



Le trophosome de *Riftia pachyptila* et *Tevnia jerichonana* (Vestimentifera) : bioaccumulations métalliques et métabolisme du soufre.

Michel TRUCHET⁽¹⁾, Christiane BALLAN-DUFRANÇAIS⁽¹⁾, Anne-Yvonne JEANTET⁽¹⁾,
Jean-Pierre LECHAIRE⁽²⁾ et Richard COSSON⁽³⁾

*1 Équipe de Cytophysiologie analytique,
Université Pierre et Marie Curie, 12 rue Cuvier, 75005 Paris.*

Fax: (33) 1 47 07 12 16

2 Laboratoire de Biologie marine, UPR CNRS 9042-Roscoff,

Université Pierre et Marie Curie, 7 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05.

3 ISOMer, EP 61 CNRS, Faculté de Pharmacie, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex

Résumé : L'étude ultrastructurale et microanalytique du trophosome des vestimentifères montre que les importantes quantités de soufre que renferme cet organe ne sont pas sous forme de globules, comme cela était précédemment supposé. Nous émettons l'hypothèse qu'il est présent sous la forme d'octaèdres de soufre élémentaire S₈, de taille nanométrique, non observable dans le cytoplasme bactérien. Les bioaccumulations métalliques sont peu importantes dans les bactéries et dans les bactériocytes et proviennent d'un métabolisme épuratif physiologique. Les sels métalliques, abondants dans le fluide hydrothermal, sont donc vraisemblablement sous une forme chimique peu soluble qui les rend beaucoup moins toxiques qu'on ne l'admettait jusqu'à présent.

Abstract: *The trophosome of the Vestimentifera Riftia pachyptila and Tevnia jerichonana: metal bioaccumulations and sulphur metabolism.*

Ultrastructural and microanalytic study of the Vestimentiferan trophosome shows that the important sulphur quantities present in the organ are not stored as globules as it was previously hypothesized. We assume that the elemental sulphur could exist under S₈ octaedral structures, whose size is not observable at the microscopic scale inside the bacteria hyaloplasm. Metallic bioaccumulations are not considerable in bacteria and in bacteriocytes and are due to a physiological purifying metabolism. Metallic salts, abundant in the hydrothermal fluid, are probably poorly soluble and then less toxic than it appeared previously.

Keywords : Vestimentiferans, Hydrothermal vents, trophosome, sulphur, metal bioaccumulations, microanalysis.

Introduction

Parmi les animaux des sources hydrothermales des fonds océaniques, les vestimentifères occupent une place à part. Dépourvus de tube digestif à l'état adulte, ces animaux hébergent des bactéries symbiotiques dans un organe spécifique, le trophosome, qui occupe la majeure partie du corps

(Cavanaugh et al., 1981 ; Gardiner & Jones, 1993 ; Childress, 1995).

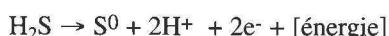
Le fluide émis par les sources hydrothermales est très chaud (jusqu'à 350°C) suite à son contact avec le magma. Il renferme en abondance des composés du soufre : sulfure d'hydrogène (H₂S), sulfures de fer et de zinc (FeS et ZnS), sulfates de manganèse, de calcium et de baryum (MnSO₄, CaSO₄ et BaSO₄), qui créent autour des organismes un environnement fortement chargé en éléments métalliques potentiellement toxiques (voir Cosson, 1996). Au contact des

eaux abyssales, le refroidissement du fluide entraîne la précipitation de la plupart de ces sels : l'anhydrite (ou la baryte) d'abord, qui constitue la majeure partie des parois de cheminées hydrothermales, mais aussi à la surface des parois, FeS et ZnS. Par ailleurs le rôle des annélides dont les tubes se fixent sur les cheminées n'est pas élucidé dans ce processus de précipitation (Juniper & Martineu, 1995).

Le principal composé qui reste en solution à basse température est donc le sulfure d'hydrogène, H₂S (jusqu'à 300 mMole, Childress & Fisher, 1992). Ce composé joue dans l'existence même de la faune hydrothermale, un rôle essentiel étant à la base de la chimiosynthèse bactérienne. Dans ces grands fonds marins où la lumière ne pénètre jamais, l'énergie nécessaire à la production primaire ne peut provenir que d'une source chimique, elle-même origininaire du magma sous-jacent. C'est le sulfure d'hydrogène qui joue ce rôle, le soufre pouvant prendre, en fonction des éléments auxquels il est associé, les valences 4+, 2+, 0, 2- (in Pascal, 1960).

Conformément à la loi de Boltzmann (Perrot, 1994) qui veut qu'une molécule soit dans sa configuration la plus stable quand son énergie est minimum, l'enthalpie moléculaire, c'est-à-dire l'énergie contenue dans la liaison chimique des composés du soufre, va en décroissant de H₂S (2-) à SO₂ (4+). En d'autres termes, l'oxydation du sulfure d'hydrogène H₂S en anhydride sulfurique SO₂ libère de l'énergie chimique, qu'un complexe enzymatique approprié pourra convertir en ATP (Doeller, 1995). Cette oxydation énergétique du soufre est effectuée dans le trophosome des Vestimentifères par les bactéries symbiotiques, qui possèdent l'équipement enzymatique nécessaire, notamment l'ATP-sulfurylase (Renosto et al., 1991 ; Doeller, 1995) ; le gène responsable en est d'ailleurs identifié et semble spécifique (Laue & Nelson, 1994). Prélevé dans le milieu ambiant par l'organe branchial et transporté au trophosome par l'hémoglobine, sur un site spécifique de cette molécule (Scott & Fisher, 1995 ; Zal et al., 1996), H₂S circule dans l'organisme sans lui causer de troubles, et en apportant aux bactéries l'énergie nécessaire au maintien de la symbiose.

Les mécanismes biochimiques complets sont loin d'être connus ; il semble que pour le trophosome des vestimentifères, la réaction suivante (Nelson & Hagen, 1995), bien qu'aboutissant à une oxydation incomplète, soit largement suffisante pour les besoins énergétiques des bactéries et de leur "hôte" :



En effet, pour Childress (1995), les bactéries symbiontes ne peuvent utiliser que H₂S et non les thiosulfates, alors que cela est le cas chez les crabes et les mollusques de la faune associée. *Riftia* est donc un cas extrême d'adaptation à l'utilisation du sulfure d'hydrogène. L'accepteur d'électrons le plus répandu serait l'oxygène, mais les composés de l'azote peuvent également remplir cette fonction ; cependant, le

taux de dénitrification chez *Riftia* semble très inférieur à sa capacité de réduction de CO₂ (Hentschel & Felbeck, 1993 ; Nelson & Hagen, 1995) et il s'agit sans doute d'une voie tout à fait secondaire. Le taux de fixation du carbone est très élevé et atteindrait 1,4 % du carbone corporel total par jour chez *Riftia* ; la croissance de ces animaux est donc très rapide (Childress, 1995), ce que confirme une étude en caisson pressurisé (Gaill et al., 1997).

Dans cette oxydation incomplète, le soufre s'accumule dans le trophosome, en quantités impressionnantes. Incomplètement oxydé, il pourrait servir de réserve énergétique en cas de tarissement des sources. Il est bien connu que des bactéries sulfo-oxydantes, comme *Beggiatoa*, accumulent des dépôts intracellulaires de soufre à l'état de soufre natif (Nelson & Hagen, 1995). Selon Hageage et al. (1970) et Vetter (1985), chez des mollusques qui abritent des bactéries symbiotiques de 6 à 8 μm, le soufre s'accumulerait à l'état de cristaux liquides dans des globules de 1 à 4 μm, à l'intérieur des bactéries. Pour ces auteurs, l'état de cristal liquide, par rapport à celui de cristal minéral, favoriserait une éventuelle réutilisation ultérieure. Cet état du soufre offre une grande labilité et, lors des manipulations, il donne facilement des cristaux orthorhombiques.

Selon Cavanaugh et al. (1981), le soufre du trophosome de *Riftia pachyptila* pourrait être stocké dans des vésicules membranaires intrabactériennes de 0,5 à 1 μm où il se trouverait à l'état de cristaux liquides. Or, l'étude ultrastructurale du trophosome de *Riftia* par Bosch & Grassé (1984 a, b) ne fait apparaître aucun emplacement susceptible de loger ces nombreux globules de soufre, que ce soit dans les bactéries ou dans le cytoplasme des bactériocytes. De plus, la question se pose de savoir si, comme chez d'autres animaux vivant dans ces conditions extrêmes, les métaux dont les teneurs globales sont loin d'être négligeables (voir revue dans Cosson, 1996) sont accumulés dans des structures lysosomiales nombreuses traduisant une mise à l'écart importante de métaux toxiques comme cela a été montré dans divers organes de *Bathymodiolus* ou d'*Alvinella* (Childress & Fisher, 1992).

Il nous a donc paru nécessaire de reprendre ces travaux de morphologie ultrastructurale sur le trophosome de *Riftia pachyptila* et *Tevnia jerichonana*, en adjoignant à la microscopie électronique en transmission, diverses méthodes de microanalyse in situ pour mieux comprendre la physiologie de ce surprenant organe, tant en ce qui concerne le stockage du soufre que la résistance aux sulfures métalliques réputés toxiques.

Matériel et méthodes

I. Matériel

Les animaux ont été récoltés dans le Pacifique oriental lors de trois missions qui nous ont fourni le matériel suivant :

EPR 1995, 9° N, juvéniles de *Riftia* et *Tevnia* ;
 LARVAE, 1995, 9° N, adultes de *Riftia* (longueurs : 8 cm, 23 cm, 64 cm) ;
 HOT 1996, 9° N, adultes de *Tevnia* (longueur : 6 cm). 13° N, adultes de *Riftia* (longueur : 64 cm).

II. Congélations

Des animaux entiers ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide à bord, puis stockés au congélateur à - 80°C. Ultérieurement des coupes au niveau du trophosome ont été effectuées au cryostat (FRIGOCUT 2800, LEICA) à l'épaisseur de 5-10 µm, déposées sur lames de verre et aussitôt observées au microscope photonique (OPTIPHOT-POL, NIKON) en lumière polarisée.

D'autres coupes ont été déposées sur terphane carboné et séchées pour analyse ultérieure à la microsonde électronique CAMECA MS 46 (WDS).

III. Fixations pour la microscopie électronique en transmission (TEM)

Des prélèvements du trophosome de *Riftia* et de *Tevnia* juvéniles et adultes ont été immédiatement fixés au glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,2 M additionné de saccharose 0,45 M, pendant 1 h 30. Les pièces ont ensuite été rincées dans le tampon cacodylate de sodium 0,2 M additionné de saccharose 0,5 M, puis conservées dans le tampon cacodylate de sodium seul.

Le matériel a été post-fixé dans le tétr oxyde d'osmium à 1 % dans l'eau distillée, puis rincé à l'eau et inclus dans l'épon-araldite après passage dans les bains de solvant intermédiaires habituels d'alcool éthylique absolu et d'oxyde de propylène.

Quelques pièces ont été incluses de cette manière, mais sans post-fixation, pour la microanalyse.

D'autres pièces, post-fixées ou non, ont été incluses dans la résine après un bain d'acétone, sans passage dans les alcools ni l'oxyde de propylène.

Les coupes ultrafines (50 à 80 nm) ont été observées à l'aide d'un microscope PHILIPS 201 à 80 KV.

IV. Microscopie électronique à balayage de surface (SEM) et microanalyse électronique par spectrométrie des rayons X en sélection d'énergie (EDS-SEM)

Du matériel fixé comme précédemment et conservé dans le tampon cacodylate de sodium a été disséqué et déposé sur supports d'aluminium pour examen au microscope électronique à balayage de surface JEOL. Ces échantillons ont également été soumis à l'analyse élémentaire par sonde électronique et spectrométrie des rayons X en sélection d'énergie, en balayage de surface, à l'aide d'un microscope JEOL JSM 840 A équipé d'un détecteur SiLi.

V. Microanalyse par sonde électronique et spectrométrie des rayons X en dispersion de longueur d'onde (WDS, CAMECA MS 46)

Pour étudier l'effet de la fixation et des différentes étapes de préparation des échantillons pour une étude cytologique ou microanalytique *in situ*, le matériel suivant a été préparé :

a)- lors de l'ouverture des animaux sur le pont du bateau, des frottis de trophosome frais ont été effectués sur terphane carboné et séchés ;

b)- du matériel fixé au glutaraldéhyde et conservé dans le cacodylate a été directement déposé sur terphane carboné, puis séché ;

c)- des étalements identiques aux précédents ont été rincés à l'alcool éthylique absolu avant séchage ;

d)- du matériel traité comme en (b) a été rincé à l'acétone avant séchage ;

e)- du matériel traité comme en (b) a été rincé dans l'oxyde de propylène avant séchage.

Ces modes de préparation ne permettent aucun repérage topographique et la nature isolante de ce type de matériel impose une forte défocalisation de la sonde électronique (environ 50 µm de diamètre) sous 15 KV et pour 40 nA de courant de sonde, mais ils n'introduisent aucun autre traitement que la dessiccation imposée par le vide qui règne dans la colonne électronique.

f)- du matériel fixé au mélange de Carnoy puis inclus à la paraffine a été coupé (coupes de 5 µm d'épaisseur). Avec les coupes au cryostat et celles semi-fines de matériel inclus dans la résine et étalées sur supports de terphane carboné, ces coupes ont permis une analyse élémentaire *in situ*.

VI. Microanalyse par émission ionique secondaire et spectrométrie de masse (SIMS)

Des coupes semi-fines (2 µm) de matériel fixé par le glutaraldéhyde et traité comme pour la microscopie électronique en transmission ont été étalées sur supports d'or ultrapur (Lyon-Alemand-Louyot, Paris) et analysées dans les conditions habituelles (Truchet, 1975 ; 1982), sous bombardement d'oxygène, à l'aide d'un appareil CAMECA SMI 300.

VII. Microanalyse par sonde électronique et spectrométrie des rayons X en sélection d'énergie, à l'échelle ultrastructurale (EDS-TEM)

Des coupes fines (100 nm) provenant du matériel préparé pour la microscopie électronique (non osmié, déshydraté à l'alcool ou à l'acétone et inclus après passage dans des bains d'oxyde de propylène, ou non) ont été recueillies sur grilles de titane et carbonées. Elles ont été analysées à l'aide d'un appareil JEOL STEREOSCAN 100 CXII équipé d'une diode SiLi pour l'analyse élémentaire par sonde électronique et spectrométrie des rayons X en sélection d'énergie (Oxford Instruments, Model AN 10.000) et du module pour la microscopie en transmission.

L'analyse a été effectuée sous une tension de 60 KV, avec un diaphragme de condenseur de 200 μm et pendant des temps de comptage de 300 s.

Résultats

I. Analyse de matériel frais

L'analyse des étalements frais de trophosome à l'aide de la microsonde CAMECA MS 46 (WDS) donne une réponse soufre ($200\text{-}400 \text{ cps.s}^{-1}$) environ dix fois plus importante que celle de frottis sanguins ou de liquide coelomique.

Le trophosome, observé au microscope en lumière polarisée sitôt après la confection de coupes au cryostat, ne montre d'abord aucune structure polarisant la lumière. Progressivement, en quelques minutes, de petits cristaux en aiguille apparaissent sur les bords des lobules du trophosome (fig. 1).

Analysées à la MS 46 (WDS) en sonde large ($50 \mu\text{m}$), les coupes au cryostat de trophosome délivrent un signal soufre assez fort ($200 \text{ à } 300 \text{ cps.s}^{-1}$) mais uniforme, car la largeur

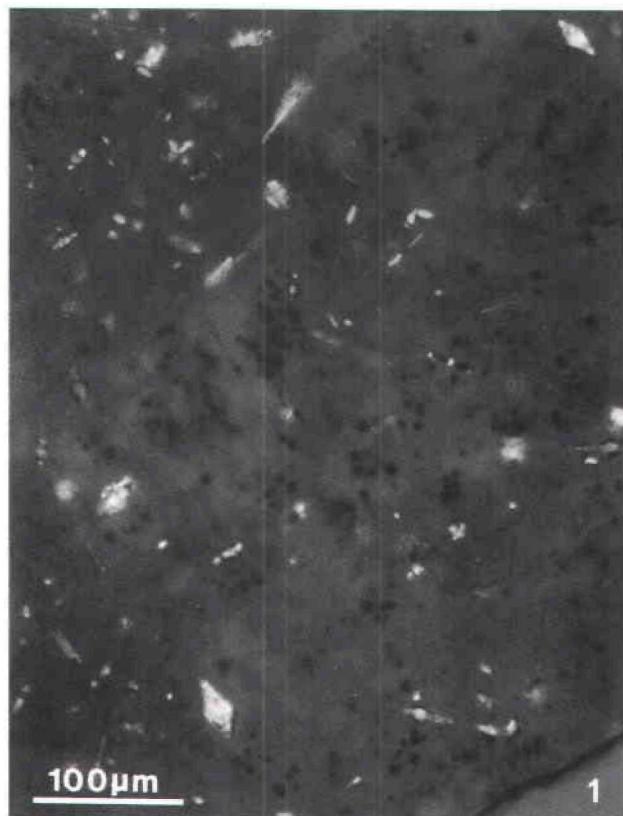


Figure 1. Trophosome de *Riftia*, congelé et coupé au cryostat observé au microscope photonique en lumière polarisée. Des aiguilles cristallines sont progressivement apparues.

Figure 1. Observation with Photonic microscopy and polarized light of freezed *Riftia* trophosome, cryostat sectionned. Polarized needles appeared progressively.

de la sonde intègre les précipitations locales observées au microscope polarisant.

D'autres éléments sont décelés, notamment du phosphore et du fer, dont les signaux sont parfois aussi intenses que ceux du soufre.

II. Mobilité du soufre en fonction des traitements cytologiques

1. Cristallisation du soufre

L'examen à la loupe de matériel fixé au glutaraldéhyde et simplement rincé au tampon cacodylate de sodium montre de grosses cristallisations ($50 \text{ à } 100 \mu\text{m}$), situées sous la trophothèque et entre les lobules.

L'observation au microscope à balayage JEOL révèle qu'il s'agit de cristaux dont l'analyse élémentaire (EDS-SEM) ne fournit que le signal du soufre (fig. 2).

Ces cristaux disparaissent après rinçage à l'alcool ou à l'acétone.

2. Effets des divers traitements chimiques

L'analyse élémentaire à la microsonde électronique CAMECA MS 46 (WDS) de matériel simplement fixé au glutaraldéhyde et rincé au tampon cacodylate de sodium montre un signal soufre plus variable que sur coupes au cryostat : certaines plages sont riches en soufre, d'autres le sont moins, tandis que d'autres éléments, et notamment le phosphore et le fer, ont disparu.

Les analyses de ces étalements, après passage dans les bains d'alcool, d'oxyde de propylène ou d'acétone, montrent une diminution progressive des signaux soufre.

Les analyses de coupes semi-fines de ces matériaux, comme les analyses de coupes à la paraffine ne fournissent que de très faibles signaux soufre.

L'analyse ionique des coupes semi-fines (SIMS) montre, par l'examen des spectres de masse, qu'elles ne renferment aucune bioaccumulation particulière, ni en ce qui concerne les métaux, ni en ce qui concerne le soufre : les signaux sont très faibles. Du baryum apparaît concentré dans des structures de taille vraisemblablement inframicrométrique, chez *Riftia* comme chez *Tevnia*, sans qu'il soit possible de préciser sur les images ioniques si ces structures de bioaccumulation sont localisées dans les bactéries ou dans les bactériocytes.

III. Recherche d'une localisation du soufre et d'autres éléments à l'échelle ultrastructurale

1. Observation au microscope électronique en transmission de coupes ultra-fines, osmierées et contrastées (TEM)

Aux stades juvéniles et adultes, les aspects des bactéries sont comparables chez *Riftia* et chez *Tevnia* et la diversité morphologique observée résulte plutôt du vieillissement de la population bactérienne que de la croissance du vestimentifère.

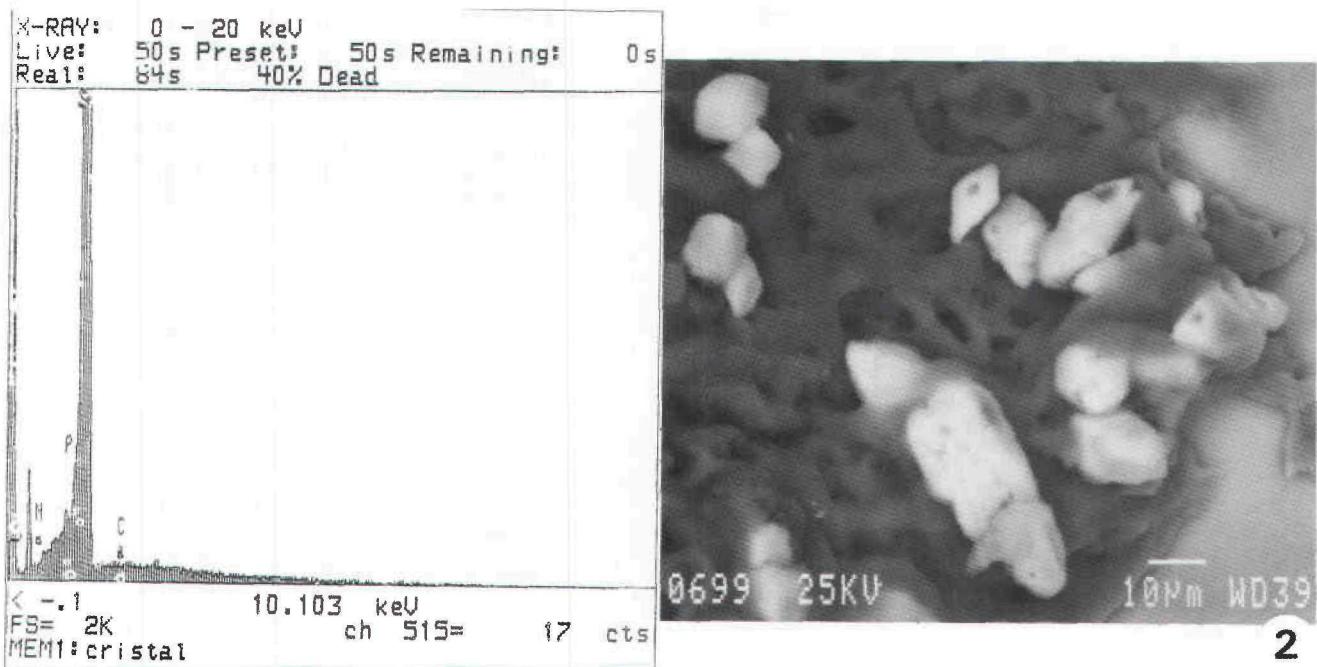


Figure 2. EDS-SEM. *Riftia* (spécimen de 64 cm) (LARVAE 1995). Après fixation au glutaraldéhyde et rinçage au tampon cacodylate de sodium, des cristaux apparaissent sur le bord des lobules du trophosome. Ils sont constitués de soufre pur (pic principal du spectre).

Figure 2. EDS-SEM. *Riftia* (specimen of 64 cm in length) (LARVAE 1995). After glutaraldehyde fixation and Na cacodylate buffer washing, crystals appear around trophosomal lobules. They are made of pure sulphur (main peak of the spectrum).

fère. On retrouve (fig. 3, 4 et 5) les divers stades décrits par Bosch & Grassé (1984 a, b). En particulier, le système endomembranaire des bactéries se diversifie dans les bactéries de plus grand diamètre : il se densifie (fig. 4) ou se vacuoile (fig. 5). Les vésicules, peu nombreuses (quatre au maximum par section de bactérie) ont un diamètre qui dépasse rarement 0,5 μm. Ces vésicules sont plus fréquentes après traitements par l'alcool et l'oxyde de propylène ; elles sont moins fréquentes après traitement par l'acétone et les citermes endomembranaires sont alors coalescentes et densifiées.

Aucun emplacement susceptible de loger des quantités de soufre importantes n'est localisé dans ces bactéries.

Entre les bactéries, le cytoplasme des bactériocytes contient de rares lysosomes (0,5 à 2 μm de diamètre) au contenu opaque aux électrons, parfois granuleux (figs. 6 et 7).

2. Observation et analyse de coupes fines non osmiées, non contrastées (EDS-TEM)

L'examen de matériel non osmié montre, dans certaines bactéries, de petites structures opaques aux électrons de 0,3 μm environ (fig. 8), qui pourraient correspondre aux vésicules denses décrites ci-dessus (fig. 4). Leur analyse révèle P, S, Fe et Cu auxquels se rajoutent Zn et Ag chez *Tevnia* ainsi que Mg et Ca chez *Riftia* (fig. 8).

L'analyse des lysosomes des bactériocytes révèle S, Fe et Zn chez *Tevnia*, alors que chez *Riftia*, on trouve Mg, P, S, Ca, Fe, Cu et Ag (fig. 9 et 10).

Enfin on observe, à la périphérie des lobules, dans les cellules de la trophothèque, des amas granulaires de S, Fe, Cu et Ag auxquels s'ajoutent des traces de brome chez *Riftia* (fig. 11 et 12).

Discussion

Les aspects cytologiques des populations bactériennes du trophosome des vestimentifères révèlent une grande diversité morphologique, aussi bien chez *Tevnia* que chez *Riftia* ce qui confirme l'étude de Bosch & Grassé (1984 a, b) et la revue de Gardiner & Jones (1993) concernant *Riftia*.

Cette diversité traduit les variations des populations bactériennes au cours de leur vie, et n'apparaît pas liée à l'âge des vestimentifères (Bosch & Grassé, 1984 a, b). Il faut noter en particulier que l'importance du réseau endomembranaire s'amplifie au cours du temps.

Le traitement de préparation des échantillons intervient sur les aspects morphologiques de ce réseau. Le traitement par l'alcool favorise la présence de vésicules (0,5 μm de diamètre) dans les bactéries plus volumineuses et donc plus âgées. Au contraire le traitement excluant les passages à l'alcool ou à l'oxyde de propylène favorise la cohésion des systèmes endomembranaires. La formation des vésicules pourrait donc être due à une fragilisation des membranes en fin de vie bactérienne. Quoi qu'il en soit les dilatations des

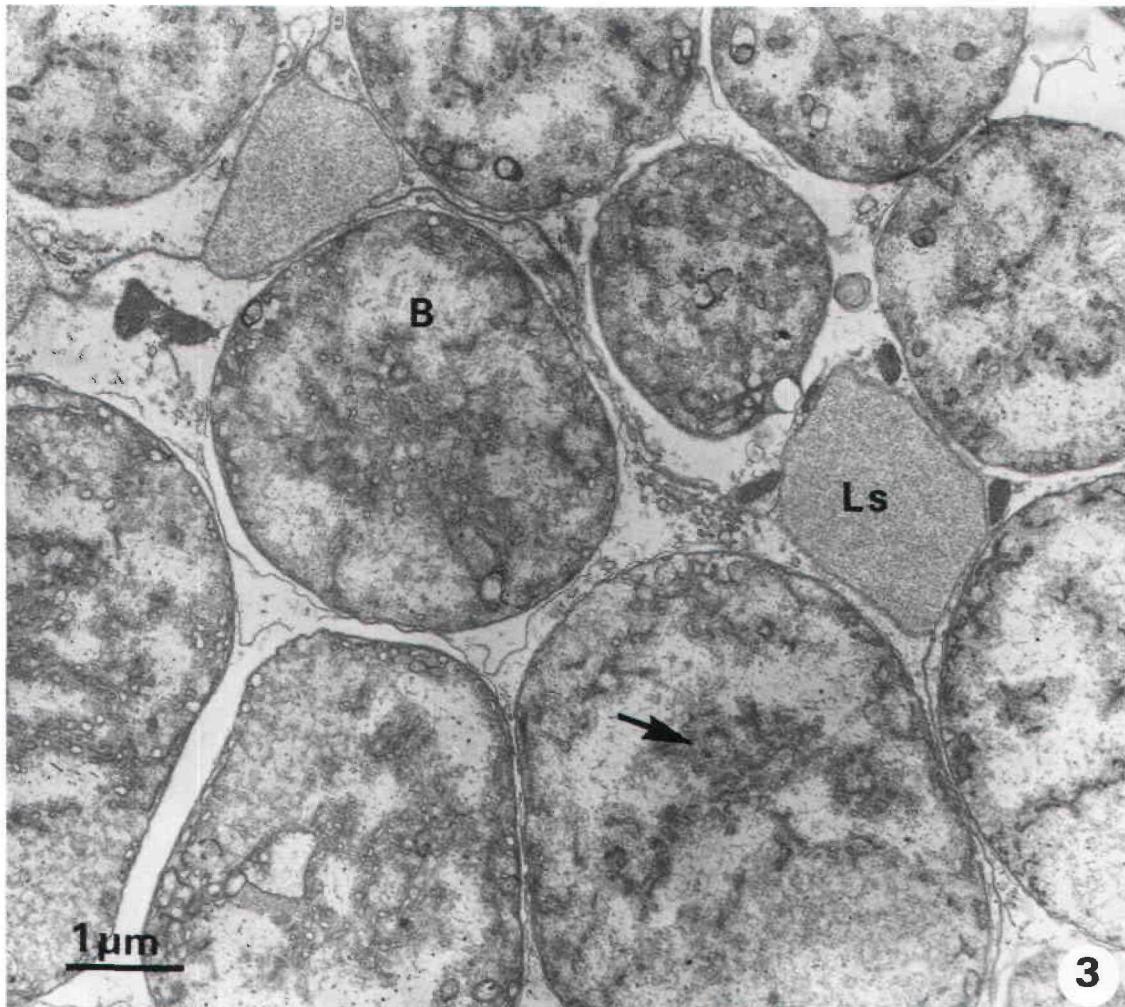


Figure 3. TEM. *Tevnia* adulte (HOT 1996). Après double fixation, le matériel a été traité à l'acétone avant d'être inclus. Noter l'abondance des endomembranes (flèche) dans les bactéries présentes dans le cytoplasme des bactériocytes. (B) bactérie. (Ls) lacune sanguine.

Figure 3. TEM. *Tevnia*, adult specimen (HOT 1996). After a double fixation, material was rinsed in acetone before inclusion. Note in a bacteriocyte the abundance of bacterial endomembranes (arrow). (B) bacteria, (Ls) Blood vessel.

citerne, lorsqu'elles existent, ne paraissent pas suffisantes pour rendre compte de la rétention du soufre, contrairement aux hypothèses de Cavanaugh et al. (1981). De même, aucun globule correspondant à ceux de diamètre 1 à 4 µm décrits par Hageage et al. (1970) ou Vetter (1985) n'est discernable.

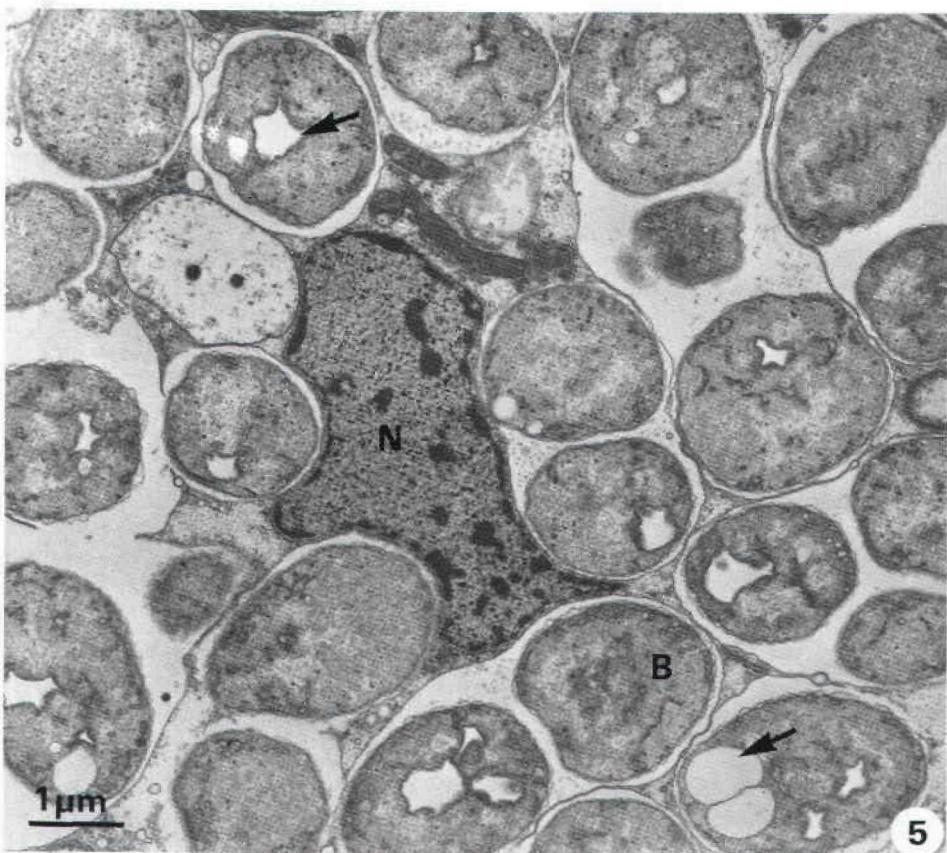
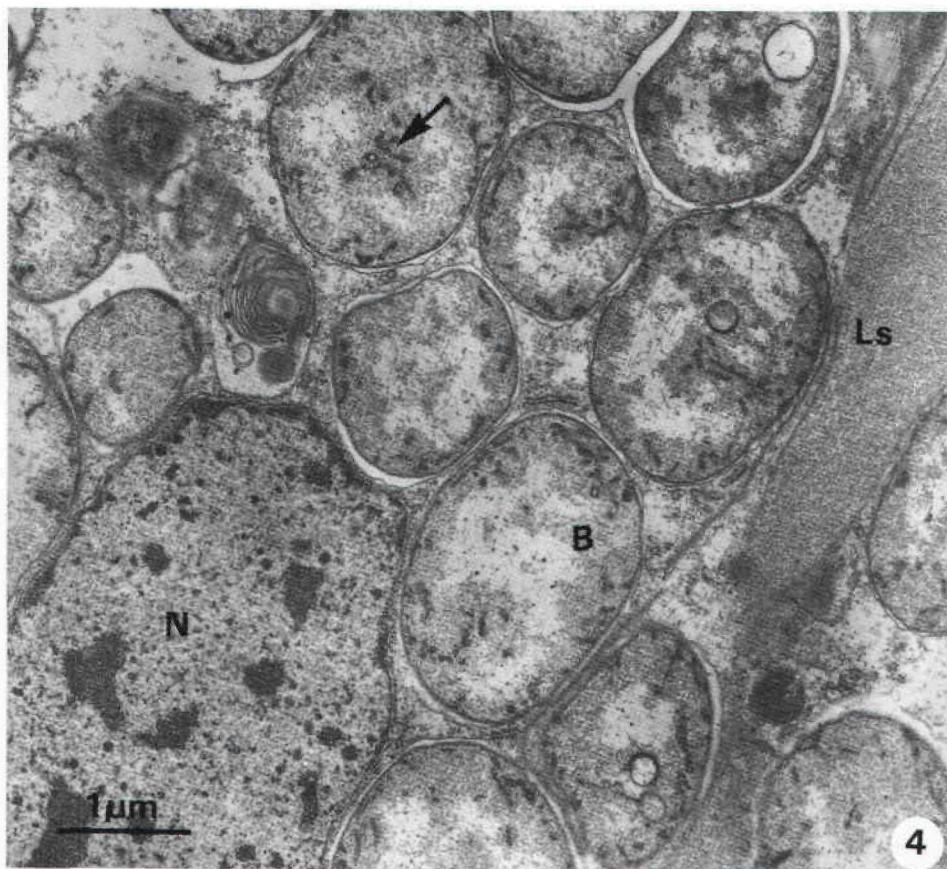
La microanalyse (EDS-TEM) décèle, dans les bactéries, un certain nombre d'éléments minéraux stockés dans les régions les plus denses ce qui correspond probablement au réseau endomembranaire. Entre les bactéries, le cytoplasme des bactériocytes contient de rares lysosomes minéralisés et des amas de granules à la périphérie cellulaire. Cette bioac-

Figure 4. TEM. *Tevnia* adulte (HOT 1996). Après double fixation, le matériel a été traité par l'acétone avant d'être inclus. Noter l'opacification de certaines endomembranes bactériennes (flèche). (B) bactérie, (Ls) lacune sanguine, (N) noyau du bactériocyte.

Figure 4. TEM. *Tevnia*, adult specimen (HOT 1996). After a double fixation, the material was washed in acetone before inclusion. Note the densification of endomembranes (arrow). (B) bacteria. (Ls) Blood vessel, (N) bacteriocyte nucleus.

Figure 5. TEM. *Riftia* (spécimen de 23 cm) (LARVAE 1995). Après double fixation, le matériel a été déshydraté par les alcools avant d'être inclus. Noter la vacuolisation apparente du système endomembranaire des bactéries (flèches). (N) noyau du bactériocyte.

Figure 5. TEM. *Riftia* (specimen of 23 cm in length) (LARVAE 1995). After a double fixation the material was dehydrated with alcohols and included. Note the apparent vacuolization of bacteria endomembranes (arrows). (N) bacteriocyte nucleus.



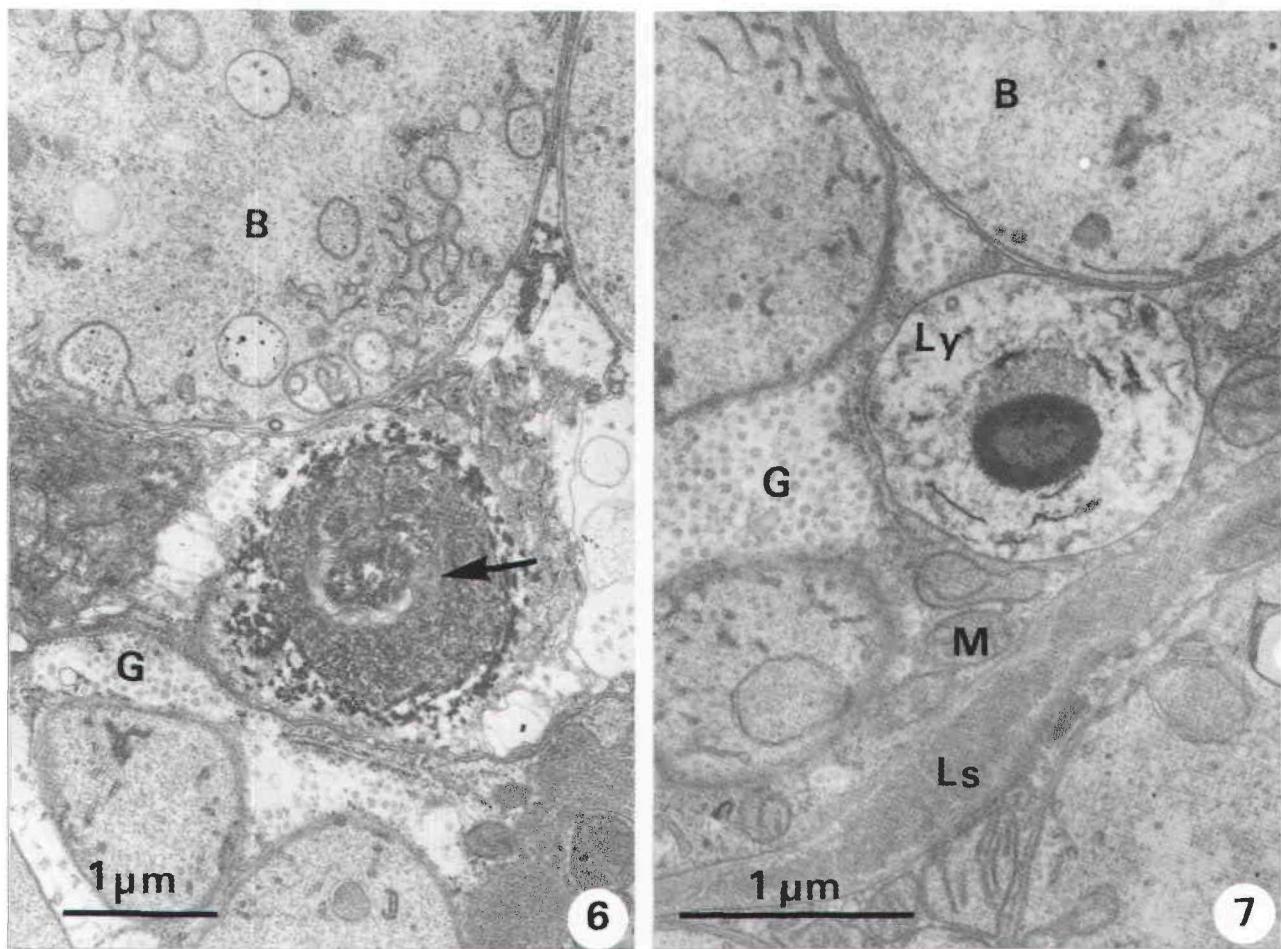


Figure 6. TEM. *Riftia* (spécimen de 8 cm) (LARVAE 1995). Double fixation et déshydratation par les alcools. Noter dans le cytoplasme d'un bactériocyte, la présence d'un lysosome à granules opaques (flèche) à proximité de bactéries (B). (G) glycogène.

Figure 6. TEM. *Riftia* (specimen of 8 cm in length) (LARVAE 1995). Double fixation and alcohol dehydration. Note in the cytoplasm of a bacteriocyte the occurrence of a lysosome (arrow) with dense granules near bacteria (B). (G) glycogen.

Figure 7. TEM. *Riftia* (spécimen de 8 cm) (LARVAE 1995). Double fixation et déshydratation par les alcools. Noter la présence d'un lysosome (Ly) à grains opaques aux électrons dans le cytoplasme d'un bactériocyte. (B) bactérie, (G) glycogène, (Ls) lacune sanguine, (M) mitochondrie.

Figure 7. TEM. *Riftia* (specimen of 8 cm in length) (LARVAE 1995). Double fixation and alcohol dehydration. Note the occurrence of a lysosome (Ly) with dense grains in the cytoplasm of a bacteriocyte. (B) bacteria, (G) glycogen, (Ls) blood vessel, (M) mitochondria.

Figure 8. EDS-TEM. *Riftia* (spécimen de 64 cm) (LARVAE 1995). Matériel traité par le glutaraldéhyde seul et l'acétone avant d'être inclus. Bactérie présentant des plages opaques aux électrons. Présence de Mg, P, S, Ca, Fe, Cu et Zn au niveau d'une plage opaque (les éléments sont cités dans l'ordre d'apparition sur le spectre, de gauche à droite ; en raison de raies K et L, certains éléments comme Fe, Cu, Ti... apparaissent deux fois). Les raies intenses, à l'extrême gauche, sont celles de la matière organique (C et O) ; Ti, au centre, provient de la grille, Cl de la résine (épon) et le silicium est dû aux pompes secondaires à diffusion d'huile (silicones).

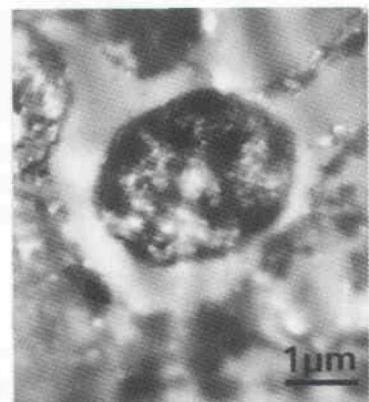
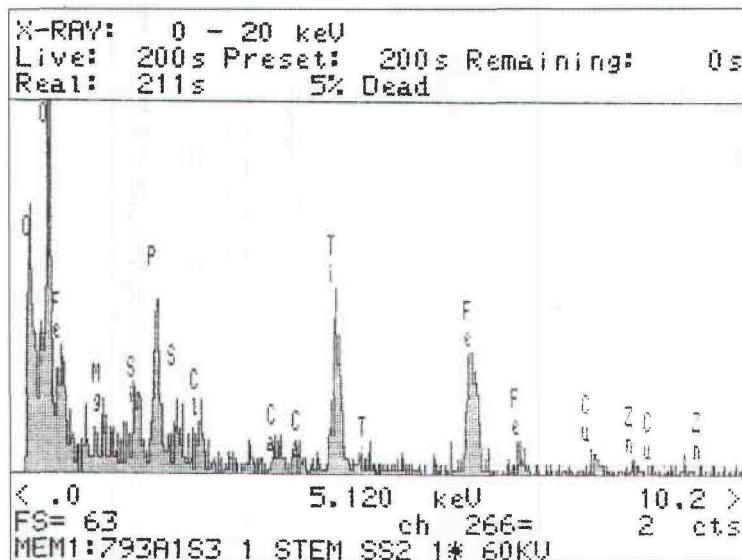
Figure 8. EDS-TEM. *Riftia* (specimen of 64 cm in length) (LARVAE 1995). Material only treated with glutaraldehyde and acetone before inclusion. A bacteria with an electron dense area. Occurrence of Mg, P, S, Ca, Fe, Cu and Zn in one electron dense area (elements are cited in the order of appearance on the spectrum, from left to right; some elements, such as Fe, Cu, Ti... appear twice, because of the K and L X-rays emissions). The most intense peaks at the left end of the spectrum are carbon and oxygen, from the organic matrix; Ti, at the center is emitted by the grid, Cl by the resin (epon) and silicon by the oils of the secondary vacuum diffusion pumps.

Figure 9. EDS-TEM. *Tevnia* adulte (HOT 1996). Matériel traité par le glutaraldéhyde seul et déshydraté par les alcools. Présence de Cu, S, Ag, Fe et Zn dans un lysosome d'un bactériocyte (mêmes remarques spectrales que pour la figure 8).

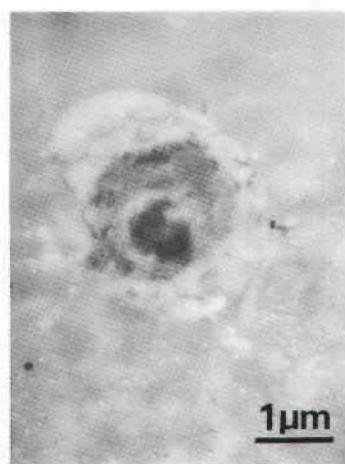
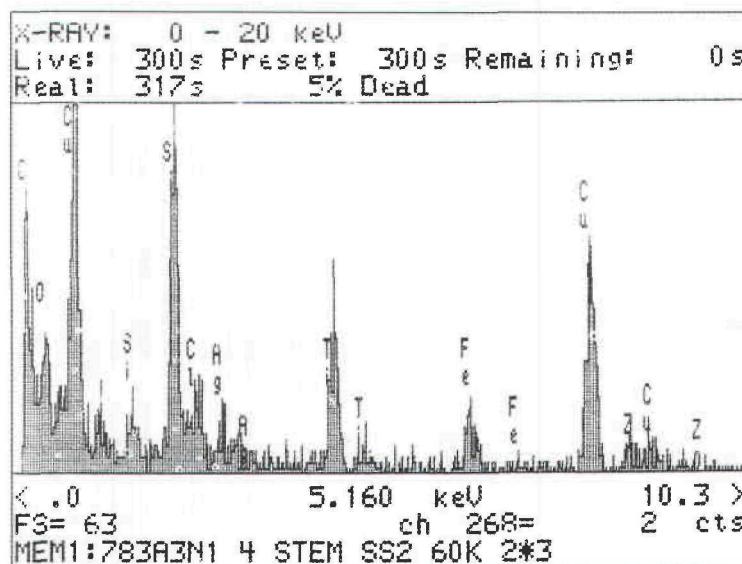
Figure 9. EDS-TEM. Adult *Tevnia* (HOT 1996). Material only treated with glutaraldehyde and alcohols. Occurrence of Cu, S, Ag, Fe and Zn in a lysosome of a bacteriocyte (same spectral indications as for figure 8).

Figure 10. EDS-TEM. *Riftia* (spécimen de 8 cm) (LARVAE 1995). Matériel traité par le glutaraldéhyde seul et déshydraté par les alcools. Présence de Fe, Zn, P, S et Ca dans un lysosome de bactériocyte (mêmes remarques spectrales que pour la figure 8).

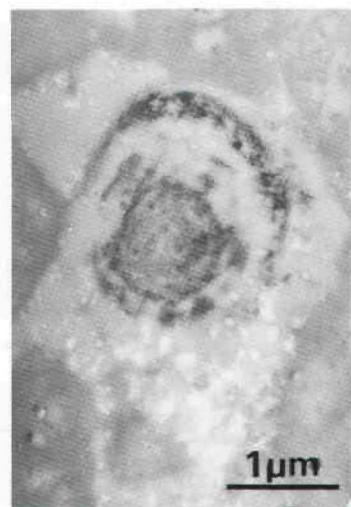
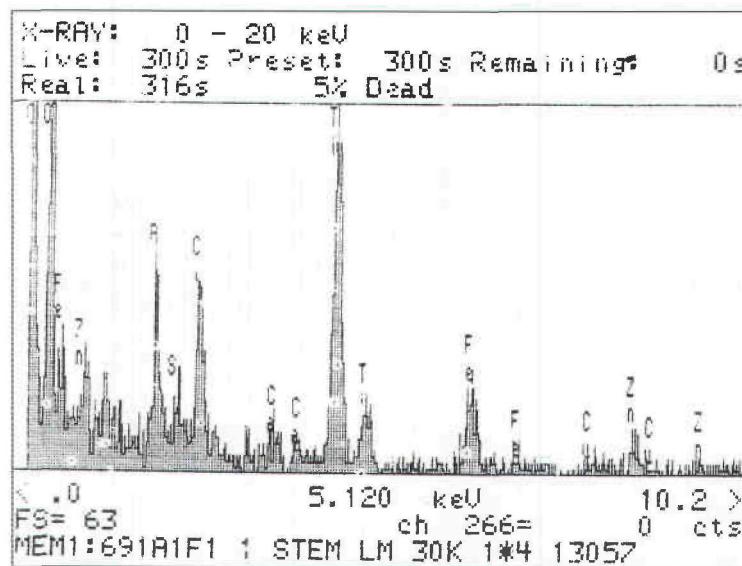
Figure 10. EDS-TEM. *Riftia* (specimen of 8 cm in length) (LARVAE 1995). Material only treated with glutaraldehyde and alcohols. Occurrence of Fe, Zn, P, S and Ca in a lysosome of a bacteriocyte (same spectral indications as for figure 8).



8



9



10

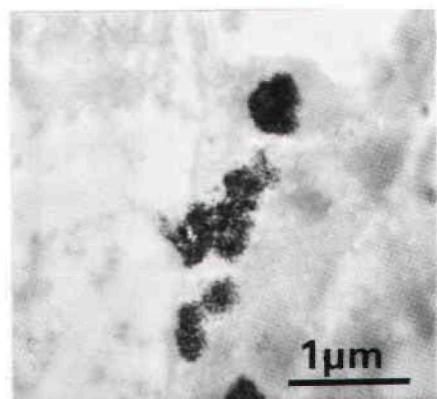
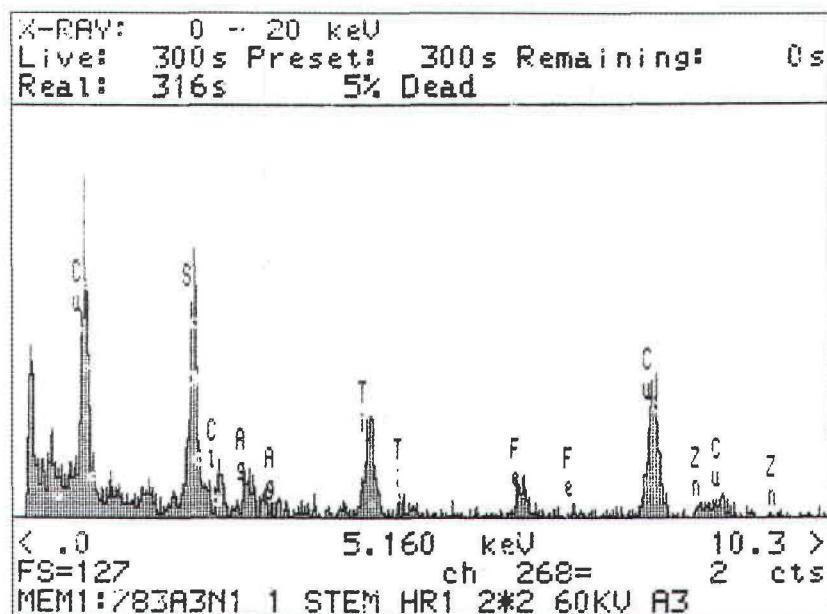
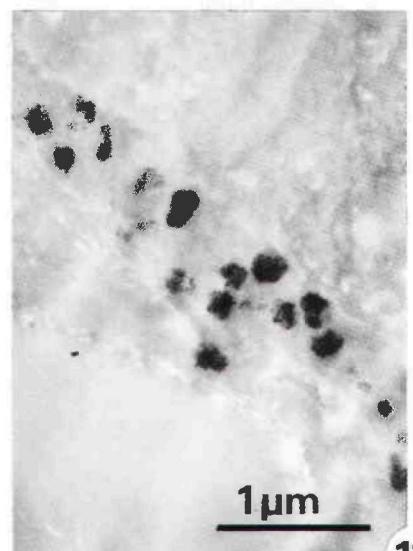
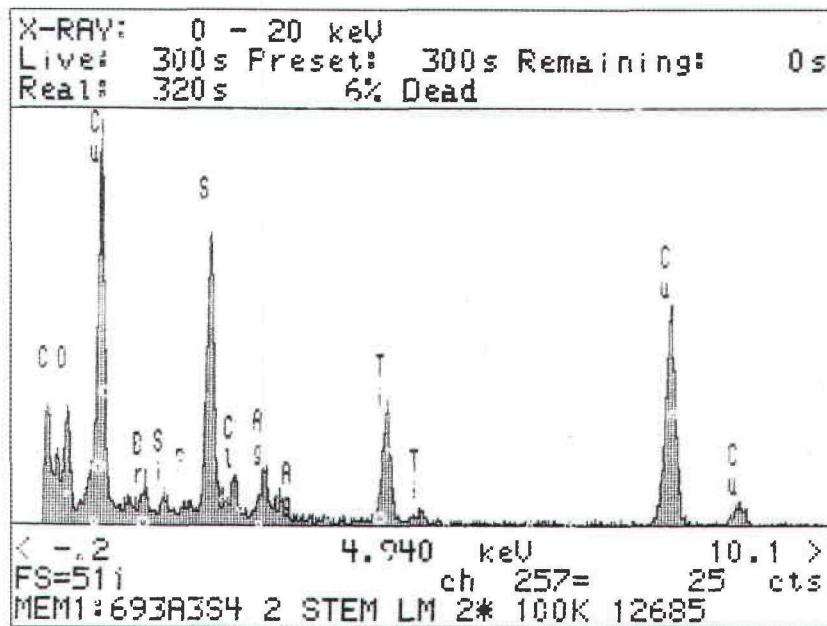


Figure 11. EDS-TEM. *Riftia* (spécimen de 64 cm) (LARVAE 1995). Matériel traité par le glutaraldéhyde seul et l'acétone. Présence de Cu, Br, S et Ag dans une concréction d'une cellule située à la périphérie d'un lobule (mêmes remarques spectrales que pour la figure 8).

Figure 11. EDS-TEM. *Riftia* (specimen of 64 cm in length) (LARVAE 1995). Material only treated with glutaraldehyde and acetone. Occurrence of Cu, Br, S and Ag in a concretion of a cell at the lobular periphery.

Figure 12. EDS-TEM. *Tevnia* adulte (HOT 1996). Matériel traité par le glutaraldéhyde seul et déshydraté par les alcools. Présence de Cu, S, Ag, Fe et Zn dans une concréction d'une cellule située à la périphérie d'un lobule (mêmes remarques spectrales que pour la figure 8).

Figure 12. EDS-TEM. Adult *Tevnia* (HOT 1996). Material only treated with glutaraldehyde then dehydrated in alcohols. Occurrence of Cu, S, Ag, Fe and Zn in a concretion of a cell at the lobular periphery (same spectral indications as for figure 8).

cumulation est peu importante. Le soufre détecté est toujours associé à d'autres éléments (magnésium, phosphore, calcium, fer, cuivre, zinc et argent). Les teneurs en soufre décelées ne peuvent en aucun cas correspondre aux quantités considérables de soufre intra-trophosomal (Childress &

Fisher, 1992). Il s'agit ici d'un mécanisme d'épuration des éléments du métabolisme. Cette excréition par bioaccumulation a par ailleurs été démontrée chez divers invertébrés marins (Jeantet et al, 1997). Dans les lysosomes des bactériocytes, le fer, le cuivre et le zinc proviendraient de cofac-

teurs enzymatiques en fin de vie ou de métallothionéines altérées (Ballan-Dufrançais et al., 1980), puisque l'on sait que *Riftia* en synthétise (Cosson-Mannevy et al., 1988). La teneur en argent n'est pas négligeable (voir Cosson, 1996) comme cela s'observe chez d'autres animaux des sources hydrothermales (*Bathymodiolus thermophilus*, *Calyptogena magnifica*, Childress & Fisher, 1992). Associé à divers autres éléments, ce métal a été détecté par microanalyse dans les tissus d'invertébrés marins (Ballan-Dufrançais et al., 1985 ; Martoja et al., 1985), où il peut précipiter sous forme de sulfure, non biodégradable (Martoja et al., 1988). Chez les bactéries, où il est décelé pour la première fois à notre connaissance, il coexiste avec d'autres éléments qui ont déjà été trouvés chez les bactéries symbiotiques du tégument d'*Alvinella* (Gaill et al., 1984). La fréquence de ces bioaccumulations d'argent chez les invertébrés marins pourrait suggérer un rôle métabolique de ce métal, rôle encore inconnu (Martoja et al., 1985). Le brome, difficile à identifier, est parfois rencontré dans les lysosomes des invertébrés marins, sans que sa signification physiologique soit bien établie (Ballan-Dufrançais et al., 1985).

Enfin, le manganèse, le nickel, le sélénium, le cadmium, le mercure et le plomb, mis en évidence par analyse chimique (Cosson, 1996), n'ont été décelés par microanalyse dans aucune structure de bioaccumulation.

Ce manque en structures lysosomiales de bioaccumulation dans le trophosome de *Riftia* et *Tevnia* se retrouve également dans le tégument et les branchies des vestimentifères (Jeantet et al., 1996). Au contraire, la bioaccumulation lysosomiale est importante chez d'autres animaux des sources hydrothermales : mollusques (Roesijadi et al., 1985) ou *Alvinella pompejana* (tégument, Gaill et al., 1984 ; tube digestif, Saulnier-Michel et al., 1989). De même le tube est minéralisé chez *Alvinella* alors qu'il ne l'est pas chez *Riftia* (Gaill & Hunt, 1986 ; Vovelle & Gaill, 1986). Il semble donc que la faible bioaccumulation observée chez les vestimentifères résulte davantage des processus physiologiques normaux d'épuration du milieu intérieur que d'une toxicité du milieu extérieur. Les nombreux composés métalliques du soufre, dosés dans le fluide hydrothermal (Cosson, 1996) sont donc vraisemblablement sous une forme peu assimilable. De ce fait, les bioaccumulations lysosomiales importantes relevées chez d'autres animaux résultent vraisemblablement de leur grande activité métabolique et non d'une adaptation à l'environnement hydrothermal.

Le phosphore et le fer, qui abondent dans le trophosome sur frottis et sur coupes au cryostat, sont extraits par la fixation. On peut admettre l'hypothèse que ces éléments seraient à l'état d'ions diffusibles, ou associés à des structures moléculaires de très faible masse. Le fer, très abondant, est selon toute vraisemblance responsable du noircissement rapide à l'air libre du soufre du trophosome, par formation de sulfure de fer, FeS (Pascal, 1960).

Le baryum peut provenir de la baryte du fluide hydrothermal. Il a été décelé par analyse chimique globale chez *Calyptogena magnifica* (Childress & Fisher, 1992). Cet élément traverse les barrières membranaires, sans doute avec le calcium, mais il est reconnu par les circuits métaboliques et précipite. Ce phénomène de bioaccumulation spécifique de baryum et/ou de strontium a d'ailleurs déjà été montré de nombreuses fois en analyse ionique (Truchet, 1982). Il apparaît, grâce au spectromètre de masse, qu'il s'agit de baryum naturel (isotope majeur, masse 138) et non du produit des expériences nucléaires, où le baryum produit est de masse 140.

Les cristaux de soufre qui se forment sur les bords du trophosome après divers traitements pourraient correspondre aux cristallisations orthorhombiques signalées par Hageage et al. (1970) et par Vetter (1985). Ces cristaux n'étant pas visualisés à l'échelle ultrastructurale correspondent à un artefact : le soufre est chassé du trophosome, au moins partiellement, par la dessiccation comme par la fixation et se rassemble en périphérie de l'organe, d'où les rinçages ultérieurs l'éliminent rapidement et complètement.

Comme aucune autre localisation n'apparaît sur les clichés ultrastructuraux pour ces quantités énormes de soufre que renferme le trophosome vivant, la seule explication plausible est que le soufre natif précipite sur place, *in vivo*, dans la masse cytoplasmique des symbiontes. Il est probable qu'il y prend alors la configuration octaédrique, la plus stable (Pascal, 1960). Les symbiontes des vestimentifères se différencient en cela du genre *Chromatium*, où les enzymes sont péri-membranaires, ce qui aboutit à une précipitation du soufre sur le bord, ou à l'extérieur du corps bactérien (Nelson & Hagen, 1995). Les emplacements de ces précipitats de soufre élémentaire S₈, d'une taille très petite, vraisemblablement infra-nanométrique, sont invisibles au microscope électronique en transmission.

Cette interprétation est étayée par le fait que, sur coupes au cryostat comme sur étalements de tissus fixés et simplement rincés au tampon cacodylate de sodium et en dépit de la formation de précipités périphériques par dessiccation, le signal soufre émet presque uniformément depuis l'ensemble du tissu, ne s'interrompant qu'au niveau des lacunes circulatoires. Le soufre est extrait lors des rinçages ultérieurs, nécessaires à la préparation des échantillons pour la microscopie.

En conclusion, nous constatons que le trophosome des vestimentifères *Riftia* et *Tevnia* n'est le siège d'aucune bioaccumulation particulière de métaux. Il est donc probable que ces animaux ne sont pas soumis à une forte pollution métallique. Les analyses chimiques à venir du fluide de l'environnement des *Riftia* (Sarradin, communication personnelle) permettront d'éprouver cette hypothèse.

Nos résultats montrent également qu'il n'existe pas de globules de rétention de soufre provenant de l'oxydation énergétique du sulfure d'hydrogène, dans les bactéries ou le cytoplasme des bactériocytes.

L'hypothèse la plus vraisemblable est donc que les grandes quantités de soufre que renferme le trophosome sont essentiellement présentes sous forme de précipités infra-nanométriques de soufre élémentaire S₈ intrabactériens.

Remerciements

Nous remercions très vivement les chefs de mission des différentes campagnes qui nous ont permis d'avoir ce précieux matériel : L. Mullineux pour la mission EPR 1995, C. Fisher pour la mission LARVAE 1995, F. Gaill pour la mission HOT 1996.

La microscopie électronique en transmission (TEM) et la microscopie électronique en balayage (SEM) ont été effectuées au Centre Interuniversitaire de Microscopie électronique (CIME), 7 quai Saint Bernard, 75251 Paris Cedex 05.

La microanalyse en dispersion d'énergie couplée au balayage (EDS-SEM) a été effectuée au service MEB de l'UFR des Sciences de la Terre, Tour 25, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05.

La microanalyse en dispersion d'énergie couplée à la microscopie électronique en transmission (EDS-TEM) a été effectuée au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Université, 8 rue Cuvier, 75252 Paris Cedex 05.

La microanalyse à l'échelle histologique par microsonde électronique (CAMECA MS 46) et par émission ionique secondaire (CAMECA SMI 300) a été effectuée sur les appareils de l'équipe de Cytophysiologie analytique, 12 rue Cuvier, 75005 Paris.

Nous remercions Anny ANGLO, Ghislaine FREBOURG et Lydia MASSOT pour l'efficacité de leur collaboration technique.

Références

- Ballan-Dufrançais C., Ruste J. & Jeantet A.Y. 1980.** Quantitative Electron Probe Microanalysis on Insects Exposed to Mercury. I - Methods. An Approach on the Molecular Form of the Stored Mercury. Possible Occurrence of Metallothionein-Like Proteins. *Biology of the Cell*, **39** (3): 317-324.
- Ballan-Dufrançais C., Jeantet A.Y., Feghali C. & Halpern S. 1985.** Physiological Features of Heavy Metal Storage in Bivalve Digestive Cells and Amoebocytes: EPMA and Factor Analysis of Correspondences. *Biology of the Cell*, **53**: 283-292.
- Bosch C. & Grassé P. 1984a.** Cycle partiel des bactéries chimoautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophore, Vestimentifère). I. Le trophosome et les bactériocytes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* (série III), **299** (9): 371-376.
- Bosch C. & Grassé P. 1984b.** Cycle partiel des bactéries chimoautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophore, Vestimentifère). II. L'évolution des bactéries symbiotiques et des bactériocytes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* (série III), **299** (10): 413-419.
- Cavanaugh C.M., Gardiner S.L., Jones M.L., Jannasch H.W. & Waterbury J.B. 1981.** Prokaryotic Cells in the Hydrothermal Vent Tube Worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible Chemoautotrophic Symbionts. *Science*, **213**: 340-342.
- Childress J.D. 1995.** Life in Sulfidic Environment: Historical Perspective and Current Research Trends. *American Zoologist*, **35**: 83-90.
- Childress J.D. & Fisher C.R. 1992.** The Biology of Hydrothermal Vent Animals: Physiology, Biochemistry and Autotrophic Symbioses. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review*, **30**: 337-441.
- Cosson R.P. 1996.** La bioaccumulation des éléments minéraux chez le vestimentifère *Riftia pachyptila* (Jones) : bilan des connaissances. *Oceanologica Acta*, **19** (2): 163-176.
- Cosson-Mannevy M.A., Cosson R.P., Gaill F. & Laubier L. 1988.** Transfert, accumulation et régulation des éléments minéraux chez les organismes des sources hydrothermales. *Oceanologica Acta*, vol. sp. **8**: 219-226.
- Doeller J.E. 1995.** Cellular energetics of animals from high sulfide environments. *American Zoologist*, **35**: 154-162.
- Fiala-Medioni A., Michalski J.C., Jolles J., Alonso C. & Montreuil J. 1994.** Lysosomal and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* (série III), **317**: 239-244.
- Gaill F., Halpern S., Quintana C. & Desbruyères D. 1984.** Présence intracellulaire d'arsenic et de zinc associés au soufre chez une Polychète des sources hydrothermales (*Alvinella pompejana*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* (série III), **298** (12): 331-336.
- Gaill F. & Hunt S. 1986.** Tubes of deep sea hydrothermal vent worms *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) and *Alvinella pompejana* (Annelida). *Marine Ecology Progress Series*, **34**: 267-274.
- Gaill F., Shillito B., Menard F., Goffinet G. & Childress J.D. 1997.** Rate and processes of tube production by the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Marine Ecology Progress Series*, **148**: 135-143.
- Gardiner S.L. & Jones M.L. 1993.** Vestimentifera. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. vol. 12. (F.W. Harrisson & M.E. Rice eds), pp. 371-384. Wiley-Liss: New-York.
- Hageage G.J., Eanes E.D. & Gherna R.L. 1970.** X-Ray Diffraction Studies of the Sulfur Globules Accumulated by *Chromatium* Species. *Journal of Bacteriology*, **101** (2): 464-469.
- Hentschel U. & Felbeck H. 1993.** Nitrate respiration in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Nature*, **366**: 338-340.
- Jeantet A.Y., Ballan-Dufrançais C. & Anglo A. 1997.** Pollution par les métaux et atteintes cytologiques chez les bivalves marins. In : Utilisation des biomarqueurs en écotoxicologie (Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F.), pp. 315-353, Masson : Paris.
- Juniper S.K. & Martineu P. 1995.** Alvinellids and Sulfides at Hydrothermal Vents of the Eastern Pacific: a Review. *American Zoologist*, **35**: 174-185.

- Laue B.L. & Nelson D.C. 1994.** Characterization of the gene encoding the autotrophic ATP sulfurylase from the bacterial endosymbiont of the hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila*. *Journal of Bacteriology*, **176**: 3723-3729.
- Martoja R., Ballan-Dufrançais C., Jeantet A.Y., Gouzerh P., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Bertet B. & Baud J.P. 1988.** Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. *Journal Canadien des Sciences Halieutiques et Aquatiques*, **45** (10): 1827-1841.
- Martoja M., Bouquegneau J.M., Truchet M. & Martoja R. 1985.** Recherche de l'argent chez quelques mollusques marins, dulcicoles et terrestres. Formes chimiques et localisation histologique. *Vie et Milieu*, **35** (1): 1-13.
- Nelson D.C. & Hagen K.D. 1995.** Physiology and Biochemistry of Symbiotic and Free-Living Chemoautotrophic Sulfur Bacteria. *American Zoologist*, **35**: 91-101.
- Pascal P. 1960.** Nouveau traité de chimie minérale. **13** (1 et 2), pp. 673 à 1650, Masson et Cie, Editeurs : Paris.
- Perrot P. 1994.** Dictionnaire de thermodynamique. Interéditions : Paris. 293 pp.
- Renosto F., Martin R.L., Borrell J.L., Nelson D.C. & Segel I.H. 1991.** ATP Sulfurylase from Trophosome Tissue of *Riftia pachyptila* (Hydrothermal Vent Tube Worm). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **290** (1): 66-78.
- Roesijadi G., Young J.S., Crecelius E.A. & Thomas L.E. 1985.** Distribution of trace metals in the hydrothermal vent clam, *Calyptogena magnifica*. *Bulletin of the Biological Society of Washington*, **6**: 722-732.
- Saulnier-Michel C., Gaill F., Hily A., Alberic P. & Cosson Mannevy M.A. 1989.** Structure and functions of the digestive tract of *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Journal Canadien de Zoologie*, **68**: 722-732.
- Scott K.M. & Fischer C.R. 1995.** Physiological Ecology of Sulfide Metabolism in Hydrothermal Vent and Cold Seep Vesicomyid Clams and Vestimentiferan Tube Worms. *American Zoologist*, **35**: 102-111.
- Truchet M. 1975.** Application de la microanalyse par émission ionique secondaire aux coupes histologiques : localisation des principaux isotopes de divers éléments. *Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire*, **24** (1): 1-22.
- Truchet M. 1982.** Étude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique : analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman ; méthodologie et exemples d'application. *Thèse de Doctorat d'État*, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), Paris. 440 pp.
- Vetter R.D. 1985.** Elemental sulfur in the gills of three species of clams containing chemoautotrophic symbiotic bacteria: a possible inorganic energy storage compound. *Marine Biology*, **88**: 33-42.
- Vovelle J. & Gaill F. 1986.** Données morphologiques, histochimiques et microanalytiques sur l'élaboration du tube organominéral d'*Alvinella pompejana*, Polychète des sources hydrothermales et leurs implications phylogénétiques. *Zoologica Scripta*, **15** (1): 33-43.
- Zal F., Lallier F., Green B.N., Vinogradov S.N. & Toulmond A. 1996.** The multihemoglobin system of the Hydrothermal Vent Tube Worm *Riftia pachyptila*. *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 8869-8881.

Cet article a été présenté lors de l'Atelier DORSALES qui s'est tenu à Roscoff les 6-8 octobre 1997.

This paper was presented during the DORSALES workshop held at Roscoff, 6-8 October 1997.