure III.19 : Alignement des différentes séquences obtenues chez *Branchipolynoe symmytilida*.

Les séquences 91, 93 et 97 ont été alignées avec celles des hémoglobines extracellulaires d'autres annélides, et avec celles d'hémoglobines intracellulaires de nématodes, du polychète

	NN	A	CCCCCCC	E
Mb fold	AAAAAAAAAAaAAaAaAB	BBBBXbBBbBBbBBCCcCCDDDDDDDDDDDDDEEEeEEeEEeEEe	EeeEF	FFF
Contacts hème		dd d d dddd	dd dd pd d	p
Glyc fold	AAAAAAAAAAaAAaAaA	B	BBBBBBBBBBBBB CCCCCCCCC	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE FFFFFFFF
Glydp2	-----MPLTADQVAALKASWPEVSAGDGG-----	-----GQLGLELFTKYFHENPQMMFIFG-----	-----YSGRTDALKH-----	-----NAKLQNHGKVIIDQIGKAVAEMDNAQMAGTLHAL
Glydp1	-----MHLTADQVAALKASWPEVSAGDGG-----	-----AQLGLEMFTRYFHENPQMMFIFG-----	-----YSGRTEALKH-----	-----SSKLQHHGKVIIDQIGKAVAEMDNAQMAGTLHAL
Glydp3	-----MHLTADQVAALKASWPEVSAGDGG-----	-----AQLGLEMFTRYFHENPQMMFVFG-----	-----YSGRTSALKH-----	-----NSKLQNHGKVIHQIGQAVSELDDGSKFEATLHKL
GlydmIV	-----MGLSAAQRQVVASTWKDIAGSDNG-----	-----AGVGKECFTKFLSAHHDIAAVFVG-----	-----FSGASD-----	-----P---G---VADL GAKVLAQIGVAVSHLGEDEGKMAEMKAV
GlydMI	-----GLSAAQRQVIAATWKDIAGADNG-----	-----AGVGKCLIKFLSAHPQMAAVFVG-----	-----FSGASD-----	-----P---G---VAAL GAKVLAQIGVAVSHLGEDEGKMAQMKAV
91prot	-----QKAAIKASWAGANL-----	-----QASGTAFYVHLAADAHDVYTVFN-----	-----LGEDPH-----	-----GAKSQAQGLKVMFVNR CVHSLDDMAAVQGFIDEL
97protD4	-----QKAAISTSWAGVDL-----	-----QAVGTAIYVQLAADVPDVYSVFN-----	-----LGADPH-----	-----GAKSQAQGLKVMQFVDS CVNSIQDMSAVLAKIDVL
97protD3	-----QKAAIKTSWAGANL-----	-----QAAGTGFYVHLAADAPAAYAAFN-----	-----LGANPE-----	-----GAKAQAQGLRVMQFVDD CVKSLDDMAAVRDKLDVL
93prot	-----QKAAIKSSWSGVDL-----	-----QAAGVAFYHQLQANAPDAYAVFN-----	-----LGSD-----	-----AGKIAAQGLKTMTFIDGVVKGSLDDMGVKASIDTL
Cerelacbw	-----MVNW---A-----	-----AVVDAFYVELFTHAHPQYQDRFA-----	-----FKGVALGDLK-----	-----GNAAYQTQASKTVDYIT---AALAG---SADAAGL
Cerelacn	-----MVNW---A-----	-----AVVDDFYQELFKAHPEYQNKFG-----	-----FKGVALGSLK-----	-----GNAAYKTQAGKTVDYIN---AAIGG---SADAAGL
UrecA	-----GLTAAQIKAIQDHWFLNIKG-CL-----	-----QAAADSIFFKYLTAYPGDLAF-----	-----HKFSSVPLYGLR-----	-----SNPAYKAQTLTVINYLDKVV DALGNA--GALMKAK
Urec	-----MGLTTAQIKAIQDHWFLNIKG-CL-----	-----QAAADSIFFKYLTAYPGDLAF-----	-----HKFSSVPLYGLR-----	-----SNPAYKAQTLTVINYLDKVV DALGNA--GALMKAK
Lumtd2	----MKVFLAVFLLAFAACVSADCNKLEGLKVKLQWARAFGTAHD-----	-----RLAFGLELWKILREHPEIKEP-----	-----GRVVRGDNII-----	-----SPEFGAHSQRVLSGLDITISMLDTPDMLAAQLAHL
Lumtel	-----ECLVTEGLKVKLQWASAFGHAHQ-----	-----RVAFGLELWKILREHPEIKAP-----	-----SRVVRGDNII-----	-----SPQFGAHSQRVLSGLDITISMLDTPDMLAAQLAHL
Tubifex	-----ECDALQRFKVKHQWAEAFGTSHH-----	-----RLDFGLKLWNSIFRDAPEIRGLF-----	-----KRVDGDNAY-----	-----SAEFEAHAERVLGGLDMTISLLDDQAAFDAQLAHL
Phese1	-----DCNTLKRFKVKHQWQOVFSGEHH-----	-----RTEFSLHFWEFLHDHDLVSLF-----	-----KRVQGENII-----	-----SPEFQAHGIRVLAGLDSVIGVLDDEDDTFTVQLAHL
Rifb	-----DYVCGPLQRLKVKRQWAEAYGSGNS-----	-----REEFGHFIWSHVFQHS PAARDMF-----	-----KRVRGDNII-----	-----TPAFRAHAATRVLGGLDMC IALLDDEPVLNTQLAHL
LamAIII	-----YECGPLQRLKVKRQWAEAYGSGND-----	-----REEFGHFIWTHVFKDAPSARDLF-----	-----KRVRGDNII-----	-----TPAFRAHAATRVLGGLDMC IALLDDEPVLNTQLAHL
LumteII	-----KKQCGVLEGLKVKSEWGRAYGSGHD-----	-----REAFSAIWRATFAQVPE SRSLF-----	-----KRVRGDDTS-----	-----HPAFIAHAERVLGGLDIAISTLDQPATLKEELDHL
TyloIIb	-----DDCCSAADRHEVLDNWKGISAEFTG-----	-----RRVAIGQAIQFQELFALDPNAKGVF-----	-----GRVNVDDTH-----	-----EADWKAHVIRVINGLDLAVNLLDPKALQOEELKHL
TyloIIc	-----DTCCSIEDRREVQALWRSIWSAEDTG-----	-----RRTLIGRLLFEELFEIDGATKGLF-----	-----KRNVVDDTH-----	-----SPEEFAHVLRVINGLDLIGVLDGSDSTLNSLIDHL
LumteIV	-----ADDECCSYEDRREIRHIWDDVWSSSFTD-----	-----RRVAIVRAVFDLDFKHYP TSKALF-----	-----ERVKIDPE-----	-----SGEFKSHLVRVANGLDLILNLLDRTLVLQSHLGH
LumteIII	MLRQLLVLVGLAVVCLADEHEHCSEEDHRIVQKQWDILWRDTESSKIKIGFGRLLLTAKLADI PDVNDLF-----	-----KRVDIEHAE-----	-----GPKFSAHALRILNGLDLAINLLDPPALDAALDHL	
TyloIIa	-----TDCGILQRKVKQWQAVQVYSGES-----	-----RTDFAIDVFNNFFRTNPD-----	-----RSLFNRVNGDNVY-----	-----SPEFKAHMVRVFAGFDILISVLDKPVLDQALAHY
Aphacmyo	-----MAGLSGADIAVIRSTWAKVQGS-----	-----ATDIGRSIFIKFFELDPAAQNEFP-----	-----CKGESLAALK-----	-----TNVLLGQH GAKFEYITTAVNGLDDYAGKAHG PLTEL
Phyca	-----VLSEGEWQLVLHVWAKVEAD-----	-----VAGHGQDILIRLFKSHPETLEK-----	-----DRFKHLKTEAMKASEDLKKH-----	-----GVTVLTALG---AILKKKGHEAELKPL

Tryptophane
invariant

Phénylalanine
invariante

"Histidine"
Position E18
distale

Figure III.20 : Alignement des globines de *Branchipolynoe symmytilida* (en grisé) avec celles d'autres annélides et la myoglobine de *Physeter catodon*. Les hélices indiquées en tête sont celles obtenues des structures cristallines de la myoglobine (Mb) et celle de l'hémoglobine de *Glycera* (Glyc). Glyd, *Glycera dibranchiata*; Cerelac, *Cerebelus lacteus*; Urec, *Urechis caupo*; Lumt, *Lumbricus terrestris*; Tylo, *Tylorrhynchus heterochaetus*; Lam, *Lamellibrachia* sp.; Rif, *Riftia pachyptila*; Tubifex, *Tubifex tubifex*; Aphac, *Aphrodite aculeata*; Phyca, *Physeter catodon*; Phese, *Pheretima seiboldi*.

	FF	FFFF	G	H
Mb fold	ffffffgx	gggggggggggggggggggg	gggggggg	hHHHHHHhHHhHHhHHhXHHHHHC
Contacts hème	p pp p pp p pp dp			p p p
Glyc fold	FFFFFFF	GGGGGGGGGGGGGGGGGG		HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Glydp2	GVRHKGFG--DIRADFFPALGMCLLDAMEEKVPG----	LNRTLWAAAY-REISDALVAGLES-----		
Glydp1	GVRHKGFG--DIRAEFFPALGMCLLDAMEEKVPG----	LNRTLWAAAY-REISDACIAGLQS-----		
Glydp3	GQEHKGFG--DIKGEYFPALGDALLEAMNSKVHG----	LDRTLWAAAGY-RVISDALIAGLES-----		
GlydmIV	GVRHKGYGKHIKAQYFEPLGASLLSAMEHRIGGKMTAAAKDAWAAAY-	ADISGALISGLQS-----		
GlydMI	GVRHKGYGKHIKAQYFEPLGASLLSAMEHRIGGKMNAAKDAWAAAY-	ADISGALISGLQS-----		
91prot	AQRHINYG---ARKAHFGPAKPCFLDGLADGLGANFNANARAAWGALY-	DVIAAGLSAPLS-----		
97protD4	ALRHINYG---ARKAHFLAKSSFLAALSEGLGAKFN-DAGAAWAVFY-	DIIASGLAAHLS-----		
97protD3	AHRHTAYP---AKKEYFPGKACFLAGLADGLGAKFTA EAKAAWATFY-	DIIAISLCQFLVSDS---		
93prot	GSRHTGYG---AKKAHFGPAGPCLLAALAEVCGGKFTPAAKDGWTALY-	GVIADGICSHLS-----		
Cerelacbw	ASRHHVGRN---VGAPEFTHAKACLAK-----	ACAANGAPDL-GGAVDAIISHF-----		
Cerelacn	ASRHHGRN---VGSAEFHNAKACLAK-----	ACSAHGAPDL-GHAIDDILSHL-----		
UrecA	VPSHDAMG---ITPKHFGQLLKLVGGVFQEEFSAD--	PTTVAAWGDAA-GVLVAAMK-----		
Urec	VPSHDAMG---ITPKHFGQLLKLVGGVFQEEFSAD--	PTTVAAWGDAA-GVLVAAMK-----		
Lumtd2	KSQHVER---NLKPEFFDIFLNHLLEVLGDHLG-T-	NLDFTAWKDCI-NHIIDDIK-----		
Lumtel	KVQHVER---NLKPEFFDIFLKHLLHVLGDRLG-T-	HDFGAWHDCV-DQIIDGIKDI-----		
Tubifex	KSQHAER---NIKADYYGVFNELLAVLPDYLG-T-	KLDFKAWSECL-GVITGAIHD-----		
Phese1	KAQHTER---GTKPEYFDLFGTQLFDILGDKLG-T-	HFDQAAWRDCY-AVIAAGIKP-----		
Rifb	AKQHETR---GVEAAHYDTVNHAVMGVENVIGSE--	VFDQDAWKPCL-NVITNGIQG-----		
LamAIII	ASQHSR---GVSAAQYDVVEHSVMMGVEHEIGQN--	VFDKDAWQACL-DVITGGIQGN-----		
LumteII	QVQHGR---KIPDNFYDAFKTAILHVVAQQLG-R-	CYDREAWDACI-DHIEDGIKGHH-----		
TyloIIb	ARQHRS---GVKAVYFDEMEKALLKVLQVSS---	HFNSGAWDRCF-TRIADVIKAELEP-----		
TyloIIc	AEQHKARA---GFKTVYFKEFGKALNHVLPQVLS---	CFNPEAWNRCF-DGLVDVISHRIDG-----		
LumteIV	ADQHIQRK---GVTKEYFRGIGEAFAFVLPQVLS---	CFNVDawnRCF-HRLVARIKDLPE-----		
LumteIII	AHQHEVR---EGVQKAHFKKFGEILATGLPQVLD---	DYDALAWKSCL-KGILTKISSRLNA-----		
TyloIIa	AAFHKQFG-----TIPFKAFGQTMFQTIAEHIGH---	ADIGAWRACYAEQIVTGITA-----		
Aphacmyo	GSRHKTRG---TTPANFGKAGEALLAILASVVGDFTPAAKDAWTKVY-	NTISSTMQAAL-----		
Phyca	AQSHATKH---KIPKYLEFISEAIIHVLHSRHPGDFGADAQGAMNKAL-	ELFRKDIAAKYKELGYQG-----		

Histidine
proximale

Figure III.20 (suite)

Glycera dibranchiata, de l'échiurien *Urechis caupo* et d'un vertébré (Figure III.20). Dans les globines de *Branchipolynoe symmytilida*, tout comme celles du Nématode *Cerebelus lacteus* et de l'échiurien *Urechis caupo*, l'histidine distale est remplacée par une glutamine. Les deux acides aminés invariants tryptophane et phénylalanine (voir figure III.20) sont aussi présents dans les globines de *Branchipolynoe*. On peut aussi remarquer la présence d'une cystéine située 11 acides aminés après la position de l'histidine distale dans toutes les globines de *Branchipolynoe*, à l'exception de la globine 93, ainsi que dans les globines de *Riftia pachyptila* et *Lamellibrachia sp.*

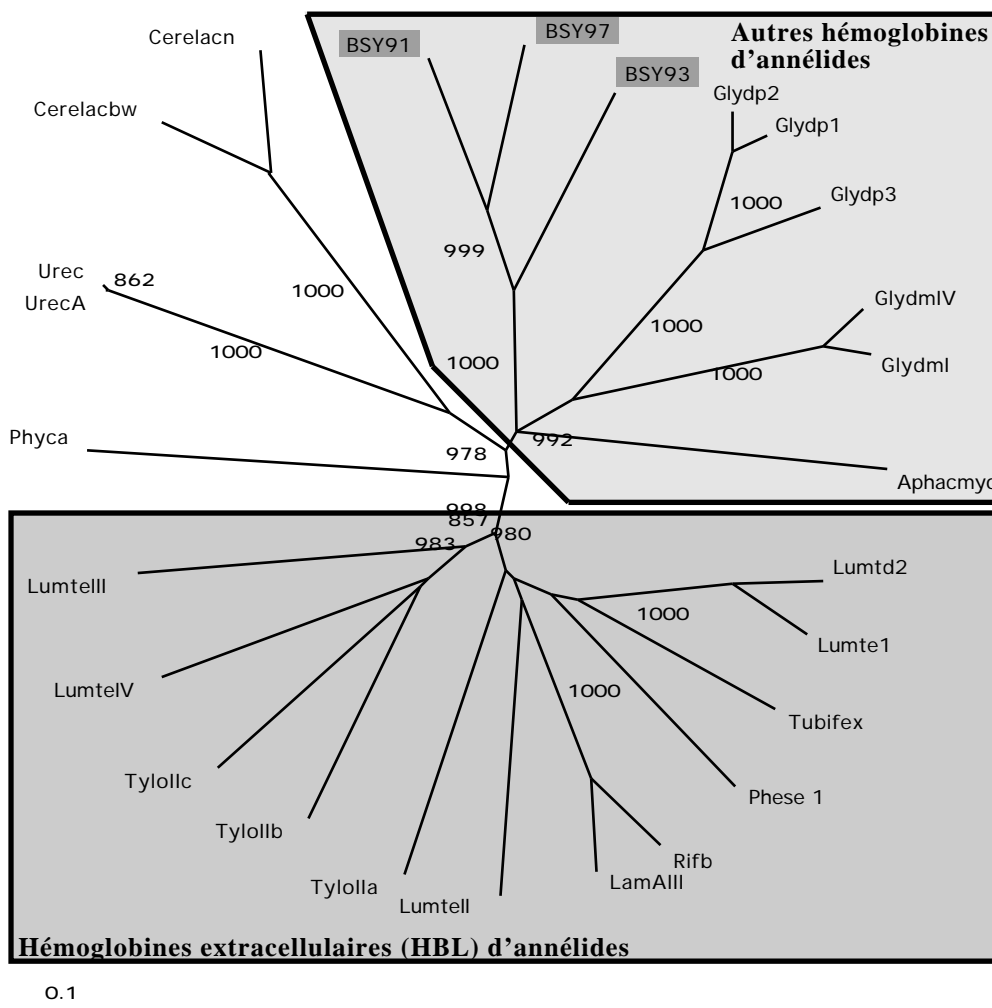


Figure III.21 : Arbre non raciné des séquences protéiques des globines analysées. Lumte *Lumbricus terrestris* (Annélide oligochète), Urec *Urechis caupo* (Echiurien), BSY *Branchipolynoe symmytilida* (Annélide polychète), Aphac *Aphrodite aculeata* (Annélide polychète), Glyd *Glycera dibranchiata* (Annélide polychète), Cerelac *Cerebelus lacteus* (Nématode), Phyca *Physeter catodon* (Vertébré), Tylo *Tylorrhinchus heterochaetus* (Annélide polychète), Tubifex *Tubifex tubifex* (Annélide oligochète), Phese *Pheretima sieboldii* (Annélide oligochète), Lam *Lamellibrachia sp.* (Annélide vestimentifère), Rif *Riftia pachyptila* (Annélide vestimentifère). Les valeurs de bootstrap supérieures à 85% sont indiquées pour chaque branche.

Lorsqu'un arbre phylogénétique est réalisé à partir de cet alignement (Figure III.21), on voit très nettement une dichotomie entre les hémoglobines extracellulaires d'annélides intervenant dans une structure hexagonale en bicouche et les autres hémoglobines, y compris celles de *B. symmytilida*. Parmi ces dernières, la séquence 97 correspond à une hémoglobine extracellulaire. Cette chaîne se retrouve pourtant dans un groupe ne contenant que des hémoglobines intracellulaires, ce qui suggère que plusieurs événements indépendants sont impliqués dans l'émergence des hémoglobines extracellulaires au cours de l'évolution.

c) Structure du gène de la globine 93

L'amplification du gène codant pour la globine 93 à partir de l'ADN génomique de *Branchipolynoe symmytilida* a généré une bande unique faisant environ 600 paires de bases de plus que la même globine amplifiée sur l'ADNc. Le produit a été séquencé et les séquences comparées. Le gène correspondant à la séquence 93 contient deux introns (Figure III.22) d'environ 300 paires de bases chacun. Ces introns sont situés aux positions conservées B12.2 (hélice B, après la deuxième base du codon du douzième acide aminé) et G7.0 (hélice G, juste avant la première base du codon du septième acide aminé).

III.1.3. Structure de l'hémoglobine intracellulaire d'*Alvinella pompejana*.

A partir de l'extrait des coelomocytes, un seul pic absorbant à la fois à 414 et 280 nm a été isolé. Sa masse apparente a été estimée à 14 kDa. Toutes les autres analyses (structure et fonction) ont été réalisées sur cette fraction, apparaissant homogène en taille.

La fraction pure a été analysée à trois reprises par ESI-MS, une fois dans le tampon qui a servi à la purification, et deux fois après désalage sur billes de résine échangeuse de cations. Bien que le désalage ait amélioré la qualité de l'analyse, aucun changement dans la masse obtenue n'a été observé. La fraction purifiée à partir de l'extrait des coelomocytes contient essentiellement un composant majeur de masse moléculaire $14810 \pm 1,5$ Da (Figure III.23). Les autres pics représentaient moins de 5% du composant majeur et ne pouvaient par conséquent pas être séparés d'une façon certaine du bruit de fond.

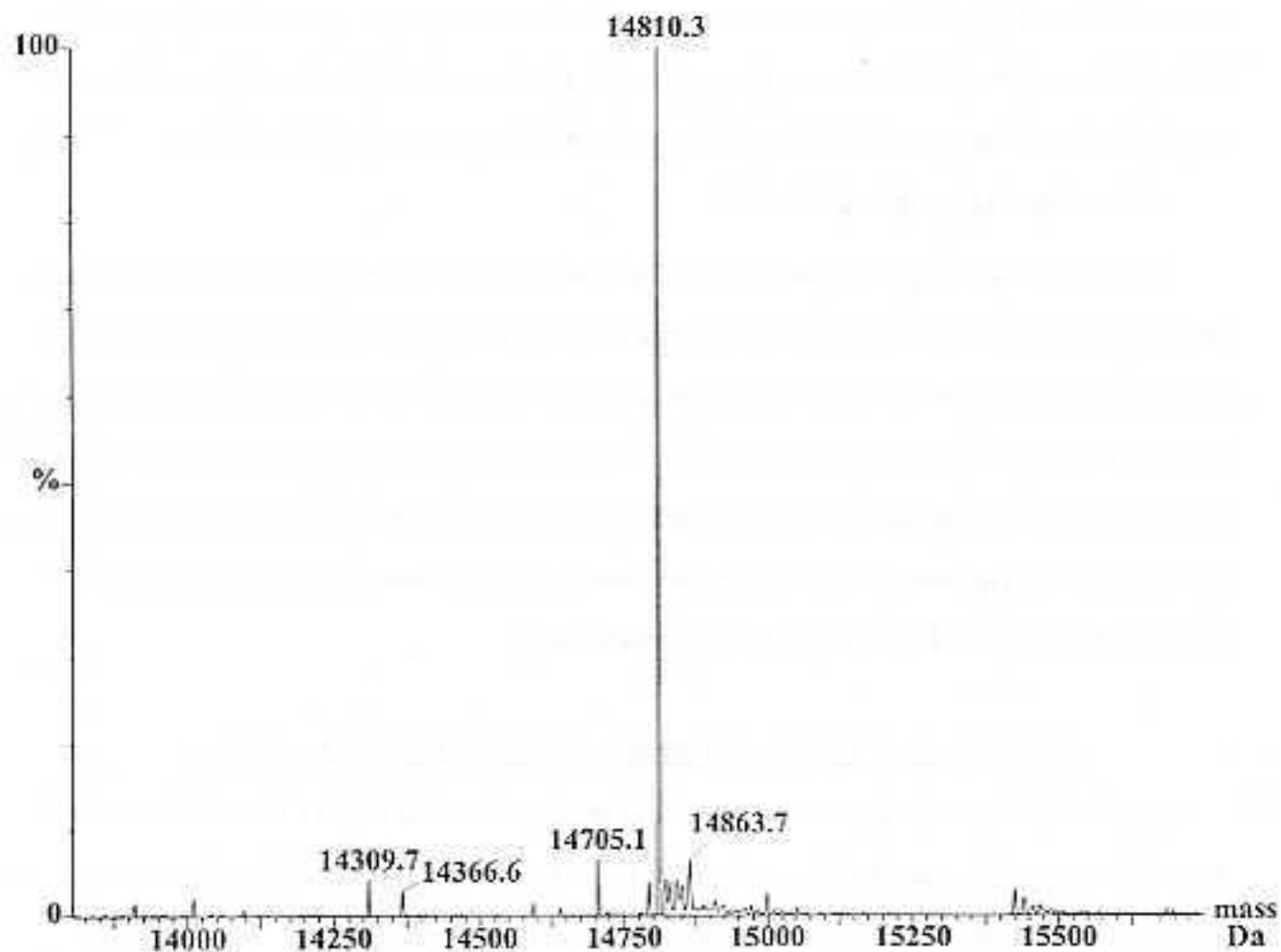


Figure III.23 : Analyse ESI-MS de l'hémoglobine intracellulaire d'*Alvinella pompejana*. Les données ont été analysées par le logiciel MaxEnt.

1	75
cDNA CAGAAGGCGG CCATCAAGAG CTCCTGGTCG GGAGTGGACC TTCAGGCCGC TGGGGTCGCA TTCTACCATC A----	
gDNA ~~~~~~CG GGAGTGGACC TTCAGGCCGC TGGGGTCGCA TTCTACCATC AGTAA	
	~~~~~ <i>iff93Riff</i> ~~~~~
76	150
cDNA -----	
gDNA GTACA CCATATTATA TTAGTCAAAA TATCACCTAC TATTGCTGTA TTATTTAAT CCATTGAATT TGAATGTAAA	
151	225
cDNA -----	
gDNA TTGCAATTAA ATTAAGATTT TATAGTCTTC CCCATTCTGC GGAGATGGAC TACTTTGTCA CTCCAAAGAA TGTA	
226	300
cDNA -----	
gDNA GCTCT CAGATATAAC GAGAAAAATA TTAACCAGAT ATATGTGGCT TGGTGTATTT CCTGGATTGT CTGCTTTGA	
301	375
cDNA -----	
gDNA GATTTGCATA ACTACATTTT TGGTTGATAC TATGCATATT GTAATATCAT ATTTTCATCA TTTCTTCTAT CCTAT	
376	450
cDNA --ACT GCAGGCTAAT GCCCCAGATG CCTATGCAGT CTTCAACTTA GGAAGTGATG CTGGAAAGAT AGCAGCTCAG	
gDNA AGACT GCAGGCTAAT GCCCCAGATG CCTATGCAGT CTTCAACTTA GGAAGTGATG CTGGAAAGAT AGCAGCTCAG	
451	525
cDNA GGCCTCAAGA CTATGACCTT CATTGATGGA GTAGTCAAGG GCCTTGATGA TATGGGTGGT GTCAAGGCAA GCATT	
gDNA GGCCTCAAGA CTATGACCTT CATTGATGGA GTAGTCAAGG GCCTTGATGA TATGGGTGGT GTCAAGGCAA GCATT	
526	600
cDNA GATAC CCTGGGCAGC CGTCACACTG GGTATGGTGC CAAGAAGGCC CACTTTGGG- -----	
gDNA GATAC CCTGGGCAGC CGTCACACTG GGTATGGTGC CAAGAAGGCC CACTTTGGGG TAAGTAATAA GATGAATGAG	
601	675
cDNA -----	
gDNA AAATGAAGGC ATGCATGAAT TTGAATATAA CAGTTTGCAA TTACTGCTCT AAATTGCTAC ATTTGGGGAA TTATC	
676	750
cDNA -----	
gDNA TGAAA AAGGACTGGT GAAGATTGTT GGTGCATGCC TGATAGATCA TTACTATTTT ATGACTTTCA AGTTTGAGTA	
751	825
cDNA -----	
gDNA GTAACATCCT CACCGATATT GGTATATAT GGGTTATTCA CTAAACCATA TGTATTAATA ACAATTAGAT CATAA	
826	900
cDNA ----- CCTGCCGGAC CATGCCTGCT CGCAGCACTG GCTGAGGTCT	
gDNA TATAA TGTTATATAT GTGATTGGTA TTACTTCCAG CCTGCCGGAC CATGCCTGCT CGCAGCACTG GCTGAGGTCT	
901	975
cDNA GTGGTGAAA GTTCACCCA GCTGCCAAGG ATGGCTGGAC CGCCCTCTAC GGAGTCATCG CTGATGGCAT CTGCT	
gDNA GTGGTGAAA GTTCACCCA GCTGCCAAGG ATGGCTGGAC CGCCCTCTAC GGAGTCATCG CTGATGGCAT CTGCT	
976	1050
cDNA CCCAT CTGAGCTAGA CCTGGAAATG AGCAGCATTG CGCTTATGAT TTAGTAATAA AATCAAGCCG TAACTAGAAA	
gDNA CCCAT CTGAGCTAGA CCTGGAAATG AGCAGCATTG CGCTTATGAT TTAGTAATAA AATCAAGCCG TAAC~~~~~	
	~~~~~ <i>iff93Riff</i> ~~~~~

Figure III.22 : Séquences de l'ADN génomique (gDNA) et de l'ADN complémentaire (cDNA) de 93. La localisation des deux amorces ayant servi à amplifier 93 sur l'ADN génomique est indiquée.

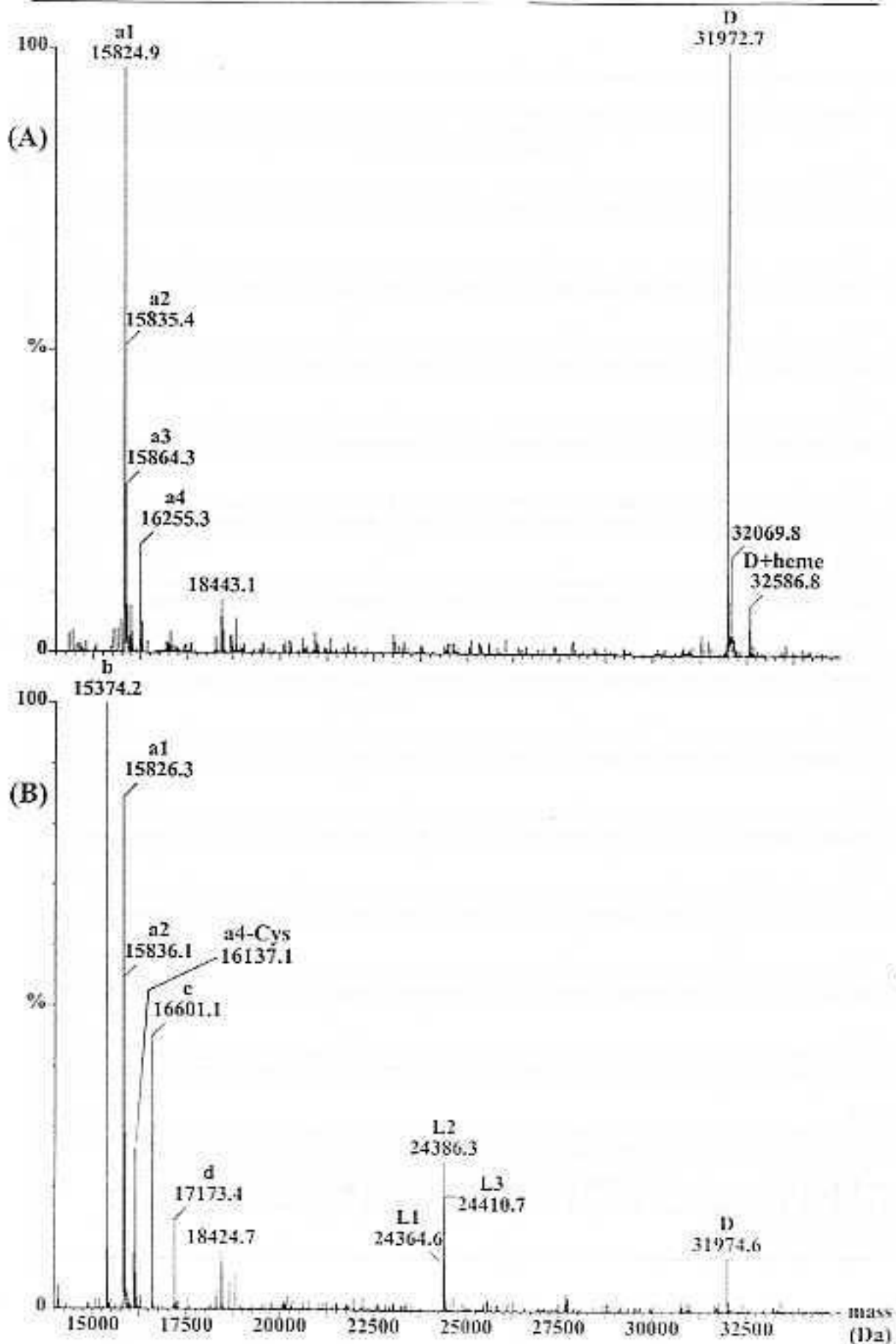


Figure III.25 : Analyse ESI-MS de l'hémoglobine de $3,5 \cdot 10^5$ Da de l'Orbiniid. **A** En conditions non réductrices. **B** En conditions réductrices (DTT).

III.1.4. Structure de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique.

III.1.4.1. Purification par FPLC

L'hémoglobine extracellulaire de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique a été purifiée par FPLC. Deux pics correspondant à de l'hémoglobine (c'est à dire absorbant simultanément à 414 et 280 nm) ont été isolés. La masse native de la première fraction a été estimée à environ $3,5 \cdot 10^6$ Da, son apparence est typique d'une hémoglobine extracellulaire d'annélide (Figure III.24). La masse native de la seconde fraction a été estimée à environ 210 kDa. Cette seconde fraction a été interprétée comme un produit de dissociation du premier pic. En effet une électrophorèse sur gel de polyacrylamide n'a pas révélé d'autres chaînes que celles de globine, comme c'est le cas pour les produits de dissociation des autres hémoglobines HBL connues (voir par exemple Zal *et al.*, 1996).

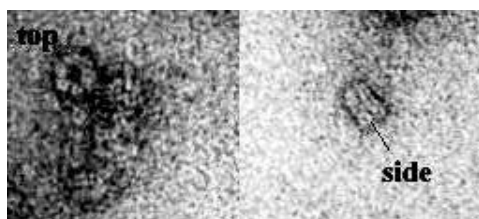


Figure III.24 : Hémoglobine de $3,5 \cdot 10^6$ Da de l'Orbiniidé observée en microscopie électronique à transmission (contraste négatif). Les dimensions de la molécule sont d'environ 30 nm de diamètre par 17 nm d'épaisseur (Photo J.M. Kenney).

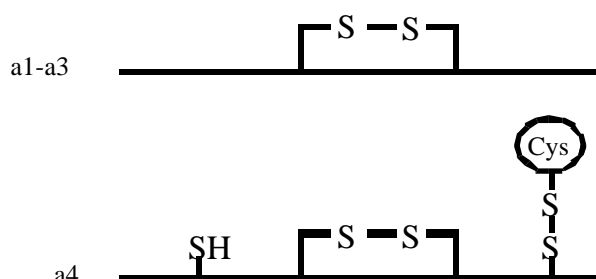
III.1.4.2. Etude en spectrométrie de masse de la composition en sous-unités

Seule la première fraction a été étudiée en spectrométrie de masse. En conditions dénaturantes, trois groupes de pics apparaissent (Figure III.25A). Le premier groupe se situe aux alentours de 15-16 kDa, le second autour de 32 kDa et le dernier de 48 kDa (Tableau III.5). Dans le premier groupe, on peut distinguer 4 pics: *a1* ($15824,8 \pm 1,5$ Da), *a2* ($15835,1 \pm 1,5$ Da), *a3* ($15864,5 \pm 1,5$ Da) et *a4* ($16255,4 \pm 1,5$ Da), d'intensités relatives 0,40:0,34:0,19:0,07, respectivement (n=5 déterminations). Aux alentours de 32 kDa, il y a un pic unique (*D*) à $31972,6 \pm 3,0$ Da (n=5 déterminations) dans les conditions que nous avons utilisées ici. Le dernier groupe a une faible intensité, et est donc peu résolu, se situant autour de 48710-48780 Da.

En conditions réductrices et dénaturantes, les masses de *a1-a3* n'ont pas significativement changé alors que la masse de *a4* a diminué de 119,1 Da, indiquant que cette dernière chaîne est

cystéinylée. En même temps, le pic à 32 kDa a disparu et trois nouveaux pics aux alentours de 15-17 kDa sont apparus (Figure III.25B). Ces nouveaux pics sont appelés *b* (15373,5±1,5 Da, n=5 déterminations), *c* (16600,5±1,5 Da, n=5 déterminations) et *d* (17172,5±1,5 Da, n=8 déterminations), d'intensité relative 0,61:0,29:0,10. Le pic *D* correspond en fait à un dimère composé des chaînes *b* et *c* (15373,5 + 16600,5 - 2H = 31972,0, très proche de la mesure de la masse de *D*) (Figure III.26 et Tableau III.6). Le pic *d* ne peut être attribué à un pic de masse plus élevée en conditions non réductrices. Il est possible que le pic correspondant à un dimère (ou à un état d'agrégation plus élevé) impliquant *d* n'ait pas été détecté pour une raison inconnue. Comme l'intensité du pic *b* est plus importante que celle de *c*, il est possible que *b* soit impliqué dans le multimère contenant *d*. Un groupe de trois pics est apparu aux environs de 24 kDa alors que le groupe de 48 kDa a disparu. Ces pics correspondent en fait à des chaînes de structure appelées "linkers" et sont appelées *L1-L3*. Leurs masses sont 24362,9±3,0 Da, 24385,1±3,0 Da et 24409,5±3,0 Da, d'intensités relatives 0,13:0,50:0,37, respectivement (n=4 ou 5 déterminations).

Monomères



Dimère

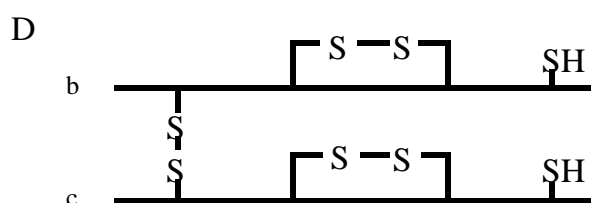


Figure III.26 : Modèle de structure des globines de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique avec leurs cystéines. La chaîne *d* et les linkers ne sont pas représentés car les informations disponibles sur ces chaînes ne sont pas suffisantes pour établir un modèle.

Après carboxyméthylation de l'hémoglobine en conditions non réductrices, les masses de *a1-a3* et des dimères de linkers n'ont pas changé, indiquant qu'elle ne contiennent pas de

cystéine libre. Le dimère de globine *D*, par contre, contient 2 cystéines libres. Après réduction et carboxyméthylation, le nombre total de cystéines de chaque chaîne a pu être mesuré. Les chaînes *a1-a3* contiennent 2 cystéines, *a4, b* et *c* contiennent 4 cystéines, *d* contient 5 cystéines et *L1-L3* contiennent 11 cystéines. La figure III.26 représente schématiquement l'implication des cystéines dans les ponts disulfures intra- et inter-caténaux ainsi que les cystéines libres pour les monomères et les dimères de globine.

Tableau III.6 : Composition en chaînes, masses moléculaires des chaînes et sous-unités, et contenu en cystéines de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique.

Chaînes	Masses (Da)	Cystéines libres	Cystéines Totales
Globines			
<u>Monomères</u>			
a1	15824,8±1,5	0	2
a2	15835,1±1,5	0	2
a3	15864,5±1,5	0	2
a4*	16255,4±1,5	1	4
<u>Dimères</u>			
D	31972,6±3,0	2	8
composé de b	15373,5±1,5	-	4
et c	16600,5±1,5	-	4
<u>Origine inconnue</u> d	17174,7±1,5	-	5
Linkers			
<u>Dimères</u>			
L1	24362,9±3,0	-	11
L2	24385,1±3,0	-	11
L3	24409,5±3,0	-	11

* cette chaîne est cystéinylée.

III.4. Discussion.

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, les Annélides présentent une grande diversité dans les types d'hémoglobine, intracellulaire ou extracellulaire, leur localisation (vasculaire ou coelomique) et leur structure quaternaire. Certaines des hémoglobines étudiées ici entrent bien dans ces catégories : c'est le cas de l'hémoglobine intracellulaire d'*Alvinella pompejana* et de l'hémoglobine extracellulaire vasculaire de type HBL de l'Orbiniidé, avec quelques particularités intéressantes que nous discuterons ci-dessous. Mais les hémoglobines coelomiques de *Branchipolynoe* n'entrent dans aucune des catégories ci-dessus : il s'agit bel et bien d'un nouveau type d'hémoglobine chez les Annélides et nous nous attarderons donc sur celles-ci.

III.4.1. Structure de l'hémoglobine intracellulaire d'*Alvinella pompejana*.

L'hémoglobine extracellulaire d'*Alvinella pompejana* a déjà fait l'objet de plusieurs études structurales (Terwilliger and Terwilliger, 1984, Toulmond *et al.*, 1990), dont une récente en utilisant la spectrométrie de masse (Zal *et al.*, 1997a) et n'a pas été réétudiée au cours de ce travail.

L'hémoglobine trouvée dans les coelomocytes d'*A. pompejana* avait été mentionnée dans un article d'anatomie décrivant le système de transfert gazeux chez cette espèce (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996) mais sa structure n'avait pas été étudiée. Elle est composée d'un seul type de chaîne, monomérique et d'une masse native semblable à celle des hémoglobines coelomiques trouvées chez les Terebellidés (Weber, 1978b, Weber *et al.*, 1977), une famille proche de celle des Alvinellidés. Les Capitellidés et les Opheliidés quant à eux peuvent posséder des hémoglobines dimériques et certaines espèces de Scalibregmatidés et les Glyceridés ont des hémoglobines tétramériques. Cependant, la masse de la globine coelomique d'*Alvinella pompejana* est significativement plus petite que celles publiées pour les Terebellidés (16-17,4 kDa) (Weber, 1978b). Il faut cependant noter que ces masses ont été estimées à partir de gels SDS-PAGE et la différence pourrait donc être due à l'imprécision de cette technique comparée à la spectrométrie de masse. La précision des mesures obtenues par ESI-MS ($14810 \pm 1,5$ Da) nous permet de dire

sans erreur possible que la chaîne de globine dans les coelomocytes est différente de celles qui composent l'hémoglobine extracellulaire d'*Alvinella pompejana* qui font toutes plus de 16 kDa (Zal *et al.*, 1997a). Une étude de l'hémoglobine intracellulaire de *Paralvinella palmiformis* a donné des résultats analogues (Zal, com. pers.).

III.4.2. Structure de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique.

Seules les molécules intactes d'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique ont été étudiées du point de vue de leur structure. Cette hémoglobine présente la masse native et l'apparence typiques d'une hémoglobine extracellulaire en double hexagone (Lamy *et al.*, 1996). Comme les autres hémoglobines de ce type, elle contient à la fois des chaînes de type globine et des chaînes de types structure (Lamy *et al.*, 1996). Les chaînes de structure (ou linker) possèdent 11 cystéines, toutes impliquées dans des ponts disulfure, dont au moins une dans le pont entre deux chaînes pour former un dimère de linker. Tous les linkers sont dimériques comme chez *Arenicola marina* (Zal *et al.*, 1997b) et chez *Tylorrhynchus heterochaetus* (Green *et al.*, 1995). Les globines sont présentes sous forme de monomères ou de dimères (et peut-être d'états d'agrégation plus élevés). Les chaînes impliquées dans les dimères ne sont pas trouvées à l'état de monomères. L'origine de la chaîne *d* demeure inconnue, elle est probablement impliquée dans des agrégats de plus haut poids moléculaire, non détectés en ESI-MS. Ce phénomène a été rencontré avec la chlororurine d'*Eudistylia vancouverii* (Green *et al.*, 1998). Une façon de tester cette hypothèse serait de purifier chacun des constituants de l'hémoglobine de l'Orbiniidé par HPLC et d'étudier ensuite ces sous-unités par ESI-MS.

La présence de dimères de globine chez un polychète est tout à fait inhabituelle. En effet, en se basant sur les données de structure des hémoglobines extracellulaires d'annélides, il avait été proposé que la présence de dimères de globine était une caractéristique des Vestimentifères et des Hirudinés, par opposition aux Polychètes qui possèdent des trimères de globine à la place (Zal *et al.*, 1996a). La découverte de dimères de globine chez l'Orbiniidé invalide cette hypothèse. Suivant la phylogénie des Annélides proposée par Rouse et Fauchald (Figure III.3), l'état de polymérisation des globines par pont disulfure ne peut servir de diagnostic puisque les

Orbiniidés, les Hirudinés et les Vestimentifères de font pas partie du même clade et possèdent tous des dimères de globine.

III.4.3. Les hémoglobines de *Branchipolynoe* spp.

III.4.3.1. Caractéristiques spectrophotométriques

Nous avons étudié les caractéristiques spectrophotométriques des hémoglobines de *Branchipolynoe* dans le but de connaître les affinités de ces hémoglobines avec celles de vertébrés ou d'invertébrés. Il apparaît clairement que ces molécules sont bien des hémoglobines (position des pics et variations observées dans les dérivés). Cependant, un examen attentif révèle des caractéristiques typiques des hémoglobines intracellulaires et d'autres typiques des hémoglobines extracellulaires. Par exemple, le rapport $\lambda_{630}/\lambda_{540}$, plus petit que 1, est caractéristique de l'hémoglobine extracellulaire de certains invertébrés, en dépit d'un petit épaulement à 630 nm dans le spectre de HbO₂, indicatif d'une certaine oxydation de l'hémoglobine. La présence de cette petite quantité d'hémoglobine oxydée ne pourrait probablement pas affecter le rapport $\lambda_{630}/\lambda_{540}$ de façon si importante. Ce rapport $\lambda_{630}/\lambda_{540}$ a aussi été observé pour les hémoglobines d'*Alvinella pompejana*, *Alvinella caudata*, *Paralvinella grasslei*, *Arenicola marina* (Toulmond, 1992) et *Ascaris suum* (Okazaki *et al.*, 1965). Cependant, la position des pics (en longueur d'onde) est plus caractéristique des hémoglobines intracellulaires.

III.1.1.2. Structure quaternaire des hémoglobines

a) Sous-unités

Dans la littérature, la famille des Polynoidés est décrite comme n'ayant pas d'hémoglobine. Toutefois, de la neurohémoglobine (globine trouvée dans les cellules du système nerveux) a été trouvée chez l'Aphroditidé *Aphrodite aculeata*, une famille proche des Polynoidés. Elle a récemment été séquencée (Dewilde *et al.*, 1996), montrant qu'elle correspond à une myoglobine plutôt qu'à une hémoglobine circulante. Elle se trouve en quantité réduite dans le corps de l'animal, principalement dans la chaîne nerveuse. Notre étude est donc la première mise en évidence d'une hémoglobine au sens propre dans la famille des Polynoidés, et plus largement dans la superfamille des Aphroditoidea. En fait, ce n'est pas une mais au moins deux, voire trois hémoglobines distinctes que l'on peut trouver chez *Branchipolynoe*. Bien que réduit (voir

chapitre II), le système sanguin contient sans doute une hémoglobine de type bicouche hexagonal, comme semble l'indiquer son poids moléculaire ($3 \cdot 10^6$ Da). La plupart des hémoglobines se trouve dans le liquide coelomique où elles peuvent probablement faciliter l'extraction d'oxygène du milieu à travers les branchies coelomiques (voir Chapitre II).

Les spectres d'élution sur FPLC du liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida* et *B. seepensis* sont très similaires. Une très petite quantité d'hémoglobine de $3 \cdot 10^6$ Da, typique des hémoglobines extracellulaires d'Annélides est présente. Etant donnée sa très faible quantité, sa présence est probablement due à la contamination du liquide coelomique par le sang contenu dans le système vasculaire réduit et qui peut être endommagé lors du prélèvement du liquide coelomique. Les trois autres hémoglobines sont plus probablement coelomiques et leur masse native est tout à fait inhabituelle pour un annélide. Une différence a été observée entre les valeurs obtenues par MALLS et par calibration de la colonne Superose 12. Ceci pourrait s'expliquer par une interaction très forte des molécules d'hémoglobine avec la matrice du gel. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser les valeurs obtenues par MALLS car la diffraction de la lumière ne dépend que des propriétés physiques des particules en solution. De plus, le MALLS est très performant pour détecter les événements d'agrégation et de dissociation. Par exemple, à la fin de l'élution de HbC1, il y a une diminution de masse notable qui est probablement due à de la dissociation. Le contraire se produit avec HbC2 pour laquelle il y a une augmentation de la masse à la fin de l'élution et qui pourrait correspondre à un phénomène d'agrégation à faible concentration en protéine. Cependant, les mesures de masse par MALLS peuvent produire des résultats erratiques quand la concentration en protéine chute (par exemple aux deux bords des pics) et nos valeurs de masse sont dérivées de la partie la plus linéaire des mesures de masse, dans le centre du pic. Si l'on se réfère au tableau III.1, on comprend que ces masses ne correspondent en aucune façon à un type d'hémoglobine d'Annélide connu.

b) Modèle de structure de l'hémoglobine de *Branchipolynoe*

La spectrométrie de masse a révélé que les sous-unités des hémoglobines coelomiques HbC1 et HbC2 de *Branchipolynoe* sont uniques, d'une masse moléculaire d'environ 58 kDa et

ne correspondant pas à des polymères de globine liés par des ponts disulfure. En se basant sur les masses natives et la composition en sous-unités, on peut proposer un modèle de structure pour HbC1 et HbC2. HbC1 serait un trimère fait de 3 sous-unités identiques de 57996 ± 10 Da, et HbC2 un dimère fait de deux sous-unités identiques de 57648 ± 10 Da (Figure III.27). Les masses de ces sous-unités sont inhabituellement élevées, d'autant plus que ces molécules correspondent à un seule chaîne polypeptidique et pas à des chaînes de 14-18 kDa liées par des ponts disulfures, comme c'est généralement le cas avec des sous-unités de ces poids des autres hémoglobines d'Annélides (Lamy, *et al.*, 1996, Weber, 1978b). Ces sous-unités ne sont pas glycosylées. L'ensemble de ces résultats nous a suggéré qu'il pouvait s'agir de sous-unités multidomaines et nous avons réalisé des expériences supplémentaires pour le vérifier.

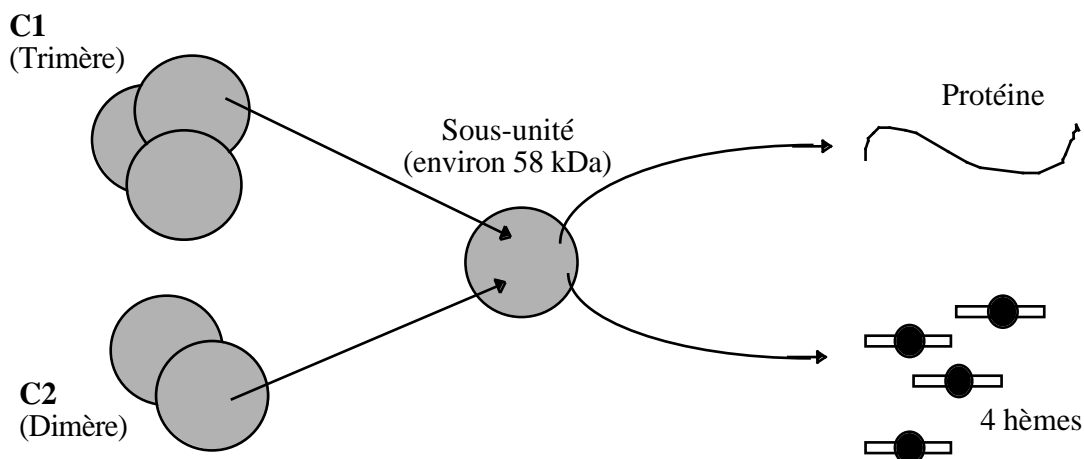


Figure III.27 : Modèle de structure de HbC1 et HbC2 : composition en sous-unités et structure générale de celles-ci.

Pour la première fois, la spectrométrie de masse en tandem a été utilisée pour compter le nombre d'hèmes sur une hémoglobine multidomaine. Les résultats montrent sans équivoque que quatre groupements héminiques sont portés par chacune des sous-unités. En effet, on peut voir la perte progressive de quatre unités de masse qui sont remarquablement proches (à 1 Da près) de la masse d'une molécule d'hème (616,5 Da). Ceci est corroboré par le rapport hème/protéine qui donne une valeur proche de quatre hèmes par sous-unités pour chaque hémoglobine (Figure III.27). La coupure par la subtilisine génère trois domaines qui semblent similaires en taille et probablement un quatrième domaine qui serait tronqué. La figure III.28

montre une interprétation des bandes observées en SDS-PAGE après hydrolyse par la subtilisine. Les bandes à 19,7-21,3 kDa correspondent à des domaines isolés et la bande à 37,3 kDa correspond à deux domaines toujours associés. La différence de masse entre deux bandes qui diffèrent par la présence ou l'absence du domaine tronqué est d'environ 3,5 kDa. Ceci représente environ 1/4 de domaine et suggère la présence de trois domaines similaires de 18 kDa ($((58-3,5)/3=18)$). A 54 kDa, on observe une bande intense correspondant à des polypeptides intacts. Le domaine tronqué n'est présent que dans les fractions 1 et 2, indiquant qu'il est probablement situé à l'intérieur de la molécule native et a gardé des interactions avec les autres parties de la globine, même quand il en a été coupé par la subtilisine. La faible intensité des bandes contenant le domaine tronqué corrobore cette hypothèse, le centre de la molécule étant moins accessible à l'action de la subtilisine. Le séquençage des domaines D3 et D4 à partir des ADNc a clairement montré que ceux-ci sont des domaines complets. Le microséquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine C2 suggère que le domaine D1 n'est pas tronqué de ce côté. L'hypothèse la plus probable est donc que c'est le domaine D2 qui est tronqué (Figure III.28). Cette hypothèse est corroborée par l'absence de produit de digestion à 50 kDa qui correspondrait à trois domaines complets associés dans un même polypeptide.

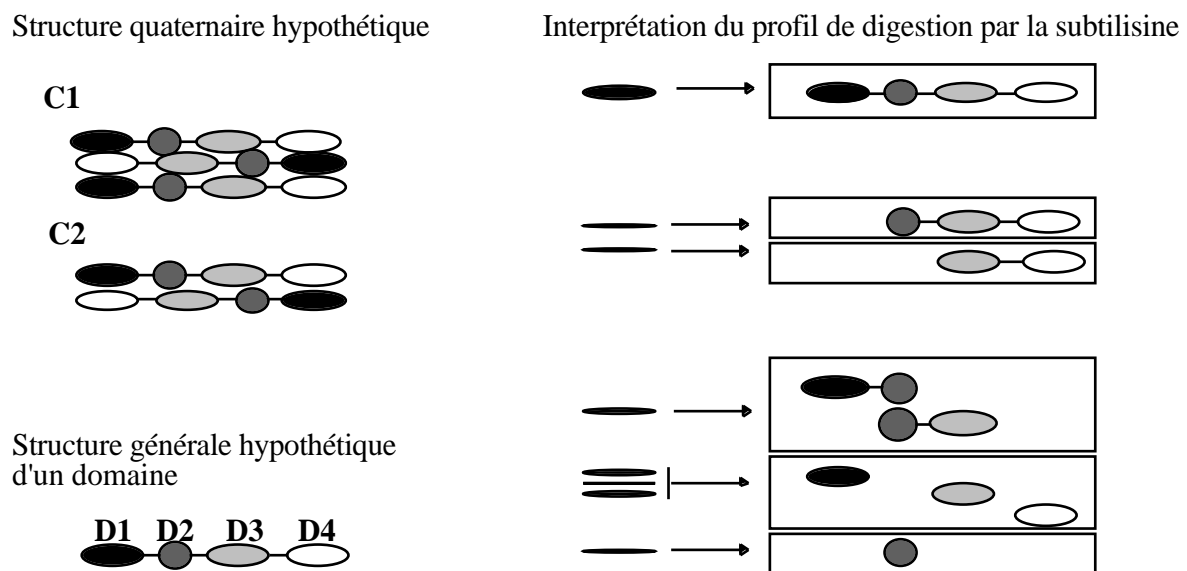


Figure III.28 : Modèle de structure quaternaire de HbC1 et HbC2 et interprétation du profil de digestion par la subtilisine.

Ce type de structure est tout à fait original pour une hémoglobine d'annélide où elle n'a jamais été rencontrée auparavant (Terwilliger, 1992, Vinogradov *et al.*, 1993). En effet, les hémoglobines multidomaines n'étaient à ce jour connues que chez les Nématodes (2 domaines), les Branchiopodes (8-9 domaines pour les Anostracés, 2 pour les Conchostracés, les Cladocères et les Notostracés), les Malacostracés (10 domaines) et les mollusques (10-12 domaines pour les Gastéropodes et 2 ou 18-20 pour les Bivalves) mais pas chez les Annélides (Terwilliger, 1992). Notre découverte vient enrichir la panoplie de types d'hémoglobines présentes chez les Annélides. Jusqu'à cette étude, les hémoglobines extracellulaires connues chez les Annélides, trouvées dans le sang ou le liquide coelomique, étaient caractérisées par un poids moléculaire de $3-4 \cdot 10^6$ Da et une structure en bicouche hexagonale (Weber, 1978b). Ces hémoglobines sont composées de chaînes de globine mais aussi de chaînes de structure dont la présence semble indispensable à l'assemblage de la macromolécule. Les hémoglobines intracellulaires d'Annélides sont toujours coelomiques et ne sont formées que de chaînes de globine, monomériques ou bien associées par 2, 4 ou 8 (Weber, 1978b). Les hémoglobines extracellulaires de 400 kDa des Vestimentifères et des Pogonophores quant à elles, ne sont aussi composées que de chaînes de globines monodomaines, certaines associées en polymères (di- ou trimères) (Terwilliger, 1992, Vinogradov *et al.*, 1993). Les hémoglobines HbC1 et HbC2 de *Branchipolynoe* sont donc les premières hémoglobines multimériques et multidomaines isolées d'Annélides à ce jour. L'association en 4 domaines est aussi unique chez les invertébrés (Terwilliger, 1992, Vinogradov *et al.*, 1993).

III.1.1.3. Contenu en acides aminés

En partant du fait que HbC1, HbC2 et HbC3 sont des hémoglobines, leur contenu en acides aminés est très inhabituel, avec de très hauts niveaux d'alanine et de glycine, deux acides aminés hydrophobes. De tels niveaux ne sont pas trouvés chez d'autres hémoglobines, même chez *Ascaris suum* qui, comme *Branchipolynoe*, possède une hémoglobine multidomaine. La présence d'une grande quantité de cystéine dans HbC2 de *Branchipolynoe symmytilida* est aussi très inhabituelle et pourrait être rapprochée à la présence de nombreux ponts disulfure

(améliorant la stabilité) ou bien à la capacité de lier l'hydrogène sulfuré. Un tel mécanisme de liaison de HS⁻ sur des cystéines libres a récemment été mis en évidence chez le Vestimentifère *Riftia pachytila* (Zal, 1998, Zal *et al.*, 1998b, Zal *et al.*, 1997c). Cependant, au contraire de *Riftia*, *Branchipolynoe* ne possède pas de bactéries symbiotiques et donc, s'il y a liaison de ce composé toxique, ceci pourrait correspondre à un mécanisme de détoxification par chélation des HS⁻ libres plutôt que de transport comme chez *Riftia*. L'absence de tryptophane est invalidée par le séquençage des ADN complémentaires.

III.1.1.4. Structure primaire

La séquence des globines de *Branchipolynoe symmytilida* a montré que ces dernières sont beaucoup plus proches des globines intracellulaires que des globines d'hémoglobines extracellulaires en bicouche hexagonale. Ceci suggère une origine différente des hémoglobines extracellulaires de *Branchipolynoe* par rapport aux autres hémoglobines extracellulaires d'annélides et une extracellularité plus récente. Il y aurait donc eu passage de l'état intracellulaire à l'état extracellulaire au moins à deux reprises au cours de l'évolution des Annélides : une première fois pour donner naissance aux hémoglobines en bicouche hexagonale, vastement répandues dans les familles d'Annélides (Clitellés et Polychètes) et une deuxième fois pour donner naissance aux hémoglobines extracellulaires multidomaines coelomiques découvertes chez *Branchipolynoe*.

Chez *Riftia pachytila*, la cystéine libre de la chaîne *b*, située 11 acides aminés après l'histidine distale, est impliquée dans la liaison réversible des sulfures (Zal, 1998, Zal *et al.*, 1998b, Zal *et al.*, 1997c). La présence d'une cystéine en une position analogue à celle des Vestimentifères (*Riftia* et *Lamellibrachia*) suggère que l'hémoglobine de *Branchipolynoe symmytilida* pourrait être capable de lier réversiblement les sulfures de la même façon. Dans le cas contraire, une comparaison des environnements respectifs de ces cystéines pourrait apporter de précieux renseignements sur le mécanisme de liaison.

Le gène correspondant à la globine monodomaine 93 contient deux introns aux positions conservées B12.2 et G7.0, comme d'autres annélides (Figure III.29). *Aphrodite aculeata*, annélide appartenant à une famille proche des Polynoidés, ne possède qu'un seul intron en

G7.0. La perte du premier intron s'est donc probablement faite après la séparation des deux familles. Un suivi de la présence de ce premier intron dans d'autres espèces pourrait aider à établir ou confirmer une phylogénie des familles au niveau de la superfamille des Aphroditoidea.

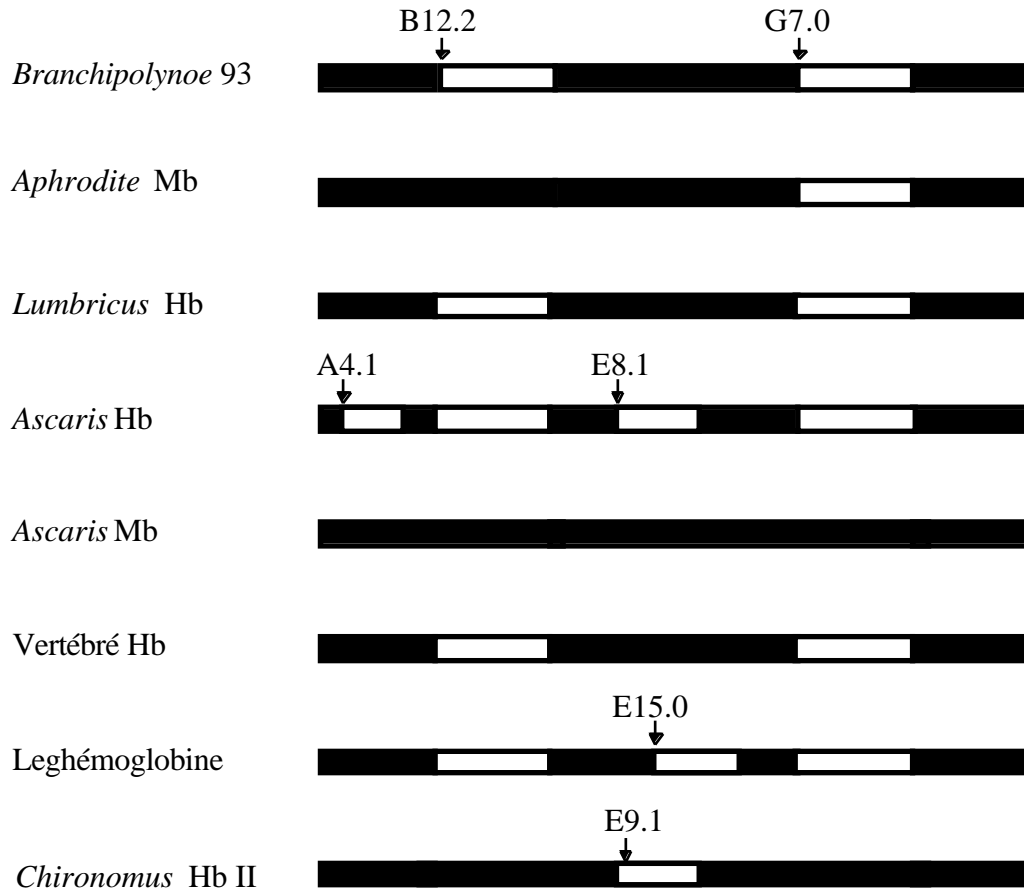


Figure III.29 : Représentation schématique de la structure du gène de quelques globines représentatives. Les rectangles blancs correspondent aux introns. La position d'insertion des introns est donnée par la notation du codon correspondant à l'acide aminé (hélice et numéro) qui est interrompu par l'intron. B12.2 indique que l'intron est inséré dans le codon correspondant à l'acide amino de la position B12 après la deuxième base. G7.0 indique que l'interruption est située entre les codons G6 et G7 (Modifié d'après Dewilde *et al.*, 1996). Les hémoglobines 2, 9.1, 7A.1, 11 et 13 de *Chironomus thummi thummi* contiennent un intron alors que les autres hémoglobines de cette espèce n'en contiennent pas (Gruhl *et al.*, 1997).

La comparaison des séquences correspondant aux domaines D3 et D4 des globines multidomaines a permis de montrer la parenté étroite entre domaines de même type. Ceci suggère qu'il y a d'abord eu formation des gènes de globine tétradomaines puis duplication de ces gènes pour former les différentes chaînes. Cependant, le séquençage des domaines D1 et D2 est indispensable à la validation du modèle classique de duplication en tandem : à savoir duplication D1 → D2 puis duplication D1D2 → D3D4 (Figure III.30). Chez *Artemia salina*, l'hémoglobine est constituée de 9 domaines et la phylogénie de ces domaines a révélé que la

duplication en tandem peut se faire par ajout d'un ou plusieurs domaines à chaque duplication (recombinaison par crossing-over inégaux ?) (Jellie *et al.*, 1996, Manning *et al.*, 1990). Chez ce crustacé, certains introns ont été perdus ou leur position a changé; ce qui peut aussi renseigner sur l'histoire évolutive du gène d'hémoglobine multidomaine. Dans le cas de *Branchipolynoe*, si la présence d'un domaine tronqué est vérifiée par séquençage, la structure intronique de ce domaine pourrait être très informative sur les mécanismes de duplication.

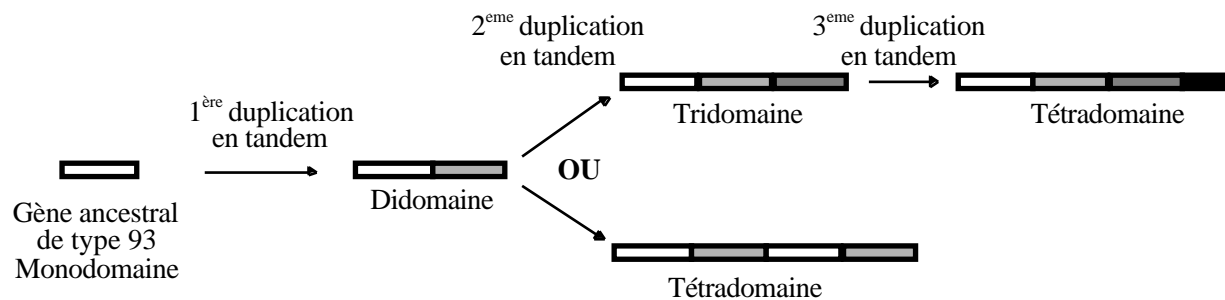
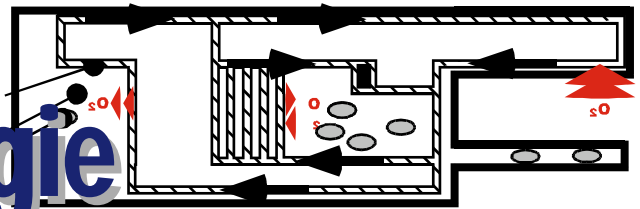


Figure III.30 : Différents mécanismes de formation d'une hémoglobine tétradomaine par duplication en tandem (deux ou trois duplications).

Chapitre 4

Physiologie



Adaptations Physiologiques du Transport de l'Oxygène

<i>Chapitre 1</i>	Introduction
<i>Chapitre 2</i>	Anatomie
<i>Chapitre 3</i>	Biochimie
<i>Chapitre 4</i>	Physiologie
<i>Chapitre 5</i>	Conclusion

IV.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, au niveau des sources hydrothermales et des suintements froids du talus de Louisiane, les concentrations en oxygène sont réduites et celles en CO₂ et en sulfures sont parfois très élevées. Ces caractéristiques font de ces milieux un environnement à *priori* difficilement compatible avec le métabolisme aérobie, à moins de développer des adaptations spécifiques à ces conditions environnementales.

Dans le chapitre II nous avons les adaptations morphologiques rencontrées chez les espèces étudiées. Nous avons montré que les espèces étudiées présentent une surface branchiale spécifique élevée, offrant une plus grande surface d'échanges gazeux. Ceux-ci sont aussi facilités par la faible distance de diffusion généralement rencontrée chez ces espèces. Des indices ultrastructuraux suggèrent également la possibilité de détoxification des sulfures par des corps intracellulaires.

Le chapitre III regroupe les données des études des hémoglobines réalisées au cours de cette thèse. Ces hémoglobines augmentent la capacitance des fluides corporels. La présence d'hémoglobine est une caractéristique tout à fait particulière pour un Polynoidé car les espèces littorales en sont dépourvues.

Ce chapitre IV s'attache à l'étude de la physiologie de la respiration. Dans le but de comprendre les adaptations physiologiques des trois espèces étudiées, nous avons réalisé différentes études : à bord, sur des animaux fraîchement récoltés; au laboratoire, sur des fluides corporels récoltés pendant les différentes missions. En associant ces données à celles des deux chapitres précédents ("Adaptations anatomiques" et "Caractérisation et structure des hémoglobines"), ainsi que les données préalablement publiées, nous pouvons essayer de comprendre le fonctionnement respiratoire des espèces dans leur environnement.

Pour *Alvinella pompejana*, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles des deux hémoglobines (coelomique et vasculaire) ainsi que le comportement du liquide coelomique et du

sang *in vitro* quand la concentration en CO₂ varie de manière à pouvoir estimer le pH *in vivo*. Grâce à ces données et à celles d'anatomie et d'ultrastructure déjà publiées (Jouin et Gaill, 1990; Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998), nous avons pu proposer un modèle du transport de l'oxygène chez cette espèce.

Pour *Branchipolynoe seepensis*, la profondeur à laquelle on le trouve (1700 m) nous a permis de garder quelques animaux vivants pour effectuer des mesures de respirométrie. Des échantillons de liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida* nous ont permis d'effectuer des expériences *in vitro* visant à en connaître le pouvoir tampon ainsi que les capacités à fixer le CO₂ (et donc limiter les effets de cette molécule). Une étude parallèle des propriétés fonctionnelles des deux hémoglobines majeures HbC1 et HbC2 nous ont permis de mieux comprendre la physiologie respiratoire de *Branchipolynoe*.

L'Orbiniidé du Golfe du Mexique, enfin, est l'espèce qui survit le mieux à la remontée de la profondeur où il est trouvé (650 m). Il permet donc d'effectuer des expériences de respirométrie. De plus, son abondance nous a permis de réaliser des expériences de résistance aux sulfures et à l'anoxie. La taille réduite de son système vasculaire ne nous a malheureusement pas permis de prélever du sang pur pour en étudier le comportement face à des concentrations variables de CO₂. Par contre, son hémoglobine a pu être purifiée et ses propriétés fonctionnelles étudiées.

IV.1.1. Résistance aux sulfures.

Comme nous l'avons vu au chapitre I, les sulfures ne sont ni utilisés ni produits par le métabolisme normal des espèces étudiées. Ces composés peuvent atteindre de très fortes concentrations dans certains environnements (Grieshaber et Völkel, 1998) et notamment celui des modèles de cette étude (voir Tableau I.2). Leur concentration et celle de l'oxygène sont

négativement corrélées et ils peuvent inhiber le métabolisme aérobie : pour ces deux raisons, les sulfures obligent les organismes à recourir au métabolisme anaérobie.

IV.1.2. Résistance à l'hypoxie et à l'anoxie.

Dans le but de maintenir un apport en oxygène suffisant pour les besoins métaboliques des tissus, les animaux peuvent développer différentes adaptations. Ces adaptations peuvent être d'ordre anatomique (voir Chapitre II) ou physiologique. Les adaptations physiologiques sont généralement une capacité à oxyréguler, c'est à dire une capacité à maintenir une extraction d'oxygène constante quelle que soit la concentration externe, jusqu'à une pression partielle critique à partir de laquelle il y a une chute de l'extraction jusqu'à zéro (Pression critique) (Figure IV.1). Dans l'écosystème hydrothermal, ce comportement n'a été observé que chez des espèces possédant un pigment respiratoire, comme *Riftia pachyptila*, le crabe *Bythograea thermidron* et le bivalve *Calyptogena magnifica* (Childress et Fisher, 1992). Chez les espèces dépourvues de pigment respiratoire comme les moules *Bathymodiolus* il n'y a pas de régulation de l'extraction de l'oxygène : on dit que l'animal est un oxyconformeur (la quantité d'oxygène extraite et consommée est directement proportionnelle à la concentration extérieure). Ceci a été démontré chez la moule du Golfe du Mexique *Bathymodiolus childressi* (Kochevar *et al.*, 1992). Pour ces espèces, l'hypoxie entraîne un passage progressif au métabolisme anaérobie. Pour les espèces oxyrégulatrices, par contre, il y a maintien du métabolisme aérobie, jusqu'à la pression critique à partir de laquelle le métabolisme anaérobie se met rapidement en place.

Les capacités de résistance aux sulfures et à l'anoxie vont généralement de pair à cause de la possible inhibition du métabolisme aérobie par de fortes quantités de sulfures (inhibition du complexe IV de la chaîne respiratoire). Même avant l'inhibition de la chaîne respiratoire, une partie importante de l'oxygène disponible peut être monopolisée pour la détoxification des sulfures. Ceci engendre l'utilisation fréquente du métabolisme anaérobie et l'accumulation des

produits de ce métabolisme dans le corps de l'animal. Certains annélides peuvent supporter des périodes d'anoxie d'une durée allant de 1 jour pour *Amphitrite* et *Neanthes* à 21 jours pour *Owenia fusiformis* (Weber, 1978a). Les annélides ne semblent pas accumuler d'acide lactique ou pyruvique au cours du métabolisme anaérobie mais plutôt du propionate et des opines (Grieshaber *et al.*, 1994; Weber, 1978a). Il est intéressant de noter que la formation d'acide propionique produit trois fois plus d'énergie que la fermentation lactique (Hochachka *et al.*, 1973). Chez l'oligochète *Alma emini*, il y a production d'acide gras volatiles comme l'acide propionique, acétique et méthylbutyrique qui sont plus faibles que l'acide lactique et plus faciles à excréter.

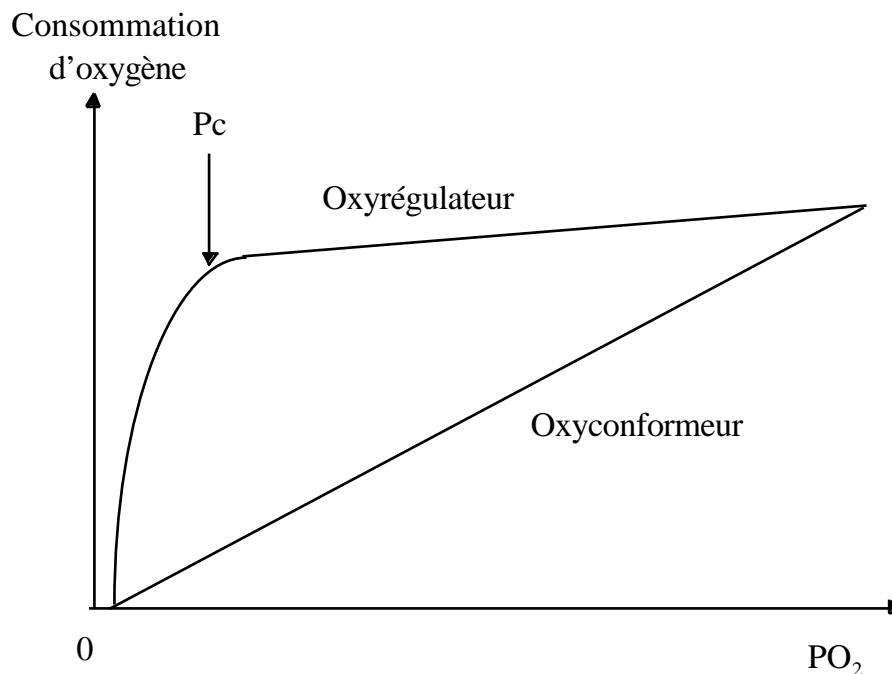


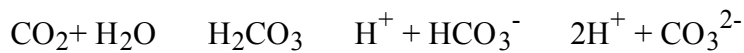
Figure IV.1 : Courbes théoriques de consommation d'oxygène en fonction de la pression partielle en oxygène pour un animal oxyrégulateur et pour un animal oxyconformeur. *P_c* correspond à la pression critique pour un oxyrégulateur. En dessous de cette pression partielle en oxygène, le métabolisme anaérobie se met en place.

Les capacités de résistance à l'anoxie doivent être très développées chez les espèces tubicoles comme *Alvinella* ou sédentaires comme *Branchipolynoe* car elles ne peuvent pas se déplacer pour éviter ces conditions défavorables. Par contre, les espèces vagiles comme

l'Orbiniidé du Golfe du Mexique peuvent se déplacer et changer de milieu quand les conditions deviennent défavorables. Nous nous attendons donc à des capacités de résistance moyennes à l'anoxie chez les espèces vagiles.

IV.1.3. Adaptations aux concentrations variables de CO₂

Le CO₂ est une molécule qui est présente en grande quantité au niveau des sources hydrothermales (Von Damm, 1990), et notamment à proximité des organismes (Childress *et al.*, 1993; Sarradin *et al.*, 1998; Sarradin *et al.*, 1999; Truchot et Lallier, 1998). Il peut réagir avec l'eau et il s'établit un équilibre avec les ions bicarbonate et carbonate :



Une augmentation de la concentration en CO₂ aura donc pour effet de diminuer le pH de l'eau de mer et des liquides biologiques. Les variations de concentration en CO₂ (fréquentes et rapides au niveau des sources hydrothermales) pourront donc avoir des effets importants sur la physiologie des animaux qui y vivent. Des mécanismes de lutte contre les effets du CO₂ sont donc nécessaires. Chez *Riftia pachyptila*, il a été montré que les concentrations en CO₂ du sang et du liquide coelomique sont très variables d'un animal à un autre alors que le pH de ces fluides corporels est très stable (Toulmond *et al.*, 1994). Cette stabilité du pH semble due en faible partie à un effet tampon des hémoglobines (probablement par fixation d'un CO₂ sur le -NH₂ terminal sous forme de carbamino-hémoglobine) et en grande partie à une molécule de faible poids moléculaire capable de fixer le CO₂. Chez *Riftia pachyptila*, cette propriété permettrait de stocker du CO₂, nécessaire aux bactéries symbiotiques trouvées dans les cellules de son trophosome.

La présence d'importantes quantités de CO₂ nécessite aussi la présence de systèmes enzymatiques pour les échanges de ce composé au niveau des cellules (anhydrase carbonique, échangeurs d'anions de type "Band-3" (Cl⁻/HCO₃³⁻)). Chez *Riftia pachyptila*, il y a deux types d'anhydrase carbonique : l'une se trouve dans les branchies de l'animal et l'autre dans le

trophosome (Kochevar *et al.*, 1993), organe contenant les bactéries symbiotiques qui utilisent beaucoup de CO₂ pour la synthèse de molécules organiques (Fisher *et al.*, 1989; Childress *et al.*, 1993). La présence d'échangeurs de type "Band-3" a été suggérée mais pas encore démontrée. Mais *Riftia pachyptila* est un modèle valable pour l'étude des symbioses chimiosynthétiques, ce qui n'est pas le cas des espèces que nous avons étudiées. Il n'en reste pas moins qu'une bonne régulation du pH et donc des flux de CO₂ reste nécessaire pour un fonctionnement normal des protéines et notamment de l'hémoglobine. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu étudier les propriétés des liquides circulants chez *Alvinella pompejana* et *Branchiopolynoe*.

IV.1.4. Systèmes de transfert de l'oxygène

Les Alvinellidés, comme la famille proche des Terebellidés, possèdent deux types d'hémoglobine : une hémoglobine vasculaire (Terwilliger et Terwilliger, 1984; Toulmond *et al.*, 1990; Zal *et al.*, 1997a) et une hémoglobine coelomique (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996). L'hémoglobine vasculaire est extracellulaire et l'hémoglobine coelomique est intracellulaire, contenue dans des érythrocytes circulant librement dans la cavité coelomique. Ceci permet un possible transfert d'oxygène entre les deux compartiments. Chez les Alvinellidés, cet échange se produit probablement principalement au niveau du réseau de capillaires entourant l'oesophage où de nombreux coelomocytes sont accumulés, leurs déplacements limités par un dissépinement formant une poche (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998). Le système de transfert de l'oxygène a été étudié chez les Terebellidés *Neoamphitrite figulus*, *Pista pacifica*, *Terebella lapidaria* et *Amphitrite ornata* (Mangum *et al.*, 1975; Terwilliger, 1974; Weber *et al.*, 1977; Wells et Dales, 1975; Wells et Warren, 1982). Dans tous les cas, l'affinité de l'hémoglobine vasculaire est plus faible que celle de l'hémoglobine coelomique, induisant un transfert possible d'oxygène selon la séquence environnement branchie sang liquide coelomique. Dans ces espèces, il a été suggéré que l'oxygène transféré aux coelomocytes est utilisé par les gamètes, trouvées libres dans le coelome. Chez *Alvinella pompejana*, le fort

développement du réseau périoesophagien suggère qu'il joue un rôle très important dans les échanges gazeux, ce rôle n'étant pas nécessairement lié à la maturation des gamètes. Mais pour pouvoir le démontrer, il restait à connaître les propriétés de l'hémoglobine coelomique par rapport à celles de l'hémoglobine vasculaire.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Récolte des animaux

a) Orbiniidés du Golfe du Mexique.

Les Orbiniidés ont été récoltés sur le site Brine Pool NR-1, sur le talus de Louisiane dans le Golfe du Mexique à 23°43'24"N, 91°16'30"W et 650 de profondeur (MacDonald, 1990b; Smith *et al.*, 2000) en Juillet 1998. Les vers ont été récoltés avec les moules *Bathymodiolus childressi* en utilisant la "cuillère" du bras du sous-marin *Johnson Sea-Link I*. Les animaux ont été placés dans une boîte du sous-marin, isolée thermiquement, pour leur récupération par le RV *Edwin Link* où ils ont été transférés dans des seaux d'eau de mer froide (8°C). Les vers ont été maintenus dans de l'eau de mer froide et aérée en chambre froide (8°C) pour une période de récupération d'au moins 24 heures. Il a été possible de garder ces vers vivants pendant au moins 2 semaines à pression atmosphérique. Leur mort est due à une défaillance de la chambre froide à terre. Les vers, transférés dans une autre chambre froide, n'ont pas pu récupérer et n'ont pas survécu au choc thermique qu'ils avaient subi (20°C)

b) *Alvinella pompejana*.

Les spécimens d'*Alvinella pompejana* ont été récoltés par 2500-2600 m de profondeur au cours de la mission franco-américaine HOT'96 et de la mission française HOPE'99 (Mars 1996 et Avril 1999, respectivement, Dorsale du Pacifique Oriental, sites de 9 et 13°N, 104°W). Une fois à bord, les animaux ont été gardés dans de l'eau de mer à 4°C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour la récolte des fluides corporels (sang et liquide coelomique).

c) *Branchipolynoe seepensis* et *B. symmytilida*.

Les spécimens de *Branchipolynoe seepensis* ont été récoltés sur la zone Lucky Strike sur la Dorsale Médio-Atlantique (37°17N 32°17'W), par 1700 m de profondeur. Ils ont été remontés dans leur moule hôte (*Bathymodiolus azoricus*) dans le panier du sous-marin, isolé thermiquement. Une fois à bord, ils ont été prélevés dans le bivalve hôte et utilisés soit pour la récolte du liquide coelomique, soit pour les expériences de respirométrie. Certains de ces vers ont été gardés vivants quelques jours dans la chambre froide de *L'Atalante* (10°C).

Les spécimens de *Branchipolynoe symmytilida* ont été récoltés sur la zone 9°N 104°W de la Dorsale du Pacifique Oriental, par 2600 m de profondeur. Ils ont été remontés dans leur moule hôte (*Bathymodiolus thermophilus*) dans le panier du sous-marin, isolé thermiquement. Une fois à bord, les vers ont été sortis de leur bivalve hôte juste avant la récolte de liquide coelomique.

IV.1.2. Récolte du sang et du liquide coelomique.

Pour *Alvinella pompejana*, le liquide coelomique a été prélevé dans une boîte de Pétri par ouverture médiane de la paroi dorsale de l'animal. Après centrifugation, les cellules ont été lavées à trois reprises avec de l'eau de mer filtrée. Après la dernière centrifugation, trois volumes d'eau distillée ont été ajoutés au culot de cellules, provoquant la lyse des cellules. Après une nouvelle centrifugation de cette solution, le surnageant a été isolé et congelé dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation. Le sang a été récolté directement dans le vaisseau dorsal en utilisant une seringue puis congelé dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation. Afin d'éviter l'hydrolyse par des protéases, du PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) a été ajouté aux fluides corporels, à une concentration finale de 1µM avant congélation.

Pour les *Branchipolynoe*, le liquide coelomique a été prélevé par ouverture dorso-latérale dans une boîte de Pétri. Le liquide coelomique épanché a été récupéré et congelé dans l'azote liquide après ajout de PMSF à une concentration finale de 1µM.

IV.1.3. Purification des hémoglobines pour l'étude des propriétés fonctionnelles.

Les hémoglobines ont été purifiées par FPLC comme c'est expliqué dans le chapitre III. Les échantillons ont été purifiés et conservés dans du tampon *Riftia* pH 7,0. Les fractions absorbant à la fois à 280 et 414 nm obtenues ont été concentrées sur tubes Centricon 10 (point de coupure de masse 10 000 Da) pour obtenir la concentration nécessaire aux expériences suivantes puis congelées à -40°C jusqu'à leur utilisation.

IV.1.4. Contenu en hème

Afin d'estimer la réserve d'oxygène que pourrait représenter l'hémoglobine saturée en dioxygène, la concentration en hème a été mesurée sur des vers entiers après broyage à la main dans un tampon d'extraction (Tris 50 mmol l⁻¹, EDTA 1 mmol l⁻¹, PMSF 1 μmol l⁻¹, pH 8.0). Après une centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes, le surnageant a été isolé et utilisé pour mesurer la concentration en hème, en utilisant un coefficient d'absorption de 11,0 mmol⁻¹ l cm⁻¹ à 540 nm pour la cyan-méthémoglobine (Van Assendelft, 1970). Le dérivé cyan-méthémoglobine a été obtenu par addition à 2 ml d'une solution d'hémoglobine diluée de 10 μl d'une solution de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) 10 mM puis de 10 μl d'une solution de cyanure de potassium (KCN) 50 mM. A partir de cette valeur, la concentration *in vivo* a été estimée. Cette mesure a été effectuée sur 37 individus de *Branchipolynoe seepensis*, d'un poids frais variant de 0,0063 à 2,0593 g, et sur 61 individus de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, d'un poids frais variant de 0,008 à 1,95 g. Le contenu en hème est exprimé en μmoles d'hème g⁻¹ de poids frais.

IV.1.5. Résistance à l'anoxie et aux sulfures

Parmi les espèces que nous avons étudiées, l'expérience a montré que *Alvinella pompejana* ne survit pas longtemps à la remontée, même si les individus sont remis sous une pression

équivalente à celle du fond. *Branchipolynoe seepensis* survit mieux à la remontée que l'espèce du Pacifique, *Branchipolynoe symmytilida*. Ceci pourrait être dû au fait que la première a été récoltée à 1700 m alors que la seconde provient d'une profondeur de 2600 m. Cette survie n'excède cependant pas une dizaine de jours. L'Orbiniidé du Golfe du Mexique peut survivre plusieurs semaines à pression atmosphérique et conserve un comportement analogue à celui qu'il a sur le fond, ce qui permet de réaliser des expériences sur le vivant.

Afin d'estimer leur capacité de résistance à l'anoxie et aux sulfures, des vers ont été exposés à l'anoxie et à deux concentrations en sulfures ($60 \mu\text{mol l}^{-1}$ et 1 mmol l^{-1}). L'eau de mer anoxique a été obtenue par bullage d'azote pendant 30 minutes. L'absence d'oxygène dissous a été vérifiée à l'aide d'un oxymètre à électrode de Clarke (Dissolved Oxygen Meter Orion 835). Des cristaux pré-lavés de sulfure de sodium ont ensuite été ajoutés pour les solutions de sulfures et la concentration en a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Afin de mimer l'environnement naturel, incluant les variations de pH dues aux sulfures, aucune molécule tampon n'a été ajoutée aux solutions d'eau de mer. Pour éviter les phénomènes d'empoisonnement par les animaux morts, chaque ver a été gardé séparément dans des fioles individuelles de 30 ml. Onze de ces fioles ont été mises dans des plus grandes boîtes étanches remplies d'eau de mer désoxygénée (tampon pour éviter une possible entrée d'oxygène dans les fioles contenant les animaux). Pour chaque condition expérimentale, deux de ces plus grandes boîtes ont été utilisées. Afin de servir de contrôle, 22 vers de la même plongée ont été gardés en normoxie, leurs fioles individuelles ouvertes à l'air. Ceci nous a permis de vérifier s'il y avait mortalité par empoisonnement par les déchets métaboliques. Toutes les préparations et incubations ont été faites dans une chambre froide à 8°C . Les solutions anoxiques ont été manipulées sous enceinte anoxique (atmosphère d'azote) pour éviter une dissolution d'oxygène atmosphérique dans les solutions lors des manipulations. Les survivants ont été comptés toutes les 12 heures. Le dernier intervalle n'est que de 7h30 car l'expérience a dû être arrêtée quand le bateau est arrivé au port.

Afin d'évaluer le temps au terme duquel il reste 50% de survivants (TL_{50} ou Temps Létal pour 50% des individus), la courbe de survie suivante a été adaptée aux données:

$$\% \text{ survivants} = \frac{100}{\frac{t}{TL_{50}} + b}$$

où t est le temps en heures, TL_{50} le temps pour atteindre 50% de survivants et b un coefficient de sigmoïdité. Des itérations ont été répétées jusqu'à ce que les paramètres TL_{50} et b ne varient que par moins de 1%.

IV.1.6. Respirométrie

Les taux de consommation d'oxygène ont été mesurés sur *Branchipolynoe seepensis* et l'Orbiniidé du Golfe du Mexique pendant les missions "MARVEL97" et "Gulf of Mexico98", respectivement.

Dans le cas de *Branchipolynoe seepensis*, les animaux ont été placés dans une enceinte étanche pendant 2 heures. Les gros individus ont été gardés séparément et afin d'obtenir une consommation mesurable, six petits individus ont été gardés ensemble dans une enceinte. La concentration en oxygène a été mesurée par la méthode de Winkler au début et à la fin de l'expérience. Les animaux ont ensuite été congelés avant d'être ramenés au laboratoire. Ils ont alors été pesés avant et après séchage dans une étuve à 50°C pendant 48 h. Par différence de concentration, la consommation d'oxygène a été mesurée en supposant que le ver présentait un comportement oxyrégulateur (c'est à dire que le taux de consommation d'oxygène ne dépend pas de la concentration extérieure en oxygène) sur la gamme de concentrations en oxygène à laquelle le ver a été soumis. Cette technique présente l'avantage de pouvoir acquérir des mesures individuelles sur plusieurs individus d'une même récolte en utilisant plusieurs enceintes par expérience. Les mesures ont été effectuées à 10°C dans une chambre froide à bord de *L'Atalante*.

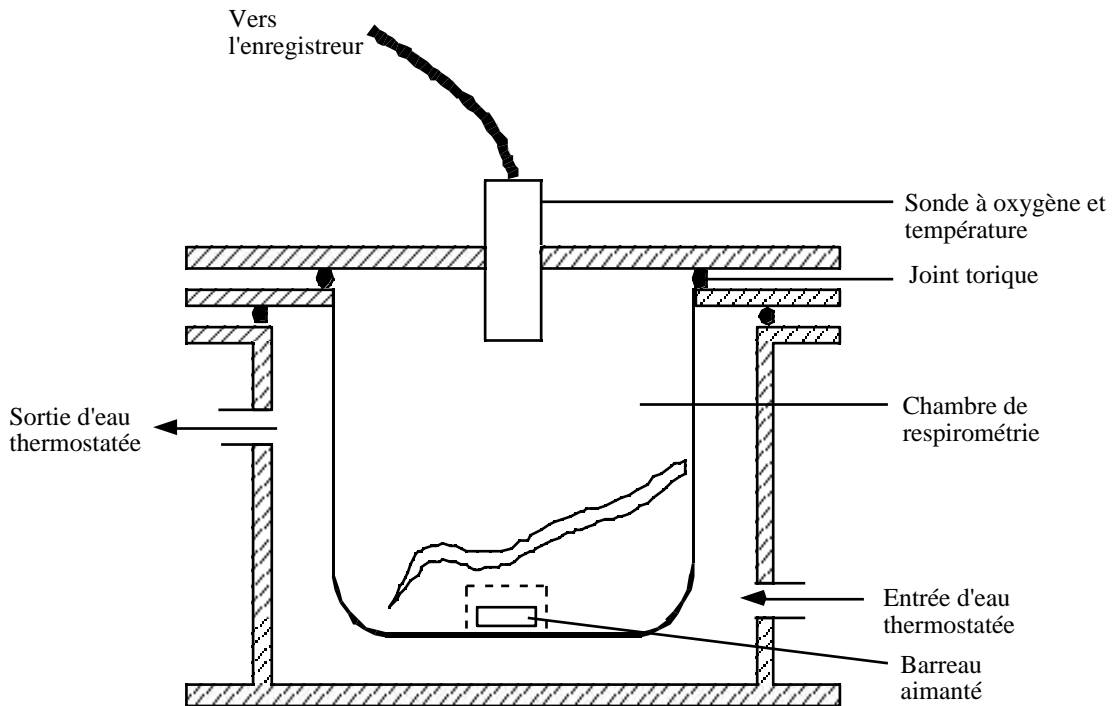


Figure IV.2 : Schéma du respiromètre utilisé pour les mesures sur l'Orbiniidé du Golfe du Mexique.

Dans le cas de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, les mesures ont été faites dans une chambre de respirométrie, à volume constant, ce qui permet d'enregistrer les valeurs de concentration en oxygène à intervalles réguliers pendant une longue période (Figure IV.2). Ce respiromètre est composé d'une enceinte centrale dont l'eau est homogénéisée grâce à un barreau aimanté mû par un agitateur magnétique placé sous le respiromètre. Afin de perturber le moins possible le ver, le barreau aimanté est placé dans une petite cage fixée au fond de l'enceinte. L'enceinte centrale est entourée par une gaine dans laquelle circule une eau thermostatée à 8°C grâce à un bain thermostaté externe. Une électrode de Clarke est insérée dans l'enceinte centrale et reliée un oxymètre (Dissolved Oxygen Meter Orion 835). La pression partielle en oxygène est enregistrée toutes les 5 minutes pendant près de 17 heures (200 points de mesure), et convertie en concentration d'oxygène (les compensations dues à la température et la salinité sont automatiques). Afin d'atteindre des concentrations faibles en oxygène avant la fin de l'expérience pour connaître le comportement du ver dans ces conditions, l'eau de mer a

été débarrassée d'une partie de son oxygène au préalable par bullage d'azote. Une concentration d'environ 5-6 mg O₂ l⁻¹ a été utilisée pour les expériences. Cette expérience a été répétée avec 7 vers différents. Ils ont ensuite été congelés à bord et pesés une fois de retour au laboratoire. Cette technique présente l'avantage de donner des informations sur la possibilité de régulation de la consommation d'oxygène mais un seul ver peut être étudié à la fois (une mesure sur un ver par jour peut être réalisée).

IV.1.7. Pouvoir tampon des fluides corporels de *Branchipolynoe symmytilida*

Le pouvoir tampon du liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida* a été étudié en mesurant les variations de pH dans un échantillon auquel a été ajoutée une quantité connue d'acide fixe ou de CO₂. Dans le premier cas, une quantité connue d'acide ou de base a été ajoutée à l'échantillon et, après équilibration avec de l'air sans CO₂, le pH a été mesuré avec un analyseur des gaz du sang (BMS2; Radiometer) sur deux répliqués de 50 µl. Dans le deuxième cas, des échantillons de 150 µl ont été équilibrés pendant 2 heures à différentes PCO₂ en utilisant des mélanges gazeux obtenus avec des pompes Wösthoff et circulant au dessus de l'échantillon dans le système BMS2. Le pH a ensuite été mesuré sur deux aliquotes de 50 µl et le CO₂ total a été mesuré sur deux sous-échantillons de 20 µl, à l'aide d'un analyseur de dioxyde de carbone total Capni-con (Cameron Instruments). Dans le but de déterminer le rôle des hémoglobines dans le pouvoir tampon, ces expériences ont été réalisées sur du liquide coelomique non traité, sur du liquide coelomique dialysé une nuit contre de l'eau distillée, sur de l'ultrafiltrat (obtenu à l'aide de microconcentrateurs avec un point de coupure de 10 kDa) et sur le concentré de cette filtration, dilué avec un sérum non tamponné pour revenir la concentration initiale en hème.

IV.1.8. Pouvoir tampon des fluides corporels d'*Alvinella pompejana*

Afin d'évaluer l'effet du CO₂ sur le pH du sang (contenant une hémoglobine extracellulaire), sur le pH extracellulaire du liquide coelomique et sur le pH intracellulaire des coelomocytes, des échantillons de sang et de liquide coelomique fraîchement récoltés ont été exposés à un flux d'air, d'air plus 1% de CO₂ et d'air plus 3% de CO₂ (Figure IV.3). Le sang a été récolté directement dans le vaisseau dorsal et les prélèvements sur 3-4 individus ont été réunis afin d'obtenir le volume nécessaire pour une expérience. Le mélange air/CO₂ a été obtenu grâce à une pompe Wösthoff connectée à une pompe à air et à une bouteille de CO₂ pur (>99.998%). Ces expériences ont été réalisées dans une chambre froide à 10°C. Le liquide coelomique a ensuite été centrifugé à 5000 g pendant 3 minutes. Le culot a été congelé dans l'azote liquide avant d'être ramené au laboratoire. Il y a été conservé jusqu'à son utilisation pour mesurer le pH intracellulaire.

Le pH du sang et du liquide coelomique sans cellules ont été mesurés à bord sur deux sous-échantillons de 50 µl à l'aide de la microélectrode pH d'un BMS2. Le pH intracellulaire a été mesuré au laboratoire par la méthode de Pörtner *et al.* (Pörtner *et al.*, 1990; Pörtner *et al.*, 1999). Au culot de cellules d'au moins 20 mg, 150 µl d'une solution de Na₂NTA/KF (0,1 mmol l⁻¹/160 mmol l⁻¹) ont été ajoutés. Cette solution est hypoosmotique et possède un très faible pouvoir tampon. Si la quantité de solution ajoutée est limitée (moins de 10 fois le volume des cellules), le pH obtenu sera donc représentatif du pH intracellulaire. Trois courtes séries d'ultrasons ont aidé à lyser les cellules. La solution a ensuite été centrifugée à 13000 g pendant 90 secondes. Le surnageant (environ 160 µl) a ensuite été transféré dans un tube pour PCR de 0,2 ml et utilisé immédiatement pour mesurer le pH sur 3 réplicats avec l'électrode pH capillaire du BMS2 Blood Gas Analyzer.

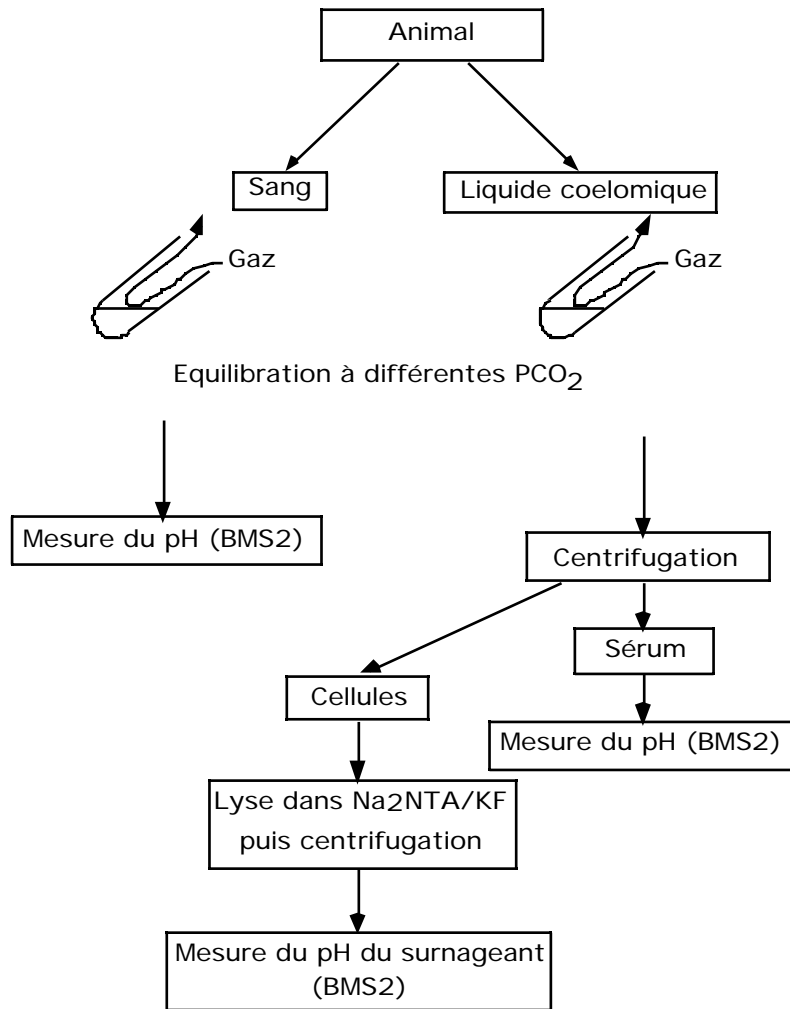


Figure IV.3 : Principe de l'expérience de l'effet du CO₂ sur les fluides corporels d'*Alvinella pompejana*.

IV.1.9. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines

Les propriétés fonctionnelles des hémoglobines ont été étudiées en collaboration avec Roy Weber à l'Université de Århus (Danemark), au cours d'un séjour de 5 semaines dans son laboratoire.

a) Principe des mesures

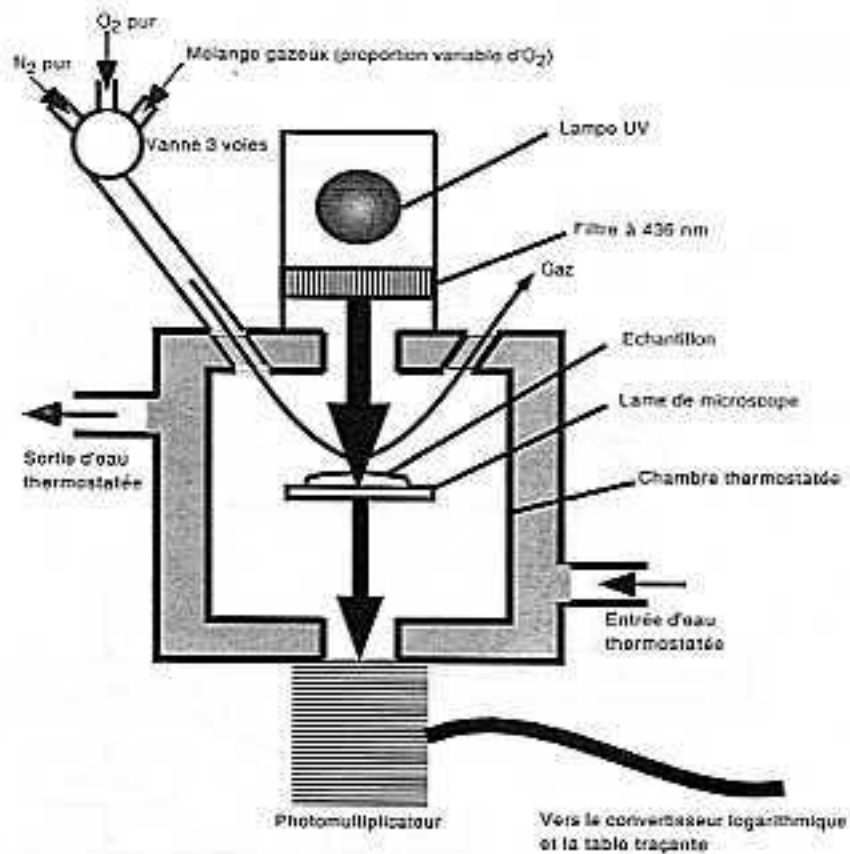


Figure IV.4 : Principe de la chambre à diffusion en mode pas-à-pas. La vanne 3-voies permet de faire passer soit de l'oxygène pur, soit de l'azote pur, soit des mélanges gazeux contenant différentes proportions d'oxygène.

Les propriétés de fixation réversible de l'oxygène ont été étudiées grâce à une chambre à diffusion (Sick et Gersonde, 1969) en utilisant la méthode dite du "pas-à-pas" (Weber, 1981). Un échantillon de pigment respiratoire (4 µl) est placé sur une lame de microscope dans la chambre à diffusion (Figure IV.4). Un faisceau de lumière est produit par une lampe à mercure et traverse l'échantillon. Un flux de gaz est maintenu au dessus de l'échantillon et l'absorbance à 436 nm est mesurée en continu par un photomètre et transformée par un convertisseur logarithmique. L'absorbance sous un flux d'azote pur (>99.998%) nous donne la valeur de l'absorbance à 0% de saturation (A_{N_2}). En remplaçant l'azote par de l'oxygène pur, l'absorbance mesurée correspond à 100% de saturation (A_{O_2}). L'échantillon est ensuite soumis à un flux de gaz contenant différentes proportions d'oxygène et, à chaque concentration, l'absorbance est mesurée ($A_{X\%O_2}$). Le mélange gazeux est préparé à l'aide de pompes Wösthoff, permettant de maintenir un flux constant au dessus de l'échantillon. Le pourcentage de saturation est calculé ainsi :

$$\% saturation = \frac{(A_{X\%O_2} - A_{N_2})}{(A_{O_2} - A_{N_2})} \times 100$$

Afin d'obtenir différents pH dans les solutions d'hémoglobine, nous avons ajouté 6 µl de Bis Tris Propane 1 M à différents pH à 100 µl d'échantillon (originellement 50 mM de Bis Tris Propane) et de l'eau a été ajoutée par amener le volume total à 120 µl. Le pH a été mesuré en duplicat avec l'électrode capillaire d'un Blood Gas Analyzer (BMS2, Radiometer) sur des sous-échantillons de 50 µl. La chambre à diffusion ainsi que le BMS2 étaient thermostatés à 10, 20, 30 ou 40 ($\pm 0,1$) °C grâce à la circulation d'eau dont la température est contrôlée par un bain thermostaté. La concentration en chlore a été mesurée sur deux échantillons de 4 µl par coulométrie (CMT10, Radiometer).

b) Calcul des constantes décrivant les propriétés fonctionnelles

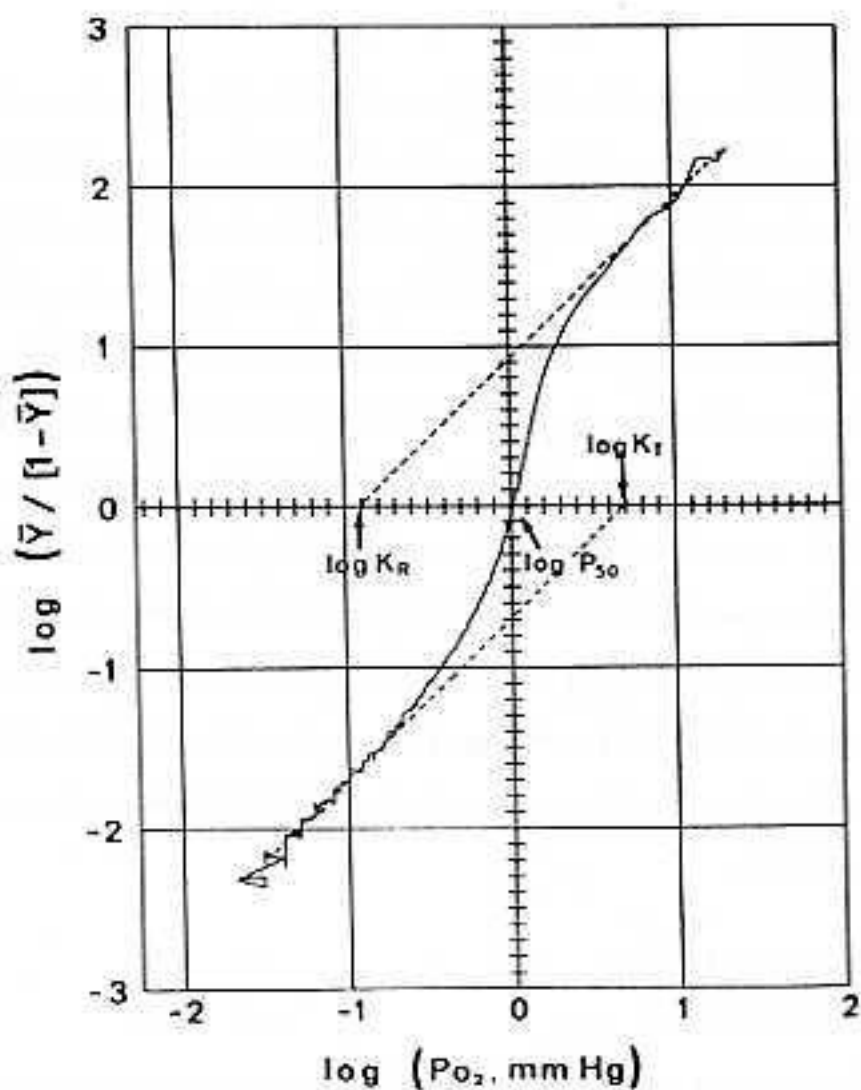


Figure IV.5 : Exemple de graphique de Hill pour déterminer graphiquement les différentes constantes décrivant les propriétés fonctionnelles des pigments respiratoires. Tiré de Toulmond et al., 1990.

La transformation de Hill ($\log \frac{S}{(1-S)} = f(\log P_{O_2})$) a été utilisée pour linéariser la relation entre la P_{O_2} et la saturation (Figure IV.5). Entre 35 et 70% de saturation, la courbe est linéaire et on peut calculer les valeurs de P_{50} (P_{O_2} à laquelle l'hémoglobine est à moitié saturée en oxygène) et n_{50} (coopérativité à P_{50} , correspondant à la pente de la droite). Pour chaque mesure, 4 à 5 points sont nécessaires afin d'obtenir une bonne corrélation.

Il est possible de faire des graphiques de Hill étendus. Dans ce cas, en plus des points de la partie linéaire (35-70% de saturation), de nombreux points dans les faibles et fortes saturations sont ajoutés. La courbe s'incurve de part et d'autre de la partie centrale linéaire (Figure IV.5) et on a accès aux constantes d'affinité de la molécule oxygénée (K_R) et désoxygénée (K_T) en prolongeant les asymptotes des parties linéaires (pente = 1) après l'incurvation de part et d'autre de la partie médiane.

c) Effet Bohr

Lorsque le pH varie, l'affinité d'un pigment respiratoire pour l'oxygène peut varier. Cet effet est appelé effet Bohr et est décrit par un coefficient () qui est calculé en utilisant l'équation :
$$= \frac{\log P_{50}}{pH}$$
. L'absence d'effet du pH se traduira par une valeur nulle de . Une diminution de l'affinité quand le pH diminue est un effet Bohr normal (le plus fréquent) et se traduira par une valeur négative de . Enfin, un effet Bohr inverse se traduira par une valeur de positive.

d) Chaleur apparente d'oxygénation ()

La réaction de liaison de l'oxygène par un pigment respiratoire est une réaction exothermique. Une variation de température aura donc une influence sur la liaison de l'oxygène. Ceci peut être visualisé sur un graphique d'Arrhenius où on représente $\log(P_{50})$ en fonction de $1/T$ où T est la température absolue. La pente correspond à la chaleur apparente d'oxygénation et peut être calculée en utilisant l'équation :

$$H = 2,303 R \frac{\log P_{50}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \text{ en kJ mol}^{-1}$$

où R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) et T_1 et T_2 sont les températures absolues (K).

Cette valeur (H^{obs}) comprend la chaleur intrinsèque d'oxygénation (H^{intr}), la chaleur de solubilisation de l'oxygène ($H^{\text{sol}} \sim 13 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) et la participation des chaleurs des réactions liées à l'oxygénation comme les chaleurs de déplacement des protons et des phosphates. Ces deux dernières réactions sont endothermiques (H positif) alors que la liaison de l'oxygène est une réaction exothermique (H négatif). A fort pH, il n'y a pas de fixation de protons (très peu de protons en solution) et, en l'absence d'effecteurs allostériques, $H^{\text{intr}} = H^{\text{obs}} - H^{\text{sol}}$.

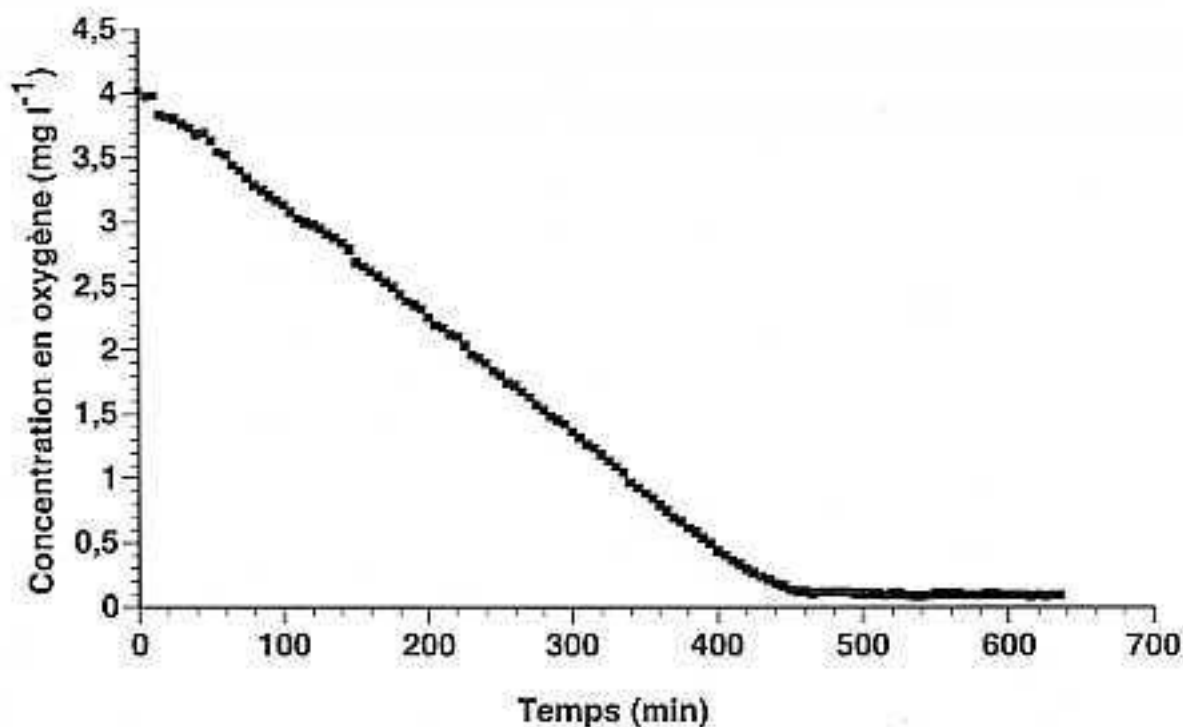
e) Mesures effectuées.

L'étude des propriétés fonctionnelles des hémoglobines des trois modèles biologiques a été effectuée. Les deux hémoglobines majeures de *Branchiopolynoe symmytilida* (HbC1 et HbC2) ont été étudiées à 10, 20 et 30°C, à des pH compris entre 6,5 et 8,0. L'effet du CO₂ a été testé avec 0, 1 et 3% de CO₂ dans le mélange gazeux utilisé.

Bien que les propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine extracellulaire d'*Alvinella pompejana* aient déjà été publiées (Toulmond *et al.*, 1990), la technique utilisée était différente (Hemox à la place de la chambre à diffusion ici). De façon à éviter les artefacts dus à l'instrumentation dans la comparaison, les propriétés des deux hémoglobines (vasculaire et coelomique) ont été analysées en utilisant la chambre à diffusion. Les températures testées étaient de 10, 20, 30 et 40°C. La gamme de pH testée était de 6,2 à 8,2.

Pour l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, enfin, les propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine intacte et de ses dodécamères (voir chapitre III) ont été étudiées à 10, 20 et 30°C. La gamme de pH testée était de 6,8 à 8,0 et l'effet des ions Ca^{2+} (11 et 100 mmol l^{-1}) a aussi été étudiée.

A



B

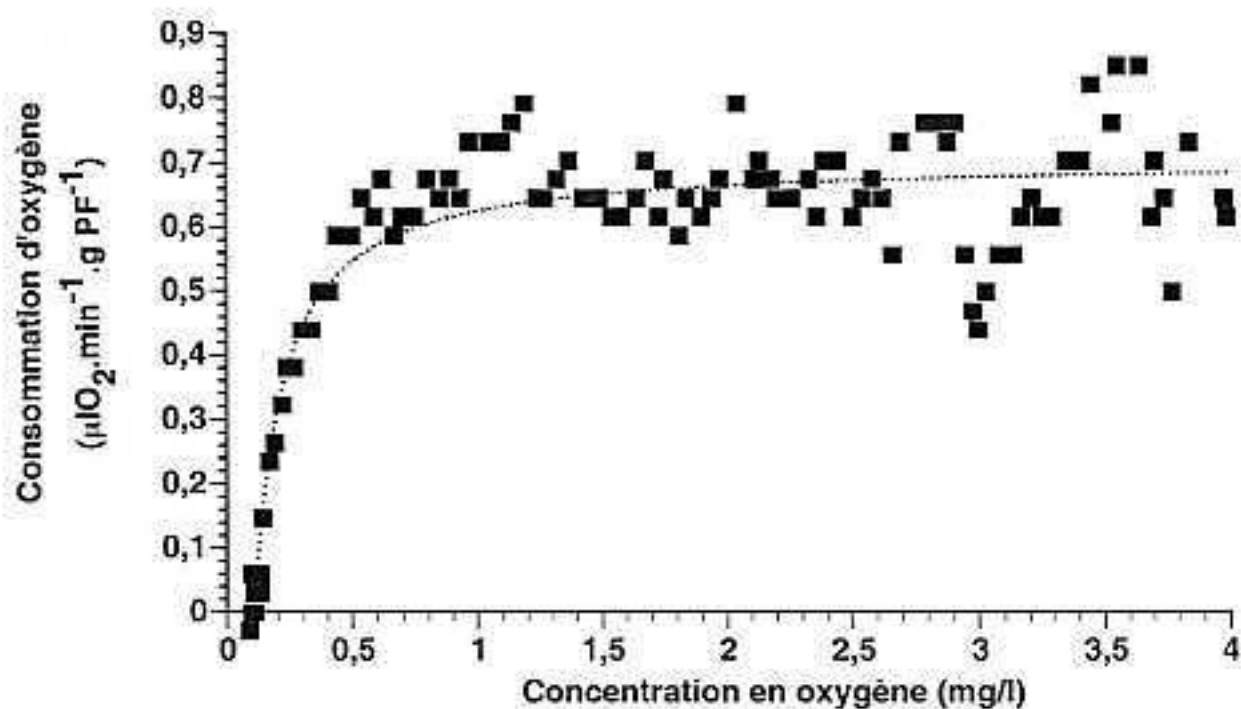


Figure IV.6 : Respirométrie sur l'Orbiniidé. A Evolution de la concentration en oxygène dans la chambre du respiromètre (130 ml) au cours du temps pour un ver de 1,24g à 8°C. B Taux de consommation d'oxygène tirés de A et représentés en fonction de la concentration en oxygène dans la chambre.

IV.3. Résultats.

IV.3.1. Respirométrie

a) Orbiniidé du Golfe du Mexique.

La figure IV.6A montre l'évolution de la concentration en oxygène dans la chambre du respiromètre pour un ver de 1,24 g de poids frais à des concentrations en oxygène variant de 4 à 0,1 mg l⁻¹. La concentration en oxygène décroît régulièrement et se stabilise à des faibles concentrations en oxygène. Les taux de consommation d'oxygène tirés de ces données sont présentés en figure IV.6B. Les taux varient légèrement autour de 0,7 µl O₂ min⁻¹ g⁻¹ poids frais (soit 3,5 µl O₂ min⁻¹ g⁻¹ poids sec) pour des concentrations en oxygène variant de la normoxie à 0,5 mg O₂ l⁻¹. Après cette valeur critique, le taux de consommation d'oxygène décroît et atteint 0 à une concentration de 0,1 mg O₂ l⁻¹. Les petites variations dans la consommation moyenne au début de l'incubation sont interprétées comme l'alternance de périodes d'activité et de repos du ver. La meilleure courbe adaptable aux données a pour équation :

$$R = \frac{a ([O_2] - c)}{(1 + b [O_2] - c)}$$

où $[O_2]$ est la concentration en oxygène (ici en mg l⁻¹), c est la valeur de concentration en oxygène à laquelle $R=0$ (où il n'y a plus de consommation d'oxygène), a et b sont des constantes et a/b est la valeur de R quand $[O_2]$ tend vers l'infini, correspondant à la consommation maximale d'oxygène (R). Les constantes a et b décrivent la pente initiale et donc à quelle vitesse le plateau est atteint. Pour le ver utilisé dans l'expérience de la figure IV.6, $c=0,106$, $a=6,146$ et $b=8,705$. Le taux de consommation maximale d'oxygène R est alors 0,706 µl O₂ min⁻¹ g⁻¹ poids frais.

Ces mesures ont été effectuées sur 7 vers, compris entre 0,64 et 1,87 g de poids frais. La valeur de r^2 était toujours plus petite que la valeur critique nécessaire pour rejeter la corrélation à la courbe théorique ($p<0,01$). La forme de la courbe est toujours la même, avec une

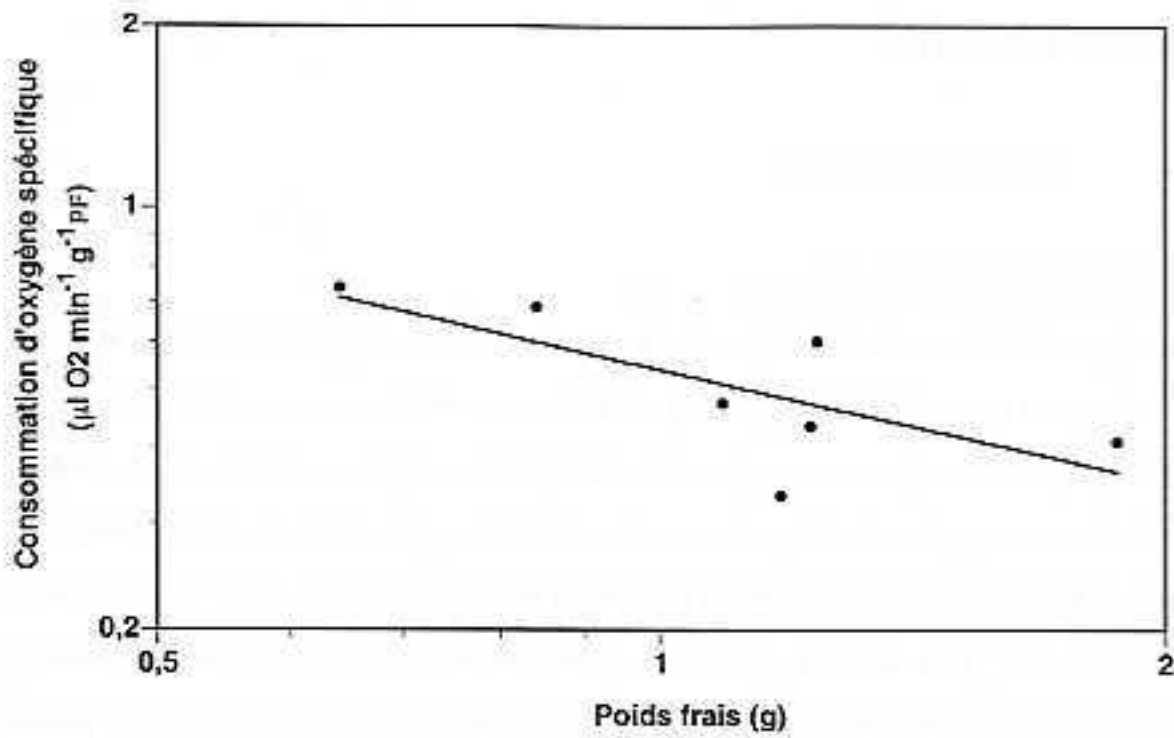


Figure IV.7 : Variation de la consommation spécifique d'oxygène en fonction du poids frais chez l'Orbinidé.

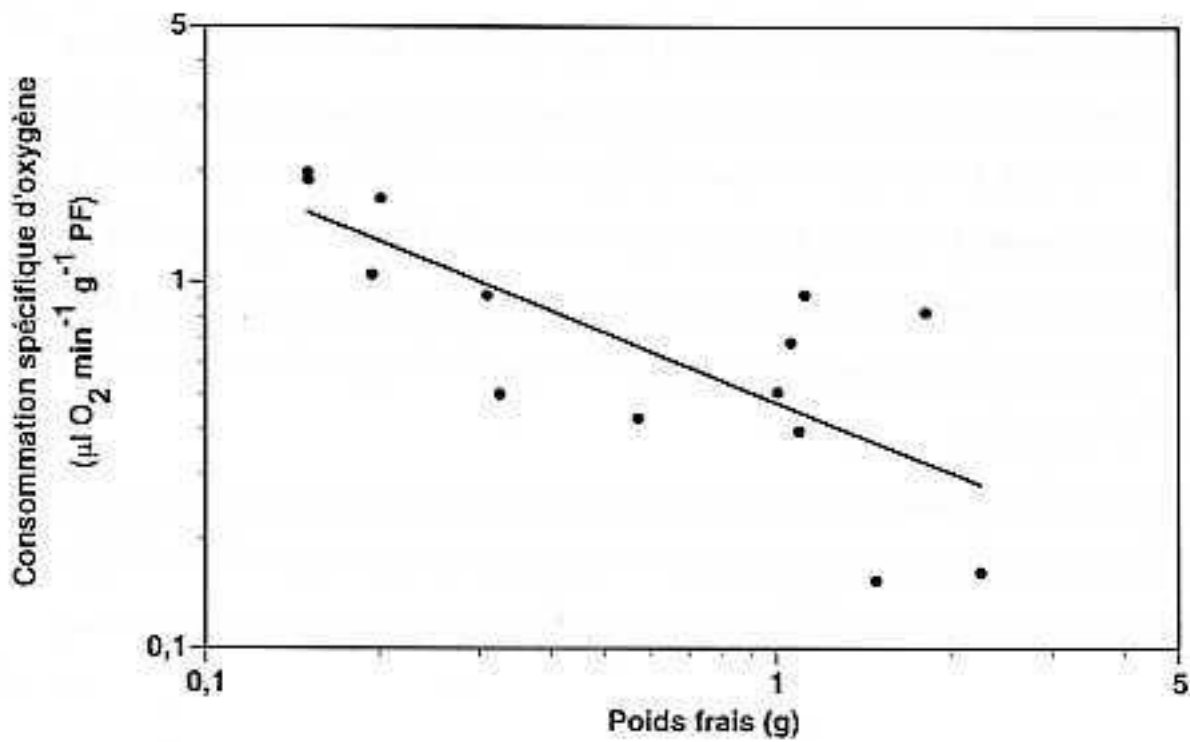


Figure IV.8 : Variation de la consommation spécifique d'oxygène en fonction du poids frais chez *Branchipolynoe seepensis*.

concentration critique en oxygène d'environ $0,5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ et des taux de consommation d'oxygène tombant à 0 à $0,09-0,11 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. Le taux moyen de consommation d'oxygène pour les 7 vers est de $0,52 \pm 0,15 \text{ } \mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ poids frais (soit environ $2,60 \pm 0,75 \text{ } \mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de poids sec). La Figure IV.7 montre l'effet du poids sur les taux respiratoires. Le taux de consommation d'oxygène suit une courbe d'équation :

$$MO_2 = 0,488 W^{-0,702}$$

où MO_2 est le taux de consommation d'oxygène en $\mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ et W est le poids frais du ver. Cette courbe a un coefficient de corrélation r de $0,7159$ ($n=7$, $p<0,1$). La relation peut aussi s'exprimer sous la forme linéaire suivante :

$$\log(MO_2) = -0,312 - 0,702 \log(W)$$

b) *Branchipolynoe seepensis*.

Pour cette espèce, la méthode de mesure était différente (voir Matériel et Méthodes IV.2.6). La figure IV.8 montre les taux de consommation d'oxygène pour 14 vers, de poids humide compris entre $0,0063$ et $2,0593 \text{ g}$, tous issus de la même plongée. Le taux varie de $0,72$ à $11,2 \text{ } \mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de poids sec, la moyenne pour toute la gamme de poids est de $4,51 \pm 3,59 \text{ } \mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de poids sec et pour les adultes (poids sec $> 0,05 \text{ g}$), la moyenne est de $2,64 \pm 1,38 \text{ } \mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de poids sec. Le taux de consommation d'oxygène suit une courbe d'équation :

$$MO_2 = 1,256 W^{-0,632}$$

où MO_2 est le taux de consommation d'oxygène en $\mu\text{l O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ et W est le poids frais du ver en grammes. Cette courbe a un coefficient de corrélation r de $0,761$ ($n=14$, $p<0,01$). cette relation peut aussi s'exprimer sous la forme linéaire suivante :

$$\log(MO_2) = 0,099 - 0,632 \log(W)$$

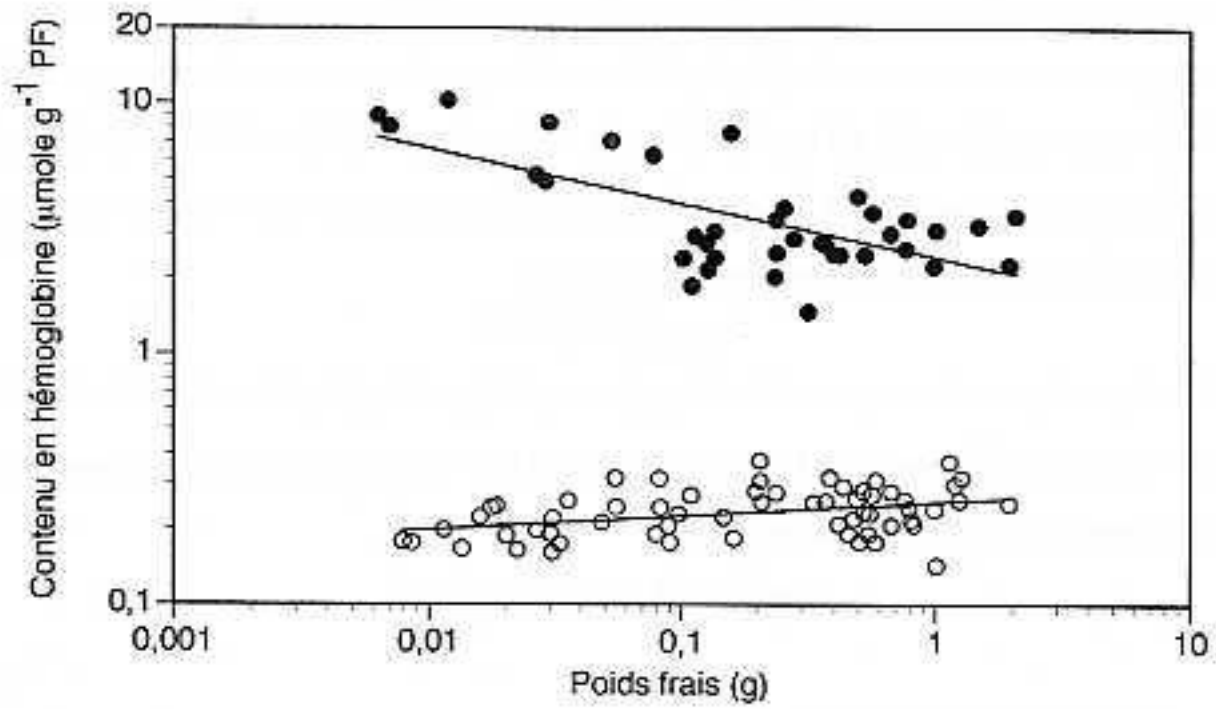


Figure IV.9 : Variation du contenu spécifique en hémoglobine en fonction du poids frais chez l'Orbiniidé (○) et chez *Branchipolynoe seepensis* (●).

IV.1.2. Contenu en hémoglobine.

a) Orbiniidé du Golfe du Mexique.

Le contenu individuel en hémoglobine a été mesuré pour 61 vers de cette espèce et représenté en fonction de leur poids frais (Figure IV.9). Pour une gamme de poids frais de 0,008 à 1,95 g, le contenu en hémoglobine variait de 143 à 373 nmole Hb g⁻¹ poids frais. Le contenu spécifique en hémoglobine, un peu plus faible pour les vers de petite taille, augmente et atteint très rapidement un plateau. Le contenu moyen en hémoglobine est de 237±52 nmole Hb g⁻¹ poids frais (n= 61). Une courbe peut être ajustée à ces points et elle a pour équation :

$$Q=0,256 W^{0,056}$$

W est le poids frais en g. Cette relation peut aussi s'exprimer sous la forme :

$$\log(Q)=-0,592+0,056 \log(W)$$

Cette courbe a un coefficient de corrélation r de 0,388 (n=61, p<0,01).

A partir de cette relation, en se plaçant dans une situation optimale (saturation complète de l'hémoglobine et consommation d'oxygène constante), et en utilisant l'équation de consommation d'oxygène en fonction du poids, on obtient une équation qui permet d'estimer l'autonomie maximale en oxygène pour cette espèce :

$$A=Q/MO_2=0,524 W^{0,758}$$

W est le poids frais du ver en g. Cette relation peut aussi s'exprimer sous la forme :

$$\log(A)=-0,281+0,758 \log(W)$$

Pour un ver de 1 g, l'hémoglobine représenterait donc une réserve d'oxygène qui permettrait 31 minutes de métabolisme aérobie avant de reposer entièrement sur l'anaérobiose.

b) Branchipolynoe seepensis.

Le contenu individuel en hémoglobine a été mesuré pour 37 vers. La Figure IV.9 montre le contenu en hémoglobine de ces 37 vers en fonction de leur poids frais. La quantité

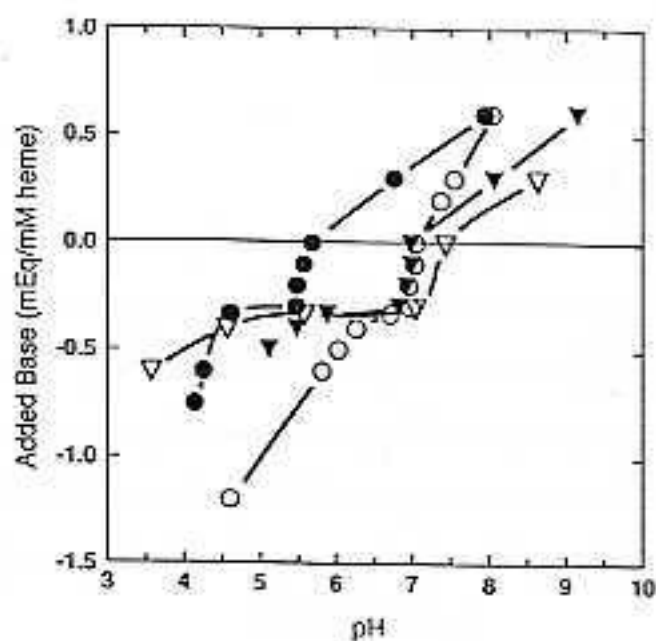


Figure IV.10 : Titration du liquide coelomique natif (ronds vides), dialysé (ronds pleins), ultrafiltré (triangles vides) et reconstitué (triangles pleins) de *Branchipolynoe symmytilida* avec de l'acide ou base fixes.

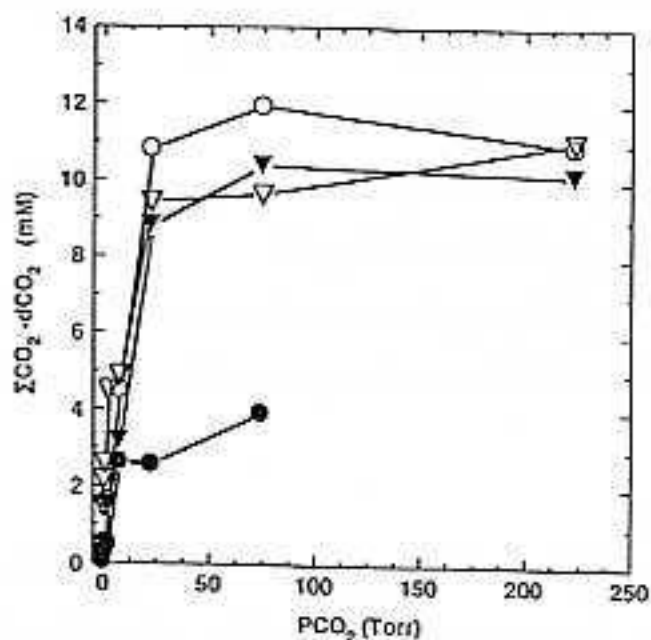


Figure IV.11 : Capacité d'accumulation de CO_2 (CO_2 total moins CO_2 dissous) du liquide coelomique natif (ronds vides), dialysé (ronds pleins), ultrafiltré (triangles vides) et reconstitué (triangles pleins) de *Branchipolynoe symmytilida*.

d'hémoglobine diminue pour les petits vers et atteint un plateau. Leur poids frais variait de 0,0063 à 2,0593 g et leur contenu en hémoglobine de 2 à 4 $\mu\text{mole Hb g}^{-1}$ poids frais pour la plupart de la gamme de taille, excepté pour les individus plus petits que 0,1 g de poids frais pour lesquels le contenu en hémoglobine peut atteindre 10,3 $\mu\text{mole/g}$ de poids frais. Le contenu moyen en hémoglobine est de $3,93 \pm 2,24 \mu\text{mole Hb g}^{-1}$ poids frais (n= 37) pour toute la gamme de taille et de $2,90 \pm 0,67 \mu\text{mole Hb g}^{-1}$ poids frais pour les animaux plus gros que 0,2 g de poids frais. Le contenu Q en hémoglobine est donné par l'équation :

$$Q = 2,445 W^{-0,215}$$

W est le poids frais en g. Cette relation peut aussi être exprimée sous la forme linéaire :

$$\log(Q) = 0,388 - 0,215 \log(W)$$

Le coefficient de corrélation est $r = 0,655$, significatif à $p < 0,001$ (n=37).

A partir de cette relation, en se plaçant dans une situation optimale (saturation complète de l'hémoglobine et consommation d'oxygène constante), et en utilisant l'équation de consommation d'oxygène en fonction du poids, on obtient une équation qui permet d'estimer l'autonomie maximale en oxygène pour cette espèce :

$$A = Q/MO_2 = 1,95 W^{0,416}$$

W est le poids frais en g. Cette relation peut aussi être exprimée sous forme linéaire :

$$\log(A) = 0,29 + 0,416 \log(W)$$

Pour un ver de 1 g, l'autonomie est donc estimée à 1,95 heures. Après cette période, l'anaérobiose est totale.

IV.1.3. Pouvoir tampon du liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida*.

La figure IV.10 montre les résultats de la titration par des acides et bases fixes du liquide coelomique natif, dialysé, reconstitué et de l'ultrafiltrat. Le pouvoir tampon est élevé dans les fluides contenant de l'hémoglobine et réduite dans l'ultrafiltrat. Sans addition d'acide ou de base, l'échantillon dialysé possède un pH de 5,7. Les valeurs correspondantes sont de 7,0 pour

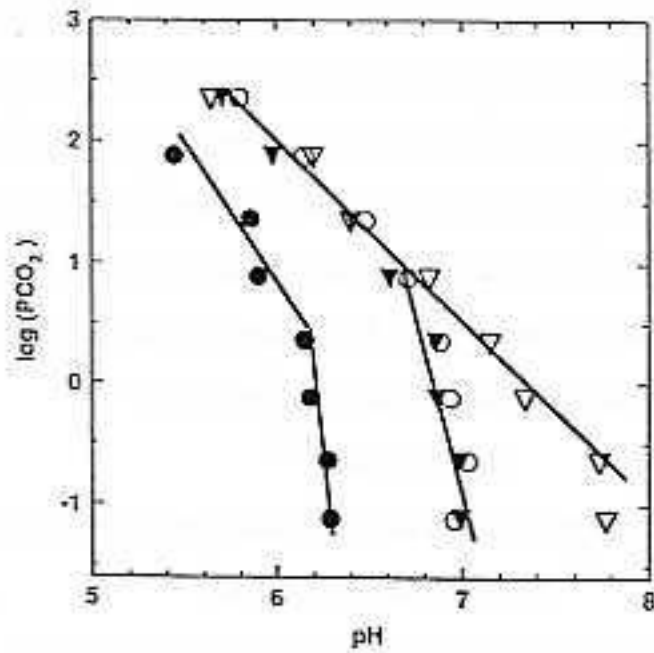


Figure IV.12 : Effets du CO₂ sur le pH du liquide coelomique natif (ronds vides), dialysé (ronds pleins), ultrafiltré (triangles vides) et reconstitué (triangles pleins) de *Branchipolynoe symmytilida*.

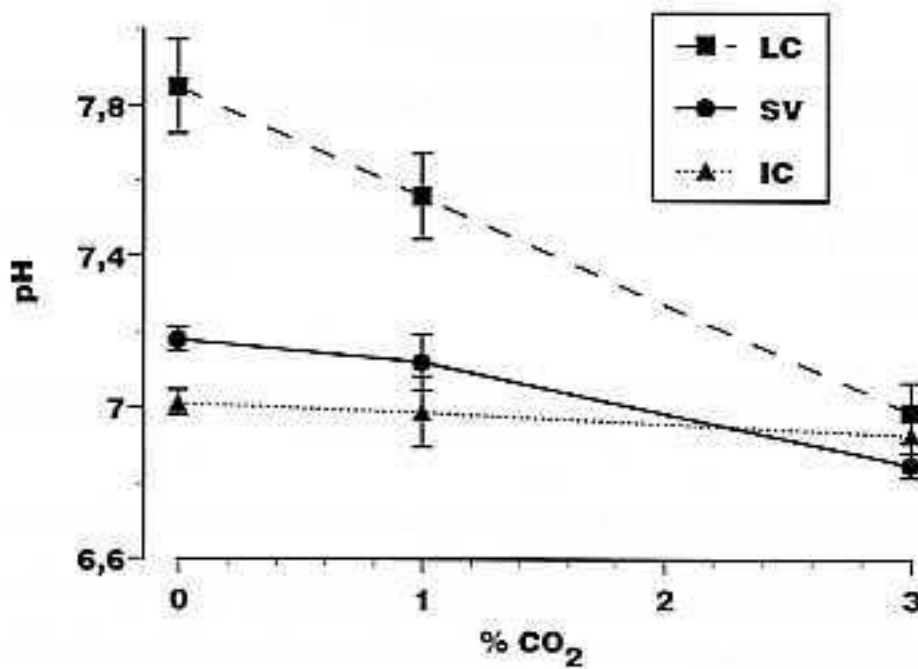


Figure IV.13 : Effets du CO₂ sur le pH du liquide coelomique (LC), celui des coelomocytes (IC) et celui du sang (SV) d'*Alvinella pompejana*.

le liquide coelomique natif et reconstitué et de 7,4 pour l'ultrafiltrat. Dans tous les cas, le maximum de pouvoir tampon est situé autour de ces valeurs, les fluides supportant l'addition d'environ 0,3 mEq d'acide par mmole d'hème sans variation importante du pH.

La figure IV.11 montre la capacité d'accumulation de CO₂ par le liquide coelomique natif, dialysé, reconstitué et l'ultrafiltrat. La quantité totale de CO₂ peut atteindre un maximum de 10-12 mM dans le liquide coelomique natif et l'ultrafiltrat quand ils ont été équilibrés à une PCO₂ d'environ 20 Torr (3% de CO₂ à pression atmosphérique). Le liquide coelomique reconstitué atteint une valeur légèrement inférieure. Dans le liquide coelomique dialysé, la quantité de CO₂ atteint seulement 3-4 mM à la même PCO₂. Ceci suggère qu'il existe une molécule de faible poids moléculaire qui est capable de fixer du CO₂ dans le liquide coelomique.

La figure IV.12 montre l'effet du CO₂ sur le pH du liquide coelomique natif, dialysé, reconstitué et de l'ultrafiltrat. Dans les échantillons natif, dialysé et reconstitué, le pH diminue légèrement pour des PCO₂ jusqu'à 7,5 Torr et plus fortement à des tensions de CO₂ supérieures. Dans l'ultrafiltrat, la diminution de pH est à peu près constante sur la gamme de PCO₂ testée. Ces observations montrent que l'hémoglobine est capable de tamponner un apport de CO₂ pouvant atteindre environ 4,5 mM (1% de CO₂ à pression atmosphérique).

IV.1.4. Effets du CO₂ sur les fluides corporels d'*Alvinella pompejana*.

La figure IV.13 montre les variations du pH du sang, du plasma coelomique et des coelomocytes après équilibration avec de l'air (environ 0.03% CO₂), de l'air plus 1% CO₂ et de l'air plus 3% de CO₂. Le pH du liquide coelomique (LC sur la figure IV.13) diminue beaucoup (de 7,85 à 6,99) quand la concentration en CO₂ augmente de 0 à 3%. En contraste, le pH intracellulaire des coelomocytes (IC sur la figure IV.13) varie très peu autour de 7, la faible diminution de 0,08 unités de pH n'étant pas significative. Le sang (SV sur la figure IV.13) possède lui aussi un certain pouvoir tampon, son pH diminuant de 0,3 unités de pH à 3% de

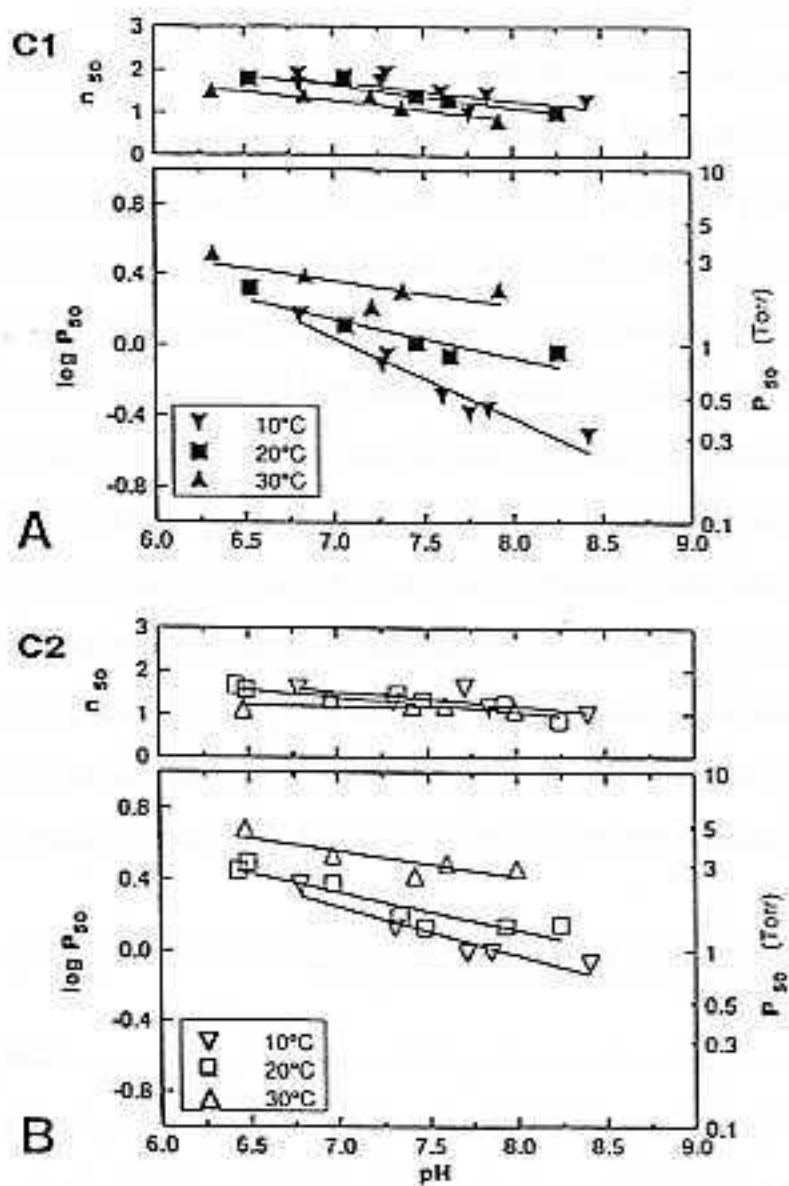


Figure IV.14 : Effets du pH et de la température sur l'affinité (P_{50}) et le coefficient de coopérativité (n_{50}) des deux hémoglobines majeures de *Branchipolynoe symmytilida* : HbC1 (A) et HbC2 (B).

CO₂ par rapport à sa valeur initiale de 7,18 à 0% de CO₂. La diminution entre 0 et 3% est significative alors que celle entre 0 et 1% ne l'est pas.

IV.1.5. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines de *Branchipolynoe symmytilida*.

Les deux hémoglobines étudiées (HbC1 et HbC2) montrent dans l'ensemble une forte affinité mais une faible coopérativité dans la liaison de l'oxygène. Les figures IV.14A et B montrent les effets du pH et de la température sur l'affinité (représentée par la P₅₀) et la coopérativité de HbC1 et HbC2, respectivement. L'affinité des deux hémoglobines décroît quand la température augmente. Les valeurs de ΔH sont données dans le tableau IV.1. A pH 8, il n'y a pas d'effet Bohr, donc pas de contribution de la chaleur de protonation à la chaleur apparente d'oxygénation mesurée. Les valeurs de ΔH pour les gammes de température 10-20 et 20-30°C sont similaires pour l'hémoglobine HbC1 (-57,1 et -62,9 kJ mol⁻¹ respectivement) alors que pour HbC2, la valeur pour la gamme 20-30°C est le double de celle pour 10-20°C (-57,8 et -28,6 kJ mol⁻¹ respectivement). A pH 7,0, la valeur de ΔH est similaire pour les deux hémoglobines et deux fois plus importante pour la gamme 20-30°C que pour 10-20°C. A toutes les températures testées, l'affinité augmente avec le pH (effet Bohr normal). Comme indiqué dans le tableau IV.1, les valeurs du coefficient de Bohr (β) pour HbC1 et HbC2 décroît quand la température augmente, tombant de -0,54 à -0,24 pour HbC1 et de -0,37 à -0,28 pour HbC2. La coopérativité diminue quand le pH augmente mais la température n'a pas d'effet clair sur ce paramètre. Des valeurs indicatives de P₅₀ à pH 7, 7,5 et 8 sont données dans le tableau IV.1.

Les figures IV.15A et B montrent l'effet du CO₂ à 20°C sur l'affinité et la coopérativité de HbC1 et HbC2, respectivement. Bien que le CO₂ ne semble pas avoir d'effet sur HbC1, il a un léger effet sur l'affinité de HbC2, la diminuant quand la tension de CO₂ augmente. La coopérativité des deux hémoglobines ne semble pas affectée par le CO₂.

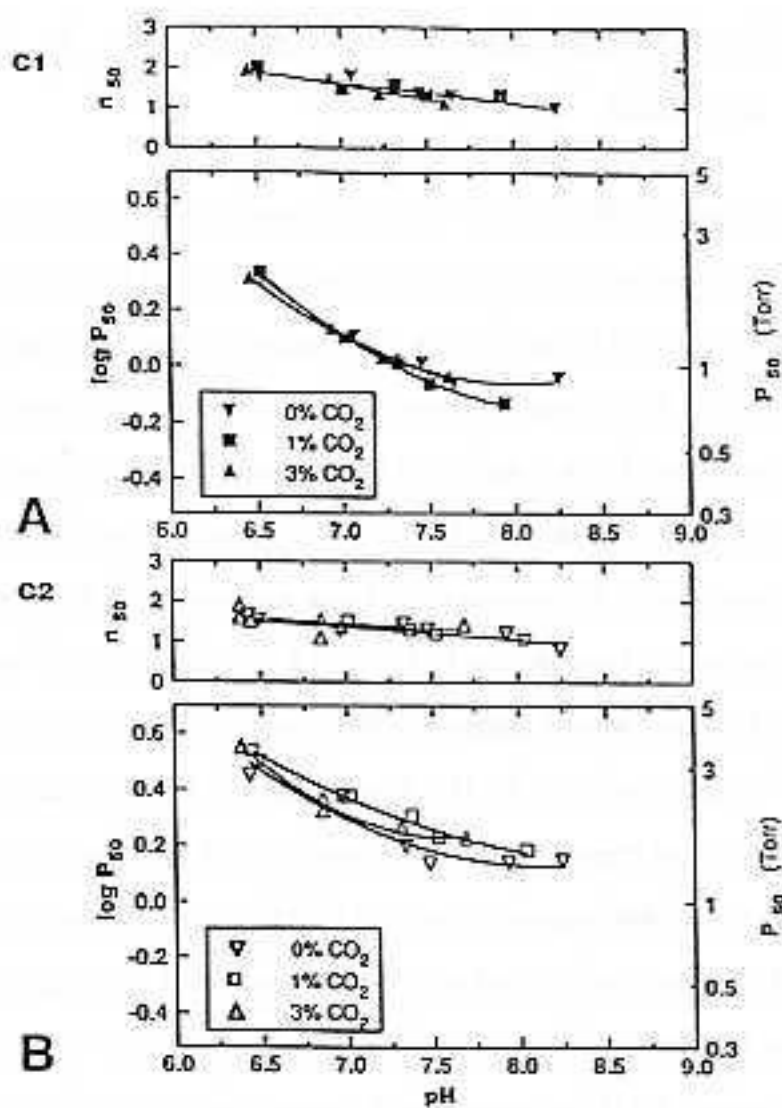


Figure IV.15 : Effets du CO_2 à 20°C sur l'affinité (P_{50}) et le coefficient de coopérativité (n_{50}) des deux hémoglobines majeures de *Branchipolynoe symmytilida* : HbC1 (A) et HbC2 (B).

CHAPITRE IV - Physiologie de la respiration -

Tableau IV.1 : Caractéristiques fonctionnelles des hémoglobines coelomiques de *Branchipolynoe symmytilida*. Affinité pour l'oxygène, coopérativité et coefficient de Bohr déterminés à 10, 20 et 30°C, chaleur apparente d'oxygénation, H^{obs} , calculée pour les gammes de température 10-20 et 20-30°C. Les valeurs ont été calculées à un pH donné par interpolation entre les points expérimentaux.

Température (°C)	Hb C1			Hb C2		
	10	20	30	10	20	30
Affinité (Torr)						
P ₅₀ à pH 7,0	1,2	1,4	2,1	1,8	2,3	3,3
P ₅₀ à pH 7,5	0,6	0,9	1,7	1,1	1,4	2,9
P ₅₀ à pH 8,0	0,4	0,8	-	0,9	1,4	3,0
Coopérativité (n ₅₀)						
gamme entre pH 6,5 et 8,5	1,0-1,9	1,0-1,8	0,8-1,5	1,0-1,6	0,8-1,7	1,1-1,4
Effet Bohr ()						
pH 6,5-7,5	-0,54	-0,33	-0,24	-0,37	-0,30	-0,28
H^{obs} (kJ mol ⁻¹)						
pH 7,0	-12,7	-27,2		-13,5	-28,9	
pH 8,0	-57,1	-62,9		-28,6	-57,8	

IV.1.6. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines d'*Alvinella pompejana*.

Les figures IV.16 et IV.17 montrent l'effet du pH et de la température sur la P₅₀ et la coopérativité de l'hémoglobine coelomique et vasculaire d'*Alvinella pompejana*, respectivement. Les deux hémoglobines ont de fortes et remarquablement similaires affinités pour l'oxygène dans les mêmes conditions de température et de pH. Les courbes logP₅₀ en fonction du pH se recouvrent parfaitement pour la plus grande partie de la gamme de pH étudiée. A 20 °C et pH supérieur à 7,5, l'affinité de l'hémoglobine vasculaire est plus forte que celle de l'hémoglobine coelomique. A 10°C, la différence d'absorbance entre l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée était très petite. Ceci est interprété comme une diminution du nombre de site de liaison de l'oxygène (effet similaire à un effet Root). Dans ces conditions, il était difficile d'obtenir une courbe de dissociation de l'oxygène, cette difficulté augmentant avec le pH. Les affinités des deux hémoglobines augmentent avec le pH dans la gamme pH 6-7,5 (effet Bohr normal). A des

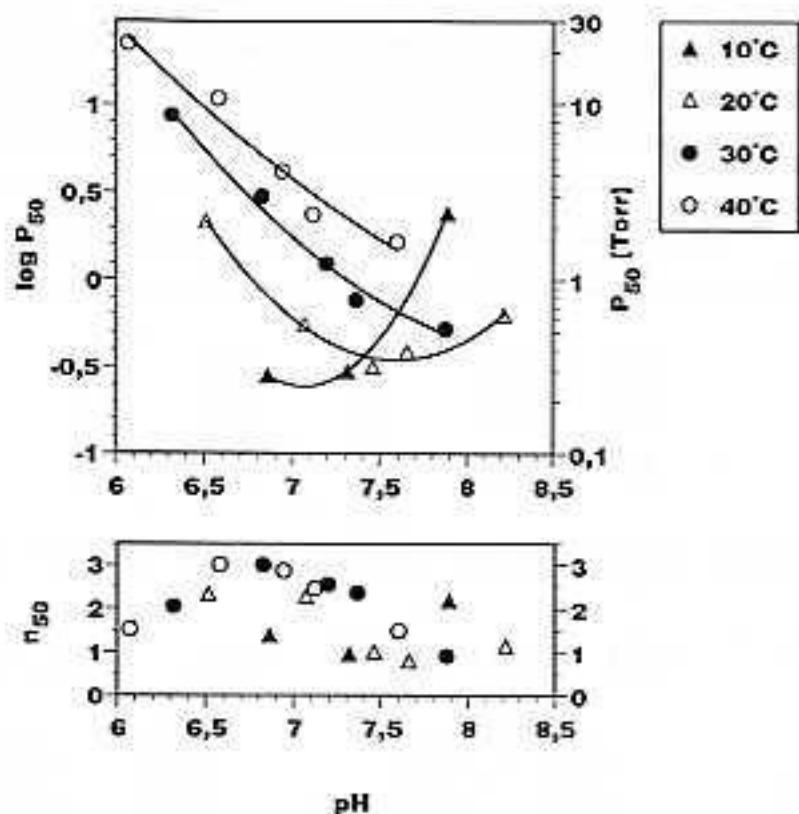


Figure IV.16 : Effets du pH et de la température sur l'affinité (P_{50}) et le coefficient de coopérativité (n_{50}) de l'hémoglobine coelomique d'*Alvinella pompejana*.

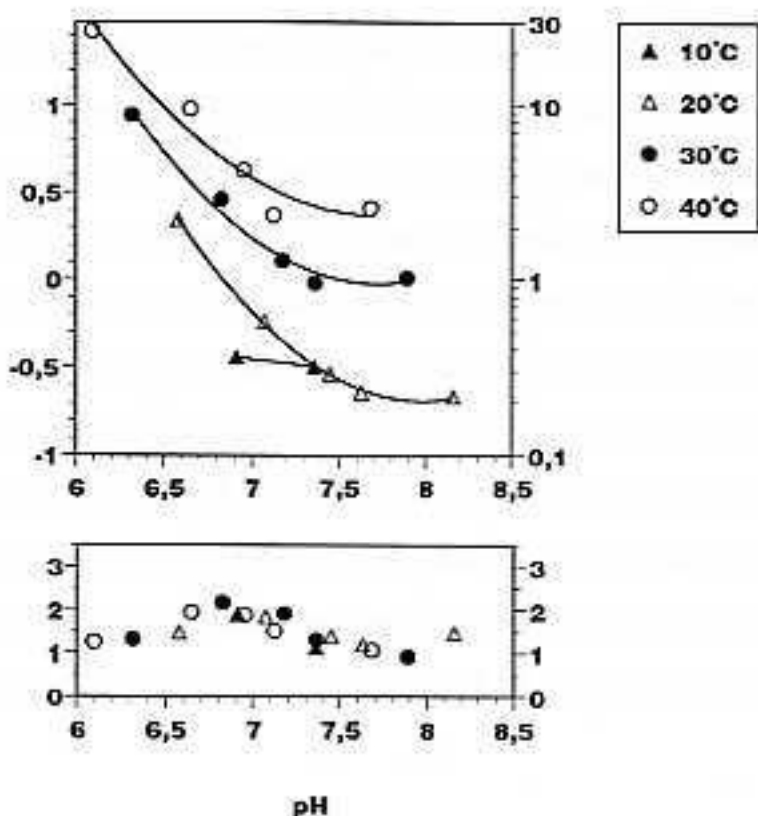


Figure IV.17 : Effets du pH et de la température sur l'affinité (P_{50}) et le coefficient de coopérativité (n_{50}) de l'hémoglobine vasculaire d'*Alvinella pompejana*.

pH plus élevés, l'affinité semble plutôt constante, à l'exception de l'hémoglobine intracellulaire à 10 et 20°C où une diminution de l'affinité se produit (effet Bohr inverse). Bien que la différence soit plus petite, il semble qu'il y ait aussi une diminution de l'affinité à 30 et 40°C. Comme on le voit dans le tableau IV.2, entre pH 6 et 7,5, l'effet Bohr semble constant aux différentes températures considérées, variant de -0,94 à -1,00 pour l'hémoglobine vasculaire et de -0,89 à -1,00 pour l'hémoglobine coelomique. A 10°C, il ne semble pas y avoir d'effet Bohr entre pH 6,9 et 7,3 pour les deux hémoglobines et entre pH 7,3 et 7,9, l'hémoglobine coelomique présente un effet Bohr inverse.

L'affinité des deux hémoglobines décroît quand la température augmente. Les valeurs de ΔH entre 30 et 40°C sont similaires pour les deux hémoglobines, avec -74 et -80 kJ.mol⁻¹ pour l'hémoglobine vasculaire et coelomique, respectivement (pH 7,1-7,3). Entre 20 et 30°C, ΔH atteint -110 kJ mol⁻¹ pour l'hémoglobine vasculaire. L'effet Bohr inverse à pH supérieur à 7,5 pour l'hémoglobine coelomique à 20°C ne permet pas de calculer la chaleur intrinsèque à cause de l'effet Bohr et des contributions de chaleur de protonation.

L'hémoglobine vasculaire et coelomique diffèrent par leur valeurs de coopérativité. Pour les deux hémoglobines, la coopérativité semble maximale entre pH 6,5 et 7, diminuant à des valeurs proches de 1 entre pH 7,5 et 8. La coopérativité maximale est de 3 pour l'hémoglobine coelomique et 2,2 pour l'hémoglobine vasculaire.

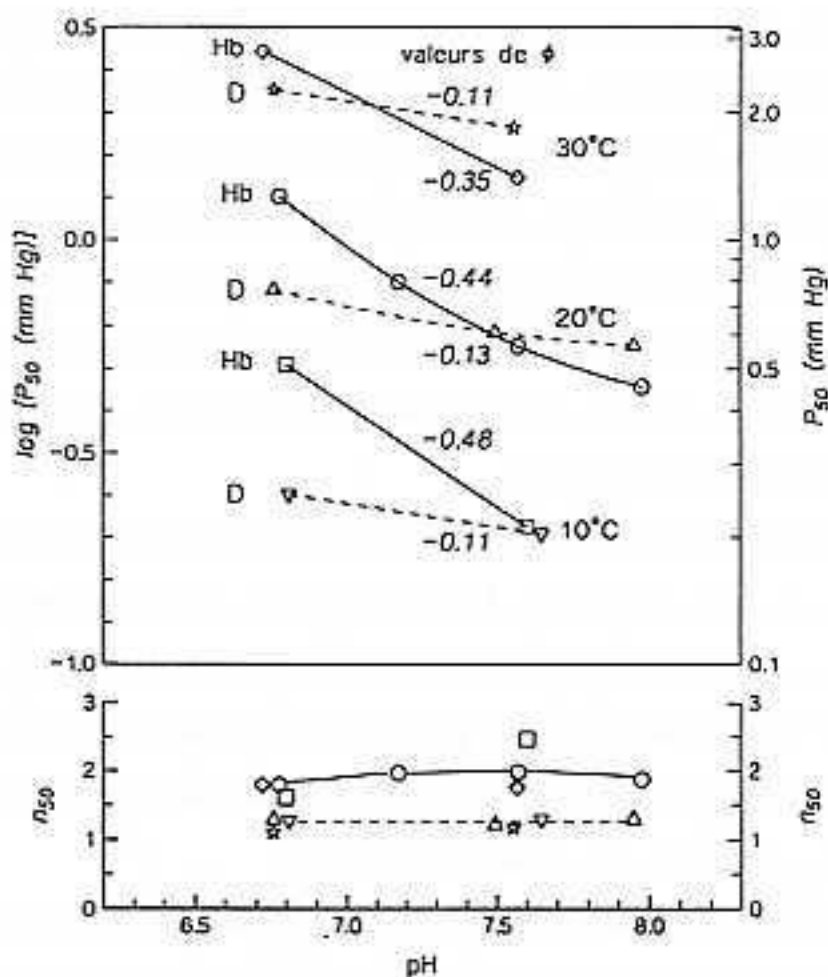


Figure IV.18 : Effets du pH et de la température sur l'affinité (P_{50}) et le coefficient de coopérativité (n_{50}) de l'hémoglobine intacte (Hb) de l'Orinidid et de ses dodécamères (D).

Tableau IV.2 : Résumé des équations utilisées pour adapter les courbes aux données des figures IV.16 et IV.17 ($\log P_{50}=f(\text{pH})$), équations dérivées pour le coefficient de Bohr () et une valeur de calculée pour la partie linéaire de la courbe. n est le nombre de points utilisés.

	Hémoglobine extracellulaire	Hémoglobine intracellulaire
10°C	$\log P_{50} = -0,12 \text{ pH} + 0,36$ $= -0,12$ $n = 2$	$\log P_{50} = 1,47 \text{ pH}^2 - 20,85 \text{ pH} + 73,05$ $= 2,94 \text{ pH} - 20,85$ $\text{pH}_{7,2} = -0,27$ $n = 3$
20°C	$\log P_{50} = 0,53 \text{ pH}^2 - 8,45 \text{ pH} + 33$ $= 1,06 \text{ pH} - 8,45$ $\text{pH}_{7,0} = -1,03$ $n = 5$	$\log P_{50} = 0,68 \text{ pH}^2 - 10,3 \text{ pH} + 38,6$ $= 1,36 \text{ pH} - 10,3$ $\text{pH}_{7,0} = -0,78$ $n = 5$
30°C	$\log P_{50} = 0,50 \text{ pH}^2 - 7,8 \text{ pH} + 30$ $= 1,00 \text{ pH} - 7,8$ $\text{pH}_{6,8} = -1,00$ $n = 5$	$\log P_{50} = 0,28 \text{ pH}^2 - 4,80 \text{ pH} + 20,1$ $= 0,56 \text{ pH} - 4,80$ $\text{pH}_{6,8} = -0,99$ $n = 5$
40°C	$\log P_{50} = 0,42 \text{ pH}^2 - 6,44 \text{ pH} + 73,05$ $= 0,84 \text{ pH} - 6,44$ $\text{pH}_{6,6} = -0,90$ $n = 5$	$\log P_{50} = 0,13 \text{ pH}^2 - 2,62 \text{ pH} + 12,39$ $= 0,26 \text{ pH} - 2,62$ $\text{pH}_{6,6} = -0,90$ $n = 5$

IV.1.7. Propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique.

La Figure IV.18 montre l'effet du pH sur l'affinité (P_{50}) et la coopérativité (n_{50}) de l'hémoglobine intacte (Hb) et de son produit de dissociation (D=dodécamère) à 10, 20 et 30°C. La molécule intacte et le dodécamère ont la même affinité pour l'oxygène à pH 7,6 pour 10°C ($P_{50} = 0,21$ Torr), à pH 7,4 pour 20°C ($P_{50} = 0,62$ Torr) et à pH 7,1 pour 30°C ($P_{50} = 2$ Torr). A des pH plus bas, les dodécamères montrent progressivement des affinités plus importantes que les molécules intactes. La situation est inverse à pH plus élevé.

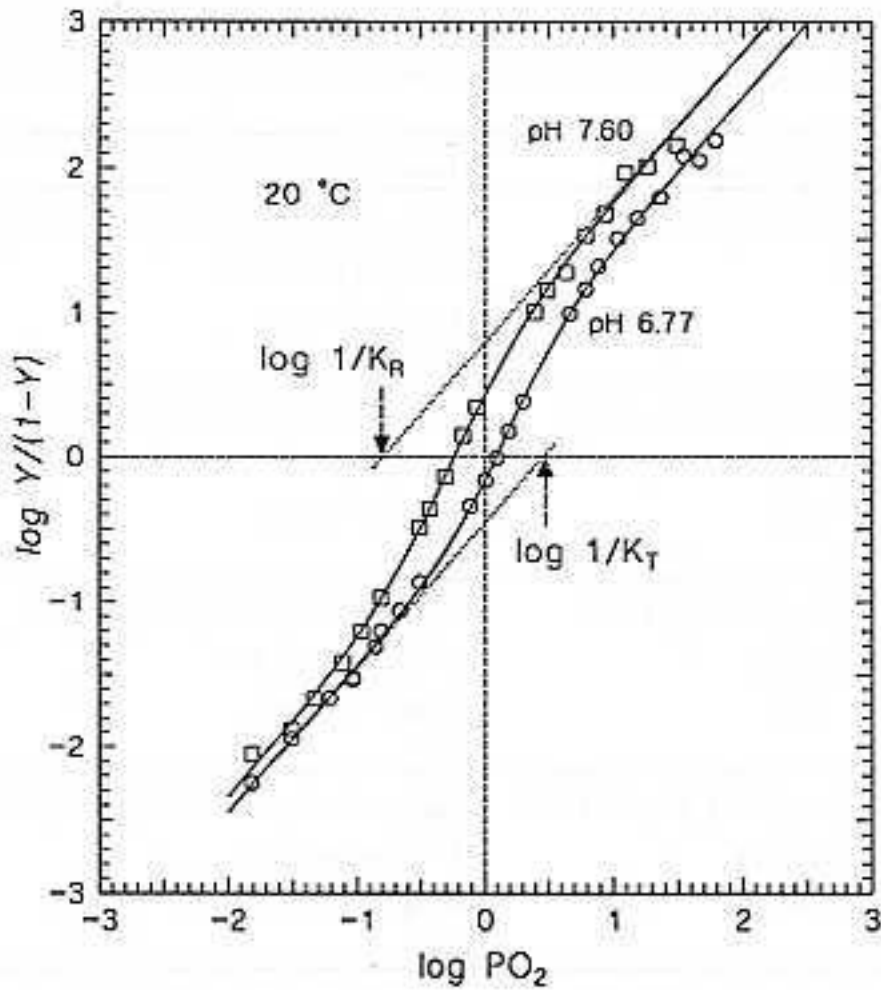


Figure IV.19 : Graphique de Hill étendu de l'hémoglobine intacte à 20°C et à deux valeurs de pH.

L'affinité des deux hémoglobines augmente avec le pH dans la gamme pH 6,7-7,5 (effet Bohr normal). Pour les molécules intactes, l'effet Bohr varie inversement avec la température ($\Delta = -0,48$ à 10°C, $-0,44$ à 20°C et $-0,35$ à 30°C) et est plus important que celui des dodécamères ($\Delta = -0,11$ à 10 et 30°C, et $-0,13$ à 20°C).

La molécule intacte et ses dodécamères diffèrent par leurs valeurs de coopérativité (Figure IV.18). Les molécules intactes ont un coefficient de coopérativité maximal à pH 7,5 et qui semble varier inversement avec la température ($n = 2,5$ à 10°C, $2,0$ à 20°C et $1,8$ à 30°C). La valeur de coopérativité de 1,2 est à peu près constante quel que soit le pH pour le dodécamère.

Les graphiques de Hill étendus pour l'hémoglobine intacte à pH 6,77 et 7,60 sont présentés dans la figure IV.19. Le paramètre d'allostérie ainsi que d'autres paramètres dérivés (comme décrits par Weber et al., 1995) à partir des équilibres basés sur le modèle d'allostérie à deux états de Monod-Wyman-Changeux (MWC) sont donnés dans le tableau IV.3. Les similarités entre les valeurs de coopérativité à demi saturation (n_{50}) et le maximum de coopérativité, ainsi qu'entre P_{50} et l'affinité pour l'oxygène médiane (P_m) reflètent la symétrie de la courbe de liaison de l'oxygène et permet l'utilisation de P_{50} dans l'analyse des interactions allostériques. Le mécanisme de contrôle de l'effet Bohr dans cette hémoglobine est principalement une augmentation de l'affinité pour la liaison de l'oxygène de l'hémoglobine dans son état oxygéné (K_R , pour "Relâché") quand le pH augmente, alors que l'affinité pour l'oxygène de la molécule désoxygénée (K_T , pour "Tendu") reste relativement constante (Tableau IV.3). Ceci augmente l'énergie libre de la coopérativité (ΔG) et le rapport K_T/K_R (qui augmente de 80% quand le pH passe de 6,77 à 7,60). Les analyses indiquent la présence de 3 à 5 sites de liaison de l'oxygène qui interagissent (coefficient Q dans le Tableau IV.3) dans la molécule d'hémoglobine intacte.

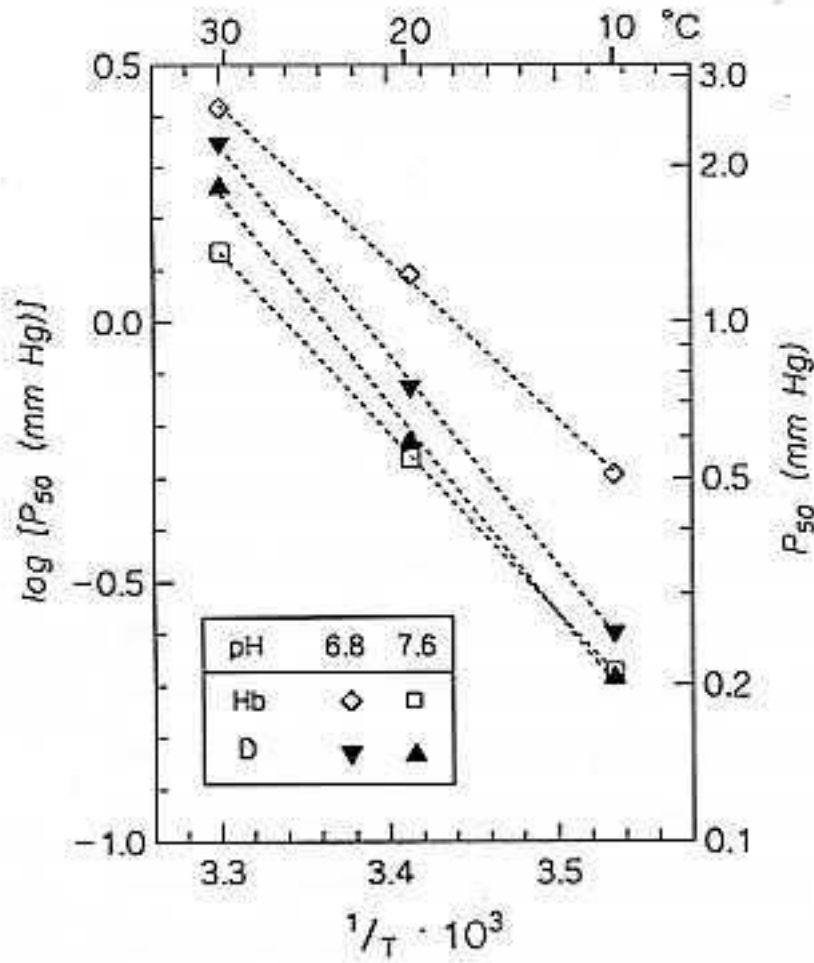


Figure IV.20 : Graphique d'Arrhenius pour l'hémoglobine intacte de l'Orbiniidé (Hb) et ses dodécamères (D) à deux valeurs de pH.

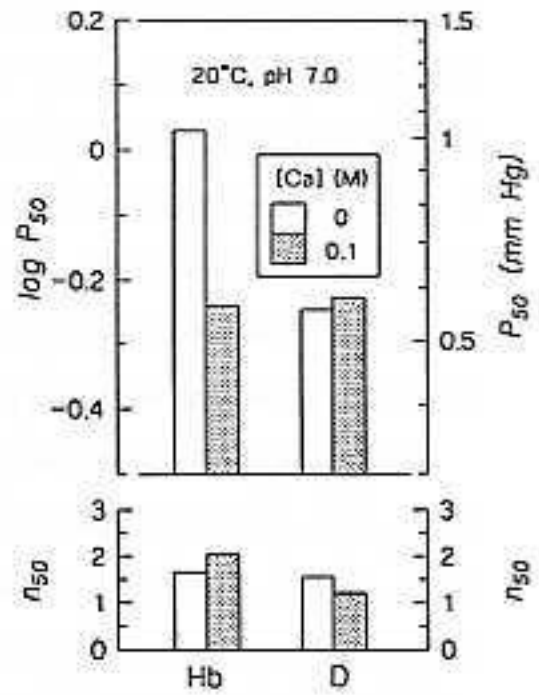


Figure IV.21 : Effets du calcium sur l'hémoglobine intacte de l'Orbiniidé (Hb) et ses dodécamères (D) à pH 7,0.

Tableau IV.3 : Paramètres du modèle à deux états de Monod-Wyman-Changeux et paramètres dérivés pour la molécule intacte d'hémoglobine d'Orbiniidés à pH 6,77 et 7,60. *L* est la constante allostérique. La signification des autres constantes est donnée dans le texte.

pH	P ₅₀	P _m	n ₅₀	n _{max}	K _T (e.s.)	K _R (e.s.)	L	Q	ΔG
6,77	1,23	1,17	1,86	1,88	0,348 ± 0,0152	3,682 ± 0,573	570	4,34	5,29
7,60	0,58	0,59	1,86	1,86	0,366 ± 0,0713	6,958 ± 1,041	87	3,19	6,42

Les affinités des deux hémoglobines dépendent fortement de la température (Figures IV.18 et IV.20) à pH 6,8 et 7,6. L'effet de la température est plus faible pour les molécules intactes que pour les dodécamères. Les valeurs de H sont -58 et -66 kJ mol⁻¹ pour les molécules intactes à pH 6,8 et 7,6, respectivement, et -77 kJ mol⁻¹ pour les dodécamères aux deux pH testés (Figure IV.20).

L'effet des ions calcium a été étudié à 20°C et pH 7,1. Le dodécamère est insensible au Ca²⁺ alors que l'affinité de la molécule entière augmente lorsque la concentration en Ca²⁺ passe de 11 mM à 100 mM ($\log P_{50}=0,28$) (Figure IV.21).

IV.1.8. Résistance à l'anoxie et aux sulfures.

La Figure IV.22 montre la survie des Orbiniidés en fonction du temps dans des conditions de normoxie, d'anoxie, d'anoxie plus 60μM de sulfures et d'anoxie plus 1 mM de sulfures. A la fin de l'expérience, aucun ver n'est mort en normoxie alors que pour toutes les autres conditions, tous les vers sauf un en anoxie sont morts. Dans toutes ces conditions, les courbes de mortalité ont une forme sigmoïde. A partir des courbes ajustées aux données, le TL₅₀ peut être calculé : 99,1 heures en anoxie +1 mmol l⁻¹ sulfures, 119,6 heures en anoxie +60 μmol l⁻¹ sulfures et 133,5 heures en anoxie sans sulfures. Après linéarisation des données, les différentes TL₅₀ ont été testées en réalisant une ANCOVA. Celle-ci a révélé un effet très significatif des

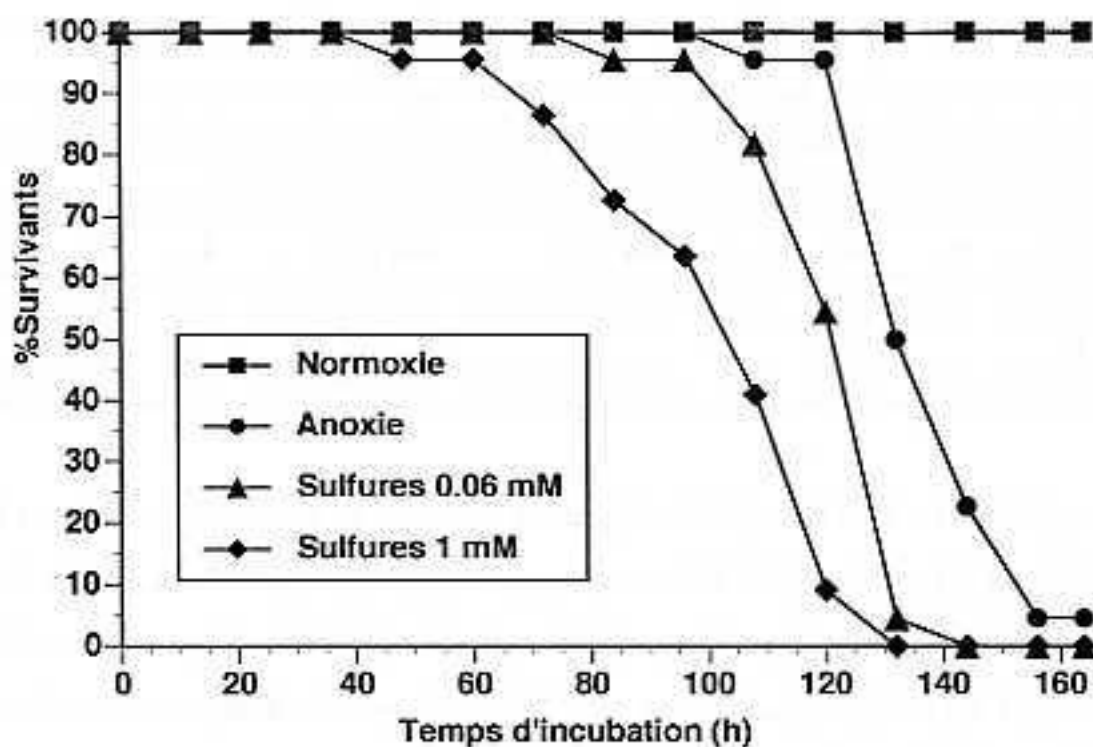


Figure IV.22 : Survie des Orbinidés en normoxie, anoxie, anoxie + $60 \mu\text{mol l}^{-1}$ de sulfures et anoxie + 1 mmol l^{-1} de sulfures en fonction du temps à 8°C . Pour chaque condition, le nombre de vers était de 22 et la survie a été vérifiée toutes les 12 heures.

différents traitements. En utilisant une correction de Bonferroni, nous avons pu comparer les traitements deux à deux et montrer que chaque traitement a un effet significatif comparé aux autres ($<0,05$).

IV.4. Discussion.

IV.4.1. Comportement des fluides corporels face aux variations de concentration en CO₂.

a) Liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida*.

Chez *Branchipolynoe symmytilida*, le pouvoir tampon du liquide coelomique est fort, permettant l'addition de 0,3 mEq de base par mM d'hème sans changement important du pH. Ce pouvoir tampon est réduit dans l'ultrafiltrat (=plasma) et toujours prononcé dans le liquide coelomique reconstitué pour lequel les grosses molécules ont été concentrées par ultrafiltration puis rediluées avec du sérum. Ceci suggère que le pouvoir tampon est principalement dû aux grosses molécules contenues dans le liquide coelomique, dont 98% sont des hémoglobines (voir Chapitre III). Le liquide coelomique est capable d'accumuler jusqu'à 12 mM de CO₂. Cette capacité est toujours présente dans l'ultrafiltrat mais est très réduite dans l'échantillon dialysé qui montre un plateau à 3-4 mM. Un tiers de la capacité capniphorique du sang implique donc les hémoglobines, probablement sous la forme de carbamino-Hb sur les groupements -NH₂ des protéines. L'extrémité N-terminale de HbC2 à elle seule représente environ 2 mM de -NH₂ libre. HbC1 ne participe vraisemblablement que très peu à la fixation du CO₂ car son extrémité NH₂-terminale est bloquée (voir Chapitre III), ce qui empêche la formation d'un groupement carbamino. Cependant, deux tiers de la capacité de fixation du CO₂ ne peuvent être attribués aux hémoglobines. Une situation similaire a été signalée pour *Riftia pachyptila* dont le liquide coelomique peut accumuler jusqu'à 30 mM de CO₂ et le sang jusqu'à 22 mM de CO₂, un dixième à un tiers seulement de ces quantités pouvant être attribué à la liaison par des protéines (Toulmond *et al.*, 1994). Chez *Riftia pachyptila*, cette propriété permet probablement au ver de stocker du CO₂ destiné aux bactéries symbiotiques qu'il abrite dans son trophosome. Cependant, aucune activité chimiosynthétique n'ayant été observée chez *Branchipolynoe*

(Fisher *et al.*, 1988), la fixation du CO₂ est donc probablement un moyen d'éviter les effets indésirables du CO₂ sur le pH. En effet, le pH reste constant quand la quantité de CO₂ augmente, et ce jusqu'à 1%. A partir de cette concentration, le niveau de CO₂ combiné atteint un plateau (Figure IV.11), après quoi le pH diminue car l'addition de CO₂ conduit à une augmentation du CO₂ libre. Dans le sang de *Arenicola marina*, la seule molécule capable de fixer du dioxyde de carbone de manière significative est l'hémoglobine, seule protéine présente. Il n'y a pas de petites molécules ayant ce rôle (Toulmond *et al.*, 1994).

b) Sang et liquide coelomique d'*Alvinella pompejana*.

Le liquide coelomique d'*Alvinella pompejana* possède un très faible pouvoir tampon vis à vis du CO₂ (le pH passe de 7,85 à 6,99 quand la quantité de CO₂ passe de 0 à 3%). Cette variation de pH est comparable à celle de l'eau de mer soumise aux mêmes variations de concentration en CO₂ et suggère l'absence de protéines et de molécules capables de fixer le CO₂ similaire à celles trouvées dans le liquide coelomique de *Branchipolynoe symmytilida* (voir ci-dessus) et de *Riftia pachyptila* (Toulmond *et al.*, 1994). Le sang d'*Alvinella pompejana* présente un pouvoir tampon plus fort (diminution de seulement 0,3 unités de pH entre 0 et 3% de CO₂), attribuable à la présence d'une forte concentration d'hémoglobine (Terwilliger et Terwilliger, 1984) qui peut fixer du CO₂ en le liant sur son extrémité N-terminale (carbaminohémoglobine). Le pH intracellulaire des coelomocytes, enfin, ne varie que très peu, la diminution n'étant pas significative entre 0 et 3% de CO₂. Il y a là certainement un mécanisme de contrôle du pH intracellulaire très efficace, faisant intervenir des systèmes enzymatiques et des transporteurs membranaires. Cette hypothèse pourrait être testée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques au cours d'expériences d'équilibration du liquide coelomique frais.

En définitive, l'hémoglobine extracellulaire peut être soumise à de variations de pH significatives alors que l'hémoglobine intracellulaire (coelomique) n'est exposée qu'à des variations de pH très limitées.

IV.1.2. Propriétés fonctionnelles des hémoglobines.

Toutes les hémoglobines des espèces étudiées présentent de très fortes affinités pour l'oxygène dans les conditions de mesure. Les P_{50} obtenues sont parmi les plus petites connues à ce jour pour des hémoglobines d'annélides (Weber, 1978b; Toulmond, 1992). Ceci peut être interprété comme une adaptation à un environnement pauvre en oxygène comme cela a été suggéré auparavant (Toulmond *et al.*, 1989; Toulmond *et al.*, 1990; Weber, 1980). En effet, avec la présence de branchies très développées, cette propriété permet probablement de mieux extraire l'oxygène de l'environnement hypoxique.

a) *Branchipolynoe symmytilida*

HbC1 et HbC2 possèdent de très fortes affinités pour l'oxygène, non seulement pour un annélide mais aussi comparées aux hémoglobines multidomaines de mollusques ($P_{50}=1,5-5,4$ Torr). Ces affinités sont par contre beaucoup plus faibles que celle de l'hémoglobine multidomaine du Nématode *Ascaris lumbricoides* ($P_{50}<0,004$ Torr) (Toulmond, 1992). La coopérativité dans la liaison de l'oxygène par les hémoglobines coelomiques de *Branchipolynoe symmytilida* sont comparables à celles obtenues pour les hémoglobines intracellulaires d'annélides et correspondent aux plus faibles valeurs connues pour des hémoglobines extracellulaires d'annélides (Weber, 1978b). HbC1 et HbC2 ont une structure oligomérique et multidomaine, étant respectivement un trimère et un dimère d'hémoglobine tétradomaine (voir Chapitre III). Les hémoglobines de mollusques, qui sont aussi multimériques et multidomaines, montrent de la même façon très peu de coopérativité dans la liaison de l'oxygène par rapport au nombre de sites de fixation (Terwilliger *et al.*, 1977; Terwilliger et Terwilliger, 1978). Dans l'hémoglobine didomaine multimérique du Branchiopode Notostracé *Lepidurus bilobatus*, le coefficient de coopérativité atteint 2,6 à fort pH dans la molécule entière et 3,3 lorsque les domaines sont étudiés séparément (Dangott et Terwilliger, 1979). Dans l'hémoglobine du

mollusque *Helisoma trivolvis*, la coopérativité est la plus élevée à haut pH (>8) et disparaît quand les domaines sont séparés par coupure par la subtilisine, même à haut pH (Terwilliger *et al.*, 1977).

La présence d'hémoglobine et de branchies (voir Chapitre II) est un caractère particulier de *Branchipolynoe* comparé aux espèces littorales de la même famille. Ces hémoglobines à forte affinité pour l'oxygène associées à la présence de branchies devraient favoriser l'extraction de l'oxygène dans l'environnement hypoxique entourant les moules hôtes de *Branchipolynoe*. De plus, la combinaison d'une forte affinité et d'une faible coopérativité rappellent la fonction d'une myoglobine. Il est donc possible que HbC1 et HbC2 jouent un plus grand rôle dans le stockage de l'oxygène que dans son transport (voir § IV.4.5., plus loin dans cette discussion).

En accord avec la nature exothermique de la réaction d'oxygénation des hémoglobines, une augmentation de la température diminue l'affinité pour l'oxygène de HbC1 et HbC2. Les effets de la température sont plus importants à fort pH, où l'effet Bohr est réduit, et diminuent à des pH plus faibles quand la liaison du proton de Bohr se produit (réaction endothermique) (Weber *et al.*, 1985). Une relation générale inverse semble établie entre la valeur de P_{50} et la gamme de températures auxquelles un pigment respiratoire donné fonctionne *in vivo* (Toulmond, 1985). Les valeurs élevées de P_{50} observées ici suggèrent que *Branchipolynoe* subit des variations de température limitées.

Les valeurs d'effet Bohr normal trouvées pour les hémoglobines HbC1 et HbC2 sont dans la gamme rencontrée pour les autres hémoglobines extracellulaires d'annélides (Weber, 1978b; Toulmond, 1992). Cet effet Bohr permet probablement aux hémoglobines de relarguer de l'oxygène au niveau des tissus quand le pH diminue du fait de la production locale de CO₂ par la respiration cellulaire, une fois dépassée la capacité tampon du liquide coelomique. Ce relargage d'oxygène pourrait être amplifié par le petit effet spécifique du CO₂ sur l'affinité de HbC2 pour l'oxygène. Les données sur le pouvoir tampon du liquide coelomique et sur l'effet Bohr indiquent que la diminution de pH associée à l'augmentation de CO₂ augmenterait la P₅₀ de 2,2 Torr à 0% de CO₂ (pH 7,0) à 3 Torr à 3% de CO₂ (pH 6.5). Si à cela on ajoute l'effet

spécifique du CO₂ sur l'affinité de HbC2, la P₅₀ atteindrait 3,4 Torr. Un effet similaire a été observé chez *Arenicola marina* (Krogh-Rasmussen et Weber, 1979), *Neoamphitrite figulus* (Wells et Warren, 1982), *Megascolides australis* (Weber et Baldwin, 1985) et *Artemia* (Davis et Riggs, 1986). L'effet inverse a été observé dans l'hémoglobine extracellulaire de *Tubifex* (Weber, 1980). Le manque d'effet du CO₂ sur l'affinité de HbC1 pourrait être attribué au fait que l'acide aminé en N-terminal de cette hémoglobine est bloqué (voir Chapitre III), empêchant la formation de carbaminohémoglobine.

b) *Alvinella pompejana*

L'hémoglobine vasculaire et l'hémoglobine coelomique d'*Alvinella pompejana* ont une structure très différente : l'hémoglobine vasculaire est extracellulaire bicouche hexagonale, d'un poids moléculaire d'environ $3,8 \cdot 10^6$ Da et comporte des linkers et des chaînes de globine (Zal *et al.*, 1997) alors que l'hémoglobine coelomique est monomérique et formée d'un seul type de chaîne de globine (voir Chapitre III). La chaîne de globine constituant l'hémoglobine coelomique n'est pas retrouvée dans l'hémoglobine vasculaire. Etant donné ces importantes différences structurales, nous nous attendions à observer d'importantes différences de propriétés fonctionnelles (affinité, coopérativité) nous permettant de déterminer sans ambiguïté la direction du transfert de l'oxygène entre les compartiments vasculaire et coelomique. Mais nos résultats montrent que les deux hémoglobines présentent des propriétés étonnamment similaires : une forte affinité pour l'oxygène et une coopérativité significative de la liaison de l'oxygène.

Les résultats obtenus pour l'hémoglobine extracellulaire sont en accord avec ceux publiés par Toulmond *et al* (1990). Par exemple, à 20°C et pH 7,25, Toulmond *et al.* signalaient une P₅₀ de 0,3 Torr, comparée à 0,4 Torr dans cette étude. La petite différence pourrait être due à la technique utilisée (Hemox contre chambre à diffusion) ou à l'utilisation d'un tampon différent. Par contre, d'après nos résultats, la température ne semble pas affecter la valeur du coefficient

de Bohr (proche de -1, voir Tableau IV.2) comme l'avaient signalé Toulmond *et al.* (de -1,18 à 20°C à -0,56 à 40°C) (Toulmond *et al.*, 1990).

Les deux hémoglobines montrent un très fort effet Bohr (environ -1) en plus de leur forte affinité. Un fort effet Bohr n'est pas inhabituel pour les hémoglobines extracellulaires d'annélides, qui peuvent avoir un coefficient atteignant -1,5 (Weber, 1978b). La présence d'un effet Bohr dans une hémoglobine monomérique est cependant très inhabituel, et les hémoglobines intracellulaires qui ont un effet Bohr (qui est alors modéré) sont habituellement oligomériques (cf Weber, 1978b) ou montrent une agrégation qui dépend de l'oxygénation.

La forte coopérativité de la liaison de l'oxygène par l'hémoglobine coelomique est aussi surprenante car les myoglobines et les hémoglobines monomériques n'ont généralement pas d'interaction hème-hème et les interactions homotropiques sous-jacentes à la coopérativité dans les hémoglobines tétramériques des mammifères sont associées à des transitions quaternaires (rotation de 12-15° d'un des dimères par rapport à l'autre) (Perutz, 1990). La coopérativité exprimée dans des hémoglobines qui sont monomériques quand elles sont oxygénées est généralement attribuée à la formation d'agrégats de faible affinité lorsqu'elles sont désoxygénées, comme cela avait originellement été observé pour l'hémoglobine de lamproie (Briehl, 1963). L'association dépendante de la désoxygénation a été signalée pour des hémoglobines intracellulaires d'invertébrés : hémoglobine érythrocytaire des holothuries *Cucumaria miniata* et *Caudina (Molpadia) arenicola*, hémoglobine des cellules trachéales de l'insecte *Anisops* et de la larve de *Gastrophilus*, hémoglobine érythrocytaire du polychète *Glycera dibranchiata* et du bivalve *Anadara broughtonii* (Wells *et al.*, 1981; Bonaventura et Kitto, 1973; Furata *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1984). La forte coopérativité exprimée dans l'hémoglobine coelomique d'*Alvinella pompejana* (n atteignant 3) nécessite un état d'agrégation impliquant au moins 3 ou 4 monomères. Bien que les résultats de FPLC ne semblent pas montrer d'agrégation de l'hémoglobine d'*A. pompejana*, nous ne pouvons pas suggérer d'autre explication. Il est possible que la très forte affinité de l'hémoglobine ne permette pas d'observer

les états d'agrégation avec une tension en oxygène comme celle de l'air avec lequel tous les tampons étaient en équilibre. Il serait possible de tester ce comportement en effectuant des purifications en conditions anoxiques ou bien en effectuant des expériences de cross-linking par un agent tel que le glutaraldéhyde en conditions anoxiques.

De la même façon, la présence d'un effet Bohr important était inattendue car les globines monomériques ont pour caractéristique de ne pas présenter d'interaction entre les groupements héminiques et les sites de liaison des protons et autres effecteurs. Malgré l'absence de transitions quaternaires dans les hémoglobines monomériques, des données récentes (revues par Weber et Vinogradov, sous presse) indiquent des effets Bohr basés sur des transitions T-R liées à la protonation dans quelques hémoglobines monomériques. Ceci est en accord avec les effets Bohr prononcés trouvés dans les hémoglobines III et IV de *Chironomus* ($\Delta\epsilon = -0,30$ et $-0,37$) (Weber et Baldwin, 1985) et le fort effet Bohr inverse ($\Delta\epsilon = +0,8$) trouvé à faible pH dans l'hémoglobine du plathelminthe parasite du foie de mouton, *Dicrocoelium dendriticum* (Smit *et al.*, 1986) attribués à des dissociations et associations liées à des changements de conformation. Le mécanisme sous-jacent à la sensibilité au pH de l'hémoglobine monomérique d'*Alvinella pompejana* n'est pour le moment pas connu.

Bien que les valeurs de coopérativité trouvées ici pour l'hémoglobine extracellulaire d'*Alvinella pompejana* soient plus faibles que celles publiées par Toulmond *et al.* (1990) -ce qui pourrait être dû aux différences de conditions expérimentales ou au protocole- nos données confirment la présence de valeurs maximales de n dans la gamme de pH physiologique de 6,6-7,2.

Les deux hémoglobines présentent un fort effet de la température (valeurs de ΔH plus fortes que -75 kJ mol^{-1}). Cet effet décroît à faible pH à cause de la contribution de l'effet Bohr (chaleur de déplacement des protons), qui est une réaction endothermique. Les valeurs sont les plus fortes à haut pH pour l'hémoglobine extracellulaire mais diminuent à pH supérieur à 7,4 pour l'hémoglobine intracellulaire à cause de la contribution de l'effet Bohr inverse.

La perte apparente de capacité de fixation de l'oxygène à 10°C dans les deux hémoglobines était aussi inattendu. La technique utilisée par Toulmond *et al.* (1990) ne leur a pas permis de détecter ce phénomène. A notre connaissance, ceci est la première fois qu'un effet Root (diminution de la capacité de transport quand le pH diminue) est mis en évidence dans l'hémoglobine d'un annélide. Chez les poissons, l'effet Root observé pour les hémoglobines anodiques permet la sécrétion d'oxygène dans la vessie gazeuse (qui régule la flottabilité) et au niveau de la rétine, où des fortes tensions en oxygène sont corrélées avec de forts taux métaboliques (Pelster et Weber, 1991). L'effet Root observé dans l'hémoglobine coelomique d'*Alvinella pompejana* limite la capacité oxyphorique des fluides corporels à faible température. Cependant, dans ces conditions, la part de fluide hydrothermal dans l'eau est limitée et la concentration en oxygène est donc élevée, ce qui pourrait compenser la diminution de capacité de liaison de l'oxygène par l'hémoglobine.

c) Orbiniidé du Golfe du Mexique

Les deux hémoglobines (molécules intactes et dodécamères obtenus par dissociation) ont de très fortes affinités pour l'oxygène mais diffèrent pour leurs autres propriétés fonctionnelles (coopérativité, effet Bohr, sensibilité aux ions Ca^{2+} , effet de la température). L'effet Bohr dans les molécules intactes est très comparable à celui de la plupart des hémoglobines extracellulaires (Weber, 1978b) et est beaucoup plus faible dans les dodécamères. Ce phénomène a aussi été signalé pour l'hémoglobine d'autres annélides (Lamy *et al.*, 1996).

L'augmentation de K_R avec le pH comme mécanisme de l'effet Bohr observé ici (Figure IV.19) est aussi rencontré chez *Arenicola marina* où il accroît le coefficient de Bohr à haute saturation en oxygène et favorise la saturation du sang en oxygène dans les branchies, le pH ayant augmenté après élimination du CO_2 (Weber, 1981). Pour l'hémoglobine humaine, par contre, le mécanisme de l'effet Bohr est dû à une variation de K_T (Tyuma *et al.*, 1973).

Bien que la concentration en ions Ca^{2+} soit très constante dans le sang des Vestimentifères et des annélides (7-13 mM), celle en ions Mg^{2+} varie de 2 à 44 mM (Oglesby, 1978; Sanders et Childress, 1991). Ce dernier cation peut donc affecter les propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine d'Orbiniidés dans le sang. L'affinité de l'hémoglobine intacte est affectée par la concentration en ions Ca^{2+} alors que celle des dodécamères ne l'est pas, suggérant que l'effet des cations du groupe IIA comme le calcium implique les linkers, modifiant la forme de la molécule ou les interactions à l'intérieur de l'édifice moléculaire. Ces observations sont en accord avec d'autres études sur différentes hémoglobines extracellulaires d'annélides, à l'exception de celle de *Lumbricus terrestris*, dont les dodécamères sont eux aussi sensibles au calcium (Lamy *et al.*, 1996).

Le coefficient de coopérativité de la molécule intacte et celui des dodécamères (2,5 et 1,2, respectivement) sont dans la gamme normale des valeurs publiées pour les hémoglobines d'annélides (Weber, 1978b, Lamy *et al.*, 1996). Les dodécamères ont une coopérativité inférieure à celle des molécules intactes, une situation similaire est rencontrée chez *Lumbricus terrestris* ($n = 5$ et 2 à pH 7,2; Krebs *et al.*, 1996). La différence entre les dodécamères et les molécules intactes suggère une participation des chaînes de structure dans les interactions hétérotropiques comme cela a été montré dans d'autres hémoglobines extracellulaires d'annélides (Lamy *et al.*, 1996). La coopérativité est maximale à pH 7,5 pour la molécule intacte, ce qui suggère qu'il s'agit là du pH physiologique dans le sang de l'Orbiniidés, tout comme les valeurs de pH auxquelles la coopérativité est maximale pour l'hémoglobine vasculaire d'*Alvinella pompejana* correspondent aux valeurs de pH mesurées dans le sang.

Etant donné que la dissociation des protons est endothermique et réduit la chaleur nette libérée lors de l'oxygénation des hèmes, l'effet plus limité de la température dans l'hémoglobine de haut poids moléculaire (comparé aux dodécamères) concorde avec le plus fort effet Bohr dans cette molécule. De la même façon, la valeur de H^{obs} des molécules intactes est plus faible à pH 6,8 qu'à pH 7,6 où l'effet Bohr est plus petit.

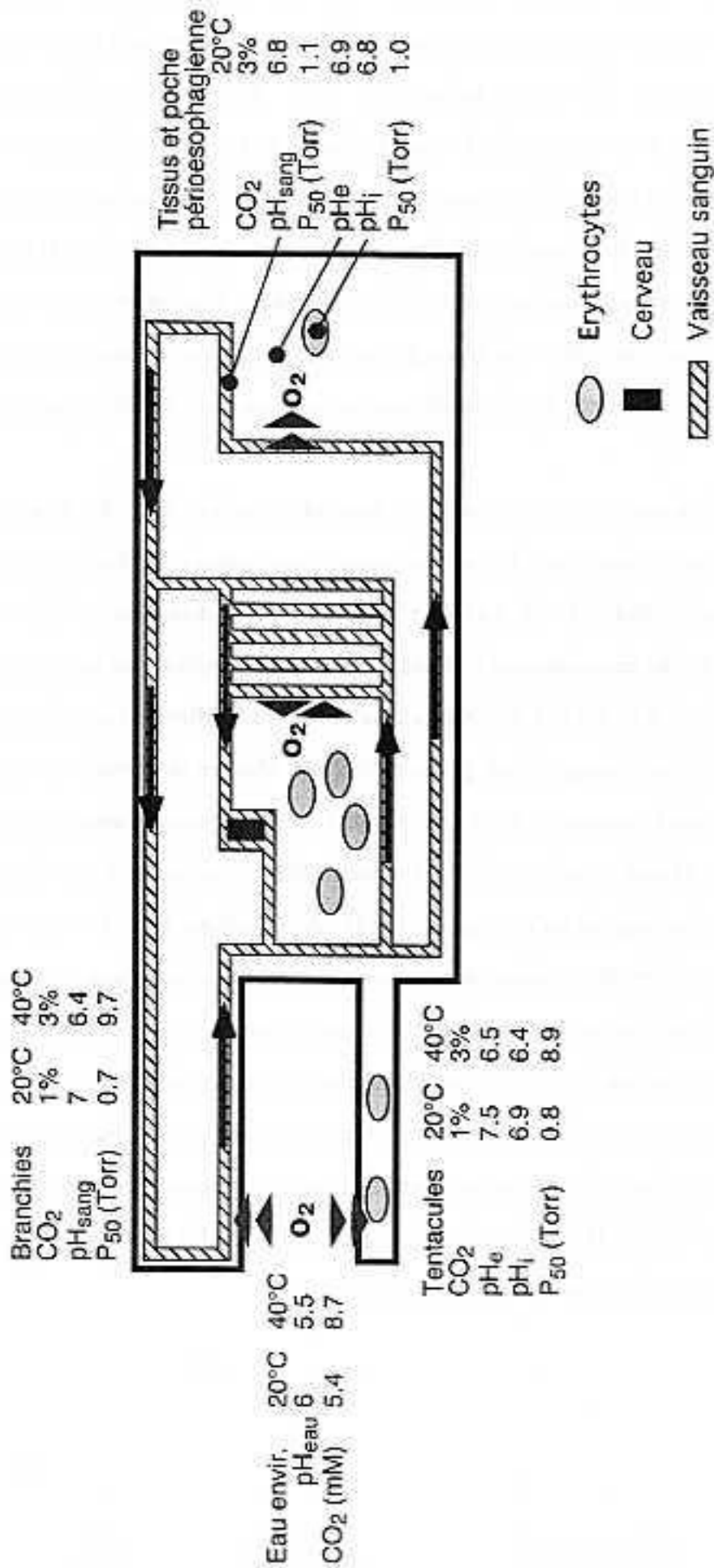


Figure IV.23 : Modèle physiologique d'Aplysia pompejana (voir détails dans le texte). Le dessin anatomique correspondant est donné en figure II.14, page 50.

En définitive, l'hémoglobine de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique présente les caractéristiques qui la rendent adéquate pour un transport efficace de l'oxygène : forte affinité pour une extraction efficace de l'oxygène au niveau branchial, lié à une coopérativité significative et un effet Bohr normal permettant le relargage de l'oxygène au niveau des organes.

IV.1.3. Système de transfert de gaz d'*Alvinella pompejana*.

A l'inverse des systèmes de transfert gazeux étudiés chez les Terebellidés dans lesquels les hémoglobines vasculaire et coelomique ont des propriétés fonctionnelles très différentes (Mangum *et al.*, 1975; Terwilliger, 1974; Wells et Dales, 1975; Wells et Warren, 1982), les deux hémoglobines d'*Alvinella pompejana* ont des propriétés très similaires dans les mêmes conditions de température et de pH : forte affinité et fort effet Bohr. Dans ces conditions, pour établir le sens du transfert d'oxygène entre les compartiments coelomique et vasculaire, il nous fallait estimer les valeurs du pH de l'environnement de chacune des hémoglobines *in vivo*.

Il est aussi important de rappeler la complexité et la spécificité du micro-environnement d'*Alvinella pompejana*. Le fluide hydrothermal qui sort des cheminées est acide, anoxique et très riche en CO₂. Bien que les valeurs puissent varier d'une source à l'autre, les valeurs typiques sont de : pH 3,5-4,0, CO₂ 50-55 mM pour des températures proches de 270°C (Sarradin *et al.*, 1998). Autour des tubes d'*Alvinella pompejana*, ce fluide est partiellement dilué par de l'eau de mer du fond (1.5°C, pH 7,8, O₂ 0,3 mM, CO₂ 2,3 mM). L'environnement est donc extrêmement variable mais des échantillonnages et mesures *in situ* récents (Sarradin *et al.*, 1998) indiquent les gammes de valeurs qui sont indiquées dans la figure IV.23. Pour la gamme de température de nos mesures (20-40°C), les concentrations en CO₂ peuvent varier de 5,4 à 8,7 mM. Sur cette base, des concentrations de 1 et 3% de CO₂ ont été choisies pour les expériences d'équilibration, pour simuler les conditions auxquelles les tentacules et les branchies sont exposés à 20 et 40°C (Figure IV.23).

Les valeurs de pH utilisées dans la figure IV.23 ont été extrapolées à partir des données de la figure IV.13 en utilisant $pH/^{\circ}C = -0.02$ pour corriger les effets de la température sur le pH. A 20°C et 1% de CO₂, la P₅₀ interpolée pour l'hémoglobine coelomique est de 0,8 Torr, et 0,7 Torr pour l'hémoglobine vasculaire. Au niveau des branchies, l'importante surface, la distance de diffusion réduite (Jouin et Gaill, 1990), ainsi que la forte affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène vont en faciliter l'extraction, même quand la concentration environnementale est faible. Le sang circule ensuite par le vaisseau ventral dans le reste du corps (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Desbruyères *et al.*, 1998). Les organes produisent du CO₂, diminuant localement le pH. Le fort effet Bohr, compensant la très forte affinité, devrait permettre le relargage d'oxygène pour remplir les besoins des organes pour la respiration cellulaire. A ce niveau, les P₅₀ des hémoglobines vasculaire et coelomique, interpolées à 20°C et 3% de CO₂, sont très proches, avec des valeurs de 1,1 et 1,0 Torr, respectivement. Selon ces estimations, la direction de transfert d'oxygène dépendrait en premier lieu du gradient de pression partielle entre les compartiments coelomique et vasculaire, tout particulièrement au niveau du réseau de capillaires où on trouve de nombreux érythrocytes (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996). Si la "réserve veineuse" (c'est à dire la quantité d'oxygène restant quand le sang revient des tissus) est importante, l'oxygène pourrait être transféré aux érythrocytes pour y être stocké. Cette réserve d'oxygène pourrait être utilisée par les gamètes en cours de maturation dans le coelome comme cela a été suggéré pour certains Terebellidés (Mangum *et al.*, 1975; Terwilliger, 1974; Wells et Dales, 1975; Wells et Warren, 1982). Si, au contraire, il reste très peu d'oxygène dans le sang, l'extraction d'oxygène pourrait se faire au niveau de la poche, dans la "réserve coelomique" pour amener de l'oxygène dans la région de la tête, incluant le cerveau.

Quand la température de l'environnement atteint 40°C, la concentration en CO₂ au niveau des branchies et des tentacules péribuccaux est élevée et il y a très peu d'oxygène dans le milieu. Les P₅₀ interpolées pour l'hémoglobine vasculaire et coelomique sont alors de 9,7 et 8,9 Torr, respectivement. L'affinité pour l'oxygène est probablement insuffisante pour extraire une quantité significative d'oxygène de l'environnement. La boucle vasculaire de la poche

péριοesophagienne pourrait alors agir comme un tampon limitant les effets d'un manque temporaire d'oxygène. Le sang est pompé à travers le vaisseau supra-oesophagien et traverse le réseau de capillaires contenu dans la poche. Là, les coelomocytes, qui ont accumulé de l'oxygène quand les conditions étaient meilleures, pourraient relarguer de l'oxygène au profit de l'hémoglobine vasculaire qui retourne ensuite vers le vaisseau ventral et la circulation périphérique.

Le système de transfert de l'oxygène décrit ici et dans des travaux précédents (Jouin et Gaill, 1990; Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Toulmond *et al.*, 1990) a certainement évolué en réponse à des contraintes respiratoires fortes. S'il fonctionne comme décrit ici, il permet probablement de retarder le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose. Bien que ceci puisse être testé en réalisant des expériences de respirométrie, les difficultés d'échantillonnage d'*Alvinella pompejana* en bonnes conditions physiologiques rendent de telles études virtuellement impossibles.

IV.1.4. Maintien de l'apport d'oxygène aux organes.

De telles expériences de respirométrie ont pu être réalisées sur les deux autres espèces étudiées. Les consommations d'oxygène de l'Orbiniidé du Golfe du Mexique et de *Branchipolynoe seepensis* se situent respectivement à la limite inférieure des valeurs mesurées chez les espèces littorales et abyssales étudiées à ce jour (Weber, 1978a; Childress et Mickel, 1985; Fisher *et al.*, 2000), si l'on se réfère uniquement aux individus adultes (voir figures IV.7 et IV.8). Ces deux espèces ont donc besoin de quantités d'oxygène comparables aux autres polychètes alors qu'ils vivent dans un milieu appauvri en oxygène.

Les Orbiniidés du Golfe du Mexique sont de très bons oxyrégulateurs, capables de compenser les faibles concentrations en oxygène de leur environnement jusqu'à des valeurs aussi basses que $0,5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (6% de saturation en oxygène dans l'air). A partir de cette

concentration, l'anaérobiose commence et elle est totale à $0,1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (environ 1,2% de saturation).

Les espèces dont la consommation d'oxygène a été étudiée ici possèdent une forte surface branchiale et, pour l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, une distance de diffusion réduite, impliquant des vaisseaux intra-épidermiques dans les branchies (voir Chapitre II). De plus, les Orbiniidés sont capables de beaucoup étendre leurs branchies quand ils sont dans une eau pauvre en oxygène (observation personnelle à la fin des expériences de respirométrie et de résistance à l'anoxie). La présence de cils à la surface des branchies permet aussi de renouveler la couche de diffusion limite (couche appauvrie en oxygène par l'extraction). Cependant, aucune des espèces ne peut réguler la ventilation et il n'y a aucune donnée qui indique une augmentation des battements ciliaires dans un environnement pauvre en oxygène. Pour *Branchipolynoe*, il est probable que la moule n'augmente pas la circulation d'eau dans la cavité palléale. En effet, les mesures de respirométrie effectuées sur une espèce proche du Golfe du Mexique ont montré qu'elle ne pouvait pas oxyréguler (Kochevar *et al.*, 1992). Il est aussi très difficile de mesurer un débit circulatoire chez les annélides : pour l'Orbiniidé, le vaisseau dorsal dans son ensemble se contracte de l'arrière vers l'avant de l'animal (observation personnelle sur des petits individus) et il n'y a pas de paramètre facile à mesurer comme un rythme cardiaque. Dans le cas de *Branchipolynoe*, les branchies sont coelomiques et non pas vasculaires. La circulation y est assurée par des battements de cils de la paroi coelomique (et probablement des contractions des branchies par les muscles) et il est très difficile de mesurer la circulation coelomique.

L'hémoglobine de *Branchipolynoe* fonctionne plutôt comme une myoglobine : sa forte affinité et faible coopérativité lui confèrent un rôle de stockage de l'oxygène plutôt que de transport. Un tel rôle pourrait permettre à *Branchipolynoe* de maintenir un métabolisme aérobie malgré la disparition progressive de l'oxygène de l'eau de mer confinée dans la cavité palléale quand l'hôte ferme les valves de sa coquille. Des études du comportement des moules seraient

nécessaires pour savoir combien de temps elles peuvent rester fermées et donc combien de temps le ver serait isolé du milieu environnant. D'après les mesures de consommation d'oxygène, la quantité d'hémoglobine représente une réserve d'oxygène de près de 2 heures avant que le métabolisme ne doive passer à l'anaérobiose. Cette valeur est plus élevée que celle obtenue pour l'Orbiniidé (31 minutes) et que celles publiées à ce jour pour *Arenicola marina* (Toulmond, 1973) ou d'autres annélides (Weber, 1978a, b).

La variation du contenu en hémoglobine en fonction du poids donne une courbe similaire pour *Branchipolynoe seepensis* et l'Orbiniidé du Golfe du Mexique, avec un plateau pour les animaux au dessus d'une certaine taille. Cependant, la tendance pour les animaux de petite taille est différente : les petits *Branchipolynoe seepensis* ont un contenu plus élevé que les adultes alors que pour l'Orbiniidé, c'est la situation inverse. Ceci peut s'expliquer si le rôle de l'hémoglobine dans *Branchipolynoe seepensis* est en effet celui de réserve : les petits individus ont un métabolisme plus élevé et nécessitent donc une réserve proportionnellement plus importante que les grands individus. Pour les Orbiniidés par contre, le rôle est celui de transport, moins nécessaire chez les petits animaux pour lesquels la diffusion à travers les tissus du corps est plus facile.

Les hémoglobines des deux espèces possèdent de très fortes affinités pour l'oxygène dans les conditions physiologiques (voir Chapitre III). Pour l'Orbiniidé, par exemple, même à une pression partielle en oxygène aussi basse que 0,75 Torr à 10°C, l'hémoglobine est saturée à 96%. Cependant, le taux de consommation d'oxygène diminue quand la pression partielle en oxygène atteint environ 10 Torr. Ceci suggère que cette chute n'est pas due à l'incapacité de l'hémoglobine à lier l'oxygène mais plutôt à un coût énergétique trop élevé pour maintenir des débits circulatoires capables d'amener assez d'oxygène aux organes. La pression critique à laquelle le taux de consommation d'oxygène chute est indicative d'un très bon oxyrégulateur, comparable au vestimentifère *Riftia pachyptila*, un peu meilleur que le crabe *Bythograea thermidron* et le bivalve *Calymptogena magnifica*, tous provenant des sources hydrothermales (Childress et Fisher, 1992). A titre de comparaison la moule trouvée avec l'Orbiniidé dans le

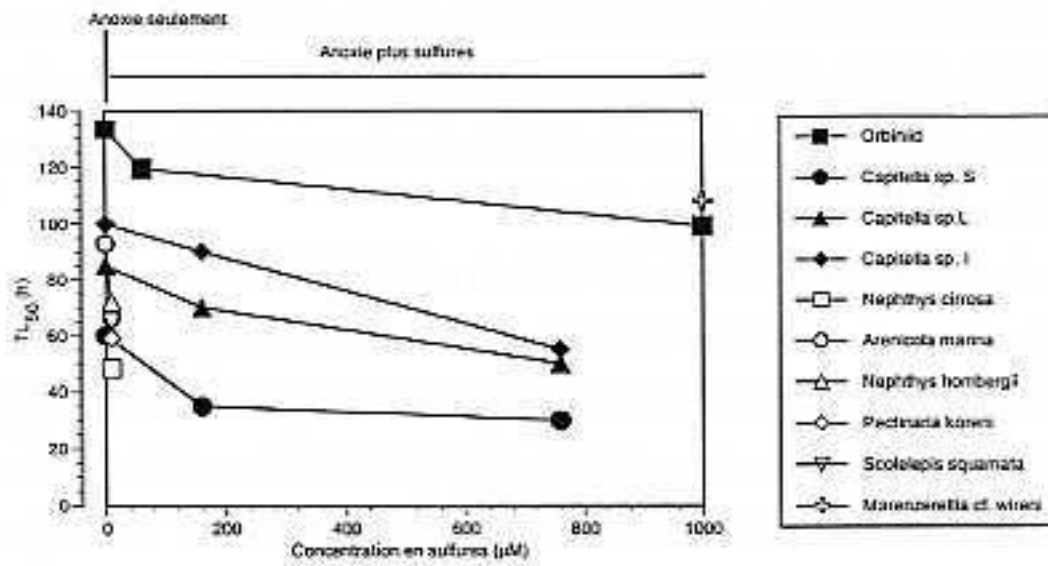


Figure IV.24 : Comparaison des capacités de résistance à l'anoxie et aux sulfures pour différentes espèces de polychètes. Données de Gamenick *et al.*, 1998; Groenendaal, 1980, 1981; Schiedek *et al.*, 1997, Schiedek, 1998; Vismann, 1990.

Golfe du Mexique, *Bathymodiolus childressi*, n'a pas de pigment respiratoire et n'est pas capable de réguler son extraction d'oxygène (Kochevar *et al.*, 1992).

IV.1.5. Résistance à l'anoxie et aux sulfures

Bien que la forte surface branchiale spécifique favorise l'extraction de l'oxygène, ceci n'est pas sélectif et les sulfures, trouvés à de fortes concentrations dans le milieu (Nix *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000), peuvent aussi traverser les surfaces respiratoires (Somero *et al.*, 1989). Les sulfures peuvent compromettre la respiration chez la plupart des animaux en inhibant la respiration mitochondriale au niveau de la cytochrome *c* oxidase et la fixation de l'oxygène dans la plupart des hémoglobines (revue par Somero *et al.*, 1989). La tolérance aux sulfures est très haute chez les Orbiniidés, plus haute que chez toutes les autres espèces de polychètes étudiées à ce jour (Figure IV.24). Ceci permet probablement aux vers de rechercher de la nourriture à l'interface entre le milieu réduit et oxygéné, riche en nourriture. Si le ver est exposé à une anoxie prolongée, la réserve d'oxygène ne lui permet de maintenir un métabolisme aérobie que pendant 13 minutes. Le ver passe alors à l'anaérobiose et peut survivre plus de 5 jours et demi en absence de sulfures et plus de 4 jours en présence de 1mM de sulfures. Comme les sulfures peuvent entrer massivement dans le corps de l'animal, des mécanismes de détoxification sont nécessaires. L'ultrastructure des branchies a révélé des granules denses aux électrons, correspondant peut-être à des organelles où les sulfures sont oxydés pour être détoxiqués (voir Chapitre II). Il a été montré que *Arenicola marina* et *Solemya reidi* (clam symbiotique avec des bactéries sulfoxydantes) sont exposés à de fortes concentrations en sulfures et contiennent des mitochondries qui sont capables d'oxyder les sulfures en thiosulfate et d'en tirer de l'énergie (Grieshaber et Völkel, 1998; Powell et Somero, 1985; Powell et Somero, 1986a, b). Chez les Alvinellidés et *Branchiopolyne*, vivant au niveau des sources hydrothermales, de nombreuses mitochondries et granules denses aux électrons ont été observés dans les organes exposés en

premier aux sulfures : les branchies et les vaisseaux efférents près des branchies (Jouin *et al.*, 1990; Jouin-Toulmond *et al.*, 1996; Chapitre II).

Chapitre 5 **Conclusion**



Diversité des Adaptations Respiratoires

<i>Chapitre 1</i>	Introduction
<i>Chapitre 2</i>	Anatomie
<i>Chapitre 3</i>	Biochimie
<i>Chapitre 4</i>	Physiologie
<i>Chapitre 5</i>	Conclusion

Dans ce travail, le premier chapitre a présenté les milieux de vie des 3 espèces étudiées avec leurs caractéristiques et les problèmes posés en termes de physiologie respiratoire. Un modèle des transferts gazeux dans un organisme théorique a permis de souligner les niveaux à étudier pouvant permettre de mettre en évidence les adaptations des organismes à leur milieu et à leur mode de vie.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux adaptations d'ordre anatomique (Chapitre II). Les grandes tendances qui se dégagent de l'étude des espèces-modèles sont la présence de branchies très développées offrant une grande surface d'échanges gazeux et des distances de diffusion réduites, permettant une diffusion rapide des gaz. Chez toutes les espèces étudiées, nous avons aussi observé de nombreuses inclusions intracellulaires denses aux électrons en microscopie électronique à transmission. Ces inclusions pourraient correspondre à des lieux de détoxification des sulfures chez ces espèces qui y sont fortement exposées.

Notre attention s'est ensuite portée sur la caractérisation et la structure des hémoglobines présentes chez les espèces étudiées (Chapitre III). Ces hémoglobines ont pour effet d'augmenter la capacitance des fluides corporels et de faciliter ainsi les échanges gazeux. *Alvinella pompejana* et l'Orbiniidé du Golfe du Mexique possèdent dans leur système vasculaire une hémoglobine extracellulaire typique des Annélides. *A. pompejana* possède en outre une hémoglobine coelomique intracellulaire de faible poids moléculaire. La découverte la plus originale est sans doute l'existence, chez *Branchiopolynoe* spp., d'hémoglobines extracellulaires correspondant à des dimères et des trimères de chaînes tétradomaines, une architecture unique chez les Annélides.

Enfin, le chapitre IV présente les études physiologiques réalisées soit sur des animaux vivants, soit sur des échantillons *in vitro*. Les résultats sont utilisés, avec ceux des deux chapitres précédents, pour tenter de comprendre le fonctionnement et les adaptations du système respiratoire des espèces-modèles.

Dans ce dernier chapitre nous reprendrons séparément le cas de chaque espèce en la replaçant dans son environnement pour avoir une vision d'ensemble des points que nous avons pu élucider et de ceux qu'il faudrait étudier dans le futur.

V.1. *Branchipolynoe* spp.

Nous avons pu étudier principalement les espèces trouvées sur la Dorsale du Pacifique Oriental (*B. symmytilida*) et sur la Dorsale Médio-Atlantique (*B. seepensis*) mais d'autres espèces du genre *Branchipolynoe* existent en association dans les écosystèmes colonisés par des Mytilidés contenant des bactéries symbiotiques sulfoxydantes.

Les moules hôtes de *Branchipolynoe* se trouvent dans la partie froide de l'écosystème hydrothermal, où la proportion de fluide chaud est la plus réduite. Les conditions rencontrées ici ne sont donc pas les plus difficiles mais les vers peuvent se trouver isolés du milieu environnant lorsque les moules se referment. Nous n'avons malheureusement pas assez de données sur le comportement des deux espèces pour pouvoir donner une idée du temps qu'elles peuvent passer dans de telles conditions et quelles sont les facteurs qui provoquent leur isolement (présence de prédateurs, changement des caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer, ...).

Les données morphologiques et anatomiques ont montré que les branchies, un organe inhabituel chez les Polynoidés littoraux, sont coelomiques et ciliées. Le liquide coelomique, contenant les hémoglobines extracellulaires, circule dans les branchies et le corps grâce à des cellules ciliées de l'épithélium coelomique. La contraction des branchies et de la paroi du corps permettent aussi de faire circuler le liquide coelomique.

Les hémoglobines ont une très forte affinité pour l'oxygène et un fort effet Bohr. La coopérativité est réduite, ce qui suggère que ces hémoglobines se comportent plutôt comme des myoglobines. Cette supposition est étayée par les données de contenu spécifique en hémoglobine, plus élevée chez les petits individus qui ont aussi une consommation spécifique d'oxygène plus importante. L'hémoglobine représente une réserve en oxygène de l'ordre de 2 heures, plus importante que toutes celles estimées à ce jour pour d'autres polychètes. Ces hémoglobines permettent aussi vraisemblablement de mieux extraire l'oxygène d'un milieu où il peut être présent en quantité très réduite.

Le liquide coelomique présente la capacité d'accumuler d'importantes quantités de CO₂ sans changement important du pH. Cette molécule est présente en quantité très variable dans l'eau environnante et cette capacité de fixation permet probablement de limiter les possibles effets de variations du pH induites par le CO₂ sur la physiologie de *Branchipolynoe*. Cette capacité de fixation implique non seulement les hémoglobines mais aussi une molécule dialysable de nature inconnue. Une situation analogue est rencontrée chez le Vestimentifère *Riftia pachyptila* (Toulmond *et al.*, 1994). Il serait intéressant de pouvoir identifier cette molécule dans le but de la quantifier, comprendre sa production et ses possibles autres rôles dans les organismes.

Les hémoglobines de *Branchipolynoe* sont probablement le sujet qui ouvre le plus de possibilités d'étude. Leur structure est tout à fait inhabituelle et il serait intéressant de pouvoir les cristalliser pour connaître les relations entre les domaines d'une même chaîne, ainsi qu'entre les différentes chaînes constituant les dimères et les trimères. La structure explique-t-elle les propriétés fonctionnelles observées ? L'histidine distale est remplacée par une glutamine dans toutes les chaînes séquencées. Quel en est l'effet du point de vue de la liaison de l'oxygène ? Certaines séquences présentent un résidu cystéine à une position identique à celle trouvée pour l'une des globines de *Riftia* et qui a été identifiée comme responsable de la fixation réversible des sulfures (Zal *et al.*, 1998). Les hémoglobines de *Branchipolynoe* sont-elles capables de lier, réversiblement ou non, les sulfures ?

Il serait aussi intéressant d'analyser entièrement les différentes chaînes dont le séquençage a déjà été commencé, afin de mieux connaître leur structure et leur évolution. Le séquençage des gènes et l'établissement de la structure intronique seraient du plus grand intérêt : existe-t-il un intron formant un pont entre les différents domaines comme c'est le cas pour l'hémoglobine didomaine du bivalve *Barbatia reeveana* (Naito *et al.*, 1991) ? Enfin, la comparaison des séquences suggère que ces hémoglobines ont récemment acquis leur état extracellulaire. Quel est l'événement qui est à l'origine de ce changement du lieu d'adressage ? Quelles sont les modifications de séquence nécessaires au fonctionnement extracellulaire de ces hémoglobines ?

Il est possible de garder les individus de *Branchipolynoe seepensis* vivants pendant quelques jours, ce qui permet de faire des mesures physiologiques telle que la respirométrie. Il serait intéressant de faire des mesures semblables à celles effectuées sur les Orbiniidés du Golfe du Mexique pour connaître la consommation d'oxygène en fonction de sa concentration environnementale (capacité d'oxyrégulation ?). Il serait aussi possible de tester leur capacité de résistance aux sulfures. La disponibilité d'enceintes pressurisées, couplées à un analyseur chimique en continu, pourraient permettre de tenter ces expériences sous pression.

V.2. *Alvinella pompejana*.

Alvinella pompejana a suscité l'intérêt des biologistes dès le début de l'étude des sources hydrothermales. Cette espèce vit au plus chaud de l'écosystème hydrothermal, avec la plus forte proportion de fluide hydrothermal dans l'eau environnante. Etant tubicole, donc sédentaire, cette espèce doit supporter les variations des caractéristiques environnementales sans pouvoir éviter les conditions défavorables.

L'anatomie du système d'échanges gazeux a déjà été étudiée par d'autres auteurs (Jouin et Gaill, 1990; Jouin-Toulmond *et al.*, 1996). Tout comme *Branchipolynoe*, *A. pompejana* se caractérise par une très grande surface branchiale, ce qui permet d'augmenter les échanges gazeux. Le record pour les surfaces branchiales est détenu par *Paralvinella grasslei*, un autre Alvinellidé. Ces espèces présentent aussi de très faibles distances de diffusion au niveau des branchies, offrant une faible barrière à la diffusion des gaz. En plus des branchies, les Alvinellidés possèdent un organe d'échange interne qui leur est propre, la poche périoesophagienne (Jouin-Toulmond *et al.*, 1996). Au niveau de cet organe, il y a une possibilité de transfert d'oxygène entre l'hémoglobine vasculaire, extracellulaire, et l'hémoglobine coelomique, intracellulaire. Chez les Terebellidés, une famille proche des Alvinellidés, il y a transfert d'oxygène de l'hémoglobine vasculaire vers l'hémoglobine coelomique. Chez *A. pompejana*, les propriétés fonctionnelles des deux hémoglobines sont tellement proches que le transfert est *a priori* possible dans les deux directions.

La poche périoesophagienne pourrait alors fonctionner comme une réserve d'oxygène, se chargeant quand les conditions sont favorables et libérant de l'oxygène dans la circulation quand les quantités disponibles dans l'environnement sont trop réduites. Il serait intéressant de comparer cette situation à celle d'autres espèces d'Alvinellidés comme *Alvinella caudata* (sympatrique d'*A. pompejana*), ou *Paralvinella grasslei* (qui vit principalement au niveau du pôle tiède).

Alvinella pompejana ne survit malheureusement pas très longtemps à la remontée, même après remise sous pression. Ceci interdit pour l'instant toute expérience de physiologie qui seraient nécessaires afin de tester les modèles établis sur les liquides corporels *in vitro*. Il est cependant possible de vérifier certains points comme les mécanismes de régulation du pH intracellulaire quand les concentrations en CO₂ varient grâce à des inhibiteurs spécifiques ou encore les capacités d'accumulation de CO₂ par les différents fluides corporels.

Il serait intéressant de disséquer les bases moléculaires des propriétés fonctionnelles particulières des hémoglobines d'*Alvinella pompejana* (forte affinité, effet Bohr, effet Root). L'hémoglobine intracellulaire est constituée d'un seul type de chaîne polypeptidique qui pourrait être séquencée assez facilement. Pour cette hémoglobine, des expériences simples pourraient nous permettre de déterminer s'il y a effectivement formation de tétramères à faible concentration en oxygène qui se dissocieraient en monomères à plus forte concentration. Il devrait être possible de cristalliser la globine intracellulaire unique dans ces deux formes (monomérique et polymérique) et ainsi de comprendre les mécanismes moléculaires de l'effet Bohr et de l'effet Root.

V.3. L'Orbiniidé du Golfe du Mexique.

L'Orbiniidé du Golfe du Mexique est l'espèce que nous avons étudiée qui survit le plus longtemps à pression atmosphérique. Il a été possible de conserver des individus plusieurs mois dans un aquarium en chambre froide. Ceci ouvre des possibilités importantes d'expériences de physiologie respiratoire et de détoxication des sulfures. Cette espèce est vagile, ce qui lui permet d'éviter les zones où les conditions ne sont pas favorables.

L'étude de son anatomie a permis de dégager certains points intéressants. Comme les autres espèces de cette étude, l'Orbiniidé possède des branchies très développées, offrant une grande surface spécifique d'échanges gazeux. Cette caractéristique, associée à la forte affinité de son hémoglobine, permettent au ver de réguler sa consommation d'oxygène, même à de faibles concentrations en oxygène. Il y a de fortes différences morphométriques et structurales entre les branchies antérieures et les branchies postérieures de ce ver, suggérant que la grande majorité des échanges respiratoires s'effectue dans la partie antérieure du corps.

L'hémoglobine, chez cette espèce, n'a probablement pas un rôle de transporteur d'oxygène efficace. Le contenu spécifique en hémoglobine et la surface branchiale spécifique sont plus réduits chez les petits individus. Ceci peut s'expliquer par le fait que la paroi du corps est plus fine chez ceux-ci, ce qui permet une bonne diffusion de l'oxygène. Quand l'animal grandit, la paroi du corps s'épaissit et la diffusion devient plus difficile. Une quantité plus importante d'hémoglobine et une plus grande surface branchiale sont alors nécessaires pour assurer un apport d'oxygène suffisant aux organes.

La taille réduite des vaisseaux sanguins ne permet malheureusement pas de prélever du sang pur et d'en étudier les propriétés. Ceci serait du plus grand intérêt dans le cadre d'expériences de physiologie de la respiration. Les expériences de respirométrie pourraient être répétées avec un système ouvert dans lequel le ver serait exposé à différentes PO_2 afin de mesurer ses capacités d'extraction de l'oxygène du milieu.

L'Orbiniidé est résistant à l'exposition à l'anoxie et aux sulfures dans les conditions que nous avons utilisées. Dans leur environnement naturel, ces vers peuvent être exposés à des concentrations en sulfures atteignant 13 mmol l^{-1} (Smith *et al.*, 2000). Il serait intéressant de pousser plus loin les études de résistance et de détoxification de sulfures chez cette espèce : produits qui sont formés lors de la détoxification des sulfures, enzymes impliquées dans ce processus, localisation des systèmes enzymatiques. Il serait aussi intéressant d'étudier le métabolisme anaérobie chez ces organismes de manière en particulier à déterminer quels composés sont formés en période d'anoxie.

V.4. Diversité des adaptations

Bien que les espèces que nous avons étudiées vivent dans des milieux différents, les adaptations générales rencontrées sont semblent les mêmes : présence de branchies développées, présence d'hémoglobine à forte affinité pour l'oxygène.

Cependant, à cette unicité des stratégies adaptatives s'oppose une importante diversité des moyens employés. Chez *Branchipolynoe*, les branchies sont des expansions de la paroi du corps, une structure nouvellement acquise dans cette famille. Chez les autres espèces, il y a augmentation de la surface d'organes préexistants. Les hémoglobines sont toutes de structure différente, *Branchipolynoe* possédant même une hémoglobine de structure encore jamais rencontrée chez les Annélides.

L'étude d'autres Annélides de milieux extrêmes, tels que les sources hydrothermales ou les suintements froids, devrait nous apporter beaucoup d'informations et de possibles stratégies originales pour pallier au manque d'oxygène. Pour cela, l'étude d'autres familles telles que celle des Hesionidés ou des Nereidés, toutes deux aussi rencontrées en milieu littoral, semble prometteuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Arp A.J. and J.J. Childress** (1983). Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science*, **219**: 295-297.
- Arp A.J., J.J. Childress and C.R. Fischer** (1984). Metabolic and blood gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*. *Physiol. Zool.*, **57**: 648-662.
- Arp A.J., J.J. Childress and R.D. Vetter** (1987). The sulfide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *J. exp. Biol.*, **128**: 139-158.
- Arp A.J., M.L. Doyle, E. Di Cera and S.J. Gill** (1990). Oxygenation properties of the two co-occurring hemoglobins of the tube worm *Riftia pachyptila*. *Respir. Physiol.*, **80**: 323-334.

B

- Ballard R.D. and J.F. Grassle** (1979). Return to oases of the deep (strange world without a sun). *Natl. Geogr.*, **156**: 680-703.
- Bergquist D.C., F.M. Williams and C.R. Fisher** (2000). Longevity record for deep-sea invertebrate. The growth rate of a marine tubeworm is tailored to different environments. *Nature*, **403**: 499-500.
- Bonaventura J. and G.B. Kitto** (1973). Ligand-linked dissociation of some invertebrate hemoglobins. in *Comparative Physiology*, ed. K. S.-N. a. S. H. P. M. L. Bolis (North-Holland Publishing Co., Amsterdam), pp. 493-507.

Briehl R.W. (1963). The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **238**: 2361-2366.

C

Carney R.S. (1994). Consideration of the oasis analogy for chemosynthetic communities at Gulf of Mexico hydrocarbon vents. *Geo-Mar. Lett.*, **14**: 149-159.

Cary S.C., T. Shank and J. Stein (1998). Worms bask in extreme temperatures. *Nature*, **391**: 546-546.

Cary S.C., R.D. Vetter and H. Felbeck (1989). Habitat characterization and nutritional strategies of the endosymbiont-bearing bivalve *Lucinoma aequizonata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **55**: 31-45.

Chevaldonné P. (1996). Ecologie des cheminées hydrothermales actives. Thèse de Doctorat. Université de la Méditerranée, Marseille. pp. 257.

Chevaldonné P., D. Desbruyères and J.J. Childress (1992). Some like it hot ... and some even hotter. *Nature*, **359**: 593-594.

Chevaldonné P., D. Desbruyères and M. Le Haitre (1991). Time-series of temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep-Sea Res.*, **38**: 1417-1430.

Chevaldonné P., D. Jollivet, R.A. Feldman, D. Desbruyères, R.A. Lutz and R.C. Vrijenhoek (1998). Commensal scale-worms of the genus *Branchipolynoe* (Polychaeta : Polynoidae) at deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Cah Biol Mar*, **39**: 347-350.

Childress J.J. and C.R. Fischer (1992). The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbioses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **30**: 337-441.

Childress J.J., R.W. Lee, N.K. Sanders, H. Felbeck, D.R. Oros, A. Toulmond, D. Desbruyères, M.C. Kennicut II and J. Brooks (1993). Inorganic carbon uptake in hydrothermal vent tubeworms facilitated by high environmental P_{CO_2} . *Nature*, **362**: 147-149.

- Childress J.J. and T.J. Mickel** (1985). Metabolic rates of animals from the hydrothermal vents and other deep-sea habitats. *Bull. Biol. Soc. Wash.*, **6**: 249-260.
- Chomzinski P. and N. Sacchi** (1987). *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- Church G.M. and W. Gilbert** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1991-1995.
- Cline J.D. and F.A. Richards** (1969). Oxygenation of hydrogen sulfide in seawater at constant salinity, temperature and pH. *Environ. Sci. Technol.*, **3**: 838-843.
- Cooper J.D.H., M.T. Lewis and D.C. Turnell** (1984). Pre-column o-phthalaldehyde derivatization of amino acids and their separation using reversed-phase high-performance liquid chromatography .II Simultaneous determination of amino and imino acids in protein hydrolysates. *J. Chrom.*, **285**: 490-494.
- Cooper J.D.H. and D.C. Turnell** (1982). Fluorescence detection of cystine by o-phthalaldehyde derivatisation and its separation using high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, **277**: 158-161.
- Corliss J.B. and R.D. Ballard** (1977). Oases of life in the cold abyss. *Natl. Geogr.*, **152**: 441-454.
- Corliss J.B., J. Dymond, L.I. Gordon, J.M. Edmond, R.P.V. Herzen, R.D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, K. Crane and T.H. van Andel** (1979). Submarine thermal springs on the Galápagos rift. *Science*, **203**: 1073-1083.

D

- Dahlhoff E., J. O'Brien, G.N. Somero and R.D. Vetter** (1991). Temperature effects on mitochondria from hydrothermal vent invertebrates : Evidence for adaptation to elevated and variable habitat temperatures. *Physiol. Zool.*, **64**: 1490-1508.

- Dangott L.J. and R.C. Terwilliger** (1979). Structural studies of a Branchiopod crustacean (*Lepidurus bilobatus*) extracellular hemoglobin. Evidence for oxygen binding domains. *Biochim. Biophys. Acta*, **579**: 452-461.
- Davis B.J. and A.F. Riggs** (1986). The effect of sodium chloride and carbon dioxide on oxygen binding by *Artemia* hemoglobin. *J. Comp. Physiol. B*, **156**: 355-361.
- De Haas F., N. Boisset, J.C. Taveau, O. Lambert, S.N. Vinogradov and J.N. Lamy** (1996a). Three-dimensional reconstruction of *Macrobdella decora* (Leech) hemoglobin by cryoelectron microscopy. *Biophys J*, **70**: 1973-1984.
- De Haas F., A. Kuchumov, J.C. Taveau, N. Boisset, S.N. Vinogradov and J.N. Lamy** (1997). Three-dimensional reconstruction of native and reassembled *Lumbricus terrestris* extracellular hemoglobin. Localization of the monomeric globin chains. *Biochemistry*, **36**: 7330-7338.
- De Haas F., J.C. Taveau, N. Boisset, O. Lambert, S.N. Vinogradov and J.N. Lamy** (1996b). Three-dimensional reconstruction of the chlorocruorin of the polychaete annelid *Eudistylia vancouverii*. *J Mol Biol*, **255**: 140-153.
- De Haas F., F. Zal, F.H. Lallier, A. Toulmond and J.N. Lamy** (1996c). Three-dimensional reconstruction of the hexagonal bilayer hemoglobin of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachytila* by cryoelectron microscopy. *Proteins*, **26**: 241-256.
- De Haas F., F. Zal, V. You, F.H. Lallier, A. Toulmond and J.N. Lamy** (1996d). Three-dimensional reconstruction by cryoelectron microscopy of the giant hemoglobin of the polychaete worm *Alvinella pompejana*. *J. Mol. Biol.*, **264**: 111-120.
- Dejours P.** (1981). Principles of Comparative Respiratory Physiology, 2nd edition (First edition 1975).(Elsevier/North Holland, Amsterdam).
- Desbruyères D., P. Chevaldonné, A.M. Alayse, D. Jollivet, F.H. Lallier, C. JouinToulmond, F. Zal, P.M. Sarradin, R. Cosson, J.C. Caprais, C. Arndt, J. O'Brien, J. Guezennec, S. Hourdez, R. Riso, F. Gaill, L. Laubier and A. Toulmond** (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 Res Pt II*, **45**: 383-422.

Desbruyères D., P. Crassous, J.F. Grassle, A. Khripounoff, D. Reyss, M. Rio and M. Van Praët (1982). Données écologiques sur un nouveau site d'hydrothermalisme actif de la ride du Pacifique oriental. *C. R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, **295**: 489-494.

Desbruyères D., F. Gaill, L. Laubier and Y. Fouquet (1985). Polychaetous annelids from hydrothermal vent ecosystems: An ecological overview. *Bull. Biol. Soc. Wash.*, **6**: 103-116.

Desbruyères D. and S. Hourdez (2000). A new species of scale-worm (Polychaeta: Polynoidae), *Lepidonotopodium atalantae* sp. nov., from the East Pacific Rise at 13°N and 9°50'N. *Cah. Biol. Mar.*, **41**: 47-54.

Desbruyères D. and S. Hourdez (2000). A new species of scale-worm (Polychaeta: Polynoidae), *Lepidonotopodium jouinae* sp. nov., from the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Cah. Biol. Mar.* accepté.

Desbruyères D. and L. Laubier (1991). Systematics, phylogeny, ecology and distribution of the Alvinellidae (Polychaeta) from deep-sea hydrothermal vents. *Ophelia*, **5**: 31-45.

Desbruyères et Segonzac (1997). Handbook of the deep-sea hydrothermal vent fauna. IFREMER, Brest. 280 pp.

Dewilde S., M. Blaxter, M.-L. Van Hauwaert, J. Vanfleteren, E.L. Esmans, M. Marden, N. Griffon and L. Moens (1996). Globin and globin gene structure of the nerve myoglobin of *Aphrodite aculeata*. *J. Biol. Chem.*, **271**: 19865-19870.

E

Eisig H. (1914). Zur systematik, anatomie und morphologie der Ariciiden nebst Beiträgen zur generellen systematik. *Mitt. Zool. Stat. Neapel*, **21**: 153-593.

F

- Fauvel P.** (1958). Sur les Ampharétiens (Annélides Polychètes) de la côte occidentale de l'Afrique. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco*, **1130**: 1-8.
- Fisher C.R., J.J. Childress, A.J. Arp, J.M. Brooks, D. Distel, J.A. Favuzzi, H. Felbeck, R. Hessler, K.S. Johnson, M.C. Kennicutt, S.A. Macko, A. Newton, M.A. Powell, G.N. Somero and T. Soto** (1988). Microhabitat variation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus*, at Rose Garden vent on the Galápagos rift. *Deep-Sea Res.*, **35**: 1769-1792.
- Fisher C.R., J.J. Childress, S.A. Macko and J.M. Brooks** (1994). Nutritional interactions in Galápagos rift hydrothermal vent communities - inferences from stable carbon and nitrogen isotope analyses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **103**: 45-55.
- Fisher C.R., J.J. Childress and E. Minnich** (1989). Autotrophic carbon fixation by the chemoautotrophic symbionts of *Riftia pachyptila*. *Biol. Bull.*, **177**: 372-385.
- Fisher C.R., I.R. MacDonald, R. Sassen, C.M. Young, S.A. Macko, S. Hourdez, R.S. Carney, S. Joye and E. McMullin** (2000). Methane ice worms: *Hesiocaeca methanicola* colonizing fossil fuel reserves. *Naturwissenschaften*, **87**: 184-187.
- Furata H., M. Ohe and A. Kajita** (1981). Ligand-dependant polymerization of tetrameric hemoglobin from the blood clam *Anadara broughtonii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **668**: 448-455.

G

- Gabe M.** (1968). Techniques histologiques. (Masson and Cie, Paris).

- Gaill F.** (1991). The biology of annelid worms from high temperature hydrothermal vent regions. *Rev. Aquat. Sci.*, **4**: 107-137.
- Gaill F., K. Mann, H. Wiedemann, J. Engel and R. Timpl** (1995). Structural comparison of cuticle and interstitial collagens from annelids living in shallow sea-water and at deep-sea hydrothermal vents. *J. Mol. Biol.*, **246**: 284-294.
- Gallacher W.A. and W.B. Elliott** (1965). The formation of pyridine haemochromagen. *Biochem. J.*, **97**: 187-193.
- Gamenick I., B. Vismann, M.K. Grieshaber and O. Giere** (1998). Ecophysiological differentiation of *Capitella capitata* (Polychaeta). Sibling species from different sulfidic habitats. *Mar Ecol Progr Ser*, **175**: 155-166.
- Gardiner S.L.** (1988). Respiratory and feeding appendages. in *The Ultrastructure of Polychaeta*, eds. W. Westheide and C. O. Hermans (Gustav Fischer Verlag), Vol. 4, pp. 37-43.
- Gardiner S.L.** (1992). Chapter 2.2. Polychaeta: general organization, integument, musculature, coelom, and vascular system. in *Annelida*, ed. F. W. Harrison and S. L. Gardiner (Wiley-Liss Inc., New-York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore), Vol. 7, pp. 19-52.
- Goodman M., J. Pedwaydon, J. Czelusniak, T. Suzuki, T. Gotoh, L. Moens, F. Shishikura, D. Walz and S.N. Vinogradov** (1988). An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *J. Mol. Evol.*, **27**: 236-249.
- Green B.N., A.R. Kuchumov, D.A. Walz, L. Moens and S.N. Vinogradov** (1998). A hierarchy of disulfide-bonded subunits: The quaternary structure of *Eudistylia chlorocruorin*. *Biochemistry*, **37**: 6598-6605.
- Green B.N., T. Suzuki, T. Gotoh, A.R. Kuchumov and S.N. Vinogradov** (1995). Electrospray ionization mass spectrometric determination of the complete polypeptide chain composition of *Tylorrhynchus heterochaetus* hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **270**: 18209-18211.
- Grieshaber M.K., I. Hardewig, U. Kreutzer and H.-O. Pörtner** (1994). Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **125**: 43-147.

Grieshaber M.K. and S. Völkel (1998). Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**: 33-53.

Grinich N.P. and R.C. Terwilliger (1980). The quaternary structure of an unusual high molecular weight intracellular haemoglobin from the bivalve mollusc *Brabatia reeveana*. *Biochem. J.*, **189**: 1-8.

Groenendaal M. (1980). Tolerance of the lugworm (*Arenicola marina*) to sulphide. *Netherlands J. Sea Res.*, **14**: 200-207.

Groenendaal M. (1981). The adaptation of *Arenicola marina* to sulphide solutions. *Neth. J. Sea Res.*, **15**: 65-77.

Gruhl M., W.Y. Kao and G. Bergtrom (1997). Evolution of orthologous intronless and intron-bearing globin genes in two insect species. *J Mol Evol*, **45**: 499-508.

H

Hardison R.C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 5675-5679.

Hartmann-Schröder G. (1992). Contribution to the Polychaete Fauna of Hydrothermal Vents (Black Smokers) on the East Pacific Rise. *Helgol. Meeres.*, **46**: 389-403.

Hochachka P.W., J. Fields and T. Mustafa (1973). Animal life without oxygen: basic biochemical mechanisms. *Amer. Zool.*, **13**: 543-555.

Hourdez S. and D. Desbruyères (2000). A new species of scale-worm (Polychaeta: Polynoidae), *Levensteiniella plicata* sp. nov., from the East Pacific Rise. *Cah. Biol. Mar.*, **41**: 97-102.

J

- Jellie A.M., W.P. Tate and C.N.A. Trotman** (1996). Evolutionary history of introns in a multidomain globin gene. *J Mol Evol*, **42**: 641-647.
- Johnson K.S., J.J. Childress and C.L. Beehler** (1988a). Short-term temperature variability in the Rose Garden hydrothermal vent field, Galápagos spreading center. *Deep-Sea Res.*, **35**: 1723-1744.
- Johnson K.S., J.J. Childress, R.R. Hessler, C.M. Sakamoto-Arnold and C.L. Beehler** (1988b). Chemical and biological interactions in the Rose Garden hydrothermal vent field, Galápagos spreading center. *Deep-Sea Res.*, **35**: 1723-1744.
- Jollivet D., T. Comtet, P. Chevaldonné, S. Hourdez, D. Desbruyères and D.R. Dixon** (1998). Unexpected relationship between dispersal strategies and speciation within the association *Bathymodiolus* (Bivalvia) - *Branchipolynoe* (Polychaeta) inferred from the rDNA neutral ITS2 marker. *Cah Biol Mar*, **39**: 359-362.
- Jollivet D., A. Empis, M.C. Baker, S. Hourdez, T. Comtet, C. Jouin-Toulmond, D. Desbruyères and P.A. Tyler** (2000). Reproductive biology, sexual dimorphism, and population structure of the deep-sea hydrothermal vent scale-worm, *Branchipolynoe seepensis* (Polychaeta: Polynoidae). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **80**: 55-68.
- Jouin C. and F. Gaill** (1990). Gills of hydrothermal vent annelids: structure, ultrastructure and functional implications in two alvinellid species. *Prog. Oceanogr.*, **24**: 59-69.
- Jouin C. and A. Toulmond** (1989). The ultrastructure of the gill of the lugworm *Arenicola marina* (L.) (Annelida, Polychaeta). *Acta Zool., Stockh.*, **70**: 121-129.
- Jouin-Toulmond C., D. Augustin, D. Desbruyères and A. Toulmond** (1996). The gas transfer system in alvinellids (Annelida Polychaeta, Terebellida). Anatomy and ultrastructure of the anterior circulatory system and characterization of a coelomic, intracellular, haemoglobin. *Cah. Biol. Mar.*, **37**: 135-151.
- Julian D. and A.J. Arp** (1992). Sulfide permeability in the marine invertebrate *Urechis caupo*. *J. Comp. Physiol. B*, **162**: 59-67.

K

- Kao W.Y., P.M. Trewitt and G. Bergtrom** (1994). Intron-containing globin genes in the insect *Chironomus thummi*. *Journal of Molecular Evolution*, **38**: 241-249.
- Kaule G., R. Timpl, F. Gaill and V. Gunzler** (1998). Prolyl hydroxylase activity in tissue homogenates of annelids from deep sea hydrothermal vents. *Matrix Biology*, **17**: 205-212.
- Kennicutt M.C. and R.A. Burke** (1995). Stable isotopes: Clues to biological cycling of elements at hydrothermal vents. in *Microbiology of Deep - Sea Hydrothermal Vents*, ed. D. M. Karl (CRC Press Inc, 2000 Corporate Blvd NW, Boca Raton, FL 33431), pp. 275-287.
- Kochevar R.E., J.J. Childress, C.R. Fischer and E. Minnich** (1992). The methane mussel: roles of symbiont and host in the metabolic utilization of methane. *Mar. Biol.*, **112**: 389-401.
- Kochevar R.E., N.S. Govind and J.J. Childress** (1993). Identification and characterization of two carbonic anhydrases from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachytila* Jones. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**: 10-19.
- Krebs A., A.R. Kuchumov, P.K. Sharma, E.H. Braswell, P. Zipper, R.E. Weber, G. Chottard and S.N. Vinogradov** (1996). Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **271**: 18695-18704.
- Krogh-Rasmussen K. and R.E. Weber** (1979). Respiratory properties of erythrocrucorin (extracellular hemoglobin) in the blood of the Annelid *Arenicola marina* with special reference to the influence of salinity and temperature. *Ophelia*, **18**: 151-170.

L

- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamy J.N., B.N. Green, A. Toulmond, J.S. Wall, R.E. Weber and S.N. Vinogradov** (1996). The giant hexagonal bilayer extracellular hemoglobins. *Chem. Rev.*, **96**: 3113-3124.
- Lindroth P. and K. Mopper** (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.*, **51**: 1667-1674.
- Lonsdale P.F.** (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Res.*, **24**: 857-863.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lwebuga-Mukasa J.** (1970). The role of elytra in the movement of water over the surface of *Halosydna brevisetosa* (Polychaeta: Polynoidae). *Bull. So. Calif. Acad. Sci.*, **69**: 154-160.

M

- MacDonald I.R., G.S. Boland, J.S. Baker, J.M. Brooks, M.C. Kennicutt II and R.R. Bidigare** (1989). Gulf of Mexico hydrocarbon communities II. Spatial distribution of seep organisms and hydrocarbons at Bush Hill. *Mar. Biol.*, **101**: 235-247.
- MacDonald I.R., W.R. Callender, R.A. Burke, Jr., S.J. MacDonald and R.S. Carney** (1990a). Fine-scale distribution of methanotrophic mussels at a Louisiana cold seep. *Prog. Oceanogr.*, **24**: 15-24.
- MacDonald I.R., J.F. Reilly II, N.L. Guinasso, Jr., J.M. Brooks, R.S. Carney, W.A. Bryant and T.J. Bright** (1990b). Chemosynthetic mussels at a brine-filled pockmark in the Northern gulf of Mexico. *Science*, **248**: 1096-1099.

- MacDonald I.R., N.L. Guinasso, J.F. Reilly, J.M. Brooks, W.R. Callender and S.G. Gabrielle** (1990c). Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities: VI. Patterns in community structure and habitat. *Geo-Mar. Lett.*, **10**: 244-252.
- Magenheim A.J. and J.M. Gieskes** (1992). Hydrothermal discharge and alteration in near-surface sediments from the Guaymas basin, gulf of California. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **56**: 2329-2338.
- Mangum C.P.** (1994). Multiple sites of gas exchange. *Amer. Zool.*, **34**: 184-193.
- Mangum C.P., B.R. Woodin, C. Bonaventura, B. Sullivan and J. Bonaventura** (1975). The role of coelomic and vascular hemoglobin in the annelid family Terebellidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51A**: 281-294.
- Manning A.M., C.N.A. Trotman and W.P. Tate** (1990). Evolution of a polymeric globin in the brine shrimp *Artemia*. *Nature*, **348**: 653-656.
- Martin D. and T.A. Britayev** (1998). Symbiotic Polychaetes: review of the known species. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **36**: 217-340.
- Martineu P., S.K. Juniper, C.R. Fisher and G.J. Massoth** (1997). Sulfide binding in the body fluids of hydrothermal vent alvinellid polychaetes. *Physiol Zool*, **70**: 578-588.
- Massoth G.J., D.A. Butterfield, J.E. Lupton, R.E. Mc Duff, M.D. Lilley and I.R. Jonasson** (1989). Submarine venting of phase-separated hydrothermal fluids at Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge. *Nature (London)*, **340**: 702-705.
- Menon J.G. and A.J. Arp** (1992). Morphological adaptations of the respiratory hindgut of a marine Echiuran worm. *J. Morphol.*, **214**: 131-138.
- Menon J.G. and A.J. Arp** (1993). The integument of the marine echiuran worm *Urechis caupo*. *Biol. Bull.*, **185**: 440-454.
- Miura T.** (1994). Two New Scale-Worms (Polynoidae, Polychaeta) from the Lau Back-Arc and North Fiji Basins, South Pacific Ocean. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **107**: 532-543.

Miura T. and D. Desbruyères (1995). Two new species of *Opisthotrochopodus* (Polychaeta: Polynoidae: Branchinotogluminae) from the Lau and the North Fiji Bac-arc Basins, southwestern Pacific Ocean. *Proc Biol Soc Wash*, **108**: 583-595.

Miura T. and J. Hashimoto (1991). Two new branchiate scale-worms (Polynoidae: Polychaeta) from the hydrothermal vent of the Okinawa trough and the volcanic seamount off Chichijima island. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **104**: 166-174.

Moore S. and W.H. Stein (1951). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **192**: 663-681.

N

Naito Y., C.K. Riggs, T.L. Vandergon and A.F. Riggs (1991). Origin of a "bridge" intron in the gene for a two-domain globin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 6672-6676.

Nichol A.W., I. Hendry, D.B. Morell and P.S. Clezy (1968). Mechanism of formation of sulphhaemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **156**: 97-108.

Nicholls P. (1975). The effect of sulfide on cytochrome *aa3*. Isosteric and allosteric shifts of the reduced -peak. *Biochim. Biophys. Acta*, **396**: 24-35.

Nix E.R., C.R. Fisher, J. Vodenichar and K.M. Scott (1995). Physiological ecology of a mussel with methanotrophic endosymbionts at three hydrocarbon seep sites in the Gulf of Mexico. *Marine Biology*, **122**: 605-617.

O

O'Brien J. and R.D. Vetter (1990). Production of thiosulfate during sulphide oxidation by mitochondria of the symbiont-containing bivalve *Solemya reidi*. *J. Exp. Biol.*, **149**: 133-148.

Oglesby L.C. (1978). Salt and water balance. in *Physiology of annelids*, ed. P. J. Mill (Academic Press, London, New-York, San Francisco), pp. 555-658.

Okazaki T., R. Briehl and J. Wittenberg (1965). The hemoglobin of *Ascaris perenteric* fluid. II. Molecular weight and subunits. *Biochem. Biophys. Acta*, **111**: 496-502.

P

Park C.M. and R.L. Nagel (1984). Sulfhemoglobinemia. Clinical and molecular aspects. *N. Engl. J. Med.*, **310**.

Patel S. and C.P. Spencer (1963). The oxidation of sulphide by the haem compounds from the blood of *Arenicola marina*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **43**: 167-175.

Paul K.G., H. Theorell and A. Akeson (1953). The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (Pyridine haemochromagen). *Acta Chem. Scand.*, **7**: 1284-1287.

Pelster B. and R.E. Weber (1991). The physiology of the Root effect. *Adv. Comp. Environm. Physiol.*, **8**: 51-77.

Perutz M. (1990). Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins (Cambridge University Press, Cambridge).

Pettibone M.H. (1983). A new scale worm (Polychaeta: Polynoidae) from the hydrothermal rift-area off Western Mexico at 21°N. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **96**: 392-399.

Pettibone M.H. (1984a). A new scale-worm commensal with deep sea mussels on the Galápagos hydrothermal vent (Polychaeta: Polynoidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **97**: 226-239.

Pettibone M.H. (1984b). Two new species of *Lepidonotopodium* (Polychaeta: Polynoidae: Lepidonotopodinae) from hydrothermal vents off the Galápagos and East Pacific Rise at 21°N. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **97**: 849-863.

- Pettibone M.H.** (1985a). Additionnal branchiate scale worms (Polychaeta: Polynoidae) from Galápagos hydrothermal vent and rift-area off Western Mexico at 21°N. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **98**: 447-469.
- Pettibone M.H.** (1985b). An additionnal new scale worm (Polychaeta: Polynoidae) from the hydrothermal rift area off western Mexico at 21°N. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **98**: 150-157.
- Pettibone M.H.** (1985c). New genera and species of deep-sea *Macellicephalinae* and *Harmothoinae* (Polychaeta: Polynoidae) from the hydrothermal rift areas off Galápagos and Western Mexico at 21°N and from the Santa Catalina Channel. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **98**: 740-757.
- Pettibone M.H.** (1986). A new scale-worm commensal with deep-sea mussels in the seep-sites at the Florida escarpment in the Eastern Gulf of Mexico (Polychaeta: Polynoidae: Branchipolynoinae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **99**: 444-451.
- Pettibone M.H.** (1988). New species and new records of scaled polychaetes (Polychaeta: Polynoidae) from hydrothermal vents of the Northeast Pacific Explorer and Juan de Fuca Ridges. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **101**: 192-208.
- Pettibone M.H.** (1989b). New species of scaled-worms (Polychaeta: Polynoidae) from the hydrothermal rift-area of the Mariana back-arc basin in the Western central Pacific. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **102**: 137-153.
- Pettibone M.H.** (1989c). Polynoidae and Sigalionidae (Polychaeta) from the Guaymas basin, with descriptions of two new species, and additionnal records from hydrothermal vents of the Galapagos rift, 21°N, and seep-sites in the gulf of Mexico (Florida and Louisiana). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **102**: 154-168.
- Pettibone M.H.** (1989d). Two new species of Harmothoinae (Polychaeta: Polynoidae) from the East Pacific Rise, collected by Alvin dives 2000 and 2003. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **102**: 305-310.

- Pettibone M.H.** (1990). New species and new records of scaled polychaetes (Polychaeta : Polynoidae) from the axial seamount caldera of the Juan de Fuca Ridge in the Northeast Pacific and the East Pacific ocean off Northern California. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **103**: 825-838.
- Pettibone M.H.** (1993). Polynoid polychaetes associated with a whale skeleton in the bathyal santa catalina basin. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **106**: 678-688.
- Pettibone M.H.** (1994). Additional records of polynoid polychaetes from the juan de fuca ridge. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **107**: 609-614.
- Pörtner H.O., R.G. Boutilier, Y. Tang and D.P. Toews** (1990). Determination of intracellular pH and P_{CO_2} after metabolic inhibition by fluoride and nitroacetic acid. *Respir. Physiol.*, **81**: 255-274.
- Pörtner H.O., L. Peck, S. Zielinsky and L.Z. Conway** (1999). Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. *Polar Biol.*, **22**: 17-30.
- Powell M.A. and G.N. Somero** (1985). Sulfide oxidation occurs in the animal tissue of the gutless clam, *Solemya reidi*. *Biol. Bull.*, **169**: 164-181.
- Powell M.A. and G.N. Somero** (1986a). Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: sites and mechanisms of detoxification and metabolism. *Biol. Bull.*, **171**: 274-290.
- Powell M.A. and G.N. Somero** (1986b). Hydrogen sulfide oxidation is coupled to oxidative phosphorylation in mitochondria of *Solemya reidi*. *Science*, **233**: 563-566.

R

- Roberts M.S., R.C. Terwilliger and N.B. Terwilliger** (1984). Comparison of sea cucumber hemoglobin structures. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **77**: 237-243.
- Rouse G.W. and K. Fauchald** (1995). The articulation of annelids. *Zool Scr*, **24**: 269-301.

Royer W.E.J. (1992). Structures of red blood cell hemoglobins. in *Oxygen Carriers in Blood and Tissues*, ed. C. P. Mangum (Springer Verlag, Berlin Heidelberg), Vol. 13, pp. 87-116.

S

Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Nolan C. ed. (Cold Springs Harbor Press, Cold Spring Harbor).

Sanders N.K. and J.J. Childress (1991). The use of single column ion chromatography to measure ion concentrations in invertebrate body fluids. *Comp. Biochem. Physiol.*, **98A**: 97-100.

Sarradin P.M., J.C. Caprais, P. Briand, F. Gaill, B. Shillito and D. Desbruyères (1998a). Chemical and thermal description of the environment of the Genesis hydrothermal vent community (13 degrees N, EPR). *Cah Biol Mar*, **39**: 159-167.

Sarradin P.M., J.C. Caprais, R. Riso, T. Comtet and A. Aminot (1998b). Brief account of the chemical environment at hydrothermal vent mussel beds on the MAR. *Cah Biol Mar*, **39**: 253-254.

Sarradin P.M., J.C. Caprais, R. Riso, R. Kerouel and A. Aminot (1999). Chemical environment of the hydrothermal mussel communities in the Lucky Strike and Menez Gwen vent fields, Mid Atlantic ridge. *Cah Biol Mar*, **40**: 93-104.

Schaefer B.C. (1995). Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.*, **227**: 255-273.

Schiedek D. (1998). Ecophysiological capability of *Marenzelleria* populations inhabiting North Sea estuaries: an overview. *Helgolander Meeresunters*, **52**: 373-382.

Schiedek D., C. Vogan, J. Hardege and M. Bentley (1997). *Marenzelleria* cf. *wireni* (Polychaeta: Spionidae) from the Tay estuary. Metabolic response to severe hypoxia and hydrogen sulphide. *Aquatic Ecol.*, **31**: 211-222.

- Sick H. and K. Gersonde** (1969). Method of continuous registration of O₂ binding curves of hemoproteins by means of a diffusion chamber. *Anal. Biochem.*, **32**: 362-376.
- Simpson R.J., M.R. Neuberger and T.-Y. Liu** (1976). Complete amino-acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *J. Biol. Chem.*, **251**: 1936-1940.
- Smit J.D.G., H. Sick, A. Peterhans and K. Gersonde** (1986). Acid Bohr effect of a monomeric haemoglobin from *Dicrocoelium dendriticum*. Mechanism of the allosteric conformation transition. *Eur. J. Biochem.*, **155**: 231-237.
- Smith E.B., K.M. Scott, E.R. Nix, C. Korte and C.R. Fisher** (2000). Growth and condition of seep mussels (*Bathymodiolus childressi*) at a Gulf of Mexico Brine Pool. *Ecology*, **81**: in press.
- Somero G.N., A.E. Anderson and J.J. Childress** (1989). Transport, metabolism and detoxification of hydrogen sulfide in animals from sulfide-rich marine environments. *CRC Crit. Rev. Aq. Sci.*, **1**: 591-614.
- Storch V. and G. Alberti** (1978). Ultrastructural observations on the gills of Polychaetes. *Helgol. Wiss. Meeresunters*, **31**: 169-179.
- Suzuki T.** (1989). Amino acid sequence of the monomer subunit of the giant multisubunit hemoglobin from the earthworm *Pheretima sieboldi*. *Eur. J. Biochem.*, **185**: 127-134.
- Suzuki T., T. Tagagi and S. Ohta** (1993). N-terminal amino acid sequences of 440 kDa hemoglobins of the deep-sea tube worms, *Lamellibrachia* sp.1, *Lamellibrachia* sp.2 and slender vestimentifera gen. sp.1. Evolutionary relationship with annelid hemoglobins. *Zool. Sci.*, **10**: 141-146.
- Suzuki T., T. Takagi and S. Ohta** (1988). N-terminal amino acid sequence of the deep-sea tube worm haemoglobin remarkably resembles that of annelid haemoglobin. *Biochem. J.*, **255**: 541-545.
- Suzuki T., T. Takagi and S. Ohta** (1989). Primary structure of a dimeric haemoglobin from the deep-sea cold seep clam *Calypptogena soyoae*. *Biochem. J.*, **260**: 177-182.

Suzuki T., T. Takagi and S. Ohta (1990a). Primary structure of a constituent polypeptide chain (AIII) of the giant haemoglobin from the deep-sea tube worm *Lamellibrachia*: a possible H₂S-binding site. *Biochem. J.*, **266**: 221-225.

Suzuki T., T. Takagi and S. Ohta (1990b). Primary structure of a linker subunit of the tube worm 3000-kDa hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **265**: 1551-1555.

T

Terwilliger N.B. (1992). Molecular structure of the extracellular heme proteins. in *Oxygen Carriers in Blood and Tissues*, ed. C. P. Mangum (Springer Verlag, Berlin Heidelberg), pp. 193-229.

Terwilliger N.B. and R.C. Terwilliger (1978). Oxygen binding domains of a clam (*Cardita borealis*) extracellular hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **537**: 77-85.

Terwilliger N.B. and R.C. Terwilliger (1984). Hemoglobin from the "pompeii worm", *Alvinella pompejana* an annelid from a deep sea hot hydrothermal vent environment. *Mar. Biol. Letters.*, **5**: 191-201.

Terwilliger N.B., R.C. Terwilliger and E. Schabtach (1976). The quaternary structure of a molluscan (*Helisoma trivolvis*) extracellular hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **453**: 101-110.

Terwilliger N.B., R.C. Terwilliger and E. Schabtach (1985). Intracellular respiratory proteins of Sipuncula, Echiura and Annelida. in *Blood cells of marine invertebrates: Experimental systems in cell biology and comparative physiology* (Alan R. Liss, Ins.) pp. 193-225.

Terwilliger R.C. (1974). Oxygen equilibria of the vascular and coelomic haemoglobins of the terebellid polychaete, *Pista pacifica*. Evidence for an oxygen transfer system. *Comp. Biochem. Physiol.*, **48A**: 745-755.

- Terwilliger R.C., N.B. Terwilliger and A.J. Arp** (1983). Thermal vent clam (*Calyptogena magnifica*) hemoglobin. *Science*, **219**: 981-983.
- Terwilliger R.C., N.B. Terwilliger, C. Bonaventura and J. Bonaventura** (1977). Oxygen binding domains of *Helisoma trivolvis* hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **494**: 416-425.
- Toulmond A.** (1973). Tide-related changes of blood respiratory variables in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Respir. Physiol.*, **19**: 130-144.
- Toulmond A.** (1985). Circulating respiratory pigments in marine animals. *Symp. Soc. exp. Biol.*, **39**: 163-206.
- Toulmond A.** (1989). Respiratory and metabolic adaptations of aquatic annelids to low environmental oxygen tensions. Woakes, M. K. Grieshaber and C. R. Bridges .
- Toulmond A.** (1990). Dioxygen binding by the extracellular hemoglobins of two deep-sea hydrothermal vent annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. in *Invertebrate Dioxygen Carriers*, eds. G. Preaux and R. Lontie (Leuven Univ. Press, Leuven), pp. 359-362.
- Toulmond A.** (1991). Respiratory and metabolic adaptations of aquatic annelids to low environmental oxygen tensions. in *Physiological strategies for gas exchange and metabolism*, eds. A. J. Woakes, M. K. Grieshaber and C. R. Bridges. Society for Experimental Biology, Vol. Seminar Series 41, pp. 191-210.
- Toulmond A.** (1992). Properties and functions of extracellular heme pigments. in *Blood and Tissues Oxygen Carriers*, ed. C. P. Mangum, pp. 231-256.
- Toulmond A., J. de Frescheville and C. Jouin** (1989). Extracellular hemoglobins of deep sea hydrothermal vent annelids. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **31**: 55.
- Toulmond A., F. El Idrissi Slitine, J. De Frescheville and C. Jouin** (1990). Extracellular hemoglobins of hydrothermal vent annelids: structural and functional characteristics in three alvinellid species. *Biol. Bull.*, **179**: 366-373.
- Toulmond A., F.H. Lallier, J. De Frescheville, D. Desbruyères, J.J. Childress, R. Lee and N.K. Sanders** (1994). Unusual carbon dioxide-combining properties of body fluids in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Deep-Sea Res.*, **41**: 1447-1456.

Truchot J.P. and F.H. Lallier (1998). High CO₂ content in hydrothermal vent water at the snake pit area, mid-Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar*, **39**: 153-158.

Tunnicliffe V., A.G. McArthur and D. McHugh (1998). A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna. in *Advances In Marine Biology*, V, eds. J. H. S. Blaxter, A. J. Southward and P. A. Tyler (Academic Press Ltd, London), Vol. 34, pp. 353-442.

Tyuma I., Y. Kamigawara and K. Imai (1973). pH dependence of the shape of the hemoglobin-oxygen equilibrium curve. *Biochim. Biophys. Acta*, **310**: 317-320.

V

Van Assendelft O.W. (1970). Spectrophotometry of haemoglobin derivatives (Royal Vangorcum Ltd, Assen).

Vinogradov S.N., O.H. Kapp and M. Ohtsuki (1982). The extracellular haemoglobins and chlorocruorins of annelids. J. Harris (Academic Press, New York).

Vinogradov S.N., J.M. Shlom, O.H. Kapp and P. Frossard (1980). The dissociation of annelid extracellular hemoglobins and their quaternary structure. *Comp. Biochem. Physiol.*, **67B**: 1-16.

Vinogradov S.N., D.A. Walz, B. Pohajdak, L. Moens, O.H. Kapp, T. Suzuki and C.N.A. Trotman (1993). Adventitious variability? The amino acid sequences of nonvertebrate globins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**: 1-26.

Vismann B. (1990). Sulfide detoxification and tolerance in *Nereis (Hediste) diversicolor* and *Nereis (Neanthes) virens* (Annelida: Polychaeta). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **59**: 229-239.

Völkel S. and M.K. Grieshaber (1996). Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina* - Evidence for alternative electron pathways. *Eur J Biochem*, **235**: 231-237.

Von Damm K.L. (1990). Seafloor hydrothermal activity: black smoker chemistry and chimneys. *Ann. Rev. Earth. Planet. Sci.*, **18**: 173-204.

W

- Weber R.E.** (1978a). Respiration. in *Physiology of Annelids*, ed. P. J. Mill (Academic Press, New York), pp. 369-392.
- Weber R.E.** (1978b). Respiratory pigments. in *Physiology of Annelids*, ed. P. J. Mill (Academic Press, New York), pp. 393-437.
- Weber R.E.** (1980). Functions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia. *Amer. Zool.*, **20**: 79-101.
- Weber R.E.** (1981). Cationic control of O₂ affinity in lugworm erythrocrucorin. *Nature*, **292**: 386-387.
- Weber R.E. and J. Baldwin** (1985). Blood and erythrocrucorin of the giant earthworm, *Megascolides australis*: respiratory characteristics and evidence for CO₂ facilitation of O₂ binding. *Mol. Physiol.*, **7**: 93-106.
- Weber R.E., G. Braunitzer and T. Kleinschmidt** (1985). Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II β , CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VII β , CTT IX and CTT X. *Comp. Biochem. Physiol.*, **80B**: 747-753.
- Weber R.E., C.P. Mangum, H. Steinman, C. Bonaventura, B. Sullivan and J. Bonaventura** (1977). Hemoglobin of two terebellid polychaetes: *Enoplobranchus sanguineus* and *Amphitrite ornata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **56A**: 179-187.
- Wells R.M.G. and R.P. Dales** (1975). Haemoglobin function in *Terebella lapidaria* L., an intertidal terebellid polychaete. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **55**: 211-220.
- Wells R.M.G., M.J. Hudson and T. Brittain** (1981). Function of the hemoglobin and the gas bubble in the backswimmer *Anisops assimilis* (Hemiptera: Notonectidae). *J. Comp. Biochem. Physiol. B*, **142**: 515-522.

- Wells R.M.G. and L.M. Warren** (1982). Oxygen binding of erythrocrucorin and coelomic cell haemoglobin from the terebellid polychaete *Neoamphitrite figulus* related to some environmental factors. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **62**: 373-384.
- Wittenberg J.B.** (1985). Oxygen supply to intracellular bacterial symbionts. *Bull. Biol. Soc. Wash.*, **6**: 301-310.
- Wittenberg J.B., R.J. Morris, Q.H. Gibson and M.L. Jones** (1981a). Hemoglobin kinetics of the Galápagos Rift vent worm *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophora: Vestimentifera). *Science*, **213**: 344-346.
- Wittenberg J.B., R.J. Morris, Q.H. Gibson and M.L. Jones** (1981b). Oxygen binding by hemoglobin of the Galápagos Rift vent worm *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophora: Vestimentifera). *Biochim. Biophys. Acta*, **670**: 255-259.
- Wittenberg J.B. and J.L. Stein** (1995). Hemoglobin in the symbiont-harboring gill of the marine gastropod *Alviniconcha hessleri*. *Biol. Bull.*, **188**: 5-7.
- Wyatt P.J.** (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta*, **272**: 1-40.

Z

- Zal F.** (1998). Sulphide-binding processes of *Riftia pachyptila* haemoglobins. *Cah Biol Mar*, **39**: 327-328.
- Zal F., B.N. Green, F.H. Lallier and A. Toulmond** (1997a). Investigation by electrospray ionization mass spectrometry of the extracellular hemoglobin from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*: an unusual hexagonal bilayer hemoglobin. *Biochemistry*, **36**: 11777-11786.
- Zal F., B.N. Green, F.H. Lallier, S.N. Vinogradov and A. Toulmond** (1997b). Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina* - A multi-angle-

laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. *Eur J Biochem*, **243**: 85-92.

Zal F., B. Kuster, B.N. Green, D.J. Harvey and F.H. Lallier (1998a). Partially glucose-capped oligosaccharides are found on the hemoglobins of the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*. *Glycobiology*, **8**: 663-673.

Zal F., F.H. Lallier, B.N. Green, S.N. Vinogradov and A. Toulmond (1996a). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* .2. Complete polypeptide chain composition investigated by maximum entropy analysis of mass spectra. *J Biol Chem*, **271**: 8875-8881.

Zal F., F.H. Lallier, J.S. Wall, S.N. Vinogradov and A. Toulmond (1996b). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* .1. Reexamination of the number and masses of its constituents. *J Biol Chem*, **271**: 8869-8874.

Zal F., E. Leize, F.H. Lallier, A. Toulmond, A. VanDorselaer and J.J. Childress (1998b). S-sulfohemoglobin and disulfide exchange: The mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 8997-9002.

Zal F., T. Suzuki, Y. Kawasaki, J.J. Childress, F.H. Lallier and A. Toulmond (1997c). Primary structure of the common polypeptide chain b from the multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: An insight on the sulfide binding-site. *Protein Struct Funct Genet*, **29**: 562-574.

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

<i>Figure</i>	<i>Titre abrégé</i>	<i>Page</i>
Figure I.1	Carte des sites hydrothermaux connus	3
Figure I.2	Schéma du fonctionnement d'une cellule hydrothermale	4
Figure I.3	Groupe de vestimentifères <i>Riftia pachyptila</i>	5
Figure I.4	Répartition des principales espèces hydrothermales	6
Figure I.5	Carte du Golfe du Mexique	7
Figure I.6	Vestimentifères du genre <i>Lamellibrachia</i>	8
Figure I.7	Photo mosaïque du site Brine Pool	8
Figure I.8	<i>Alvinella pompejana</i>	10
Figure I.9	<i>Branchipolynoe</i>	12
Figure I.10	Groupe d'Orbiniidés sur le site Brine Pool	13
Figure I.11	Schéma conceptuel des échanges gazeux	16
Figure II.1	Spécimen adulte de <i>Branchipolynoe symmytilida</i>	33
Figure II.2	Branchies de <i>Branchipolynoe</i> en MEB	34
Figure II.3	Branchies de <i>Branchipolynoe</i> en MET	37
Figure II.4	Détails de branchies de <i>Branchipolynoe</i> en MET	39
Figure II.5	Dessin de coupe transversale du corps de <i>Branchipolynoe</i>	40
Figure II.6	Morphologie générale de l'Orbiniidé	41
Figure II.7	Branchies de l'Orbiniidé en MEB	42
Figure II.8	Variation de la surface branchiale spécifique de l'Orbiniidé ...	43
Figure II.9	Montage mosaïc d'une coupe de branchie antérieure d'Orbiniidé	44
Figure II.10	Détails de branchie antérieure de l'Orbiniidé en MET	45
Figure II.11	Détails de branchie antérieure de l'Orbiniidé en MET	46
Figure II.12	Coupe de branchie postérieure de l'Orbiniidé	48
Figure II.13	Circulation sanguine chez l'Orbiniidé	49
Figure II.14	Système circulatoire de la partie antérieure d' <i>Alvinella pompejana</i>	50
Figure II.15	Structure comparée des différents types de branchie	51
Figure III.1	Structure d'une hémoglobine	59
Figure III.2	Evolution des gènes de globine et de leurs introns	60
Figure III.3	Présence de pigments respiratoires chez les familles d'annélides	63
Figure III.4	Principe d'une source électrospray	72
Figure III.5	Exemple de calcul de masse à partir d'un spectre multichargé	73
Figure III.6	Principe des mesures effectuées par spectrométrie de masse	75
Figure III.7	Principe du spectromètre de masse en tandem	77
Figure III.8	Etude des hémoglobines multidomaines par digestion ...	78
Figure III.9	Synthèse des ADNc par transcription inverse	81
Figure III.10	Principe de la RACE-PCR	84
Figure III.11	Purification des hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i>	90
Figure III.12	Analyse ESI-MS des hémoglobines majeures de <i>Branchipolynoe</i>	91
Figure III.13	Analyse de HbC2 en spectrométrie de masse en tandem	92
Figure III.14	Digestion de HbC1 par la subtilisine	94
Figure III.15	Spectres d'absorption UV/Visible des dérivés de HbC2	95
Figure III.16	Structure schématique des séquences d'ADNc obtenues	97
Figure III.17	Hybridation des ARNm de <i>Branchipolynoe</i>	98
Figure III.18	Phylogénie des séquences de globine obtenues entre elles	99

Figure III.19	Alignement des séquences protéiques déduites	100
Figure III.20	Alignement des globines de <i>Branchipolynoe</i> et d'autres annélides	101
Figure III.21	Arbre phylogénétique des globines	101
Figure III.22	Localisation des introns sur le gène 93	103
Figure III.23	Analyse ESI-MS de l'hémoglobine intracellulaire d' <i>Alvinella</i>	104
Figure III.24	Hémoglobine de 3,5 10 ⁶ Da de l'Orbiniidé en MET	104
Figure III.25	Analyse ESI-MS de l'hémoglobine de 3,5 10 ⁶ Da de l'Orbiniidé	105
Figure III.26	Modèle de structure des globines de l'Orbiniidé	105
Figure III.27	Modèle de structure des hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i>	111
Figure III.28	Modèle de structure quaternaire de HbC1 et HbC2	112
Figure III.29	Structure des gènes de quelques globines	115
Figure III.30	Mécanismes de formation d'une hémoglobine tétradomaine	116
Figure IV.1	Courbe théorique oxyrégulateur/oxyconformeur	121
Figure IV.2	Respiromètre utilisé pour l'Orbiniidé	130
Figure IV.3	Expérience de l'effet du CO ₂ sur les fluides corporels d' <i>Alvinella</i>	133
Figure IV.4	Schéma de la chambre à diffusion	134
Figure IV.5	Exemple de graphique de Hill	135
Figure IV.6	Respirométrie de l'Orbiniidé	138
Figure IV.7	Effet du poids sur la consommation en O ₂ chez l'Orbiniidé	139
Figure IV.8	Effet du poids sur la consommation en O ₂ chez <i>Branchipolynoe</i>	139
Figure IV.9	Variation du contenu en hémoglobine en fonction du poids	140
Figure IV.10	Titration du liquide coelomique de <i>Branchipolynoe</i>	141
Figure IV.11	Capacité d'accumulation du CO ₂ par le liq. coel. de <i>Branchipolynoe</i>	141
Figure IV.12	Effets du CO ₂ sur le liquide coelomique de <i>Branchipolynoe</i>	142
Figure IV.13	Effets du CO ₂ sur le pH des fluides corporels d' <i>Alvinella</i>	142
Figure IV.14	Propriétés fonctionnelles des hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i>	143
Figure IV.15	Effets du CO ₂ sur les hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i>	144
Figure IV.16	Propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine intracellulaire d' <i>Alvinella</i>	145
Figure IV.17	Propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine extracellulaire d' <i>Alvinella</i>	145
Figure IV.18	Propriétés fonctionnelles de l'hémoglobine de l'Orbiniidé	146
Figure IV.19	Graphique de Hill étendu de l'hémoglobine de l'Orbiniidé	147
Figure IV.20	Graphique d'Arrhenius pour l'hémoglobine de l'Orbiniidé	148
Figure IV.21	Effets du calcium sur l'hémoglobine de l'Orbiniidé	148
Figure IV.22	Survie de l'Orbiniidé en présence de sulfures et en anoxie	149
Figure IV.23	Modèle physiologique des transferts gazeux chez <i>Alvinella</i>	159
Figure IV.24	Résistance à l'anoxie et aux sulfures pour différents Polychètes	164

TABLEAUX

Tableau	Titre abrégé	Page
Tableau I.1	Caractéristiques physiques et chimiques du fluide hydrothermal	4
Tableau I.2	Environnement chimique des espèces étudiées	15
Tableau II.1	Liste des Polynoidés hydrothermaux	27
Tableau II.2	Surfaces branchiales des différentes espèces de <i>Branchipolynoe</i>	35
Tableau II.3	Comparaison des surfaces branchiales de différents polychètes	53
Tableau III.1	Hémoglobines extracellulaires chez les animaux	62
Tableau III.2	Masses natives et sous-unités des hémoglobines de <i>Branchipolynoe</i>	92
Tableau III.3	Différences de masse entrépéiques (spectrométrie de masse en tandem)	93
Tableau III.4	Caractéristiques spectrophotométriques des dérivés de HbC1 et HbC2	95

Tableau III.5	Contenu en acide aminés de HbC1, HbC2 et HbC3	96
Tableau III.6	Sous-unités de l'hémoglobine de l'Orbiniidé	106
Tableau IV.1	Caractéristiques fonctionnelles de HbC1 et HbC2 de <i>Branchipolynoe</i>	144
Tableau IV.2	Caractéristiques fonctionnelles des hémoglobines d' <i>Alvinella</i>	146
Tableau IV.3	Paramètre du modèle MWC pour l'hémoglobine de l'Orbiniidé	148