

Écologie / Ecology
**Adaptation des organismes aux conditions extrêmes
des sources hydrothermales marines profondes**

Zoran Minic *, Valérie Serre, Guy Hervé *

*Laboratoire de biochimie des signaux régulateurs cellulaires et moléculaires, FRE 2621, CNRS, université Pierre-et-Marie-Curie (Paris-6),
96, bd Raspail, 75006 Paris, France*

Reçu le 25 janvier 2006 ; accepté après révision le 8 février 2006

Disponible sur Internet le 29 mars 2006

Présenté par Jean Rosa

Résumé

Les sources hydrothermales profondes sont situées à l'axe des dorsales volcaniques du fond des océans et sont caractérisées par des conditions physico-chimiques extrêmes et variables (température, pression), la présence de molécules toxiques ainsi que l'absence de carbone organique fournie par la photosynthèse. Cependant, la vie existe dans ces environnements. Les producteurs primaires d'énergie et de molécules organiques dans ces chaînes alimentaires sont les bactéries chimiolithoautotrophes. De nombreuses espèces d'animaux vivent en symbiose intime et complexe avec ces bactéries sulfo-oxydantes ou méthanogènes. Ces symbioses impliquent une stratégie de nutrition et une organisation métabolique spécifique, mettant en jeu de nombreuses interactions et échanges métaboliques, entre les deux partenaires. Les organismes de ces écosystèmes ont développé différentes stratégies d'adaptation. Dans cet environnement, de nombreux micro-organismes sont adaptés aux hautes températures. De plus, pour survivre dans ces environnements, ils ont développé différentes stratégies pour se protéger de molécules toxiques telles que l'H₂S et les métaux lourds. **Pour citer cet article : Z. Minic et al., C. R. Biologies 329 (2006).**

© 2006 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Adaptation of organisms to extreme conditions of deep-sea hydrothermal vents. The deep-sea hydrothermal vents are located along the volcanic ridges and are characterized by extreme conditions such as unique physical properties (temperature, pressure), chemical toxicity, and absence of photosynthesis. However, life exists in these particular environments. The primary producers of energy and organic molecules in these biotopes are chemolithoautotrophic bacteria. Many animals species live in intimate and complex symbiosis with these sulfo-oxidizing and methanogene bacteria. These symbioses imply a strategy of nutrition and a specific metabolic organization involving numerous interactions and metabolic exchanges, between partners. The organisms of these ecosystems have developed different adaptive strategies. In these environments many microorganisms are adapted to high temperatures. Moreover to survive in these environments, living organisms have developed various strategies to protect themselves against toxic molecules such as H₂S and heavy metals. **To cite this article: Z. Minic et al., C. R. Biologies 329 (2006).**

© 2006 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Sources hydrothermales profondes ; Symbiose ; Adaptation ; Chimiolithoautotrophie ; Assimilation ; Métaux lourds ; Extrémophiles

Keywords : Deep-sea hydrothermal vents; Symbiosis; Adaptation; Chemolithoautotrophy; Assimilation; Heavy metals; Extremophiles

* Auteurs correspondants.

Adresses e-mail : zoranminic@yahoo.fr (Z. Minic), gserve@ccr.jussieu.fr (G. Hervé).

Abridged English version

In 1977, geologists discovered an abundant deep-sea life community at a depth of 2.5 km around a hot spring on the Galapagos volcanic Rift (spreading ridge) off the coast of Ecuador. Since then, numerous vents sheltering rich living biotopes were discovered and explored along the volcanic ridges in the Atlantic and Pacific oceans. These hydrothermal vents are characterized by unique physical and chemical properties such as elevated pressure (up to 420 atm), high and rapidly changing temperature (from 2–4 °C to 400 °C), chemical toxicity and complete absence of light. However, numerous living organisms were discovered in these hostile environments including microorganisms and pluricellular organisms such as shrimps, clams and giant mussels, giant tubeworms, crabs and fishes. These ecosystems differ from those already known on the planet and some of their living organisms are regarded as new species. These organisms have developed different strategies which ensure their adaptation to these extreme environments. In the total absence of photosynthesis, the food chain is based on primary production of energy and organic molecules by chimiolithoautotrophic bacteria. These bacteria are able to extract chemical energy starting from the oxidation of reduced mineral compounds present in their habitat. This process involves an electron transfer chain associated to a Calvin–Benson cycle for carbon fixation and ATP production. The small organic molecules synthesized are provided to a series of animal species, which live in an obligate symbiosis with these chemosynthetic bacteria (clams, mussels, gastropods and vestimentiferan tubeworms). Nitrogen assimilation involves enzymes such as nitrate reductase, glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and carbamylphosphate synthetase, which are present in one or the two partners. Among the vestimentiferans (*Siboglinidae annelide polychaete*) present in the East Pacific Ridge, *Riftia pachyptila* is the most representative and constitutes a particularly interesting model to study symbiosis and biological adaptation to the deep-sea extreme environment. In this tubeworm, studies of pyrimidine nucleotides and arginine metabolisms revealed particular modes of molecular and physiological adaptation to these extremes conditions. The symbiosis between *Riftia* and its specific bacterial endosymbiont involves a complex metabolic organization and exchange of numerous metabolites. The hydrogen sulphide (H₂S) and heavy metals (Pb, Cd, Hg, Zn...) present in high concentrations in the hydrothermal vents are toxic compounds for the living organisms. The organisms of this ecosystem developed efficient mecha-

nisms of defence to protect themselves from these toxic molecules. Several mechanisms of protection and tolerance to the toxic effects of H₂S were proposed to explain the adaptation to the habitat rich in sulphides: impermeability to sulphides, existence of cytochrome C oxydases insensitive to H₂S, reversible fixation with compounds of blood (others than haemoglobin) or the presence of oxidation systems. Some mechanisms of protection and tolerance to the heavy metals were proposed as well. For example, some proteins naturally present in many organisms in deep-sea environment: the metallothionines, have the aptitude to bind heavy metals, thus ensuring protection against their toxic effects. Many thermophilic and hyperthermophilic bacteria and archaea live inside or in the vicinity of the vents at temperatures which can exceed 100 °C. The *Archae Pyrolobus fumari* can grow at 113 °C with an optimal temperature of growth at 106 °C. The adaptation of these microorganisms implies many modifications of their biochemical components (proteins and enzymes, membranes and nucleic acids) as well as other physiological modes of adaptation. Finally, biomolecules from these organisms might be of value for different biotechnological and medical strategies.

1. Introduction

Les océans couvrent plus de 66% de la surface de la Terre. Leur profondeur moyenne est de 3800 m. À partir de 200 m de profondeur, l'obscurité est totale et la photosynthèse est impossible. Du fait de cette absence, on pouvait penser qu'aucune vie n'était possible dans cette partie obscure de la biosphère. Cependant, l'expédition océanographique britannique du *Challenger* (1872–1876) démontra que la vie existe à des profondeurs pouvant atteindre 5200 m [1]. À la suite de cette campagne, d'autres expéditions se sont succédé : américaines, allemandes, hollandaises, françaises, russes et japonaises. Elles ont toutes démontré la présence de la vie dans les grandes profondeurs océaniques.

Sur les continents, les plantes jouent un rôle primordial pour l'ensemble de la chaîne alimentaire. En tant que « productrices primaires », elles fournissent la matière organique obtenue par photosynthèse, au reste de cette chaîne. Dans la zone océanique superficielle, la production primaire de carbone organique provient également de la photosynthèse par différents organismes tels que les micro-algues, microphytoplancton et picophytoplancton [2–4]. Dans les zones profondes, à l'écart des zones volcaniques, en l'absence de lumière, une chaîne alimentaire peu abondante repose sur le flux de carbone organique synthétisé en surface par photosyn-

thèse. Une partie de cette matière organique est recyclée, l'autre est sédimentée. Lors de leur descente vers le fond, les déjections et les cadavres d'organismes sont dégradés par des micro-organismes. Seule une petite fraction atteint le fond de l'océan, et nourrit les animaux détritivores (bactéries et mycètes) et filtreurs [3]. En règle générale, la biomasse décroît avec la profondeur et l'éloignement des côtes. Toutefois, on sait maintenant qu'il existe, dans les grandes profondeurs océaniques, dans l'environnement des sources hydrothermales profondes, ainsi que dans d'autres zones de l'océan, comme les suintements froids situés sur les marges continentales, des habitats peuplés de nombreuses espèces d'organismes, constituant des écosystèmes indépendants du reste de la biosphère.

2. Les sources hydrothermales profondes

En 1977, à l'aide du sous-marin de recherche Alvin, les géologues ont découvert sur une dorsale de l'océan Pacifique à 2600 m de profondeur, au contact de sources hydrothermales chaudes, une population riche d'organismes divers [5,6]. À partir de 1979, de nombreuses expéditions de biologistes et géologues se sont succédé pour l'exploration systématique de ces dorsales océaniques. Au début, l'exploration a été ciblée sur le Pacifique oriental et occidental [7] et, ultérieu-

rement (1985), la dorsale médio-atlantique puis la dorsale indienne ont également été explorées [8] (Fig. 1). Il semble que l'existence de biotopes hydrothermaux soit un phénomène universel, bien que des communautés animales n'aient pas encore été trouvées, à l'heure actuelle, au niveau de toutes les dorsales océaniques et en particulier dans les hautes latitudes. Toutefois, de nombreuses régions de ces dorsales restent à explorer (Fig. 1). Au cours des vingt dernières années, des spécimens ont été récoltés sur l'ensemble des zones explorées et de nombreux nouveaux taxons ont été décrits.

2.1. Formation des sources hydrothermales chaudes

L'origine des sources hydrothermales profondes est une conséquence de la dérive des continents. La surface du globe est divisée en sept plaques de croûte terrestre principales rigides et en une série de plaques, plus petites, qui sont en mouvements et s'écartent les unes des autres [9]. Ces plaques sont séparées par des dorsales divisées en de multiples segments séparés par des zones de fracture (Fig. 1). La vitesse d'expansion des segments de dorsale varie de 1 à 280 mm par an. La zone de fracture est caractérisée par une très forte activité volcanique. La coulée de lave monte en surface, se refroidit et se solidifie. Ces sites sont le siège des principales manifestations hydrothermales. L'eau de mer s'infiltr

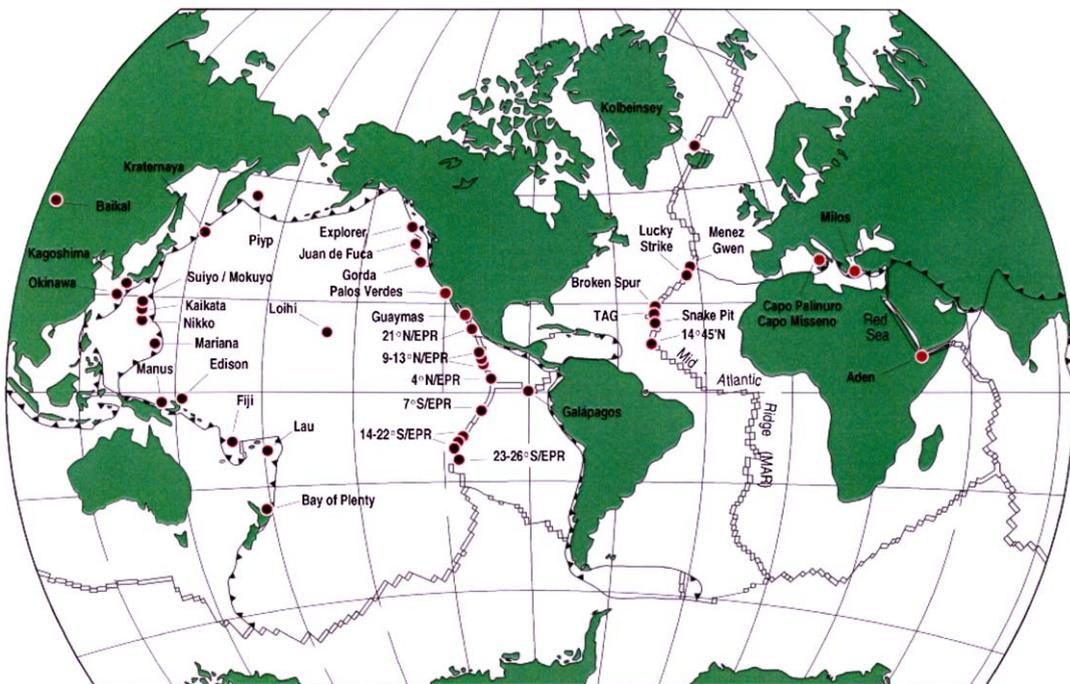


Fig. 1. Représentation schématique des dorsales de zones hydrothermales. Les points représentent les zones explorées (cliché Ifremer, avec permission).

dans les fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique (ou roches profondes du manteau ou ultramafiques) en fusion, pouvant atteindre des températures très élevées (jusqu'à 400 °C) puis, par d'autres fissures, remonte en surface. Ce fluide hydrothermal est riche en composés réduits tels que H_2S , CH_4 , NH_4^+ ainsi qu'en éléments métalliques tels que Mn^{2+} , Fe^{2+} , Li^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} [7,10,11]. Le mélange de ce fluide avec l'eau de mer froide (2 °C) provoque la précipitation de divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, origine des « fumeurs » (Fig. 2A) et « diffuseurs », qui constituent progressivement les cheminées hydrothermales [12] (Fig. 2B).

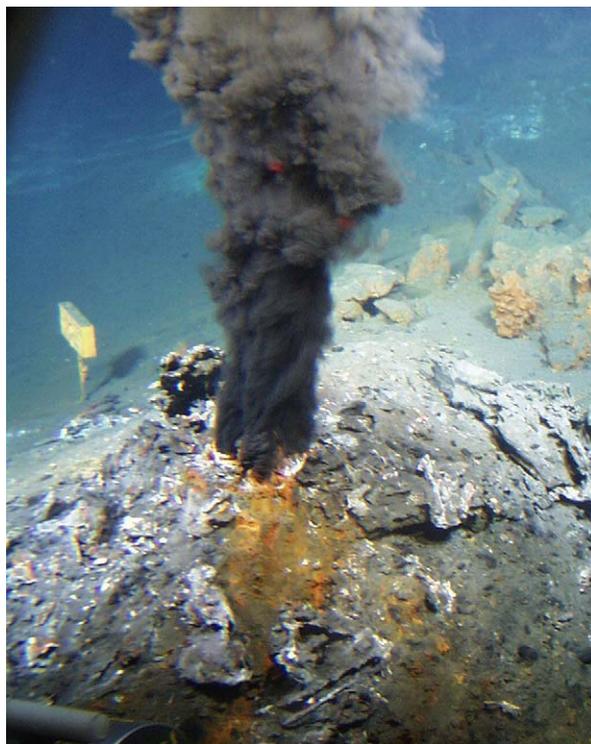
C'est dans cette zone de mélange turbulent, entre le fluide hydrothermal toxique surchauffé et l'eau de mer oxygénée et froide, que se développe la vie hydrothermale [13,14].

2.2. Organismes des sources hydrothermales chaudes

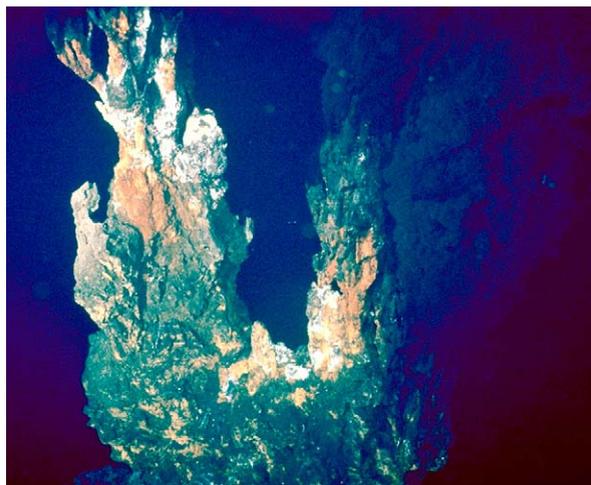
Les animaux se répartissent autour des cheminées hydrothermales en fonction de leur capacité à s'adapter et supporter la température et la toxicité des composés présents dans le fluide, ainsi que de leurs adaptations trophiques. Les recherches des biologistes ont montré que près de 90% des espèces, présentes dans ces zones de mélange, sont endémiques aux sources hydrothermales [13]. Dans la faune associée aux dorsales du Pacifique, on trouve des espèces appartenant aux Annélides, Galathées, Vestimentifères, Bivalves, Crustacés et Poissons [7,13] (Fig. 3). La faune associée à la dorsale médio-atlantique est dominée par des Bivalves, Crevettes, Clams, Crustacés, Poissons, Gastéropodes, Mollusques, etc. [8,15] (Fig. 4). La découverte de ces communautés d'organismes a suscité de nombreuses interrogations. Parmi celles-ci : comment de tels peuplements de biomasse très élevée peuvent-ils se développer dans un monde sans lumière, où la matière organique disponible est a priori très faible ? Un élément de réponse a été rapidement apporté par la découverte de bactéries chimioautotrophes, libres ou associées de façon plus ou moins étroite à certains de ces organismes [7,14]. Ces bactéries assurent une production primaire d'énergie et de matière organique abondante, sur laquelle reposent entièrement ces biotopes [16,17].

3. Les bactéries des sources hydrothermales profondes

Autour des sources hydrothermales, la température varie selon un gradient fluctuant, où se retrouvent différentes populations de bactéries. Certaines se dévelop-



(A)



(B)

Fig. 2. Cheminées hydrothermales : (A) fumeurs noirs, dorsale pacifique, mission Hope-99, 13 °N EPR, 2600 m ; (B) fumeur noir, dorsale atlantique, Açores, mission Pico, site Menez Gwen, 850 m (photos Ifremer, avec permission).

pent à la température normale du fond des mers à environ 2 °C (bactéries psychrophiles adaptées au froid), d'autres, les mésophiles, à des températures moyennes (10–30 °C) ; enfin, certaines souches, dites thermophiles ou hyperthermophiles, se développent aux alentours de 60 °C et 100 °C respectivement [18]. On y trouve, par



(A)



(B)

Fig. 3. Les communautés animales autour des sources hydrothermales de la dorsale du Pacifique oriental. (A) massif de vers siboglinidés *Riftia pachyptila* avec crustacés galathées et poissons zoarcidae, mission Phare, 13 °N EPR ; (B) massif de vers polychètes *Alvinellidae* mission Phare, 13 °N EPR, 2600 m (photos Ifremer, avec permission).

exemple, l'*Archaea Pyrococcus abyssi*, qui peut se développer jusqu'à 106 °C, et *Pyrolobus fumarii*, qui peut se développer à 113 °C [19]. Récemment on a découvert un autre micro-organisme, « souche 121 », capable de se développer à 121 °C [20].

La plupart des bactéries de ces écosystèmes sont des *Archaea*. Ces micro-organismes présentent diverses caractéristiques spécifiques concernant notamment l'ARN ribosomal, les lipides, l'architecture membranaires et l'ADN, qui diffèrent de celles connues chez les autres organismes vivants procaryotes et eucaryotes. Selon la classification actuelle, les *Archaea* constituent un groupe indépendant des *Bacteria* et des *Eucarya*. Sur la base d'arguments de génétique et de biologie moléculaire, certains auteurs considèrent les archaebactéries



(A)



(B)

Fig. 4. Les communautés animales autour des sources hydrothermales de la dorsale médio-atlantique. (A) bivalves *Bathymodiolus azoricus*, campagne Atos, site Menez Gwen, 850 m ; (B) crevettes *Rimicaris exoculata* sur des fumeurs noirs du site Rainbow, campagne Atos, 2300 m (photos Ifremer, avec permission).

thermophiles, qui se sont développées près des sources hydrothermales marines, comme des espèces primitives [21,22]. Il a été suggéré que la vie était apparue dans l'environnement de sources chaudes volcaniques, en particulier au fond des océans. Il est postulé que les conditions chimiques des sources chaudes volcaniques sont voisines de celles de l'époque prébiotique, où la vie est apparue sur terre. Les premiers micro-organismes auraient utilisé l'énergie et des substrats minéraux provenant des volcans.

3.1. Les producteurs primaires : bactéries chimioautotrophes

La vie dépend de l'énergie et, de ce point de vue, on distingue deux grands types autotrophes (*trophos* =

«nourrir» en grec) : les «phototrophes» qui utilisent l'énergie lumineuse du soleil pour réaliser leurs synthèses et les «chimiotrophes» qui utilisent l'énergie chimique de leurs aliments. En l'absence de lumière, de nombreuses bactéries des sources hydrothermales chaudes sont chimiotrophes et ceux de ces organismes qui utilisent les minéraux sont «chimiolithotrophes». En conséquence, la chaîne alimentaire de ces environnements repose sur une production primaire bacterio-chimiolithoautotrophe d'énergie et de molécules organiques [16].

Dans les écosystèmes des sources hydrothermales profondes, on trouve des bactéries de type sulfo-oxydantes (*Beggiatoa*, *Pyrodictium*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Thiothrix*) [23,24], des bactéries sulfatoréductrices (*Archaeoglobus*) [25], des bactéries méthanogènes (*Methanococcus*) [26] et quelques autres ayant des actions nitrifiantes, dénitrifiantes ou encore manganooxydantes.

Sur la base de la présence en quantité importante de sulfures dans ces environnements, les bactéries sulfo-oxydantes sont indispensables pour la production primaire [17,27–29]. Ces bactéries oxydent l'hydrogène sulfuré (H_2S) en soufre élémentaire (S^0), qui s'accumule dans les cellules sous forme de granules. Lorsque le soufre exogène est épuisé, ces granules sont secondairement oxydés en sulfates. Ce sont souvent ces bactéries sulfo-oxydantes que l'on trouve associées en relation symbiotique avec d'autres organismes de ces sources hydrothermales, organismes dont la survie est impossible sans cette symbiose intime [30].

4. Symbiose : adaptation physiologique

L'ensemble des organismes consommateurs primaires (utilisant directement l'énergie et les substances organiques fournies par les producteurs primaires) représente une biomasse très importante qui constitue, à son tour, une production secondaire conséquente pour les prédateurs et nécrophages [31]. Les espèces les plus abondantes sont celles qui sont en relation symbiotique avec les bactéries chimiolithoautotrophes. On trouve ces bactéries en symbiose avec des groupes d'organismes tels que vers tubicoles (*Riftia pachyptila*), mollusques (*Calyptogena magnifica*), modioles (*Bathymodiolus thermophilus*), crevettes et autres organismes [7,10,13,14,32–34].

Les vers tubicoles symbiotiques appartiennent à la classe des Vestimentifères (*Siboglinidae*) qui sont bien adaptés dans cet environnement [35]. Parmi ces Vestimentifères, *Riftia pachyptila* est un ver très abondant autour des sources volcaniques de la dorsale du Pacifique

oriental [6] (Fig. 3A). Il vit spécifiquement au contact des sources hydrothermales et il peut atteindre une dimension de 1 à 1,5 m de long. C'est un organisme qui constitue, pour les biologistes, un excellent modèle en termes d'adaptation, de symbiose et de physiologie. Ce ver vit dans un tube dont il synthétise les constituants. Il est dépourvu de tractus digestif et son existence repose, de manière absolue, sur la symbiose avec une bactérie endosymbiotique, appartenant au groupe des γ protéobactéries [28]. Cette bactérie endosymbiote est localisée, en quantité importante, dans les cellules appelées bactériocytes qui sont localisées dans l'organe du ver appelé trophosome [36]. *Riftia* possède un système branchial très efficace, le panache, au niveau duquel se fait l'absorption des éléments nutritifs minéraux nécessaires (O_2 , CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- ...) et les sulfures, tous ces éléments étant apportés aux bactéries par le système circulatoire du ver [17,37,38]. Ces bactéries endosymbiotes sont des autotrophes qui tirent l'énergie de l'oxydation des sulfures. L'énergie, ainsi extraite sous forme d'ATP, leur sert à convertir le carbone minéral en carbone organique (Fig. 5). Ce dernier est alors fourni au ver sous forme de petites molécules carbonées organiques qui vont lui permettre de produire son propre ATP. Ainsi, la vie du ver dépend, de manière absolue, de la présence de la bactérie qui lui est spécifique. Cette dernière n'a, jusqu'ici, jamais pu être mise en culture.

Le système circulatoire du ver constitue la connexion entre l'environnement extérieur du ver et les bactéries endosymbiotiques. Dans le sang de *Riftia*, de nombreuses molécules sont transportées, d'une part les métabolites minéraux provenant du milieu extérieur et, d'autre part, de nombreux métabolites échangés par les deux partenaires. Peu de choses sont connues de ces échanges métaboliques et des molécules transportées [39,40]. Les méthodologies modernes d'analyse protéomique et d'analyse du métabolome devraient fournir des informations sur les aspects métabolique et physiologique de cette symbiose.

4.1. Mécanisme d'assimilation du carbone et de l'azote

Étant donné l'importance de la biomasse provenant de la symbiose avec les bactéries chimiolithoautotrophes autour des sources hydrothermales profondes [31], ces bactéries ont besoin d'une grande quantité de composés minéraux carbonés et azotés. La concentration de dioxyde de carbone dans cet environnement est environ de 5 mM [41–43]. En ce qui concerne les molécules inorganiques azotées, l'ammonium et le nitrate

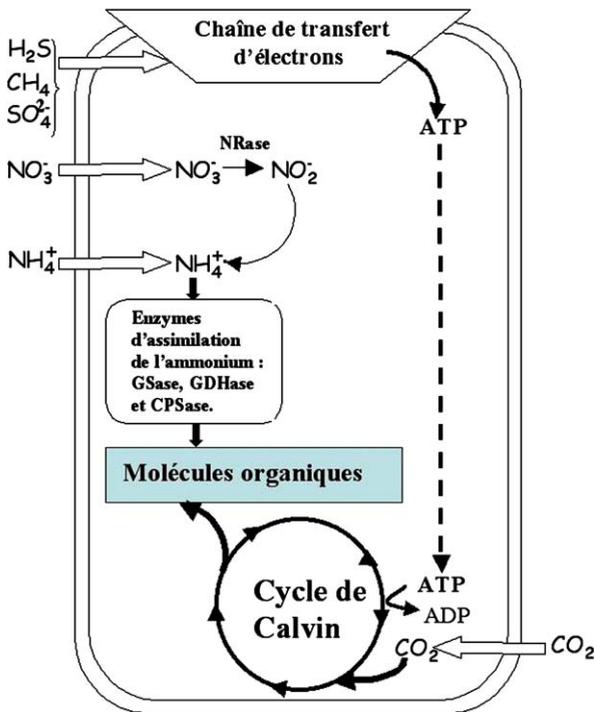


Fig. 5. Représentation schématique générale de respiration et d'assimilation du carbone et de l'azote inorganique chez les bactéries chimioautotrophes. La figure représente la relation entre la production d'énergie par le système de transport des électrons et les voies d'assimilation du carbone (cycle de Calvin) et de l'azote. Les bactéries chimioautotrophes produisent l'énergie à partir des minéraux (comme H_2S , CH_4 , SO_4^{2-} , etc.). L'assimilation de CO_2 est effectuée par le cycle de Calvin Benson. Le NH_3 peut venir directement du milieu extérieur ou peut être le résultat de la réduction du nitrate par des enzymes d'assimilation comme la nitrate réductase et la nitrite réductase. Le NH_3 peut être assimilé par les différentes enzymes comme la glutamine synthétase (GSase), la glutamate déhydrogénase (GDHase) ou la carbamylphosphate synthétase (CPSase). Le carbone et l'azote assimilés sont utilisés ensuite pour la biosynthèse des métabolites organiques nécessaires à la biosynthèse des biomacromolécules : acides nucléiques, protéines et lipides.

sont présents à des concentrations de $40 \mu\text{M}$ et 1 mM respectivement [44].

4.1.1. Assimilation du carbone

Les bactéries endosymbiotiques sont capables de fixer le gaz carbonique, de la même manière que les plantes terrestres, *via* les réactions biochimiques du cycle de Calvin Benson (Fig. 5). Les enzymes du cycle de Calvin ont été mises en évidence et caractérisées dans les bactéries des sources hydrothermales [17,27, 45–48]. Le cycle de Calvin consomme une énergie considérable puisque l'incorporation d'une molécule de CO_2 dans le cycle requiert trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH. Pour cette raison, les bactéries

endosymbiotiques (chimioautotrophes) doivent oxyder une grande quantité de H_2S pour se développer.

4.1.2. Assimilation de l'azote

Sur la base de la connaissance générale de l'assimilation de l'azote, l'ammonium peut provenir directement de l'environnement extérieur ou résulter de la conversion du nitrate en nitrite par la nitrate réductase (NRase) (Fig. 5), suivie par la transformation de ce nitrite par la nitrite réductase en ammonium. La nitrate réductase a été identifiée et étudiée chez les bactéries endosymbiotiques de *Riftia pachyptila*, *Tevnia jerichonana*, *Calymmatobacter magna*, *Bathymodiolus thermophilus* et *Solemia velum* [38,49–53]. En ce qui concerne les enzymes de l'assimilation de l'ammonium, la glutamine synthétase (GSase) et la glutamate déhydrogénase (GDHase) ont également été mises en évidence chez ces bactéries [49]. Les résultats obtenus montrent que ces enzymes sont présentes aussi dans les tissus de l'hôte. L'ammonium peut également être assimilé par la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques et de l'arginine *via* la carbamylphosphate synthétase (CPSase). Cette dernière voie d'assimilation de l'azote et du carbone a été particulièrement étudiée dans le cas de *Riftia pachyptila* [53].

4.1.3. Le métabolisme des pyrimidines et de l'arginine chez *Riftia pachyptila*

Les résultats de ces recherches ont montré que, chez *Riftia pachyptila*, les trois premières enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides pyrimidiques (carbamylphosphate synthétase, aspartate transcarbamylase et dihydroorotase) ne sont présentes que dans la bactérie symbiotique [51]. Les enzymes qui suivent (dihydroorotase déhydrogénase, orotate phosphoribosyltransférase) et le dernier de cette voie métabolique (CTP synthétase) sont présents à la fois dans la bactérie et dans les cellules de l'hôte. La voie de récupération des bases est présente seulement dans les cellules de l'hôte [54]. Ces conclusions impliquent que les cellules du ver ne sont capables de synthétiser les bases pyrimidiques qu'à partir des métabolites d'origine bactérienne qui proviennent des cellules du trophosome et sont transportés par la circulation sanguine du ver. L'étude des enzymes du catabolisme des nucléotides pyrimidiques a montré que celles-ci sont présentes uniquement dans les différents tissus du ver et aucune activité de ces enzymes n'a été pas détectée dans les extraits de bactéries isolées [54]. Une étude récente montre que chez *Riftia* le contenu cellulaire de la bactérie symbiotique peut être libéré par lyse de

cette bactérie dans le trophosome [55]. Pour le ver, ceci peut représenter une source alternative de métabolites, y compris de bases pyrimidiques. Pour la bactérie, la voie *de novo* de biosynthèse des bases pyrimidiques est la seule route vers la synthèse des pyrimidines.

En ce qui concerne le métabolisme de l'arginine, les trois premières enzymes de la voie de biosynthèse de cet acide aminé (carbamylophosphate synthétase ammonium dépendante, ornithine transcarbamylyase et arginosuccinate synthétase) sont présentes chez l'hôte et dans la bactérie symbiotique [56]. Ceci indique que tous les tissus de *Riftia* peuvent assimiler le carbone et l'azote inorganique par cette voie. Sur cette base, on peut conclure que l'arginine est un acide aminé non essentiel pour *Riftia*.

Une utilisation métabolique importante de l'arginine et de l'ornithine est la synthèse des polyamines qui passe par la formation d'agmatine et de putrescine par les enzymes arginine décarboxylase et ornithine décarboxylase. Dans tous les organismes vivants, y compris les virus, les polyamines jouent un rôle majeur dans la biosynthèse et la maintenance de la structure des acides nucléiques et dans beaucoup de processus biologiques comme la stabilité membranaire, le développement et la croissance [57,58]. Il apparaît que chez *Riftia*, l'arginine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase sont présentes uniquement dans la bactérie endosymbiotique [56]. L'absence de ces enzymes chez le ver suggère fortement que *Riftia* est dépendant de sa bactérie endosymbiotique pour ces synthèses. L'agmatine et la putrescine, synthétisées par la bactérie au sein du trophosome, devraient être transportées dans les autres tissus du ver. Par ailleurs, ces polyamines peuvent y être dégradées, et par conséquent, constituer une source complémentaire de carbone et d'azote [56].

L'absence d'activité de l'arginine décarboxylase et de l'ornithine décarboxylase a aussi été rapportée dans le cas de vers parasites humains et animaux comme *Dirofilaria immitis*, *Brugia pateri* et *Litomosoides* [59]. Par ailleurs, l'absence des trois premières enzymes de la voie de biosynthèse des pyrimidines (carbamylophosphate synthétase, aspartate transcarbamylyase et dihydroorotase) est aussi une caractéristique des parasites protozoaires tels que *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* et *Tritrichomonas fetus* [51,54]. Il semble donc que *Riftia* ait développé un métabolisme des bases pyrimidiques et des polyamines qui ressemble à celui qui est observé chez certains parasites, ce qui suggère une ressemblance d'adaptation des voies métaboliques dans la symbiose et le parasitisme.

5. Systeme de protection contre les produits chimiques toxiques

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) et les métaux lourds (Pb, Cd, Hg, Zn...) présents en forte concentration dans les effluents des sources hydrothermales profondes sont des composés toxiques pour les organismes vivants. Les organismes de cet écosystème ont développé des mécanismes de défense efficaces pour se protéger de ces molécules toxiques.

5.1. Stratégies de protection contre H_2S

Du fait de son pouvoir réducteur et de sa capacité à réagir avec de nombreux composants cellulaires (groupes sulfhydryles des protéines, cations, etc.), le H_2S est un composé toxique. Il inhibe en particulier les métalloprotéines comme la cytochrome-c oxydase et les hémoglobines [60].

Plusieurs mécanismes de protection et de tolérance aux effets toxiques de H_2S ont été proposés pour expliquer l'adaptation aux milieux riches en sulfures : l'imperméabilité aux sulfures, l'existence de cytochrome c oxydases insensibles à H_2S , la fixation réversible à des composés du sang (autres que l'hémoglobine) ou la présence de systèmes d'oxydation. Par exemple, les hématines (hème libre avec un hydroxyle lié au fer) sont des molécules qui ont la capacité de catalyser l'oxydation des sulfures. Les hématines ont été identifiées dans les tissus de l'annélide polychète *Arenicola marina* ainsi que chez l'échiurière *Urechis caupo* (phylogénétiquement très proche des Annélides) [61]. Chez ce dernier organisme, on trouve de petits organites contenant des sulfures, les SOB (*sulfo oxidizing bodies*) qui présentent des capacités d'oxydation de ces sulfures [61,62]. Certains organismes comme le bivalve *Solemya reidi* peuvent oxyder les sulfures en thiosulfate au niveau des mitochondries. La même caractéristique a été observée chez d'autres organismes tels que la moule, certains poissons, annélides polychètes et préapuliers [63].

La présence et le métabolisme des bactéries sulfuroxydantes endosymbiotiques est un moyen indirect de détoxification de l'organisme par la respiration de l' H_2S , oxydé en sulfate qui n'est pas toxique. Chez les Annélides, l' H_2S doit être transporté par la voie circulatoire aux organes contenant la bactérie, sans intoxication de l'organisme. Ce problème chez ces organismes a été résolu par la présence d'hémoglobines de haut poids moléculaire, qui transportent non seulement l'oxygène mais également les sulfures indispensables à la bactérie [64–66]. On trouve trois types d'hémoglobines chez les Annélides : des hémoglobines non-circulantes cytoplas-

miques, des hémoglobines circulantes intracellulaires et extracellulaires dans le coelome et le réseau vasculaire respectivement [67]. *Riftia pachyptila* possède trois hémoglobines extracellulaires capables de lier réversiblement, sur deux sites différents, l'oxygène et le sulfure d'hydrogène qui, de cette manière, ne peut pas être directement oxydé par O₂ [68].

5.2. Stratégies de protection contre les métaux lourds

Certains métaux et métalloïdes présents dans certains biotopes, à des concentrations extrêmement faibles, se trouvent dans les fluides hydrothermaux, à des concentrations nettement plus élevées que celles généralement observées dans l'eau de mer [69,70]. Les teneurs en éléments métalliques des fluides hydrothermaux subissent des variations quantitatives importantes en fonction des sites, qui sont à relier à la nature chimique des roches sous-jacentes et à la dynamique propre à chaque système hydrothermal (variabilité dans la direction des courants, des intensités au voisinage des cheminées actives et pression hydrostatique) [71]. À ce jour, un certain nombre d'informations ont été publiées concernant les interactions entre la richesse métallique des sources hydrothermales et leur faune associée [72,73].

Chez les mollusques bivalves marins, deux types de structures anatomiques sont considérées comme des cibles préférentielles pour l'accumulation des métaux : celles qui sont directement exposées au milieu (branchies, tractus digestif) et celles qui participent au transport et au métabolisme des métaux dans l'organisme (glandes digestives, organes excréteurs) [74]. Le franchissement des barrières membranaires est un mécanisme naturel pour les métaux essentiels (zinc, cuivre). Les ions métalliques, composés hydrophiles, doivent se combiner avec des ligands pour former des complexes apolaires ou des structures électriquement neutres, afin de franchir la membrane lipidique de nature hydrophobe. Les possibilités d'utiliser les mécanismes de transport actif ou d'être incorporés par endocytose constituent d'autres voies de pénétration. Les métaux toxiques, grâce à des phénomènes de compétition avec les métaux essentiels, empruntent les mêmes voies. La barrière membranaire franchie, le métal exogène va réagir avec des ligands intracellulaires pour lesquels il présente une affinité. Concernant *Riftia pachyptila*, la branchie qui baigne directement dans le milieu ambiant est exposée aux molécules organiques ou minérales dissoutes et aux particules en suspension. Les métaux lourds peuvent donc être absorbés sur les filaments branchiaux ou franchir les barrières membranaires et pénétrer dans l'organisme [75].

Il existe des protéines naturellement présentes chez de nombreux organismes, les métallothionéines, dont l'aptitude à complexer les métaux a été démontrée [76, 77]. Il est aussi admis que ces protéines interviennent de façon importante dans les mécanismes de détoxification des métaux [74]. Elles constituent donc un moyen de protection contre les effets toxiques de métaux non essentiels (cadmium, mercure). Ces protéines existent sous de nombreuses isoformes. Elles diffèrent entre elles par quelques acides aminés et la synthèse de certaines isoformes constitue une réponse spécifique à la présence de certains métaux. Ces métallothionéines ont été identifiées chez les organismes des sources hydrothermales profondes telle que *Alvinella pompejana*, *Paralvinella grasslei* [76] et *Riftia pachyptila* [75]. Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire caractérisées par leur richesse en cystéine (20 à 30%). La taille de ces protéines est très variable (de 25 à 80 acides aminés) et leur caractéristique commune est la présence de doublets cystéine Cys–Cys ou de triplets Cys–X–Cys. Ce sont ces cystéines qui participent à la fixation des ions métalliques.

Pour beaucoup d'espèces, la résistance à la toxicité des métaux est due à leur capacité d'accumuler les polluants métalliques sous une forme non toxique. Les formes physico-chimiques du polluant métallique sous forme « neutralisée » peuvent être divisées en deux grandes catégories : (1) les formes minéralisées, composés insolubles, relativement stables dans le temps, et (2) les formes organiques solubles, labiles dans le temps qui sont généralement des métalloprotéines. Si les mécanismes de passage entre formes solubles et formes insolubles sont loin d'être connus, il est intéressant de noter que chez le ver siboglinidé, *Riftia pachyptila*, il a été mis en évidence une accumulation de ces métaux sous formes insolubles [75]. De même, le stockage des éléments lourds sous des formes insolubles semble prédominer chez les polychètes des sources hydrothermales profondes. Il est montré, dans certains cas, que les métallothionéines pouvaient participer à l'incorporation de certains métaux à des structures de type granule [75]. Les crustacés et polychètes des sources hydrothermales profondes sont connus pour leur capacité à synthétiser des métallothionéines [76]. L'absence de toxicité apparente des polluants métalliques s'expliquerait alors par l'abondance de leurs formes insolubles dans les tissus, ainsi que par la présence des métallothionéines [78]. L'adaptation aux polluants métalliques peut aussi correspondre à un stockage au niveau de sites biochimiques moins sensibles [79,80]. C'est finalement l'aptitude des organes, ou des tissus, à maintenir un équilibre entre les flux entrants et sortants (excrétion, neutralisation, sto-

ckage) de métaux qui va permettre à l'organisme dans sa globalité de s'adapter à son environnement.

6. Adaptation aux hautes températures

De nombreuses *Bactéria* et *Archaea* thermophiles et hyperthermophiles vivent au contact et même à l'intérieur des cheminées des sources hydrothermales profondes à des températures pouvant excéder 100 °C. L'*Archae Pyrolobus fumari* peut se développer jusqu'à 113 °C avec une température optimale de croissance de 106 °C. L'adaptation de ces micro-organismes implique de nombreuses modifications de leurs composants qui doivent résister et fonctionner à ces températures. Cette adaptation moléculaire a été examinée au niveau des protéines et enzymes, ainsi qu'à celui des membranes et des acides nucléiques.

La stabilisation des protéines résulte de modifications souvent nombreuses dont la panoplie diffère d'une protéine à l'autre [81,82]. Ces modifications incluent :

- l'augmentation du nombre d'acides aminés chargés et, ce qui en découle, du nombre de liaisons ioniques ;
- l'augmentation du nombre de résidus prolines, ce qui augmente dans la structure le nombre de β -turns et confère à la protéine une structure plus compacte et diminue l'instabilité des boucles ;
- l'accroissement de la taille et de la compacité des noyaux hydrophobes de la protéine, ce qui résulte de l'augmentation de la taille des chaînes latérales des acides aminés hydrophobes qui constituent ces noyaux (substitutions gly \rightarrow ala, ala \rightarrow leu, val \rightarrow ileu) ;
- le remplacement d'un certain nombre de résidus lysines par des arginines, ce qui augmente le nombre de liaisons hydrogène que ces résidus contractent avec leur environnement ;
- la diminution ou l'absence d'acides aminés dont la chaîne latérale est particulièrement sensible aux hautes températures (groupe amide de l'asparagine et de la glutamine, cystéine, tryptophane).

La nature et le nombre de ces modifications varient beaucoup d'une protéine à une autre, la structure de chacune d'elles déterminant les modifications à apporter. Ceci est illustré de manière significative chez *Bacillus stearothermophilus*. Chez ce micro-organisme, la stabilisation de l'enzyme d'inactivation de la kanamycine implique la présence d'un seul résidu lysine supplémentaire, alors que celle de l'oligo-1,6-glucosidase implique la présence de 14 résidus prolines supplémentaires, et

que celle de la glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase est associée à la présence de six ponts ioniques supplémentaires, ainsi qu'à de nombreuses liaisons hydrogène et hydrophobes, qui n'existent pas chez son homologue des espèces mésophiles [83–85]. La stabilisation des membranes cytoplasmiques résulte de modifications qui s'accompagnent de la formation de liaisons covalentes entre les deux couches lipidiques [86]. En ce qui concerne l'ADN, l'adaptation aux hautes températures semble être associée à un contenu plus élevé en paires G–C, à un taux plus élevé de super-enroulement et d'interaction avec des protéines basiques, ainsi qu'à une fixation accrue de cations [87].

Il s'agit là des processus moléculaires les plus évidents qui doivent être accompagnés d'adaptations physiologiques plus complexes. Cette hypothèse est illustrée, par exemple, par le fait que chez *Pyrococcus abyssi*, *Archaea* prélevée à l'intérieur même d'un fumeur noir [88], le seul examen des propriétés des deux premières enzymes de la voie de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques a fait apparaître trois processus d'adaptation.

- (a) Une série de substitutions d'acides aminés qui, par exemple, conduit à la présence, dans la sous-unité catalytique de l'aspartate transcarbamylase de deux fois plus d'acides aminés chargés, localisés à la surface de ces unités et qui doivent donc conduire à la stabilisation de la structure quaternaire de cette enzyme [89].
- (b) Un phénomène « d'emprunt de gène » par lequel *Pyrococcus* repose pour la synthèse du carbamylphosphate, sur l'adaptation à la synthèse de carbamylphosphate d'une enzyme catalysant une réaction très proche, la carbamate kinase [90].
- (c) Un processus de « canalisation métabolique » par lequel le carbamylphosphate, métabolite très labile, synthétisé chez cet organisme par la carbamate kinase-like carbamylphosphate synthétase est directement transféré au site catalytique de l'aspartate transcarbamylase, sans diffusion dans le milieu cellulaire de ce métabolite intermédiaire. Ce processus repose sur une interaction transitoire entre les deux enzymes [91].

7. Importance biotechnologique des études des organismes des sources hydrothermales profondes

En parallèle avec l'objectif fondamental d'une meilleure connaissance physiologique et biochimique de l'adaptation des organismes aux environnements extrêmes des sources hydrothermales profondes, la connais-

sance détaillée des molécules biologiques des organismes qui vivent dans ces environnements est susceptible de conduire vers des applications biotechnologiques [92].

Dans les procédés industriels, les enzymes jouent un rôle de plus en plus important. Ces procédés mettent souvent en jeu des conditions physico-chimiques (température, pression, pH, etc.) incompatibles avec l'instabilité des enzymes provenant des organismes mésophiles. Les enzymes des bactéries vivant au contact des sources hydrothermales profondes, adaptées aux hautes températures et à la pression, présentent un intérêt potentiel pour les usages industriels [93]. Jusqu'ici, les applications de ces enzymes sont peu nombreuses. Néanmoins, des enzymes issues de micro-organismes des sources hydrothermales ont trouvé une application biotechnologique particulière dans le domaine de la biologie moléculaire. L'invention d'une méthode d'amplification de gène *in vitro* (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) par le chimiste Kary Mullis [94] avait déjà révolutionné la génétique et la biologie moléculaire. Des ADN polymérase, résistants aux hautes températures et issues des sources hydrothermales, sont maintenant commercialisés pour ces techniques de PCR [http://www.ifremer.fr/com/muniquies/09-04-02_isis.htm].

Dans l'industrie agroalimentaire, les enzymes des sources hydrothermales profondes sont susceptibles d'application, en particulier dans les processus industriels de conversion de l'amidon en dérivés sucrés (amylases, pullulanases, glucosidases). Certaines de ces enzymes ont déjà été purifiées et caractérisées chez des *Archae* provenant de ces environnements en particulier des pullunases [95–97]. D'autres enzymes, les glycoside hydrolases, susceptibles d'avoir une implication biotechnologique, restent à étudier chez ces micro-organismes. Il est de même en ce qui concerne les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques.

Certains composants polymériques présentent également un intérêt biotechnologique. C'est le cas des exopolysaccharides (EPS) microbiens. Leurs propriétés physiques spécifiques en la présence ou l'absence d'ions monovalents et bivalents, leur aptitude à lier des métaux et certaines activités biologiques devraient trouver de nombreuses applications dans un proche avenir. Les bactéries des sources hydrothermales sont capables de synthétiser ces EPS [98] et devraient contribuer à ces développements.

Certaines molécules biologiques provenant des organismes des sources hydrothermales profondes, pourraient trouver une application dans le domaine médical.

C'est le cas, par exemple, des hémoglobines de haut poids moléculaires des vers tels que *Riftia pachyptila* qui pourraient être utilisables comme substitut à l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène dans le sang humain [99].

Divers agents anticancéreux actifs proviennent des plantes et des micro-organismes terrestres. Récemment, plusieurs nouveaux agents anticancéreux d'origine marine ont fait l'objet d'essais précliniques et cliniques [100]. Ces potentialités pourraient s'étendre aux organismes des sources hydrothermales profondes.

Remerciements

Les auteurs remercient le docteur Daniel Desbruyères (Ifremer, Brest) pour avoir lu et amélioré ce manuscrit et avoir fourni plusieurs des documents photographiques.

Références

- [1] The Columbia Encyclopaedia, sixth ed., New York, Columbia University Press, 2001–2004.
- [2] G. Zeidner, C.M. Preston, E.F. DeLong, R. Massana, A.F. Post, D.J. Scanlan, O. Beja, Molecular diversity among marine picoplankton as revealed by psbA analyses, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 212–216.
- [3] D.M. Karl, Nutrient dynamics in the deep blue sea, *Trends Microbiol.* 10 (2002) 410–418.
- [4] O. Beja, M.T. Suzuki, J.F. Heidelberg, W.C. Nelson, C.M. Preston, T. Hamada, J.A. Eisen, C.M. Fraser, E.F. DeLong, Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs, *Nature* 415 (2002) 630–633.
- [5] P. Lonsdale, Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers, *Deep-Sea Res.* 24 (1977) 857–863.
- [6] J.B. Corliss, J. Dymond, L.I. Gordon, J.M. Edmond, R.P.V. Herzen, R.D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, K. Crane, T.H. Andel, Submarine thermal springs on the Galapagos Rift, *Science* 203 (1979) 1073–1083.
- [7] V. Tunnicliffe, A. McArthur, D. McHugh, A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna, *Adv. Mar. Biol.* 34 (1998) 353–442.
- [8] P.A. Rona, G. Klinkhammer, T.A. Nelsen, J.H. Trefry, H. Elderfield, Black smokers, massive sulfides and vent biota at the mid-Atlantic Ridge, *Nature* 321 (1986) 33–37.
- [9] X. Le Pichon, Sea-floor spreading and continental drift, *J. Geophys. Res.* 73 (1968) 3661–3697.
- [10] I.R. Mac Donald, N.L. Guinasso, J.F. Reilly, J.M. Brooks, W.R. Callender, S.G. Gabrielle, Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. IV. Patterns in community structure and habitat, *Geo.-Mar. Lett.* 10 (1990) 244–252.
- [11] A.C. Campbell, J.M. Gieskes, J.E. Lupton, P.F. Lonsdale, Manganese geochemistry in the Guaymas Basin, Gulf of California, *Geochim. Cosmochim. Acta* 52 (1988) 345–357.
- [12] A. Fustec, D. Desbruyères, S.K. Juniper, Deep-sea hydrothermal vent communities at 13 °N on the East Pacific Rise: micro-distribution and temporal variations, *Biol. Oceanogr.* 4 (1987) 121–164.

- [13] V. Tunnicliffe, The biology of hydrothermal vents: ecology and evolution, *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 29 (1991) 319–407.
- [14] R.A. Zierenberg, M.W. Adams, A.G. Arp, Life in extreme environments: hydrothermal vents, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 12961–12962.
- [15] J. Galeron, M. Sibuet, M.L. Mahaut, A. Dinet, Variations in structure and biomass of the benthic communities at the three contrasting sites in the tropical Northeast Atlantic, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197 (2000) 121–137.
- [16] C.R. Fisher, Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates, *Aquat. Sci.* 2 (1996) 399–436.
- [17] H. Felbeck, Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera), *Science* 213 (1981) 336–338.
- [18] T. Nakagawa, J. Ishibashi, A. Maruyama, T. Yamanaka, Y. Morimoto, H. Kimura, T. Urabe, M. Fukui, Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Western Pacific, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 393–403.
- [19] E. Blochl, R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H.W. Jannasch, K.O. Stetter, *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, Extending the upper temperature limit for life to 113 °C, *Extremophiles* 1 (1997) 14–21.
- [20] K. Kashefi, D.R. Lovley, Extending the upper temperature limit for life, *Science* 301 (2003) 934.
- [21] P. Forterre, Thermoreduction, a hypothesis for the origin of prokaryotes, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* 318 (1995) 415–422.
- [22] J. Wiegel, M.W.W. Adams (Eds.), *Thermophiles – The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?*, Taylor and Francis, London, 1998, p. 346.
- [23] J.M. Larkin, W.R. Strohl, Beggiatoa, Thiolithrix, and Thioploca, *Annu. Rev. Microbiol.* 37 (1983) 341–367.
- [24] R.H. White, Distribution of folates and modified folates in extremely thermophilic bacteria, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 1983–1991.
- [25] J. Lampreia, G. Fauque, N. Speich, C. Dahl, I. Moura, H.G. Truper, J.J. Moura, Spectroscopic studies on APS reductase isolated from the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeobacterium *Archaeoglobus fulgidus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 (1991) 342–347.
- [26] D.H. Bartlett, C. Kato, K. Horikoshi, High-pressure influences on gene and protein expression, *Res. Microbiol.* 146 (1995) 697–706.
- [27] D.C. Nelson, C.R. Fisher, in: D.M. Karl (Ed.), *Microbiology of Deep Sea Hydrothermal Vents*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1995, pp. 125–167.
- [28] D.L. Distel, D.J. Lane, G.J. Olsen, S.J. Giovannoni, B. Pace, N.R. Pace, D.A. Stahl, H. Felbeck, Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: Analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2506–2510.
- [29] D.W. Smith, W.R. Strohl, Sulfur-oxidizing bacteria, in: J.M. Shively, L.L. Barton (Eds.), *Variations in Autotrophic Life*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1991, pp. 1121–1146.
- [30] R.A. Lutz, M.J. Kennish, Ecology of deep-sea hydrothermal vent communities: a review, *Rev. Geophys.* 31 (1993) 211–242.
- [31] R.A. Lutz, T.M. Shank, D.J. Fornari, R.M. Haymon, M.D. Lilley, K.L. Von Damm, D. Desbruyeres, Rapid growth at deep-sea vents, *Nature* 371 (1994) 663–664.
- [32] E.R. McMullin, S. Hourdez, S.W. Schaeffer, C.R. Fisher, Phylogeny and biogeography of deep sea vestimentiferan tube worms and their bacterial symbionts, *Symbiosis* 34 (2003) 1–41.
- [33] E.R. Nix, C.R. Fisher, J. Vodenichar, K.M. Scott, Physiological ecology of a mussel with methanotrophic endosymbionts at three hydrocarbon seep sites in the Gulf of Mexico, *Mar. Biol.* 122 (1995) 605–617.
- [34] N.M. Conway, B.L. Howes, J.E. McDowellcapuzzo, R.D. Turner, C.M. Cavanaugh, Characterization and site description of *Solemya borealis* (Bivalvia; Solemyidae), another bivalve-bacteria symbiosis, *Mar. Biol.* 112 (1992) 601–613.
- [35] T. Naganuma, J. Naka, Y. Okayama, A. Minami, K. Horikoshi, Morphological diversity of the microbial population in a vestimentiferan tubeworm, *J. Mar. Biotechnol.* 5 (1997) 119–123.
- [36] S.C. Hand, Trophosome ultrastructure and the characterization of isolated bacteriocytes from invertebrate-sulfur bacteria symbioses, *Biol. Bull.* 173 (1987) 260–276.
- [37] F. Gaill, Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents, *FASEB J.* 7 (1993) 558–565.
- [38] U. Hentschel, H. Felbeck, Nitrate respiration in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, *Nature* 366 (1993) 338–340.
- [39] H. Felbeck, J. Jarchow, Carbon release from purified chemoautotrophic bacterial symbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, *Physiol. Zool.* 71 (1998) 294–302.
- [40] M. De Cian, M. Regnault, F.H. Lallier, Nitrogen metabolites and related enzymatic activities in the body fluids and tissues of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, *J. Exp. Biol.* 203 (2000) 2907–2920.
- [41] J.J. Childress, C.R. Fisher, The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry, and autotrophic symbiosis, *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 30 (1992) 337–441.
- [42] J.J. Childress, R.W. Lee, N.K. Sanders, H. Felbeck, D.R. Oros, A. Toulmond, D. Desbruyeres, M.C. Kennicutt, J. Brooks, Inorganic carbon uptake in hydrothermal vent tubeworms facilitated by high environmental $p\text{CO}_2$, *Nature* 362 (1993) 147–149.
- [43] K.M. Scott, C.R. Fisher, J.S. Vodenichar, E.R. Nix, E. Minnich, Inorganic carbon and temperature requirements for autotrophic carbon fixation by the chemoautotrophic symbionts of the giant hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*, *Physiol. Zool.* 67 (1994) 617–638.
- [44] M.D. Lilley, D.A. Butterfield, E.J. Olson, J.E. Lupton, S.A. Macko, R.E. McDuff, Anomalous CH_4 and NH_4^+ concentrations at an unsedimented mid-ocean-ridge hydrothermal system, *Nature* 364 (1993) 45–47.
- [45] H. Felbeck, J.J. Childress, G.N. Somero, Calvin–Benson cycle and sulfide oxidation enzymes in animals from sulfide rich environment habitats, *Nature* 293 (1981) 291–293.
- [46] J.J. Robinson, J.L. Stein, C.M. Cavanaugh, Cloning and sequencing of a form II ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 1596–1599.
- [47] C.A. Williams, D.C. Nelson, B.A. Farah, H.W. Jannasch, J.M. Shively, Ribulose bisphosphate carboxylase of the prokaryotic symbiont of a hydrothermal vent tube worm: kinetics, activity and gene hybridization, *FEMS Microbiol. Lett.* 50 (1988) 107–112.
- [48] H. Felbeck, CO_2 fixation in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* (Jones), *Physiol. Zool.* 58 (1985) 272–281.
- [49] R.W. Lee, J.J. Robinson, C.M. Cavanaugh, Pathways of inorganic nitrogen assimilation in chemoautotrophic bacteria-marine invertebrate symbioses: expression of host and symbiont glutamine synthetase, *J. Exp. Biol.* 202 (1999) 289–300.
- [50] P.R. Girguis, R.W. Lee, N. Desaulniers, J.J. Childress, M. Pospel, H. Felbeck, F. Zal, Fate of nitrate acquired by the tubeworm *Riftia pachyptila*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2783–2790.

- [51] Z. Minic, V. Simon, B. Penverne, F. Gaill, G. Herve, Contribution of the bacterial endosymbiont to the biosynthesis of pyrimidine nucleotides in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23777–23784.
- [52] R.W. Lee, J.J. Childress, Assimilation of inorganic nitrogen by chemoautotrophic and methanotrophic symbioses, *Appl. Env. Microbiol.* 60 (1994) 1852–1858.
- [53] Z. Minic, G. Herve, Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3093–3102.
- [54] Z. Minic, S. Pastra-Landis, F. Gaill, G. Hervé, Catabolism of pyrimidine nucleotides in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 127–134.
- [55] M. Bright, H. Keckeis, C.R. Fisher, An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis, *Mar. Biol.* 136 (2000) 621–632.
- [56] Z. Minic, G. Hervé, Arginine metabolism in the deep sea tube worm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40527–40533.
- [57] C.W. Tabor, H. Tabor, Polyamines in microorganisms, *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 81–99.
- [58] S. Cohen, A Guide to the Polyamines, Oxford University Press, Oxford, UK, 1988.
- [59] R.M. Wittich, H.D. Kilian, R.D. Walter, Polyamine metabolism in filarial worms, *Mol. Biochem. Parasitol.* 24 (1987) 155–162.
- [60] P. Nicholls, The effect of sulphide on cytochrome aa3. Isoelectric and allosteric shifts of the reduced alpha-peak, *Biochim. Biophys. Acta.* 396 (1975) 24–35.
- [61] B.X. Bailly, S. Vinogradov, The sulfide binding function of annelid hemoglobins: relic of an old biosystem?, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 142–150.
- [62] A.J. Arp, J.G. Menon, D. Julian, Multiple mechanisms provide tolerance to environmental sulfide in *Urechis caupo*, *Am. Zool.* 35 (1995) 132–144.
- [63] R.W. Lee, D.W. Kraus, J.E. Doeller, Oxidation of sulfide by *Spartina alterniflora* roots, *Limnol. Oceanogr.* 44 (1999) 1155–1159.
- [64] X. Bailly, D. Jollivet, S. Vanin, J. Deutsch, F. Zal, F. Lallier, A. Toulmond, Evolution of the sulfide-binding function within the globin multigenic family of the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*, *Mol. Biol. Evol.* 19 (2002) 1421–1433.
- [65] F. Zal, T. Suzuki, Y. Kawasaki, J.J. Childress, F.H. Lallier, A. Toulmond, 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, *Proteins* 29 (1997) 562–574.
- [66] X. Bailly, R. Leroy, S. Carney, O. Collin, F. Zal, A. Toulmond, D. Jollivet, The loss of the hemoglobin H₂S-binding function in annelids from sulfide-free habitats reveals molecular adaptation driven by Darwinian positive selection, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100 (2003) 5885–5890.
- [67] R.E. Weber, S.N. Vinogradov, Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 569–628.
- [68] A.J. Arp, J.J. Childress, R.D. Vetter, Sulfide binding protein in the blood of *Riftia pachyptila* is the extracellular hemoglobin, *J. Exp. Biol.* 128 (1987) 139–158.
- [69] J.M. Edmond, K.L. von Damm, R.E. McDuff, C.I. Measures, Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal, *Nature* 297 (1982) 187–191.
- [70] T.S. Bowers, A.C. Campbell, C.I. Measures, A.J. Spivack, M. Khadem, J.M. Edmond, Chemical controls on the composition of vent fluids at 13–11 °N and 21 °N, East Pacific Rise, *J. Geophys. Res.* 93 (1988) 4522–4536.
- [71] E. Bonatti, Hydrothermal metal deposits from the oceanic rifts: a classification, in: P.A. Rona, K. Bostrom, L. Laubier, K. Smith (Eds.), *Hydrothermal Processes at Sea Floor Spreading Centers*, in: NATO Conf. Ser., vol. IV, Plenum, New York, 1984, pp. 491–502.
- [72] M.-A. Cosson-Mannevy, R.P. Cosson, F. Gaill, L. Laubier, Transfert, accumulation et régulation des éléments minéraux chez les organismes des sources hydrothermales, *Oceanol. Acta* (volume spécial n° 8) (1988) 219–226.
- [73] C. Jeanthon, D. Prieur, Susceptibility to heavy metals and characterization of heterotrophic bacteria isolated from two hydrothermal polychaetes annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 3308–3314.
- [74] A. Viarengo, J.A. Nott, Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates, *Comp. Biochem. Physiol.* 104C (1993) 355372.
- [75] P.R. Cosson, J.P. Vivier, Interactions of metallic elements and organisms within hydrothermal vents, *Cah. Biol. Mar.* 38 (1997) 43–50.
- [76] J.H. Kägi, Overview of metallothionein, *Methods Enzymol.* 205 (1991) 613–626.
- [77] C. Capasso, V. Carginale, R. Scudiero, O. Crescenzi, R. Spadaccini, P.A. Temussi, E. Parisi, Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature, *J. Mol. Evol.* 57 (Suppl. 1) (2003) S250–S257.
- [78] C.F. Shaw 3rd, M.M. Savas, D.H. Petering, Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein, *Methods Enzymol.* 205 (1991) 401–414.
- [79] C. Amiard-Triquet, Bioaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines, *Bull. Ecol.* 20 (1989) 129–151.
- [80] R.D. Palmiter, Molecular biology of metallothionein gene expression, in: J.H.R. Kägi, Y. Kojima (Eds.), *Metallothioneins II. Experientia Supplementum*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987, pp. 63–80.
- [81] M. Robinson-Rechavi, A. Alibes, A. Godzik, Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: Lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 547–557.
- [82] S. Kumar, C.J. Tsai, R. Nussinov, Factors enhancing protein thermostability, *Protein Eng.* 13 (2000) 179–191.
- [83] C. Ganter, A. Pluckthun, Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: effects on stability, *Biochemistry* 29 (1990) 9395–9402.
- [84] M. Matsumura, Y. Katakura, T. Imanaka, S. Aiba, Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110, *J. Bacteriol.* 160 (1984) 413–420.
- [85] Y. Suzuki, K. Oishi, H. Nakano, T. Nagayama, A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) 546–551.
- [86] M. De Rosa, A. Trincone, B. Nicolaus, A. Gambacorta, Archaeobacteria: lipids, in: G. di Prisco (Ed.), *Life Under Extreme Conditions*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991, pp. 6–87.

- [87] A.E. Vinogradov, DNA helix: the importance of being GC-rich, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 1838–1844.
- [88] G. Erauso, A.L. Reysenbach, A. Godfroy, J.R. Meunier, B. Crump, F. Partensky, J.A. Baross, V. Marteinsson, G. Barbier, N. Pace, D. Prieur, *Pyrococcus abyssi* specia nova, a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent, *Arch. Microbiol.* 160 (1993) 338–349.
- [89] C. Purcarea, G. Herve, M.M. Ladjimi, R. Cunin, Aspartate transcarbamylase from the deep-sea hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*: genetic organization, structure, and expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 4143–4157.
- [90] C. Purcarea, G. Herve, R. Cunin, D.R. Evans, Cloning, expression, and structure analysis of carbamate kinase-like carbamoyl phosphate synthetase from *Pyrococcus abyssi*, *Extremophiles* 5 (2001) 229–239.
- [91] C. Purcarea, D.R. Evans, G. Herve, Channeling of carbamoyl phosphate to the pyrimidine and arginine biosynthetic pathways in the deep sea hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6122–6129.
- [92] J.W. Deming, Deep ocean environmental biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998) 283–287.
- [93] D. Prieur, Physiology and biotechnological potential of deep-sea bacteria, in: *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, Blackie, Glasgow, London, 1992, pp. 163–197.
- [94] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Biotechnology* 24 (1986) 17–27.
- [95] M. Erra-Pujada, P. Deberie, F. Duchiron, M.J. O'Donohue, The type II pullulanase of *Thermococcus hydrothermalis*: molecular characterization of the gene and expression of the catalytic domain, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3284–3287.
- [96] H. Gantelet, F. Duchiron, Purification and properties of a thermoactive and thermostable pullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*, a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (1998) 770–777.
- [97] H. Gantelet, C. Ladrat, A. Godfroy, G. Barbier, F. Duchiron, Characteristics of pullulanases from extremely thermophilic archaea isolated from deep-sea hydrothermal vents, *Biotechnol. Lett.* 20 (1998) 819–823.
- [98] J. Guezennec, Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest ? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 204–208.
- [99] X. Bally, S. Vinogradov, The sulfide binding function of annelid hemoglobins: relic of an old biosystem ? *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 142–150.
- [100] G. Schwartzmann, A. Brondani da Rocha, R.G. Berlinck, J. Jimeno, Marine organisms as a source of new anticancer agents, *Lancet Oncol.* 2 (2001) 221–225.