



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE présentée par

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Ecologie Microbienne

École Doctorale des Sciences de la Mer

Mathieu Guri

Préparée à l'UMR 6197, Ifremer-CNRS-UBO

Etablissement de rattachement : Ifremer, Centre de Brest

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

Etude de la diversité des
épibiontes bactériens associés
au céphalothorax de la
crevette hydrothermale
Rimicaris exoculata.

Thèse soutenue le 19 décembre 2011

devant le jury composé de :

Abdelaziz Heddi (Rapporteur)
Professeur, INSA de Lyon

Philippe Vandenkoornhuysse (Rapporteur)
Professeur, Université de Rennes I

Magali Zbinden (Examineur)
Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)

Christine Paillard (Examineur)
Directeur de recherche CNRS, IUEM / UMR 6539 / LEMAR

Georges Barbier (Examineur)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale (UBO)

Mohamed Jebbar (Examineur)
Professeur à l'UBO et Directeur adjoint du LM2E (UMR 6197)

Marie-Anne Cambon-Bonavita (Directeur de thèse)
Chercheur, Ifremer / UMR 6197 / LM2E



Remerciements

Une aventure de trois ans qui s'achève. Je n'ai vraiment pas vu le temps passer. Le travail réalisé pendant ces années ne s'est évidemment pas fait tout seul. Il est temps de remercier les personnes et les organismes qui ont contribué à mener à bien ce projet.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), UMR6197 (Ifremer/UBO/CNRS), à l'Ifremer de Brest. Le CNRS, BMO, l'Ifremer, l'UBO, l'ANR Deep Cases, ainsi que le GDR ECCHIS ont apporté leur soutien financier pour la réalisation de ce projet de thèse.

Je souhaite dans un premier temps exprimer ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Marie-Anne Cambon-Bonavita, chercheur responsable de l'équipe « Interactions et Symbioses » au LM2E. Un grand merci pour ta présence, tes conseils, ton encadrement en général qui m'a permis d'évoluer professionnellement dans de bonnes conditions au cours de ces années.

Je tiens à remercier M. Abdelaziz Heddi, enseignant-chercheur à l'INSA de Lyon et M. Philippe Vandenkoornhuysse, professeur à l'Université de Rennes I pour avoir jugé ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que les autres membres du jury que sont Magali Zbinden, Christine Paillard, Mohamed Jebbar et Georges Barbier.

Merci aux membres de mon comité de thèse : Bernard Ollivier et Laurent Toffin pour leurs avis et recommandations.

Un grand merci à toute l'équipe du LM2E, qui durant ces trois années a été dirigée par Joël Querellou et Daniel Prieur pour finir par Anne Godfroy et Mohamed Jebbar que je remercie vivement pour leurs gestions (merci Anne pour les deux mois supplémentaires) et leurs avis scientifiques. Merci à tous ceux qui m'ont apporté une aide technique et scientifique, je pense particulièrement à Lucile Durand qui m'a formé durant mes stages successifs de Master (je te souhaite bon courage pour la suite). Merci à Erwan Roussel (pour m'avoir initié à la DGGE), Philippe Crassous (pour les images en microscopie électronique à balayage), Adrien Vigneron (pour le golf, la Q-PCR et nos discussions scientifiques), Cyrielle Jan (pour nos discussions scientifiques et pour m'avoir fait tester la cuisine moléculaire), Bénédicte Ritt (pour les sessions surfs) ainsi que Cassandre Lazar, Stéphane L'Haridon du groupe Marges Continentales. J'aimerais également remercier l'équipe réplique du LM2E, notamment Benoit Castrec avec qui j'ai pu développer, lors d'un stage, mon côté « Manager », ainsi que Adeline Palud pour nos discussions générales. Merci à Hélène Moussard pour les cultures de méthanotrophes et à Ian Probert pour avoir corrigé l'anglais de mes articles.

Je remercie mes deux stagiaires de Master 2, pour m'avoir supporté (ou plutôt, vous devriez me remercier pour vous avoir supportées, non ?) et avoir contribué à mes premières expériences d'encadrement : Perrine Cruaud (merci pour ta curiosité scientifique et tes nombreuses questions (dur)) et Jennifer Martin (merci pour ta persévérance), je vous souhaite à toutes les deux bonne chance pour vos thèses et vos carrières scientifiques respectives. Pour les questions administratives, commandes et bonne humeur, notre secrétaire Christine Lamy a toujours répondu présente, je l'en remercie. J'aimerais également remercier nos collaborateurs de Liège, Philippe Compère et Julie Ponsard chez qui j'ai pu découvrir, entre autres, des techniques de mesures de radioactivité et goûter aux frites et bières Belges. J'en arrive à Valentin Crépeau, dit « Crossword Master », merci pour ta bonne humeur et surtout pour tes péripéties rocambolesques, espérons que tu n'auras pas à convoquer les masses sacrées et les phases élues pour ton avenir (au fait, les mots fléchés à midi c'est fini, on fait des sudokus... Je rigole, on bosse bien sûr).

J'aimerais maintenant remercier particulièrement Valérie, collègue de boulot et amie sur qui moi et ma petite famille pouvons compter depuis bientôt plus de... (J'évite de le dire, ça vieillit) tout comme Nicolas son mari, qui m'a fait partager sa passion pour les sports nautiques, notamment la voile... je n'oublierai pas les régates en Laser2000. Un grand merci à Benjamin et Angélique ; Benjamin, désolé de t'avoir exploité sur les manip de SIP et de Q-PCR, et de t'avoir fait croire que t'étais fort au squash, je rigole bien sûr (enfin, on verra le prochain match) ; Angélique, sans toi, j'aurais jamais pu faire croire à Benjamin qu'il était fort au squash, encore merci. Je voudrais également remercier Maria et Vlad, pour les bons moments passés ensemble, à qui je souhaite une bonne réussite pour la suite de leurs carrières professionnelles et dans leur vie commune.

Un grand merci à mes parents qui ont toujours été là pour moi, quoi que je choisisse de faire (dans la limite du raisonnable), pour leur confiance et leurs aides de chaque instant. Merci aux membres de ma famille et belle-famille de l'Est de la France, de Guyane et de Chamonix pour les bons moments passés ensemble (toujours trop courts) et qui restent à venir.

Pour toi, Sarah, je n'ai pas les mots pour dire à quel point je te suis reconnaissant d'avoir été là (et de l'être encore), de m'avoir soutenu, mais également remué quand c'était nécessaire, de tes sacrifices. Je réalise que cette thèse n'aurait pas été menée de la même façon si on ne vivait pas ensemble.

Au cours de cette dernière année de doctorat, de nombreux événements se sont produits, je pense à mes deux grands-mères qui nous ont quittés et à la naissance de notre petite fille Elsa. C'est avec plaisir et humilité que je leur dédie, tout simplement, cette thèse.

Valorisation scientifique de ce doctorat

Articles :

Guri, M., Klein, B., Cruaud, P., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.A. (2011). New insights into the carbon and energy metabolic pathways occurring among the *Rimicaris exoculata* epibionts. *The ISME J* (en préparation).

Durand, L., Roumagnac, M., Cueff-Gauchard, V., Cyrielle, J., **Guri, M.**, Teissier, C., Haond, M., Crassous, P., Zbinden, M., Arnaud-Haond, S., Cambon-Bonavita, M.A. (2011). Biogeographical distribution of the *Rimicaris exoculata* gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. *The ISME J* (soumis).

Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., Cambon-Bonavita, M.A. (2011). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J* (accepté).

Communications orales :

Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., Cambon-Bonavita, M.A. (June 2011). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*.
FEMS, 4th Congress of European Microbiologists, Genève (Suisse) (poster, Annexe I).

Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B., Cambon-Bonavita, M.A. (March 2011). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*.
GDR Ecchis, Brest (France) (présentation orale).

Guri, M., Durand, L., Jan, C., Cruaud, P., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Le Bris, N., Roussel, E., Shillito, B., Zbinden, M., Cambon-Bonavita, M.A. (September 2010). New insights on the diversity among microbial communities associated to the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*: a double symbiosis.
2nd International Workshop on deep-sea Microbiology, Brest (France) (présentation orale).

Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Shillito, B., Zbinden, M., Cambon-Bonavita, M.A. (June 2010). Microbial epibiotic communities' succession along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*.
CAREX, Summer School, Pieve Tesino (Italie) (poster).



The **ISME** Journal
Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology



Table des matières

INTRODUCTION (1)

Introduction générale. (3)

1. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. (7)

1.1. Naissance d'un écosystème hydrothermal océanique. (7)

1.2. Répartition géographique et conditions géochimiques des écosystèmes hydrothermaux océaniques. (8)

1.3. La vie dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques. (12)

2. Les interactions entre organismes vivants. (16)

2.1. La symbiose. (16)

2.2. Transmission des symbiotes microbiens. (17)

2.2.1. Transmission horizontale. (19)

2.2.1.1. Définition et exemples de transmissions horizontales. (19)

2.2.1.2. Les moyens de reconnaissances et d'attachements : hôte – symbiote microbien. (21)

2.2.1.3. Le parcours du symbiote au cours d'une transmission horizontale. (23)

2.2.2. Transmission verticale. (25)

2.2.2.1. Définition et exemples de transmissions verticales. (25)

2.2.2.2. Les moyens de reconnaissances et d'attachements : hôte – symbiotes microbiens. (27)

2.2.2.3. Le parcours du symbiote au cours d'une transmission verticale. (28)

2.2.2.3.1. Du bactériome aux organes reproducteurs de l'hôte. (28)

2.2.2.3.2. Des organes reproducteurs aux bactériomes de la descendance. (29)

2.2.3. Les impacts phylogénétiques des modes de transmission des symbioses. (30)

3. Les associations symbiotiques chimiosynthétiques dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques. (33)

3.1. Métabolismes des partenaires microbiens. (33)

3.1.1. L'oxydation de l'hydrogène. (34)

3.1.2. La ferro-oxydation. (35)

3.1.3. La sulfo-oxydation ou thiotrophie. (37)

3.1.4. L'oxydation du méthane ou méthanotrophie. (38)

- 3.1.5. Les voies autotrophes. (40)
- 3.1.5.1. Le cycle de Calvin. (40)
- 3.1.5.2. Le cycle inverse de l'acide citrique. (41)
- 3.2. Exemples de symbioses chimiosynthétiques hydrothermales. (42)
- 3.2.1. *Riftia pachyptila*. (42)
- 3.2.2. *Bathymodiolus azoricus*. (43)

4. Le modèle de l'étude : *Rimicaris exoculata*. (45)

- 4.1. Pourquoi étudier *Rimicaris exoculata* ? (45)
- 4.2. Biologie de *Rimicaris exoculata*. (46)
- 4.3. Double symbiose ? (49)
- 4.3.1. Les épibiontes du céphalothorax (49)
- 4.3.2. Les épibiontes du tube digestif (53)
- 4.4. Mode de nutrition et cycle de vie (55)

5. Objectifs de l'étude. (57)

MATERIEL ET METHODES (59)

6. Collecte / préparation des échantillons. (61)

7. Observations microscopiques et *in situ* des épibiontes de *R. exoculata*. (63)

- 7.1. Observations *in situ* (63)
- 7.2. Observations après hybridation fluorescente *in situ* (FISH). (63)
- 7.3. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB). (63)
- 7.4. Observations par microscopie électronique à transmission (MET). (64)

8. Etude de l'incorporation *in vivo* de molécules marquées chez les épibiontes de *R. exoculata*. (64)

9. Etude phylogénétique et fonctionnelle des épibiontes de *R. exoculata*. (69)

- 9.1. Extraction d'acides nucléiques (ADN/ARN) et amplification (RT)-PCR. (69)
- 9.2. Clonage / Séquençage et analyse phylogénétique. (70)
- 9.3. Quantification par Q-PCR des épibiontes et leurs voies métaboliques. (71)

RESULTATS (73)

Chapitre 1 : Acquisition des épibiontes bactériens au cours du cycle de vie de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*. (75)

10. Acquisition des épibiontes bactériens au cours du cycle de vie de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*. (77)

- 10.1. Introduction de l'étude. (77)
- 10.2. Article 1: "Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*" (accepté). (79)
- 10.3. Rappel des principaux résultats et conclusion. (96)

Chapitre 2 : Recherche des voies métaboliques utilisées par les épibiontes bactériens du céphalothorax de *Rimicaris exoculata*. (97)

11. Recherche des voies de fixation du carbone et des sources d'énergie utilisées par les épibiontes de *Rimicaris exoculata*. (99)

- 11.1. Introduction de l'étude. (99)
- 11.2. Article 2: "New insights into the carbon and energy pathways occurring among *Rimicaris exoculata* epibionts" (in prep.). (101)
- 11.3. Rappel des principaux résultats et conclusion. (137)

Chapitre 3 : Distribution biogéographique des épibiontes du tube digestif de *Rimicaris exoculata* le long des sites hydrothermaux de la Ride Médio-Atlantique. (139)

12. Distribution biogéographique des épibiontes du tube digestif de *Rimicaris exoculata* le long des sites hydrothermaux de la Ride Médio-Atlantique. (141)

- 12.1. Introduction l'étude. (141)
- 12.2. Article 3: "Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites" (soumis à *The ISME J*). (143)
- 12.3. Rappel des principaux résultats et conclusion. (189)

BILAN ET PERSPECTIVES (191)

13. Focus sur l'épibiose de *Rimicaris exoculata*. (193)

14. Perspectives. (197)

15. Conclusion. (200)

BIBLIOGRAPHIE (201)

ANNEXE I (217)

Liste des figures

- Figure 1** : schéma du fonctionnement d'une source hydrothermale marine profonde. (7)
- Figure 2** : localisation des dorsales océaniques et des sites hydrothermaux marins. (9)
- Figure 3** : réaction de serpentinisation. (10)
- Figure 4** : schéma de la photosynthèse *versus* chimiosynthèse. (13)
- Figure 5** : exemples d'organismes hydrothermaux symbiotiques. (14)
- Figure 6** : modes de transmission des symbiotes microbiens. (18)
- Figure 7** : exemples de symbiotes transmis horizontalement. (20)
- Figure 8** : schéma d'un système de sécrétion de type III (T3SS). (24)
- Figure 9** : exemples de symbiotes transmis verticalement. (26)
- Figure 10** : histoire évolutive en fonction du mode de transmission. (31)
- Figure 11** : réactions de l'oxydation de l'hydrogène. (34)
- Figure 12** : réactions de l'oxydation du fer. (36)
- Figure 13** : réactions de la sulfo-oxydation. (37)
- Figure 14** : réactions de l'oxydation du méthane. (39)
- Figure 15** : réactions du cycle de Calvin. (40)
- Figure 16** : réactions du cycle inverse de l'acide citrique. (41)
- Figure 17** : évolution du système hôte – symbiote chez *R. pachyptila*. (42)
- Figure 18** : évolution du système hôte – symbiote chez *B. azoricus*. (44)
- Figure 19** : taxonomie et cliché de *R. exoculata*. (46)
- Figure 20** : anatomie du céphalothorax de *R. exoculata*. (47)
- Figure 21** : schéma du cycle de mue de *R. exoculata*. (48)
- Figure 22** : morphologies et phylogénie des épibiontes de *R. exoculata*. (50)
- Figure 23** : phylogéographie des épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata*. (51)
- Figure 24** : hypothèses sur les métabolismes des épibiontes de *R. exoculata*. (52)
- Figure 25** : schéma du tube digestif de *R. exoculata*. (53)
- Figure 26** : observation des épibiontes du tube digestif de *R. exoculata*. (54)
- Figure 27** : cycle de vie partiel de *R. exoculata*. (56)
- Figure 28** : localisation des sites hydrothermaux de cette étude. (61)
- Figure 29** : photos du navire océanographique *Pourquoi pas ?* et de submersibles. (62)
- Figure 30** : outils de prélèvement et d'expérimentation *in vivo* des animaux profonds. (65)
- Figure 31** : protocole utilisé pour la séparation en SIP. (66)
- Figure 32** : récupération des fractions SIP. (67)
- Figure 33** : séparation des communautés épibiotiques de *R. exoculata* en SIP. (68)

Figure 34 : schéma bilan sur les hypothèses majeures des échanges possibles entre l'environnement / les épibiontes / *Rimicaris exoculata*. (195)

Figure 35 : exemple de la technique du geneFISH. (197)

Figure 36 : exemple de la technique du NanoSIMS. (198)

Liste des tableaux

Tableau 1 : concentrations de minéraux et gaz de certains sites hydrothermaux. (11)

Tableau 2 : caractéristiques de diverses symbioses chimiotrophes. (33)

Tableau 3 : amorces PCR utilisées dans cette étude. (69)

Tableau 4 : amorces Q-PCR utilisées dans cette étude. (71)

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.
APS : Adénosine-5' PhosphoSulfate réductase.
ARN : Acide RiboNucléique.
ARNr : ARN ribosomique.
ATP : Adénosine Tri-Phosphate.
DAPI : 4', 6'-diamidino-2-phénylindole.
EPR : East Pacific Rise.
EPS : ExoPolySaccharides.
FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization.
LPS : LipoPolySaccharides.
MAR : Mid-Atlantic Ridge.
MEB : Microscopie Electronique à Balayage.
MET : Microscopie Electronique à Transmission.
OTU : Operational Taxonomic Unit.
pb : paires de bases.
PCR : Polymerase Chain Reaction.
pMMO : Méthane Mono-oxygénase particulière.
Q-PCR : Quantitative-Polymerase Chain Reaction.
ROV : Remoted Operated Vehicle.
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction.
rTCA : reverse Tri-Carboxylic Acid.
RubisCO : Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase / Oxygénase.
SIP : Stable Isotope Probing.

« Il n'est pas nécessaire d'aller vite, le tout est de ne pas s'arrêter. »
Confucius

« L'important n'est pas le temps qu'il nous reste, mais bien ce que l'on va en faire. »
Un surfeur

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Cette thèse a été effectuée dans le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE, UMR6197) au centre Ifremer de Brest, au sein du groupe « Interactions et Symbioses », sous la direction de Marie-Anne Cambon-Bonavita. Le sujet de cette thèse portait sur l'étude de la diversité des épibiontes bactériens associés à la crevette *Rimicaris exoculata* vivant au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes.

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont des écosystèmes dépourvus de lumière où la photosynthèse est remplacée (en tant que système primaire de production d'énergie) par un processus bioénergétique basé sur l'utilisation de composés chimiques par des microorganismes : la chimiosynthèse. Ces microorganismes sont qualifiés de chimiolithoautotrophes et constituent dans ces écosystèmes (comme les végétaux à la surface de la Terre) les principaux producteurs primaires. La plupart des organismes supérieurs hydrothermaux (ex. : vers tubicoles, crevettes, moules) vont vivre en symbiose avec ces microorganismes. Plusieurs types de symbioses existent, que le symbiote microbien vive dans (endosymbiose) ou sur l'hôte (épibiose) le bénéfice principal est généralement d'ordre trophique (nutritionnel).

Ce manuscrit va présenter une étude focalisée sur l'analyse d'une épibiose entre des microorganismes et un crustacé endémique des sources hydrothermales de la Ride Médio-Atlantique (MAR), la crevette *Rimicaris exoculata* (Williams and Rona 1986). Ce crustacé représente l'espèce majoritaire de nombreux sites hydrothermaux de la Ride-Médio Atlantique (MAR). Sur les sites colonisés, les crevettes vivent en agrégats denses et mobiles sur les édifices hydrothermaux, avec une densité pouvant atteindre 2500 individus / m² (Segonzac 1992). Une des particularités anatomiques de *R. exoculata* est de présenter un céphalothorax hypertrophié à l'intérieur duquel se développent des communautés microbiennes épibiotiques très denses. En 1995, une première étude mettait en évidence à partir d'individus du site Snake Pit de la MAR que ces épibiontes appartenaient à un seul groupe bactérien : les *Epsilonproteobacteria* (Polz and Cavanaugh 1995). Cependant, des travaux récents ont montré la présence d'autres phylotypes tels que les *Gammaproteobacteria* qui sont couramment impliqués dans des relations symbiotiques avec des invertébrés hydrothermaux (Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011). En prenant en compte la composition du fluide hydrothermal et les résultats de phylogénie, 4 métabolismes énergétiques bactériens sont suspectés au sein de la communauté d'épibiontes: oxydation du fer, du méthane et de l'hydrogène et oxydation / réduction des composés soufrés (Schmidt *et al.*, 2008, Zbinden *et al.*, 2008, Hügler *et al.*,

2011). De plus, une communauté bactérienne inféodée au tube digestif de la crevette a également été décrite (Zbinden and Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.*, 2010). D'ailleurs, l'observation du contenu du tube digestif de ce crustacé, montrant la présence en majorité de minéraux avec peu de matière organique (Segonzac *et al.*, 1993), a conduit à l'élaboration de plusieurs hypothèses quand à son mode de nutrition : (i) les microorganismes ingérés avec les particules minérales des parois des cheminées hydrothermales ou avec l'eau environnante seraient la source principale de nutrition (Van Dover *et al.*, 1988) ; (ii) les épibiontes du céphalothorax seraient la source nutritive principale par grattage du tapis microbien (Casanova *et al.*, 1993, Polz and Cavanaugh 1995, Gebruk *et al.*, 1997, Rieley *et al.*, 1999, Gebruk *et al.*, 2000a), par ingestion des épibiontes et de l'exuvie après la mue ou encore par transfert trans-cuticulaire de matière organique des épibiontes à la crevette (Zbinden *et al.*, 2004, Corbari *et al.*, 2008, Zbinden *et al.*, 2008) ; (iii) la communauté bactérienne inféodée au tube digestif de *R. exoculata* pourrait représenter une source nutritive alternative (Polz *et al.*, 1998, Pond *et al.*, 2000, Zbinden and Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.*, 2010). Ces différentes hypothèses peuvent coexister au sein de ce modèle.

Comme tous les arthropodes, la crevette *R. exoculata* présente la particularité de muer. Elle perd la totalité de ses épibiontes du céphalothorax à chaque mue et les réacquière par la suite (durée d'un cycle de mue environ 10 jours), conduisant à l'hypothèse d'une transmission horizontale (Corbari *et al.*, 2008). Pour mieux comprendre le fonctionnement des relations entre la crevette et ses épibiontes et notamment pour valider le mode de transmission de ces derniers, il faudrait analyser la présence (ou non) des épibiontes sur tous les stades de la vie du modèle. Or, le cycle de vie de *R. exoculata* est actuellement incomplet, il manque en effet les stades larvaires pélagiques. Néanmoins à l'heure actuelle, à part les travaux sur le cycle de mue de Corbari et collaborateurs en 2008, aucune étude n'a regardé les changements possibles dans la communauté d'épibiontes dû aux variations physiologiques rencontrées au cours des stades connus du cycle de vie de *R. exoculata*.

Les travaux de cette thèse se sont donc principalement concentrés sur l'étude des épibiontes associés au céphalothorax de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* au cours de son cycle de vie. Je commencerai par introduire le sujet en décrivant les écosystèmes hydrothermaux, milieu de vie du modèle et poursuivrai sur des notions allant du parasitisme à la symbiose en insistant particulièrement sur les modes de transmissions, pour revenir enfin au modèle de l'étude qu'est *R. exoculata*. Les résultats de cette thèse vont être ensuite présentés en trois parties :

- **Chapitre 1** : Acquisition des épibiontes bactériens au cours du cycle de vie de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* (Article accepté à The ISME J).
- **Chapitre 2** : Recherche des voies métaboliques utilisées par les épibiontes bactériens du céphalothorax de *Rimicaris exoculata* (Article en préparation).
- **Chapitre 3** : Distribution biogéographique des épibiontes du tube digestif de *Rimicaris exoculata* le long des sites hydrothermaux de la Ride Médio-Atlantique (Article soumis à The ISME J).

Finalement, les résultats de ces travaux seront synthétisés et des axes de recherches futures seront discutés dans une partie bilan et perspectives.

INTRODUCTION

1. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

1.1. Naissance d'un écosystème hydrothermal océanique.

Les sources hydrothermales océaniques profondes ont été découvertes pour la première fois en 1977 au large des Galápagos dans le Pacifique par le submersible américain *Alvin* (Corliss *et al.*, 1979). L'hypothèse que le plancher océanique n'était qu'un désert oligotrophique fut remise en cause suite à l'observation de communautés luxuriantes d'organismes vivants autour de ces sources (section 1.3.). Ces biotopes sont caractérisés par la présence de cheminées hydrothermales (appelées aussi « fumeurs ») (Fig.1). Ces édifices remarquables sont situés le long des dorsales océaniques et des bassins arrière-arcs (section 1.2.). A ce niveau, les mouvements de la croûte terrestre vont créer des anfractuosités dans le plancher océanique où l'eau de mer profonde (froide, 2 à 3°C) va s'infiltrer et se retrouver à proximité de la matière en fusion (magma ou manteau) (Fig.1).

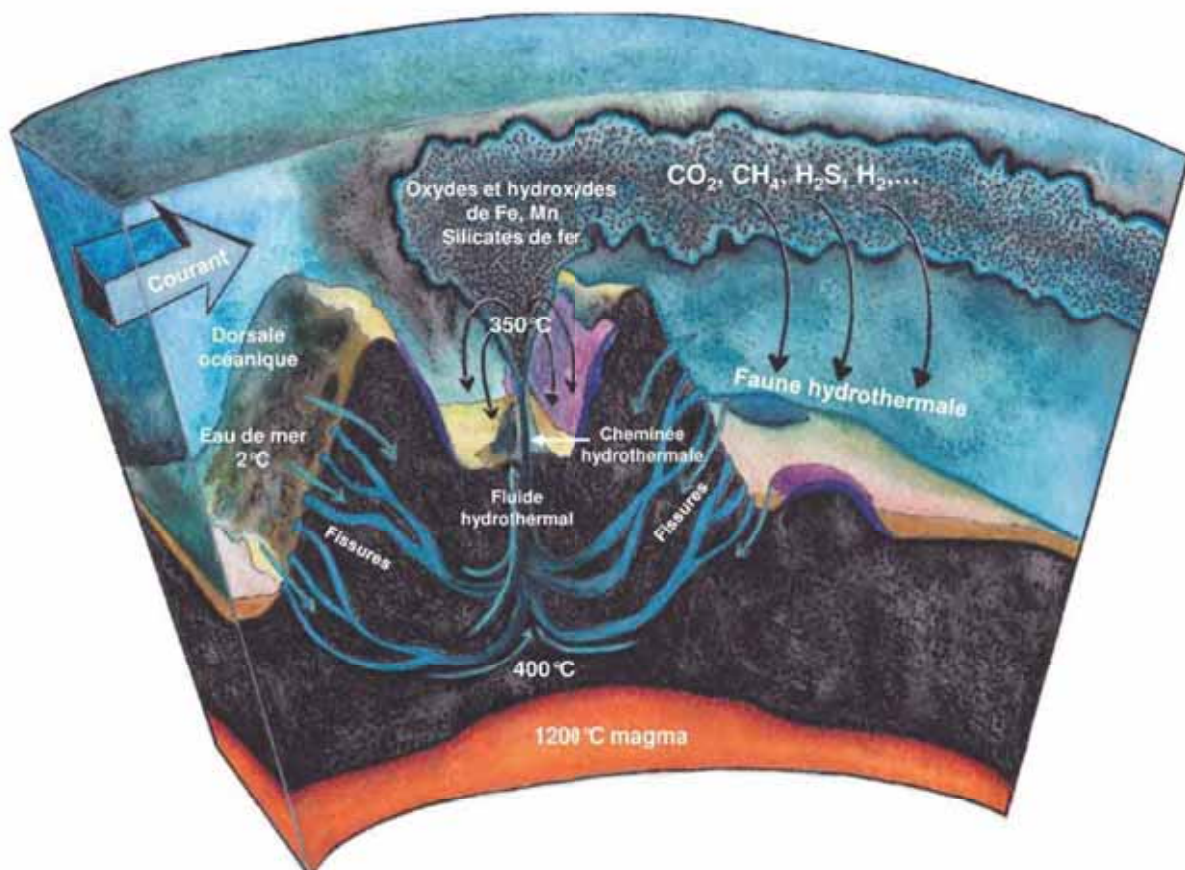


Figure 1 : schéma du fonctionnement d'une source hydrothermale marine profonde (modifié par C. Guri d'après La Recherche n°355, juillet-août 2002, p.23).

L'eau va donc se réchauffer entraînant la diminution de sa densité et une augmentation de la pression provoquant sa remontée. Pendant la remontée, l'eau va se charger en éléments métalliques (ex. : Zn, Mn, Fe, Si) et en gaz dissous (ex. : H₂S, H₂, CH₄) extraient des roches qu'elle lessive. Ce fluide est anoxique et généralement acide. Il peut atteindre une température de plus de 400°C sans être vaporisé car le phénomène se déroule à plusieurs centaines de mètres de profondeur où la pression hydrostatique peut atteindre plusieurs dizaines de MégaPascals (MPa) (ex. : à 1000 m de profondeur la pression atteint 10 MPa). C'est au contact de l'eau de mer froide que les différents minéraux contenus dans ce fluide vont précipiter et former des structures appelées cheminées hydrothermales qui peuvent atteindre plus d'une vingtaine de mètres de hauteur. Ces structures peuvent disparaître en quelques jours, comme persister des centaines d'années (Van Dover 2000).

1.2. Répartition géographique et conditions géochimiques des écosystèmes hydrothermaux océaniques.

Répartition géographique :

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont localisées le long des dorsales médio-océaniques de l'Atlantique, du Pacifique et de l'océan Indien, ainsi qu'au niveau des bassins avant et arrière-arc (Van Dover 2000) (Fig.2). La communauté scientifique internationale étudie principalement la dorsale Est-Pacifique (EPR pour East Pacific Rise), la dorsale médio-Atlantique (MAR pour Mid-Atlantic Ridge) ainsi que le point triple de l'Océan Indien (Fig.2). Les sites du Pacifique ont été plus explorés et étudiés que ceux de la MAR. L'expansion lente de cette dernière (1 à 2 cm par an contre 15 à 18 cm pour les dorsales de l'océan Pacifique) avait conduit, à tort, à la conclusion d'une faible activité hydrothermale. Cependant, depuis 1985 une quinzaine de sites hydrothermaux actifs ont été découverts le long de la MAR. La profondeur de ces sites varie de -850 m pour Menez Gwen (37°85'N ; 31°51'W) à -4088 m pour Ashadze (12°50'N ; 44°51'W). La pression hydrostatique peut alors varier de 8,5 MPa (pour Menez Gwen) à plus de 40 MPa (pour Ashadze). Tout comme la géochimie, la profondeur est un facteur important à prendre en compte dans les études menées sur ces écosystèmes particuliers (Priede *et al.*, 2006).

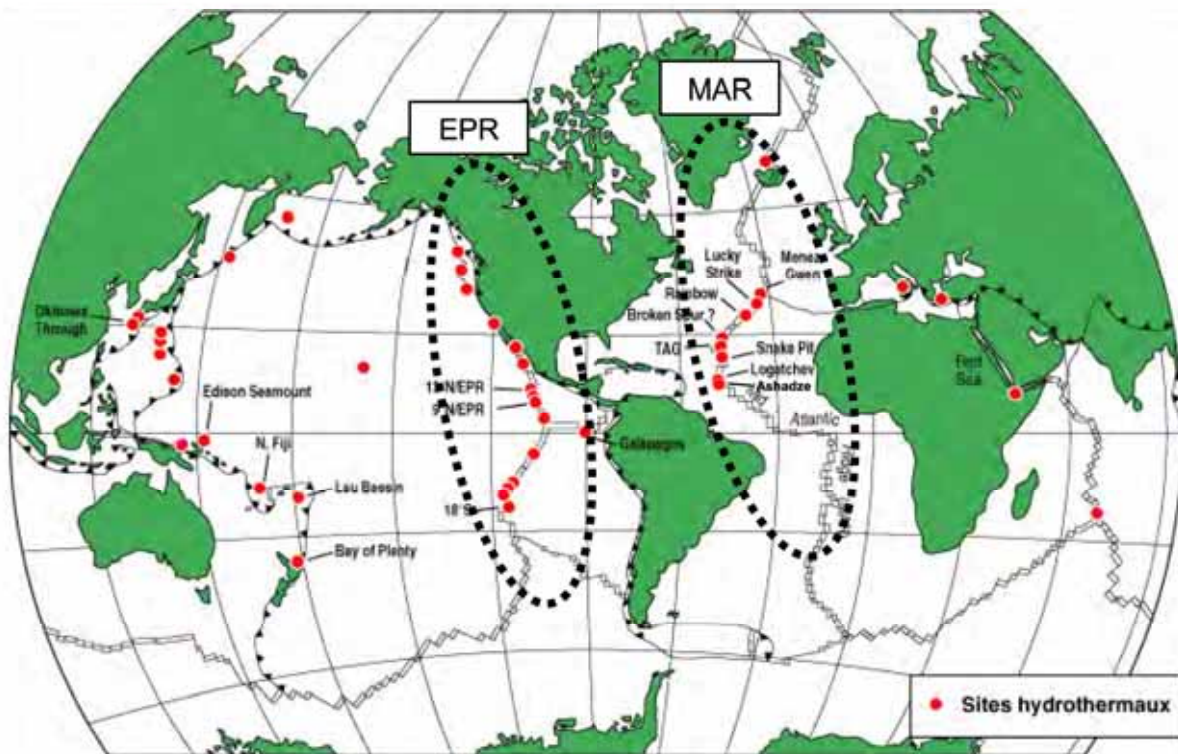


Figure 2 : localisation des dorsales océaniques et des sites hydrothermaux marins en cours d'études. Les zones en pointillés sont les plus étudiées (EPR pour East Pacific Rise et MAR pour Mid-Atlantic Ridge). <http://www.ifremer.fr/droep/n-sites-hydro.html>

Conditions géochimiques :

La composition géochimique du plancher océanique varie le long d'une dorsale. L'eau de mer qui s'infiltré à ce niveau va donc rencontrer des roches de natures différentes, influençant en retour la composition du fluide hydrothermal expulsé. Quand l'eau de mer rencontre des roches de la croûte océanique, principalement composées de basalte (également riche en silice), le site hydrothermal est qualifié de basaltique ou « classique ». C'est le cas de la plupart des sites de la MAR (ex. : le site TAG (MAR, 26°08'N ; 44°49'W), Fig.2 et Tab.1).

Il existe des sites dits mantelliques où, dans ce cas, l'eau s'infiltré dans le manteau qui peut affleurer à certains endroits du plancher océanique (ex. : cas de trois sites de la MAR : Rainbow (36°13'N ; 33°54'W), Logatchev (14°45'N ; 44°57'W) et Ashadze (12°58'N ; 44°51'W ; Fig.2 et Tab.1). La croûte des océans est mince (environ 6 km) et se forme à l'axe des dorsales lorsque les deux plaques s'écartent. Dans les océans à faible taux d'expansion, où l'ouverture est inférieure à 3 ou 4 cm/an (comme l'Océan Atlantique), l'écartement des plaques s'accompagne de formation de grandes failles d'extension qui découpent la croûte océanique et font remonter les niveaux les plus superficiels du manteau. Le manteau est

constitué d'un assemblage de minéraux appelé **péridotite**, dominé par l'olivine. L'olivine est constituée d'un réseau d'atomes de silice et d'oxygène (appelé silicate), sur lequel s'organisent des atomes de magnésium et de fer. Les péridotites contiennent aussi en proportions moindres d'autres silicates de fer-magnésium appelés pyroxènes, et des oxydes riches en chrome et en aluminium, les spinelles. Lorsque l'eau de mer rencontre les péridotites, elle réagit avec l'olivine et les pyroxènes pour former de la serpentine : c'est le processus de serpentinisation (Fig.3). Les différents gaz présents et émis lors de cette réaction enrichissent donc différemment le fluide hydrothermal par rapport aux sites basaltiques.

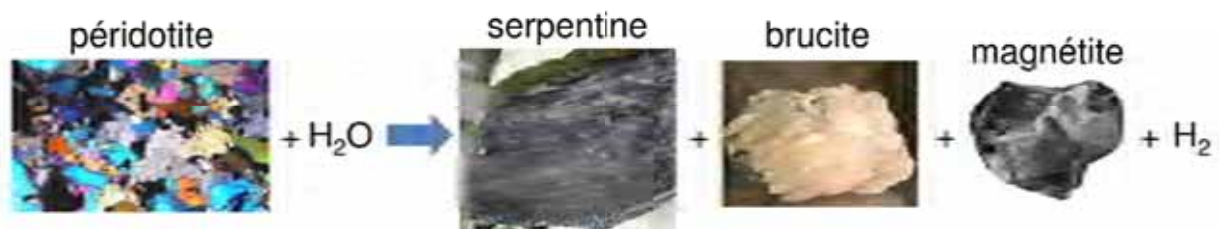


Figure 3 : une réaction de **serpentinisation**.

La **serpentine** est un silicate magnésien riche en eau, dont la formule est : $Mg_3SiO_5(OH)_4$. Le fer contenu dans les olivines et les pyroxènes est libéré au cours de la réaction et est utilisé pour former la **magnétite** (Fe_3O_4) et de la **brucite** ($Mg(OH)_2$). La formation de magnétite consomme de l'oxygène à partir de l'eau et s'accompagne d'un dégagement d'**hydrogène**. Il existe de nombreuses réactions de serpentinisation possibles. <http://www.ifremer.fr/serpentine/fiches/fiche5.htm>

Ainsi, les fluides hydrothermaux des sites mantéliques présentent des concentrations relativement faibles en sulfures mais très élevées en hydrogène, méthane et fer par rapport aux sites basaltiques (Douville *et al.*, 2002, Charlou *et al.*, 2010) (Tab.1).

Tableau 1 : concentrations de certains minéraux et gaz obtenues dans les fluides purs de 4 sites de la MAR ; TAG, site basaltique et Rainbow / Logachev / Ashadze, sites mantéliques. Les données en gras soulignent les différences majeures entre les deux types de site (modifié d'après Charlou *et al.*, 2010).

	Eau de mer	TAG	Rainbow	Logachev	Ashadze	
Profondeur (m)		3670	2300	3000	4088	
Température (°C)	2	321/290	365	347/352	355	
pH	7.8	3.1	2.8	3.3	3.1	
Gaz	H ₂ S (mM)	0	6.7	1.2	0.5/0.8	1
	CH ₄ (mM)	0.0003	0.124/0.147	2.5	2.1	0.5/1.2
	H ₂ (mM)	0.0004	0.15/0.37	16	12.0	8/19
	CO ₂ (mM)	2.30	2.9/3.4	16	10.1	3.7
	CO (nM)	0.3	-	-	-	-
	Ar (µM)	16	20/40	-	12	-
	N ₂ (mM)	0.59	0.90/0.89	1.8	3.0	2/5.5
	minéraux	Fe (µM)	<0.001	1640	24050	2500
Si(OH) ₄ (mM)		<0.2	22.0	6.9	8.2	6.6
Cl (mM)		546	659	750	515	614
Br (µM)		838	880/1045	1178	818	1020
Rb (µM)		1.3	10	36.9	27.7	34
Cs (nM)		2.3	110	333	385	-
Mg (mM)		53	0	0	0	0
Ca (mM)		10.2	26.0	66.6	27.3	42.8
Sr (µM)		87	99	200	138	83
Ba (µM)		0.14	>19	>67	>4.5	-
Mn (µM)		<0.001	1000	2250	330	1062
Cu (µM)		0.007	150	121/162	15/50	138
Zn (µM)		0.01	46	115/185	25/30	108

L'activité des cheminées hydrothermales va dépendre de l'âge du site et de la distance qui le sépare des zones centrales de déformations de la croûte océanique. Le débit, la température, de même que la composition du fluide hydrothermal, peuvent varier sur une échelle de temps très court. Les courants profonds peuvent également venir perturber le système (Fig.1). Autour d'une cheminée hydrothermale, les gradients chimiques et thermiques sont très abrupts et vont chuter rapidement en s'éloignant de l'édifice. Toutes ces caractéristiques influencent la composition et la répartition des communautés microbiennes et de la faune hydrothermale.

1.3. La vie dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques.

Production primaire en absence de lumière : la chimiosynthèse.

A la surface de la Terre, les producteurs primaires sont les organismes photosynthétiques. Ils utilisent l'énergie solaire pour créer de manière autotrophe de l'énergie et de la biomasse, le sous-produit étant l'oxygène (Fig.4). Cette transformation est possible grâce à la présence de chloroplastes (organites intracellulaires), dont l'origine est procaryotique (théorie endosymbiotique) (Blanchard and Lynch 2000). Les sources hydrothermales océaniques profondes sont des écosystèmes dépourvus de lumière. Dans ces écosystèmes, c'est alors la chimiosynthèse microbienne qui est la voie principale permettant la production d'énergie et de matière organique primaire (Fig.4). Cette voie est basée sur l'assimilation de carbone inorganique grâce à l'énergie chimique générée par des réactions d'oxydoréductions (Jannasch and Wirsen 1979). Ces réactions sont possibles grâce à la présence dans l'environnement hydrothermal d'accepteurs d'électrons (éléments oxydés), présents dans l'eau de mer (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.) et de donneurs d'électrons (éléments réduits), présents dans les fluides hydrothermaux (CH_4 , H_2S , H_2 , etc.). Le choix très varié des couples oxydant / réducteur possibles pour réaliser ces synthèses chimiques est à l'image de la diversité métabolique existante chez les microorganismes. C'est ainsi que les microorganismes sont impliqués dans les étapes clés de nombreux cycles biogéochimiques (carbone, soufre, azote, fer, etc.) contribuant à l'homéostasie de la biosphère. La faune hydrothermale va donc être directement dépendante de la chimiosynthèse microbienne et indirectement dépendante de la photosynthèse puisqu'elle utilise pour vivre l'oxygène d'origine photosynthétique qui se trouve dissous dans l'eau de mer froide (Fig.4). Ainsi, selon les besoins, les organismes colonisent le biotope à différents niveaux entre le fluide hydrothermal réducteur et l'eau de mer oxydante.

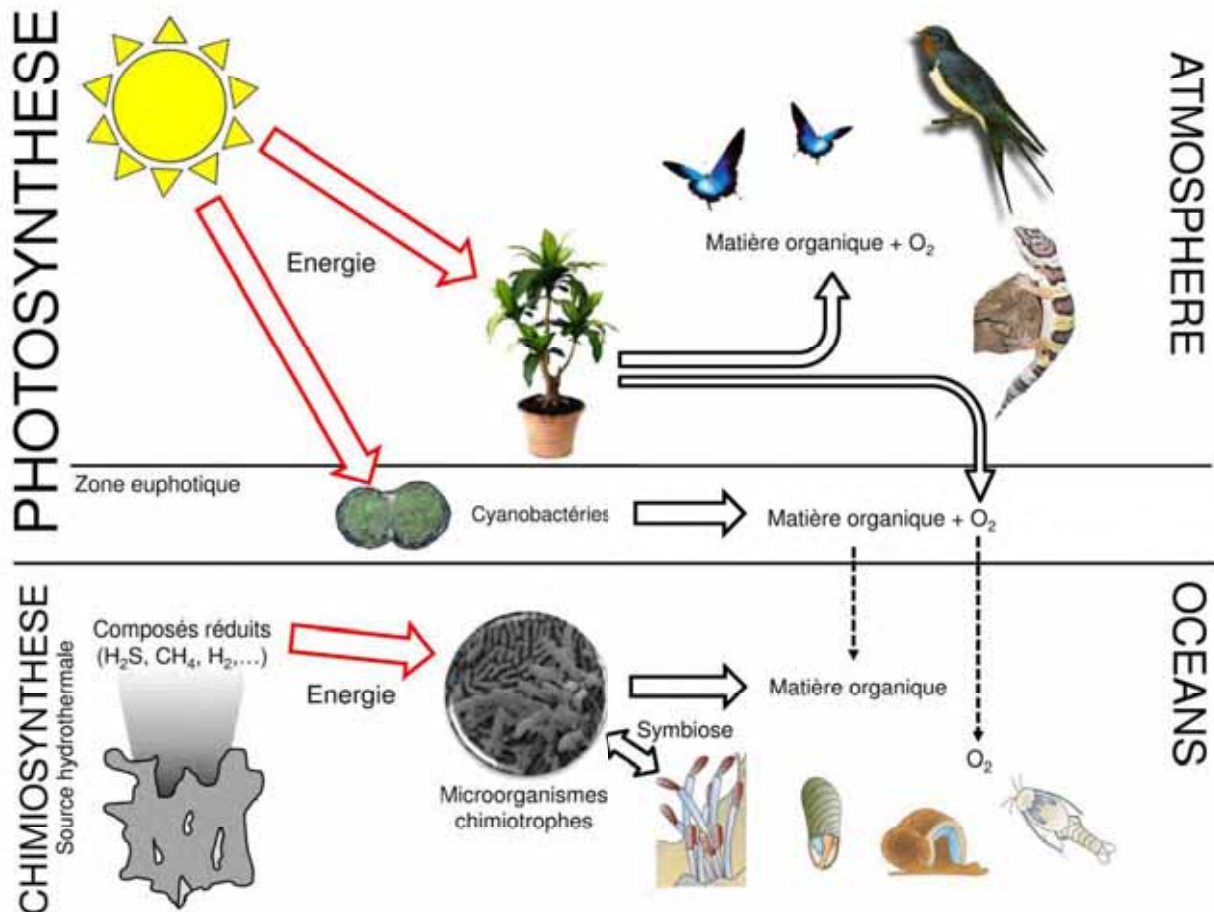


Figure 4 : schéma simplifié de la photosynthèse (atmosphère et océans) et de la chimiosynthèse au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes.

La faune hydrothermale :

Les conditions géochimiques (section 1.2) et la présence de microorganismes comme producteurs primaires permettent l'installation et le développement d'une macrofaune ayant des caractéristiques particulières (Desbruyères *et al.*, 2000). Par rapport aux communautés benthiques abyssales, la diversité dans les environnements hydrothermaux océaniques est réduite, avec un fort taux d'endémisme (Wolff 2005). Par contre, la biomasse y est très importante (50 kg / m² contre 1 kg / m² dans les abysses) (Van Dover 2000). La répartition faunistique est régie par les gradients géochimiques et de température concentriques établis autour d'une cheminée hydrothermale. Très peu d'organismes supérieurs vivent dans le pôle chaud (>30°C), correspondant aux limites de la vie animale (au-dessus de 45°C, on note une instabilité des protéines (Somero 1995)). Cependant, certains vers polychètes tubicoles (famille *Alvinellidae* retrouvée sur les sites de l'EPR) vivent fixés sur les parois des cheminées actives à des températures allant de 40 à 50°C, voire supporteraient 60°C (Le Bris *et al.*, 2005) (Fig.5). Le pôle « tiède » (15-30°C) regroupe principalement des crevettes caridées : *Mirocaris fortunata*, *Chorocaris chacei*,

Alvinocaris markensis et *Rimicaris exoculata* (Fig.5). Le pôle froid (2-10°C) est dominé par des bivalves comme *Bathymodiolus* spp. et *Calyptogena* spp., par des vestimentifères comme *Riftia pachyptila* (Fig.5), mais également par divers crabes, poissons et gastéropodes.



Figure 5 : exemples d'organismes vivant en symbiose bactérienne au niveau des sources hydrothermales océaniques.

- a. Le ver tubicole *Alvinella pompejana* retrouvé uniquement au niveau du pôle chaud des sites de l'EPR.
- b. La modiole *Bathymodiolus azoricus* colonisant les sites de la MAR.
- c. La crevette *Rimicaris exoculata*, endémique à la MAR, représentant la macrofaune dominante de certains sites (ici le site Logachev).
- d. Le vestimentifère *Riftia pachyptila*, endémique de l'EPR.

Du fait de l'instabilité intrasite et de la distance intersite (parfois plusieurs centaines de kilomètres), les stratégies de reproduction et de dispersion des espèces hydrothermales apparaissent comme déterminantes pour la survie de ces écosystèmes. Certains individus comme les bivalves vont être retrouvés aussi bien sur les sites de la MAR que sur l'EPR, mais également dans d'autres écosystèmes comme les zones de suintements froids. Cependant, il existe des espèces endémiques de certaines rides : *Alvinella pompejana* (ver de Pompéi) et *Riftia pachyptila* n'ont jusqu'à présent été retrouvés que sur les sites de l'EPR, tandis que l'espèce *Rimicaris exoculata* n'est retrouvée que sur les sites de la MAR, tels TAG, Rainbow, Logachev et Ashadze. Des études phylogénétiques basées sur l'utilisation du gène *mtCOI* (mitochondrial cytochrome oxidase I) des espèces hydrothermales, comparées aux barrières naturelles existantes permettent d'évaluer les phénomènes de séparation et de spéciation intra-espèces le long des dorsales. Ces études ont été

effectuées notamment chez l'annélide *A. pompejana* sur l'EPR (Plouviez *et al.*, 2009, Plouviez *et al.*, 2010) où ont été observés deux groupes distincts séparés par la barrière équatoriale, mais aussi chez la crevette *R. exoculata* sur la MAR (Teixeira *et al.*, 2011) chez qui est observée une très forte stabilité génétique supposant des échanges récents entre les populations des différents sites colonisés de la MAR.

Dans les écosystèmes hydrothermaux, les conditions physico-chimiques sont éloignées des standards classiquement admis pour le règne animal. Pour vivre dans ces conditions, la majorité de la faune hydrothermale va créer des relations durables de type symbiotique avec les principaux producteurs primaires, les microorganismes (Fig.4). Dans ces milieux, les microorganismes vont donc être présents soit sous forme libre, soit en interaction symbiotique avec la macrofaune. Les symbiotes microbiens produisent pour l'hôte de la matière organique par chimiosynthèse et peuvent ainsi avoir un rôle dans la détoxification de certains composés toxiques présents dans le milieu (ex. : sulfures, métaux lourds, etc.). Les interactions entre organismes peuvent donc permettre la colonisation de biotopes qualifiés d'extrêmes. Il existe de nombreux types d'interactions plus ou moins complexes et évoluées entre organismes vivants.

2. Les interactions entre organismes vivants.

2.1. La symbiose.

Définition de la « symbiose » : La symbiose au sens large correspond à une association durable entre des organismes. Elle englobe alors tous les types d'interactions durables, sans considérer la notion de bénéfice des partenaires ou l'aspect physiologique de l'association. Ainsi le parasitisme (où l'un des partenaires tire bénéfice de l'association au détriment de l'autre) et le mutualisme (bénéfice partagé des partenaires) sont des associations symbiotiques au sens large. La symbiose au sens strict prend en compte la notion de bénéfices des partenaires. Elle est parfois distinguée du mutualisme par l'aspect physiologique, la symbiose étant considérée comme une association plus intégrée que le mutualisme. Dans la suite du manuscrit, le terme **symbiose** sera utilisé en respectant la définition de Sélosse (Sélosse 2000) soit une « **coexistence durable de deux organismes, à bénéfice mutuel** ». Au sein de l'association, le partenaire le plus grand est appelé hôte, et le plus petit, symbionte (Smith and Douglas 1987).

La symbiose participe à la diversité du vivant, chaque association symbiotique va former « une entité » ayant des capacités trophiques et écologiques plus importantes que chacun des partenaires pris séparément dans un même écosystème (Moran 2007). Elle peut avoir un rôle protecteur, de nature physique ou chimique (ex. : prédation, composé chimique). Les associations symbiotiques ont un rôle important dans l'évolution et seraient à l'origine de l'apparition des cellules eucaryotes sur Terre. En témoigne la théorie endosymbiotique des mitochondries et des plastes dans les cellules eucaryotes (Schimper 1883), les hypothèses étant que la mitochondrie aurait pour origine une *Alphaproteobacteria* et le chloroplaste, une cyanobactérie. Plusieurs hypothèses coexistent quant à l'explication de l'origine des organites intracellulaires chez les eucaryotes (Margulis *et al.*, 2000).

Lors de l'élaboration d'une interaction durable symbiotique, les symbiontes peuvent, au départ, se comporter comme des parasites (ex. : pénétration dans les tissus de l'hôte par des systèmes de sécrétion de type III) ; puis ils vont être sélectionnés positivement ou négativement par l'hôte selon leurs apports. Les symbiontes peuvent ainsi être considérés comme des parasites sélectionnés positivement dans ou sur certains organes de l'hôte, selon certaines conditions (ex. : physico-chimiques) pour une ou plusieurs raisons données (ex. : nutrition / détoxification). Les associations symbiotiques sont généralement caractérisées par plusieurs critères:

- La **spécificité** de l'association : elle est déterminée par le nombre d'espèces avec lesquelles un organisme donné peut établir une association symbiotique durable.
- La **durée** de l'association : les symbioses peuvent avoir des durées variables et être limitées à une partie du cycle de vie d'un organisme.
- Le caractère **obligatoire** ou **facultatif** de l'association : une symbiose est dite obligatoire si au moins un des partenaires est dépendant de cette association pour vivre, sinon elle est

dite facultative. L'hôte vivant sans symbiote est dit **aposymbiotique** et le symbiote non associé à son hôte est dit « sous forme libre ».

- La **localisation** au niveau de l'hôte : une **ectosymbiose** signifie que le symbiote est simplement en contact avec la paroi externe de son hôte. Une **endosymbiose** signifie que le symbiote est localisé dans les tissus de l'hôte. L'endosymbiose est extracellulaire quand le symbiote est situé dans le plasmalemma de l'hôte, tandis que lorsqu'il pénètre dans une cellule de l'hôte, on parle d'endosymbiose intracellulaire (Sélosse 2000). La zone de contact entre les partenaires correspond à une interface non seulement d'adhésion, mais également d'échanges entre les partenaires. Ces échanges sont plus ou moins importants selon le degré d'intégration de la symbiose. La surface de contact peut d'ailleurs subir des modifications de manière à faciliter les échanges entre les partenaires de la symbiose.

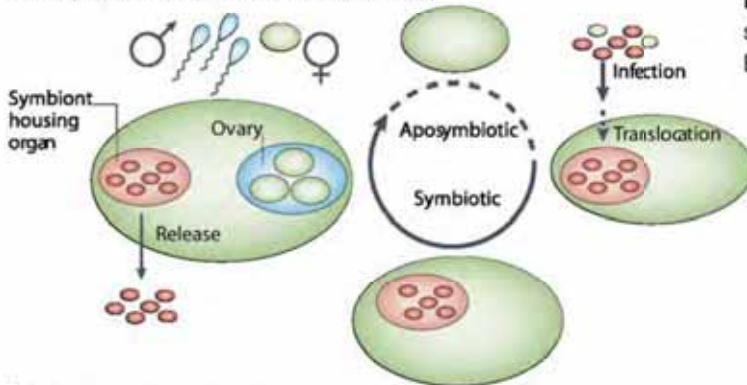
- Les **échanges entre les partenaires** : les échanges principaux observés dans les symbioses sont d'ordre trophique. Les transferts varient selon la nature des partenaires. Ex. : les microorganismes hétérotrophes du rumen qui dégradent la cellulose des graminées en composés carbonés assimilables par les bovins ; les procaryotes du sol (Rhizobiums) qui captent l'azote gazeux pour le transmettre à certaines plantes (Légumineuses). Il existe également dans certaines associations un rôle de détoxification des symbiotes comme par exemple le cas de l'intestin de l'isopode marin *Limnoria tripunctata* qui va être colonisé par des microorganismes symbiotiques détoxifiants, uniquement quand il se nourrit sur du bois traité à la créosote (pesticide) (Zachary and Colwell 1979).

- Le **mode de transmission** des symbiotes: considéré comme l'un des critères les plus importants, car une symbiose démarre par l'acquisition des symbiotes pour un hôte et doit se pérenniser par la transmission à chaque génération. Ces événements font appel à des processus souvent complexes de reconnaissance impliquant de nombreux gènes.

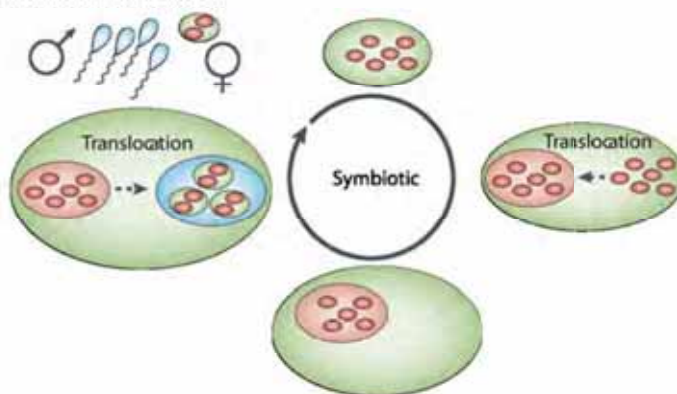
2.2. Transmission des symbiotes microbiens.

Le mode de transmission des symbiotes a été le premier processus identifié pour comprendre l'évolution des associations symbiotiques (Lipsitch *et al.*, 1995). La transmission peut être **horizontale** ou **verticale** (Fig.6). La transmission horizontale est définie comme une transmission depuis l'environnement. La transmission verticale se produit au contraire de parents à descendants. Elle a une conséquence majeure : elle lie le destin des partenaires grâce à la cotransmission de leur patrimoine génétique. Ainsi, si un symbiote induit un très fort coût sur son hôte, il limite directement sa propre transmission. Au contraire, un symbiote qui procure un bénéfice à son hôte verra sa propre transmission augmentée et sera sélectionné. La transmission verticale impose de ce fait, la « fidélité entre partenaires ».

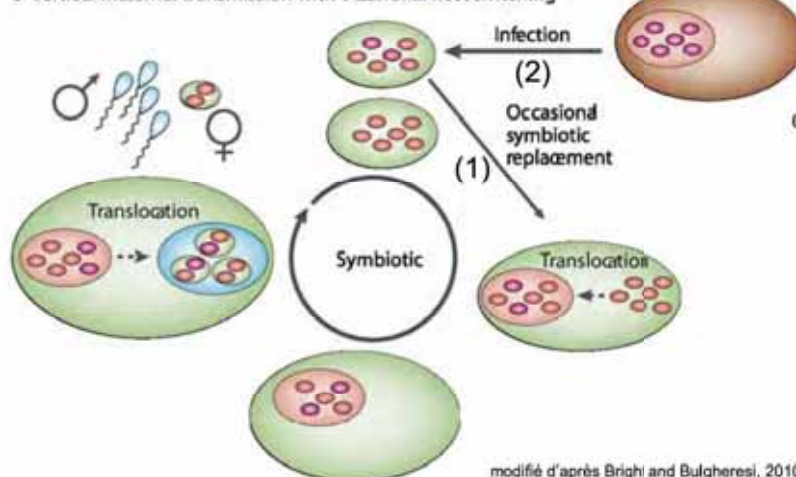
a Horizontal transmission from the environment



b Vertical maternal transmission



c Vertical maternal transmission with occasional host switching



modifié d'après Brighi and Bulgheresi, 2010

Figure 6 : les différents modes de transmission des symbiontes microbiens, d'après Brighi and Bulgheresi, 2010.

a. **Transmission horizontale via l'environnement.** La reproduction de l'hôte conduit à former des descendants aposymbiotiques (sans symbionte), lesquels vont être colonisés à un certain stade de leur cycle de vie par des symbiontes présents dans l'environnement ; souvent les symbiontes peuvent être transférés depuis le site initial de contact avec l'hôte jusqu'à un organe spécialisé dans l'hôte (« symbiont housing organ » ou bactériome); parfois une libération des symbiontes dans l'environnement à partir de l'hôte adulte se produit.

b. **Transmission verticale à travers une lignée germinale femelle.** Les symbiontes sont généralement transférés depuis un organe spécialisé dans l'hôte (« symbiont housing organ » ou bactériome) jusqu'aux gonades femelles, il va donc se créer des descendants symbiotiques ; souvent les symbiontes sont transférés depuis leur site de colonisation jusqu'à l'organe spécialisé dans l'hôte (« symbiont housing organ »).

c. **Mode de transmission multiple.** Une transmission verticale avec occasionnellement une transmission horizontale par commutation d'hôte (« host switching ») peut se produire. Au cours d'une transmission verticale, le transfert horizontal occasionnel de nouveaux symbiontes (en magenta) depuis une population d'hôtes de la même espèce (1), depuis d'autres espèces (en brun) (2), ou depuis une population de symbiontes libres dans l'environnement (non montré ici) peut survenir.

2.2.1. Transmission horizontale.

2.2.1.1. Définition et exemples de transmissions horizontales.

Dans ce mode de transmission, il y a une phase dite aposymbiotique (avant l'acquisition du symbiote) et une phase symbiotique de l'hôte qui sont intrinsèques à son cycle de vie (Fig.6a). Chez l'hôte animal, la phase aposymbiotique inclut les cellules germinales (œufs et sperme) et le développement embryonnaire. Généralement dans le cas des symbioses en milieu marin, les larves sont également aposymbiotiques durant leur phase de dispersion pélagique (cas des vers tubicoles, des lucinidés, des moules *bathymodiolus*) (Bright and Bulgheresi 2010). Pour les bactéries transmises horizontalement, la vie symbiotique est facultative et une population libre dans l'environnement sert d'inoculum pour la symbiose. Dans les environnements marins, ces populations sont retrouvées au niveau des sédiments (West and Adams 1997, Costa *et al.*, 2001), dans les zones pélagiques (Lee and Ruby 1992, Gros *et al.*, 2003, Aida *et al.*, 2008) et dans les zones abyssales (Harmer *et al.*, 2008). Dans certains cas, l'hôte adulte peut libérer ses symbiotes dans l'environnement à proximité de sa descendance (Kiers *et al.*, 2003, Salerno *et al.*, 2005).

Pour établir cette association, les deux partenaires libres doivent rentrer en contact, au bon moment, au bon endroit et doivent répéter cette opération à chaque génération. La rencontre est souvent restreinte à une phase précise du cycle de vie de l'hôte, phase larvaire pour les vers tubicoles (*Riftia pachyptila*) (Fig.7b), juvénile pour les bivalves (*Bathymodiolus azoricus*) et les calamars (*Euprymna scolopes*) (Fig.7a). Par exemple, les symbiotes bactériens méthanotrophes du ver *Siboglinum poseidoni* vont être ingérés par la bouche ou par l'anus seulement durant la phase larvaire (Callsencencic and Flugel 1995).

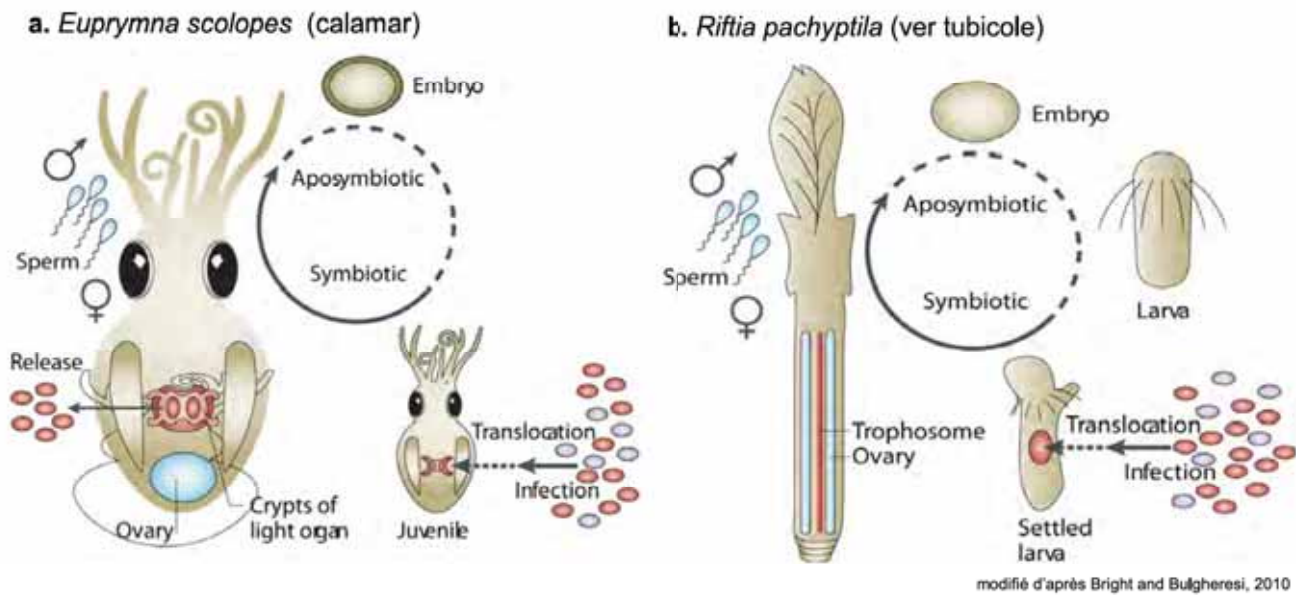


Figure 7 : exemples de cycles de vie simplifiés d'hôtes possédant des symbiotes transmis horizontalement d'après Bright et Bulgheresi, 2010 (les bactéries symbiotiques sont en rouge et les bactéries environnementales sont en violet).

- Le calamar *Euprymna scolopes* et son endosymbiote extracellulaire *Vibrio fischeri* colonisant les cryptes des organes lumineux de son hôte. Les hôtes mâle et femelle se reproduisent, les œufs sont libérés dans l'environnement et deviennent des juvéniles aposymbiotiques. *V. fischeri* en phase libre dans l'environnement est spécifiquement sélectionné et la colonisation de l'organe lumineux est complète au bout de 12 heures seulement après éclosion (Nyholm and McFall-Ngai 2004).
- Le vestimentifère *Riftia pachyptila* et son endosymbiote intracellulaire *Candidatus Endoriftia persephone* localisé dans le trophosome (ou bactériome) de l'hôte. Les mâles libèrent leur sperme dans l'environnement qui migre vers les femelles, où les œufs sont fécondés ; le zygote est libéré dans la colonne d'eau, il se disperse et se développe en larve qui se fixe. A ce moment, la métamorphose est initiée. Les symbiotes se fixent sur l'épiderme de la larve, puis migrent à travers le mésoderme entourant l'intestin, engendrant le développement du trophosome (Nussbaumer *et al.*, 2006).

Dans beaucoup de systèmes, le moment de la rencontre entre les partenaires peut être modifié expérimentalement. Par exemple, la pénétration d'endosymbiotes bactériens sulfo-oxydants dans l'épithélium des branchies du lucinidé *Codakia orbicularis* se produit généralement après la métamorphose, mais peut être artificiellement reportée de quelques mois en cultivant la phase juvénile aposymbiotique de l'hôte en milieu stérile (Gros *et al.*, 1998). La rencontre peut être également limitée dans l'espace. Même en l'absence de structures spéciales chez l'hôte (bactériocytes), le contact peut être restreint à des zones spécifiques, telles que la région du tronc chez les larves de vers tubicoles (Nussbaumer *et al.*, 2006) ou les branchies (et quelquefois une partie de l'épithélium du manteau) chez les bivalves (Salerno *et al.*, 2005).

L'une des entrées les plus répandues est la voie orale. Les symbiotes accèdent à leur hôte *via* les particules ingérées et peuvent coloniser l'épithélium de l'intestin. Par exemple, le poisson-zèbre *Danio rerio* acquiert ses symbiotes intestinaux par ingestion orale d'eau de mer juste après éclosion (Bates *et al.*, 2006). Une fois dans l'intestin, les

mouvements péristaltiques peuvent améliorer le contact des symbiotes avec l'épithélium. D'autres bactéries suivent les gradients chimiques en nageant (utilisation de flagelles) ou en utilisant des mécanismes dits de « gliding » (déplacement sans flagelles, (McBride 2001)). Le métagénome du symbiote bactérien *Candidatus Endoriftia persephone* dont l'hôte est le ver tubicole *R. pachyptila* présente de nombreux gènes corrélés à la chimioréception et la mobilité, suggérant que les symbiotes en phase libre pourraient reconnaître et se déplacer vers leurs hôtes respectifs par chimiotaxie (Robidart *et al.*, 2008).

Les milieux aquatiques sont par nature turbulents, il peut être difficile pour un hôte de rencontrer son symbiote. De plus, ces milieux ont généralement une faible concentration de symbiotes potentiels (Gros *et al.*, 1996, Ruby and Lee 1998). De ce fait, de nombreux hôtes aquatiques vont pomper activement l'eau à travers leurs tissus augmentant ainsi leurs chances de piéger des symbiotes potentiels. Par exemple, les courants d'eaux générés par l'ouverture et la fermeture des bivalves facilitent la rencontre entre des symbiotes potentiels et l'épithélium branchial (Bright and Bulgheresi 2010). Les nouveau-nés du calamar *E. scolopes* capturent leur symbiote *V. fischeri* seulement s'il se trouve très proche des appendices ciliés de l'organe lumineux en développement. Ceci est possible grâce à la contraction du manteau et par la génération d'un micro-courant par les cils de l'animal (Nyholm and McFall-Ngai 2004). Dans le cadre d'une transmission horizontale, pour qu'un hôte rencontre son (ou ses) symbiote(s) spécifique(s), il faut des moyens de reconnaissances et des systèmes de fixation élaborés.

2.2.1.2. Les moyens de reconnaissances et d'attachements : hôte – symbiotes microbiens.

Dans le cas d'une transmission horizontale dans un système hôte - symbiotes microbiens, le contact initial se fait généralement par l'intermédiaire d'un composé sécrété par l'hôte : le mucus (Hooper and Gordon 2001). Le mucus peut couvrir des surfaces planes, mais peut également se développer entre des structures ciliées sur le corps de l'animal (ex. : chez certains bivalves et calamars (Dubilier *et al.*, 2008)) et au niveau de microvillosités intestinales (intestin des vertébrés (Sonnenburg *et al.*, 2004)) et également sur les œufs (Gilturmes and Fenical 1992). La qualité et la quantité du mucus peuvent être sous contrôle microbien. Par exemple, les symbiotes environnementaux stimulent la production du mucus qui recouvre les appendices de l'organe luminescent du calamar *E. scolopes* juvénile (Nyholm and McFall-Ngai 2004). Similairement, les résidents de l'intestin des vertébrés peuvent stimuler l'excrétion de mucus (Sonnenburg *et al.*, 2004).

Pour les symbiotes bactériens, la fixation à la surface de l'hôte implique généralement des appendices protéiques de surface très bien connus : les pili (ou frimbriae). La perte de fonction (par mutation) du gène *pilA*, qui code pour une protéine similaire à la piline de type IV-A, affecte la colonisation de *V. fischeri* chez le calamar *E. scolopes* (Stabb and Ruby 2003).

Dans le mucus, les partenaires peuvent s'attacher en utilisant des molécules de surface qui vont promouvoir la fixation. Ces molécules chez l'hôte sont souvent présentes sous forme de protéines glycosylées. Le rématode marin *Laxus oneistus* produit une protéine de type lectine retrouvée dans le mucus sécrété sur tout le corps de l'animal, excepté au niveau de la tête. Cette protéine possède un domaine de reconnaissance spécifique des hydrates de carbones (sucres), permettant l'identification et le recrutement de symbiotes sulfo-oxydants. De plus, ce récepteur est similaire aux cellules dendritiques immuno-réceptrices humaines, mettant ainsi en évidence que les relations symbiotiques sont régies par des processus fondamentaux très conservés (Bulgheresi *et al.*, 2006). Les larves de *R. pachyptila* produisent également un mucus dans lequel des bactéries s'agglutinent avant la pénétration dans les tissus par les symbiotes spécifiques chimioautotrophes (Nussbaumer *et al.*, 2006). Ces auteurs suggèrent que ce mucus est dérivé de glandes pyriformes sécrétant de la chitine (Gaill *et al.*, 1992, Shillito *et al.*, 1995, Chamoy *et al.*, 2001). Des bactéries adhérant sur des surfaces chitineuses sont retrouvées dans d'autres relations symbiotiques au niveau des sources hydrothermales, notamment entre le crabe *Kiwa hirsuta* et ses épibiontes bactériens (Goffredi *et al.*, 2008).

Les molécules de fixation des symbiotes bactériens dans le mucus vont être les exopolysaccharides (EPS) ou des lipopolysaccharides (LPS). Par exemple, des auteurs ont montré que le fait de modifier (par mutation) les gènes codant pour le LPS chez *V. fischeri* a un effet négatif sur la colonisation des organes luminescents chez le calamar (Adin *et al.*, 2008).

Avec la reconnaissance et la fixation sur l'hôte, l'autoagrégation des symbiotes bactériens entre eux est un facteur important pour la symbiose ; beaucoup de molécules de surface (EPS) et de structures mentionnées précédemment facilitent ces processus. Par exemple, le fait que *V. fischeri* s'agrège spécifiquement dans le mucus sécrété par *E. scolopes* dépend du système de transduction du signal à deux composants RscS du symbiote : il contrôle la production d'EPS I par régulation de l'opéron *syp* (Yip *et al.*, 2006, Husa *et al.*, 2007). De plus, l'induction de mutations sur le système de quorum sensing AinS-AinR réduit la vitesse de colonisation de *V. fischeri*, probablement en raison d'une mobilité flagellaire insuffisante (Visick and Ruby 2006). Pour les transmissions horizontales, la reconnaissance hôte - symbiote(s) se fait généralement dans le mucus sécrété par l'hôte.

Néanmoins, concernant les symbioses chez les plantes, la reconnaissance peut commencer à distance par la libération dans le milieu, au niveau des racines, de molécules (flavonoïdes) reconnues par les symbiotes bactériens (*Rhizobium*). Ces molécules activent chez la bactérie le facteur de transcription NodD qui permet principalement la synthèse et la libération des facteurs de nodulation (Cooper 2004, Cooper 2007).

2.2.1.3. Le parcours du symbiote au cours d'une transmission horizontale.

Dans le cas des ectosymbioses marines, le mucus de l'hôte correspond généralement au lieu de colonisation finale du symbiote. Cependant, dans certaines associations, le symbiote doit migrer à travers les tissus de l'hôte vers un organe spécialisé (« symbiote housing organ » ou bactériome, Fig.6a), comme dans le cas des endosymbioses. Par exemple, le symbiote, *Candidatus Endoriftia persephone*, du ver tubicole *R. pachyptila*, migre depuis l'épiderme vers un organe spécialisé (appelé le trophosome) à travers le mésoderme de l'hôte (les symbiotes sont trouvés au niveau inter- et intracellulaire chez l'hôte à l'état larvaire). Les symbiotes en migration sont donc libres dans le cytoplasme, tandis que une fois dans le trophosome, ils sont enfermés dans une vacuole (Nussbaumer *et al.*, 2006).

Durant leur migration, en plus des barrières physiques (cellulaires), les symbiotes doivent faire face au système immunitaire de l'hôte. Le symbiote *Candidatus Endoriftia persephone* possède une large gamme de gènes de défense, suggérant qu'il peut résister aux possibles attaques de son hôte (Robidart *et al.*, 2008). Le symbiote *V. fischeri* possède une catalase périplasmique qui lui permet de survivre au stress oxydatif lorsqu'il pénètre dans les organes luminescents (Davidson *et al.*, 2004) et une porine (OmpU) permettant d'éviter la phagocytose par les hémocytes de l'hôte (Aeckersberg *et al.*, 2001). Dans le cas des symbioses chez les plantes (légumineuses), les symbiotes bactériens (*Rhizobium*) sont connus pour éviter la phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte en utilisant des protéines libérées par un système de sécrétion de type III (T3SS) (Bartsev *et al.*, 2004) (Fig.8).

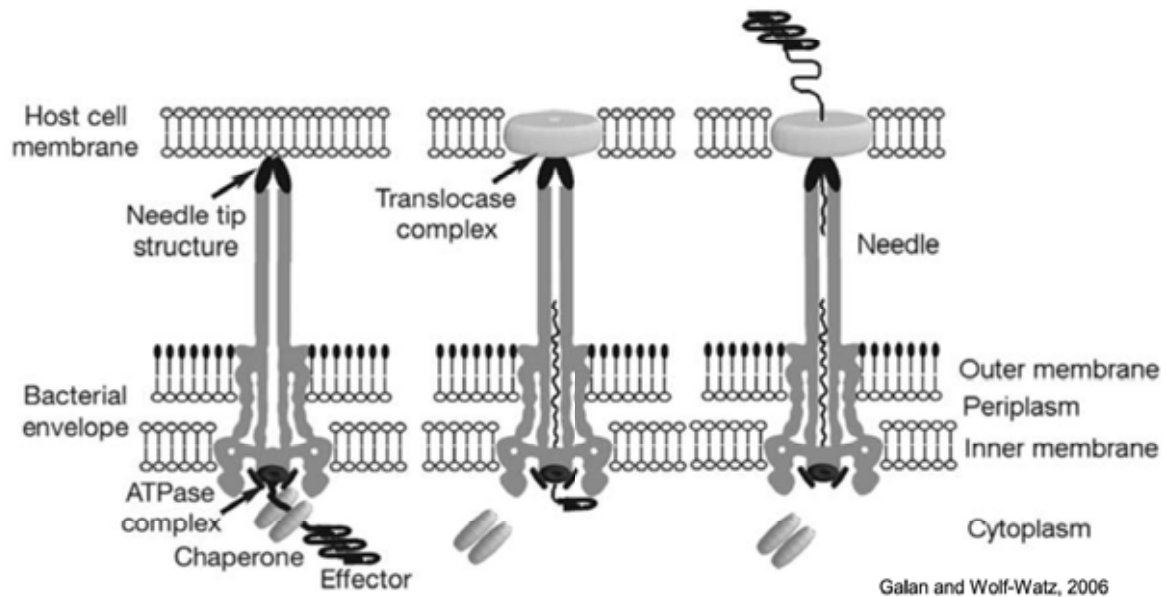


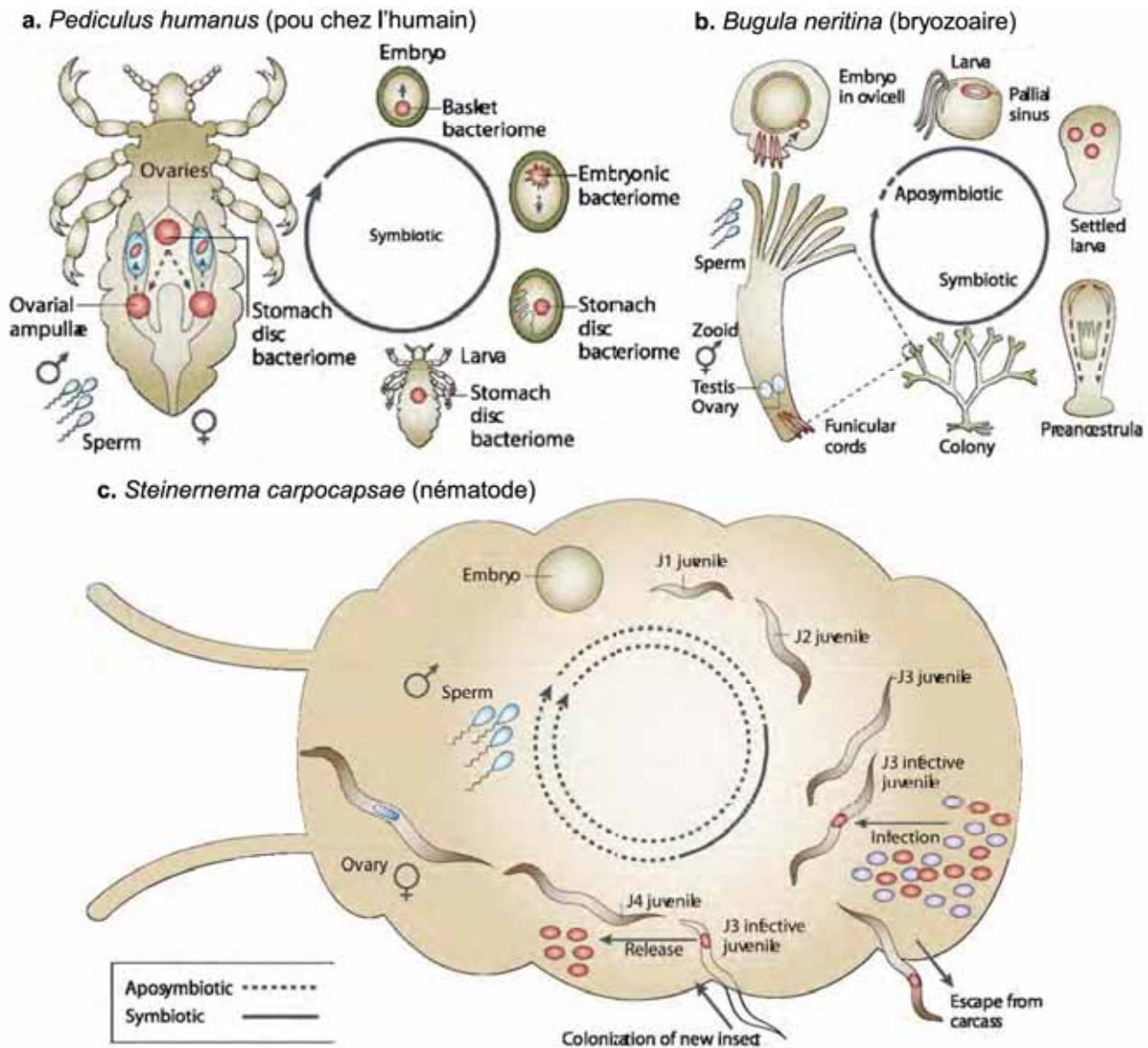
Figure 8 : schéma représentant le fonctionnement d'un **système de sécrétion de type III (T3SS)**. Le complexe effecteur-chaperon est reconnu par le système, auquel une ATPase est associée. L'ATPase décroche le chaperon du complexe, qui reste à l'intérieur de la cellule bactérienne et module le passage de la protéine effectrice à travers le canal central de l'aiguille. Un complexe de translocation constitué également par des protéines du T3SS est assemblé sur la membrane de la cellule hôte et module le passage des protéines effectrices à travers la membrane de l'hôte. Les effecteurs transloqués dans la cellule hôte peuvent effectuer leurs fonctions (Galan and Wolf-Watz 2006).

En conclusion, toutes les symbioses transmises horizontalement requièrent l'utilisation de machineries cellulaires complexes pour sélectionner des symbiontes spécifiques depuis l'environnement. Généralement, ces associations impliquent des interactions sucre-lectine et certaines structures de surfaces cellulaires qui vont moduler l'attachement dans un premier temps entre les symbiontes eux-mêmes, puis entre les symbiontes et l'hôte. L'une des différences par rapport aux transmissions verticales est que les partenaires vont devoir à chaque génération se « réapproviser ».

2.2.2. Transmission verticale.

2.2.2.1. Définition et exemples de transmissions verticales.

La transmission verticale se produit de parents à descendants. Dans certains cas, il n'y a pas de phase aposymbiotique, donc l'association est permanente entre les partenaires (cas du pou *Pediculus humanus* (Fig.9a)). Plus couramment, dans ce type de transmission, une longue phase symbiotique suit une courte phase aposymbiotique (cas du bryzoaire *Bugula neritina* (Fig.9b)). La transmission démarre au niveau des œufs. En fonction du couple, elle peut se produire durant les différentes étapes embryonnaires (cas d'une ascidie *Trididemnum miniatum* et des aphides *Acrytosiphon pisum* et *Brevicoryne brassicae*) jusqu'au stade larvaire (larve toujours associée au parent, cas la mouche tsé-tsé *Glossina morsitans*) ou pendant le développement du juvénile à l'intérieur (cas du nématode *Heterorhabditis bacteriophora*) ou à l'extérieur (cas de la sangsue *Hirudo* spp.) de la mère. Bien que la majorité de ces associations soit obligatoire pour l'hôte, il existe des exceptions comme chez le nématode *Steinernema carpocapsae* qui peut accomplir entièrement son cycle de vie sans son symbionte, le nématode au stade juvénile peut être associé facultativement avec son symbionte *Xenorhabdus nematophila* (Herbert and Goodrich-Blair 2007) (Fig.9c).



modifié d'après Bright and Bulgheresi, 2010

Figure 9 : exemples de cycles de vie simplifiés d'hôtes possédant des symbiotes transmis verticalement d'après Bright et Bulgheresi, 2010 (les bactéries symbiotiques sont en rouge / les bactéries environnementales sont en violet).

- Le pou *Pediculus humanus* possède un symbiote intracellulaire *Candidatus* *Riesia pediculicola* dans ses disques stomacaux et ses ampoules ovariennes. Les œufs pondus vont suivre un développement embryonnaire jusqu'au stade larvaire. Pendant ces processus le bactériome subit trois étapes de maturation (Eberle and McLean 1982). Il n'y a pas de phase aposymbiotique dans cette association.
- Le bryzoaire hermaphrodite *Bugula neritina* possède un endosymbiote extracellulaire *Candidatus* *Endobugula sertula* dans ses cordons funiculaires au stade adulte et dans son sinus palléal au stade larvaire. La fécondation interne résulte du transfert du zygote dans l'ovicell, dans lequel les endosymbiotes vont venir se développer. Les larves libérées vont se fixer et se développer. Pendant la métamorphose en preancestrula et ancestrula, les symbiotes migrent vers les cordons funiculaires (Sharp *et al.*, 2007). Il y a une phase aposymbiotique très courte caractéristique des transmissions verticales.
- Le nématode *Steinernema carpocapsae* (parasite de nombreux insectes) possède un symbiote, *Xenorhabdus nematophila*, transmis de manière « pseudo-verticale ». Les symbiotes sont libérés depuis les vésicules dans un nouvel insecte hôte en passant de l'intestin au sang de l'insecte, où ils vont se reproduire et tuer l'insecte (Herbert and Goodrich-Blair 2007, Hüglér *et al.*, 2011). Cette transmission est dite « pseudo-verticale » car plus d'un nématode peut être trouvé à l'intérieur d'un seul insecte, et donc les symbiotes transmis à la descendance peuvent provenir soit des parents (vertical), soit d'autres nématodes présents (« host switching »). L'hôte peut réaliser un cycle complet de manière aposymbiotique.

Les symbiotes acquis verticalement sont souvent transmis à travers les lignées germinales femelles (voie transovarienne) pour les animaux à sexes séparés et hermaphrodites. La transmission verticale est rarement la seule voie utilisée pour le transfert des symbiotes à la génération suivante. Généralement, les études phylogénétiques montrent que l'acquisition verticale est dominante avec un transfert horizontal occasionnel inter-, intra-espèces ou depuis l'environnement. C'est le cas par exemple pour les insectes colonisés par *Wolbachia* spp. (DeWayne Shoemaker *et al.*, 2002) et également pour quatre genres d'ascidies associées à la cyanobactérie *Prochloron* spp. (Munchhoff *et al.*, 2007). Chez l'insecte *Frankliniella occidentalis* le symbiote bactérien intestinal du genre *Erwinia* est transmis verticalement par l'intermédiaire des fèces et/ou par régurgitation des congénères hôtes sur les larves aposymbiotiques venant d'éclore (De Vries *et al.*, 2004). Dans le cadre d'une transmission verticale, les moyens de reconnaissance mis en œuvre pourraient être moins complexes que pour une transmission horizontale, mais tout aussi importants.

2.2.2.2. Les moyens de reconnaissances et d'attachements : hôte – symbiotes microbiens.

Dans le cas des transmissions verticales, les symbiotes sont dits obligatoires et n'ont pas besoin d'être sélectionnés depuis une population environnementale. Les molécules de surface pour la reconnaissance entre partenaires ne sont pas donc pas nécessaires. Dans le cas des transmissions horizontales, les molécules de surface de type lectines ont un rôle central dans la reconnaissance entre partenaires (section 2.2.1.2.). Cependant, il n'existe qu'une seule symbiose transmise verticalement dans laquelle les lectines ont également une importance majeure : entre une plante aquatique, *Azolla* sp., et une cyanobactérie, *Anabaena* spp. (Adams and Duggan 2008). De plus, les symbiotes facultatifs et les symbiotes qui sont confrontés aux bactéries environnementales montrent des structures de surface et des molécules similaires à celles rencontrées chez les symbiotes transmis horizontalement. Par exemple, les protéines membranaires (externe) de *Wolbachia* spp. (Wsp) sont très variables entre les souches. Elles peuvent moduler l'infection des cellules hôtes, par exemple en inhibant leurs apoptoses en se fixant sur les récepteurs de type Toll 2 (Serbus *et al.*, 2008). Les gènes *nilA*, B et C de *X. nematophila* sont génétiquement liés et régulés ; ils codent pour des protéines membranaires de type lectines qui sont essentielles pour la colonisation du nématode (Cowles and Goodrich-Blair 2008). Ces trois protéines fonctionnent simultanément pour moduler l'attachement de la bactérie au mucus (riche en sucre) sécrété par l'hôte. Curieusement, des homologues de la

protéine NilB sont présents chez des pathogènes (*Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*) qui colonisent des muqueuses (Herbert and Goodrich-Blair 2007). En plus des gènes *nil*, le gène *mrxA*, qui code la sous-unité structurale de frimbriae de type I, est également requis pour la réussite de la colonisation du nématode (Chandra *et al.*, 2008). Bien que le rôle du quorum sensing dans les symbioses à transmission verticale reste inconnu, il est clair que dans le cas de *X. nematophila*, la réussite de la colonisation va dépendre de changements transcriptionnels globaux en réponse à des signaux environnementaux (Herbert and Goodrich-Blair 2007). Pour les symbiotes transmis verticalement, les moyens de reconnaissances sont moins élaborés que pour des symbiotes transmis horizontalement, mais leur parcours est quant à lui plus complexe. Les symbiotes vont devoir parcourir deux trajets distincts, le premier dans l'hôte (bactériomes vers organes reproducteurs), le second dans la descendance hôte (des cellules indifférenciées vers les bactériomes).

2.2.2.3. Le parcours du symbiote au cours d'une transmission verticale.

2.2.2.3.1. Du bactériome aux organes reproducteurs de l'hôte.

Le transfert de symbiote(s) des parents à la descendance peut varier selon différents paramètres :

- Quel partenaire migre ? (les deux, seulement l'hôte ou seulement le symbiote).
- A quelle étape de développement du parent (embryonnaire, adulte) et de la descendance (œuf en développement ou fécondé, embryon, larve ou juvénile) la migration se produit ?
- La distance entre le bactériome (où se situent les symbiotes) et les organes reproducteurs.
- Le mode de translocation (symbiotes contenus dans des bactériocytes ou libres).

La distance entre le bactériome (contenant les symbiotes) de l'hôte et sa descendance peut être parcourue par migration conjointe ou seulement par migration d'un des deux partenaires. Chez de nombreux insectes, le déplacement des œufs dans l'appareil reproducteur se fait conjointement avec le déplacement des symbiotes ; ce système requiert un transfert des symbiotes dans des poches qui sont connectées à l'orifice génital femelle (Douglas 1989). Au final, les œufs éclosent et les larves se nourrissent des symbiotes. Chez les ascidies, ce sont les embryons et les larves (dépendant de l'espèce)

qui migrent depuis les ovaires à travers la tunique et rencontrent les symbiontes dans la cavité cloacale (*Prochloron didemni*) (Hirose *et al.*, 2006).

Dans beaucoup de cas, les symbiontes doivent parcourir de longues distances pour atteindre la progéniture de l'hôte. Chez le bryzoaire *Bugula neritina*, l'endosymbionte extracellulaire *Candidatus Endobugula sertula* parcourt un réseau de canaux qui atteint des cellules spécialisées dans lesquelles les embryons et les larves se situent (Fig.9b) (Sharp *et al.*, 2007). Chez certains mollusques bivalves, les endosymbiontes doivent migrer depuis les branchies jusqu'aux ovaires pour coloniser les œufs (*Solemya reidi*) (Cary 1994). Les œufs du mollusque *Calyplogena* spp. sont colonisés par les symbiontes par l'intermédiaire de cellules folliculaires, mais le mécanisme de transfert des symbiontes depuis les branchies vers les ovaires reste inexplicé (Endow and Ohta 1990, Cary and Giovannoni 1993).

Dans de nombreux cas, les systèmes de sécrétions (type T3SS, Fig.8) jouent un rôle clé dans la colonisation (ou l'infection) des cellules de l'hôte lors d'une transmission verticale. Des auteurs ont montré que sans T3SS, *S. glossinidus* ne peut pas pénétrer dans les cellules de l'insecte hôte (*in vitro*) et ne peut donc pas être transmis verticalement, même si on l'injecte directement dans le thorax de l'insecte au stade adulte (Dale *et al.*, 2002). Chez *P. luminescens*, un T3SS est utilisé pour sécréter une protéine (YopT) qui a une activité anti-phagocytaire, mais il n'est pas possible de conclure que le système de sécrétion est nécessaire pour la colonisation de l'hôte (nématode) (Brugirard-Ricaud *et al.*, 2005).

A la fin du parcours des bactériomes vers les organes reproducteurs de l'hôte, les symbiontes transmis verticalement peuvent être internalisés dans les cellules de l'hôte par endocytose (cas de l'éponge *Halisarca dujardini* (Ereskovsky *et al.*, 2005)), par fusion de cellules nourricières (dans lesquelles sont les symbiontes) avec les œufs (cas de l'éponge *Chondrilla australiensis* (Usher *et al.*, 2001)) ou par formation de connexions transitoires de type collagène entre des cellules nourricières et les œufs (cas de l'éponge *Hippospongia lachine* (Kaye 1991)). Le parcours des symbiontes n'est pas fini puisqu'une fois atteint la descendance de l'hôte (au stade œuf, embryonnaire, larvaire, etc.), ils doivent migrer vers les bactériomes alors que le développement physiologique et anatomique du « nouvel hôte » (le descendant) est en cours.

2.2.2.3.2. Des organes reproducteurs aux bactériomes de la descendance.

Une fois atteint les organes reproducteurs, les symbiontes vont coloniser l'œuf (la descendance) et vont devoir migrer vers les bactériomes qui se développent en même temps que le nouvel hôte. L'embryon de l'aphide *Acyrtosiphon pisum* subit une série de modifications morphogénétiques qui incluent des extensions, des torsions et des

rétractations. Malgré ces modifications, les bactériocytes contenant le symbionte restent associés avec les cellules germinales dans la région dorsale de l'hôte en développement (Miura *et al.*, 2003). Dans d'autres systèmes, le symbionte rentre en contact avec l'embryon alors que la segmentation est déjà bien avancée (cas de la betaproteobactérie *Verminephrobacter eiseniae*, symbionte d'un ver de terre (Davidson and Stahl 2008)). Une stratégie inhabituelle est utilisée par les symbiontes du bivalve *Solemya reidi*, qui vont migrer vers les branchies. Les symbiontes, localisés dans les cellules entourant l'embryon, sont ingérés et transportés dans l'intestin antérieur pour finir au niveau de la cavité périviscérale (Gustafson and Reid 1988). Le trajet de l'intestin jusqu'aux branchies en développement reste inexpliqué.

Les transmissions verticales impliquent donc des stratégies qui permettent d'intégrer les symbiontes dans la reproduction et le développement biologique de l'hôte. Les mécanismes moléculaires montrent que ces intégrations ne sont pas dirigées uniquement par les hôtes. En effet, les systèmes d'origine bactérienne comme les T3SS apparaissent comme essentiels dans le dialogue entre les partenaires symbiotiques. Les relations dans un système hôte – symbionte, notamment dans le cas des symbioses transmises verticalement, font apparaître des phénomènes évolutifs.

2.2.3. Les impacts phylogénétiques des modes de transmission des symbioses.

Dans le cas des endosymbioses à transmission verticale, la possibilité de transferts latéraux de gènes entre les symbiontes et d'autres organismes environnementaux est très réduite par rapport aux transmissions horizontales. De plus, à chaque génération, seulement quelques symbiontes sont transmis, limitant la diversité génétique (effets « bottlenecks »). De nombreux gènes essentiels pour un organisme libre mais codant des fonctions redondantes avec celles de l'hôte sont perdus (ex. : les gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation du flagelle), pouvant diminuer considérablement la taille du génome du symbionte comme par exemple chez l'endosymbionte bactérien *Carsonella* qui possède le plus petit génome, constitué d'environ 160 000 paires de bases codant pour 182 protéines (Nakabachi 2008). Une co-évolution entre les deux partenaires peut apparaître au cours du temps (Fig.10a). En effet, les arbres phylogénétiques des symbiontes transmis exclusivement de manière verticale sur une longue période évolutive sont congruents avec ceux de leurs hôtes, de nombreux exemples existent chez les insectes (Baumann 2005, Dale and Moran 2006, Moya *et al.*, 2008) (Fig.10a). De nombreuses études sur les clams montrent que les généalogies des symbiontes et des hôtes sont congruentes, suggérant une co-évolution (Goffredi *et al.*, 2003, Hurtado *et al.*, 2003). Cependant, des

analyses effectuées sur une lignée de *Vesicomyidae* (*Vesicomya* sp. mt-II) indiquent que des transferts horizontaux occasionnels peuvent se produire (Stewart *et al.*, 2008) (Fig.10b). En général une longue co-évolution va engendrer une complémentarité fonctionnelle entre les deux partenaires, comme dans le cas du couple *Glossinidia* (mouche tsé-tsé) / *Wigglesworthia* (endosymbionte bactérien) (Moran 2006). *Wigglesworthia* a conservé dans son génome de 0.7 mégabases les fonctions essentielles complétant les déficiences nutritionnelles de son partenaire, mais est devenu auxotrophe pour certains acides aminés essentiels (apportés par l'hôte). Les gènes inactivés ou inutiles disparaissent rapidement et les génomes les plus petits sont avantageés (Sélosse 2000), certainement parce qu'ils sont répliqués plus vite et à moindre coût.

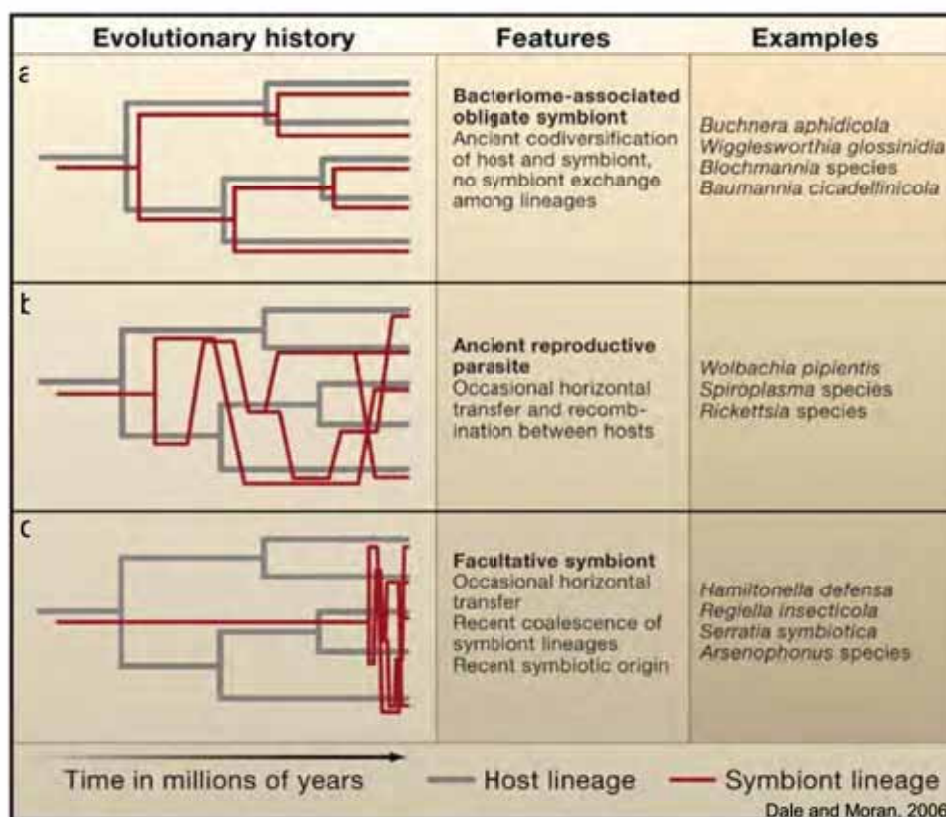


Figure 10 : différents types d'évolutions en fonctions des échanges dans un système hôte – symbionte, modifié d'après Dale and Moran, 2006.

- Le même symbionte est transmis de génération de génération d'hôte, conduisant à une co-évolution entre l'hôte et son symbionte (transmission verticale stricte).
- Cas où des transferts horizontaux (occasionnels) sont possibles (transmission « pseudo-verticale »).
- Cas d'une association symbiotique récente, où le symbionte est facultatif pour l'hôte (équivalent à une transmission horizontale).

Une transmission horizontale implique un ou des partenaires symbiotiques venus de l'environnement (brassage génétique), qui devront être acquis à chaque nouvelle génération de l'hôte, rendant les phénomènes de co-évolutions difficiles. Ainsi, il n'y a pas de congruence dans la topologie des arbres phylogénétiques entre certaines espèces de

moules ou de vers tubicoles, et leurs symbiotes (Vrijenhoek 2010). De même, de nombreuses espèces de lucinidés (clams) vivant dans le même habitat sont associées au même symbiote (phylotype) (Gros *et al.*, 2003).

De plus, les études sur l'évolution conduisent à l'idée qu'un hôte récoltera peu de bénéfiques dans une association symbiotique si ses symbiotes sont en compétition (Frank 1996). Donc, la sélection devrait favoriser les associations avec une diversité de symbiotes limitée, réduisant ainsi la compétition. Cette théorie a été corroborée expérimentalement dans de nombreux modèles quel que soit le mode de transmission (verticale ou horizontale) : *X. nematophila* (bactérie) – *S. carpocapsae* (nématode) (Martens *et al.*, 2003) ; *V. fischeri* (bactérie) – *E. scolopes* (calamar) (Wollenberg and Ruby 2009) ; *P. luminescens* (bactérie) – *H. bacteriophora* (nématode) (Cicche *et al.*, 2008). En général, réduire la clonalité d'une population, comme dans le cas des populations symbiotiques, peut avoir un effet négatif sur la valeur sélective de l'hôte et/ou du symbiote par des effets de « bottlenecks », qui peuvent causer l'accumulation de mutations délétères, qui éventuellement peuvent conduire une population à s'éteindre (ex. : le principe de Muller's ratchet (Muller 1964, Felsenstein 1974), qui est, dans l'évolution génétique, un processus dans lequel les génomes d'une population asexuée accumulent de manière irréversible des mutations délétères). Néanmoins, une étude montre que si la taille de la population hôte est suffisamment grande ($>10^5$ individus), la population de symbiotes dans son ensemble ne va pas être conduite à l'extinction (Pettersson and Berg 2007). Donc, une population de grande taille dans l'environnement peut contrer les effets délétères de Muller's ratchet, permettant aux hôtes de réduire les compétitions inter-symbiotes à travers une sélection clonale.

Le fait d'établir une interaction avec un seul symbiote annule peut-être toute compétition, mais peut aussi baisser l'adaptabilité de l'association par rapport à des changements physico-chimiques brusques de l'environnement. Ceci peut être différent dans le cas où plusieurs symbiotes cohabitent rendant l'association plus adaptée à des changements environnementaux, ce qui augmente le pouvoir de colonisation de l'hôte (sa valence écologique). C'est le cas de *Bathymodiolus azoricus*, qui possède des symbiotes thiotrophes et méthanotrophes, qui fait partie des espèces dominantes sur les sites qu'elle colonise (Duperron *et al.*, 2006).

3. Les associations symbiotiques chimiosynthétiques dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques.

Dans les écosystèmes hydrothermaux, la chimiosynthèse constitue la source primaire d'énergie et de matière organique (section 1.3.). Elle est réalisée par des communautés microbiennes dites chimioautotrophes, présentant une grande diversité métabolique. Ces microorganismes ont donc un rôle important dans l'élaboration et le développement de la vie autour des édifices hydrothermaux. Ils sont retrouvés soit sous forme libre, soit en interaction avec les animaux hydrothermaux (Tab.2 et Fig.5).

Tableau 2 : caractéristiques de diverses symbioses impliquant des bactéries chimiotrophes. Métabolisme : sulfo-oxydant (SOX), méthanotrophe (MOX), ferro-oxydant (FOX), oxydation de l'hydrogène (HOX) ; Localisation : intracellulaire (I), extracellulaire (E) ; Transmission : horizontale (H) ; modifié d'après Duperron, 2005.

Les symbioses chimiosynthétiques se font entre un partenaire autotrophe (le(s) symbionte(s) procaryote(s)) et un hétérotrophe (l'hôte eucaryote). L'hôte permet au symbionte d'accéder aux substances minérales ainsi qu'à l'oxygène et peut fournir, dans les cas où le symbionte se situe dans les cellules ou dans une cavité (ex. : tube digestif) de l'hôte, une protection efficace contre les prédateurs et les variations de l'environnement. L'oxydation des substances minérales fournit de l'énergie, utilisée pour la fixation du carbone et la synthèse de matière organique. Selon la substance minérale oxydée par le symbionte, le métabolisme mis en jeu pourra être différent (Tab.2). Ces oxydations permettent l'élaboration par le symbionte de molécules carbonées, qui sont transférées à l'hôte qui les consomme dans son métabolisme. La diversité de ces symbioses en terme de partenaires impliqués, de modalités des associations, d'adaptations anatomiques, physiologiques et/ou comportementales des partenaires est extrêmement complexe (Dubilier *et al.*, 2008).

3.1. Métabolismes des partenaires microbiens.

La plupart des hôtes hydrothermaux est associée avec des microorganismes pouvant fixer des molécules inorganiques à un atome de carbone (plusieurs voies possibles) et ayant des métabolismes énergétiques basés principalement sur l'oxydation de composés soufrés et de méthane (Tab.2). Néanmoins d'autres métabolismes sont suspectés, notamment basés sur l'oxydation du fer ferreux chez les épibiontes de la crevette *R. exoculata* (Zbinden

et al., 2004, Zbinden et al., 2008) et sur l'oxydation de l'hydrogène chez les épibiontes du bivalve *B. puteoserpentis* (Petersen et al., 2011) (Tab.2).

3.1.1. L'oxydation de l'hydrogène.

L'hydrogène est un produit courant du métabolisme microbien et de nombreuses bactéries chimiolithotrophes sont capables de l'utiliser comme donneur d'électrons dans leur métabolisme énergétique. Il existe de nombreuses bactéries et archées oxydant l'hydrogène et se différenciant selon l'accepteur d'électrons utilisé (nitrate, sulfate, fer ferrique, etc.), comme par exemple *Caminibacter hydrogenophilus* (Alain et al., 2002). La génération d'ATP au cours de l'oxydation de l'hydrogène résulte de l'oxydation de H_2 par O_2 (Fig.11).

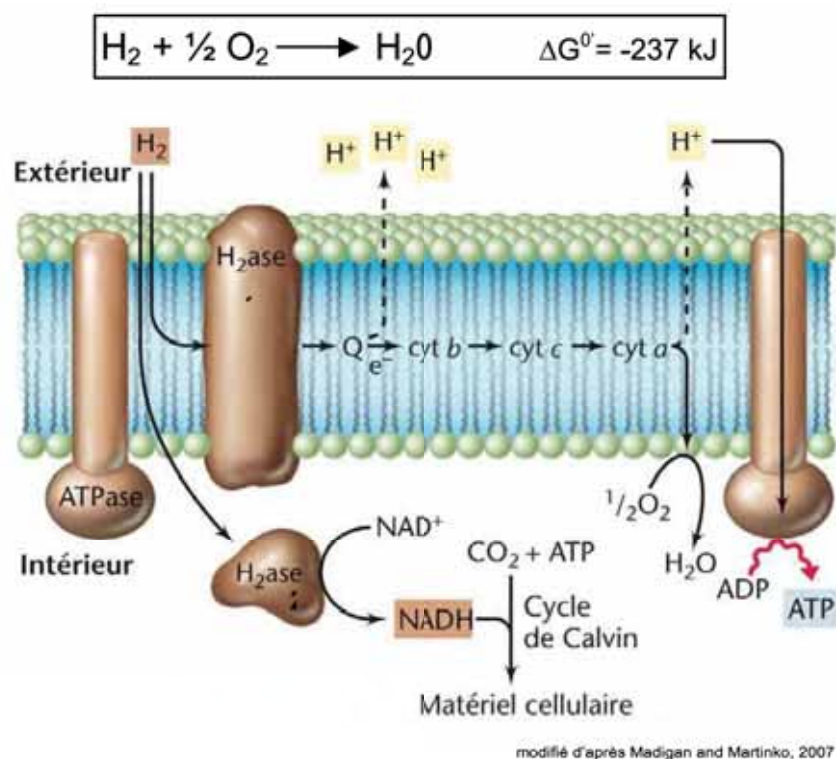


Figure 11 : schéma montrant la réaction (dans le cadre) et les flux d'électrons lors de l'oxydation de l'hydrogène (chez *Ralstonia eutropha*). L'hydrogénase membranaire (1) est impliquée dans la production d'énergie (génération de la force proton-motrice), tandis que l'hydrogénase cytoplasmique (2) produit NADH pour le cycle de Calvin (production de biomasse) (H₂ase : hydrogénase ; cyt : cytochrome ; Q : quinone) (Madigan and Martinko 2007).

Cette réaction est très exergonique et permet la synthèse d'au moins un ATP par réaction (Fig.11). Elle est catalysée par des enzymes appelées hydrogénases, qui peuvent être membranaires ou cytoplasmiques (Fig.11). Les hydrogénases NiFe du groupe 1 sont des enzymes membranaires qui permettent d'initier le flux d'électrons conduisant à la formation d'une force proton-motrice, elles font le lien entre l'oxydation de l'hydrogène et la

production d'énergie. Ces enzymes membranaires sont codées notamment par le gène *hupL*, utilisé comme marqueur de cette voie dans les études phylogénétiques (Csáki *et al.*, 2001). Les bactéries réalisant cette voie sont appelées des hydrogénobactéries. La plupart de ces bactéries sont capables de croître en chimio-organotrophie, mais également en chimolithotrophie où elles fixent le CO₂ *via* le cycle de Calvin (Fig.11 et section 3.1.5.1.). Cependant, lorsque des composés organiques utilisables sont présents dans le milieu, la synthèse des enzymes du cycle de Calvin et de l'hydrogénase est réprimée chez les hydrogénobactéries aérobies typiques. Dans la nature, les concentrations en H₂ sont variables. Il est vraisemblable que les hydrogénobactéries régulent alors la synthèse de leurs enzymes cataboliques. Ces organismes peuvent passer de la chimio-organotrophie à la chimolithotrophie, selon les concentrations disponibles de composés organiques et/ou d'hydrogène dans l'environnement. De plus, de nombreuses hydrogénobactéries aérobies se développent mieux en microaérophilie et sont donc adaptées aux interfaces oxique / anoxique, où l'H₂ produit par le métabolisme fermentatif sera plus abondant que dans les milieux fortement oxygénés. Ce n'est que très récemment qu'a été démontrée l'utilisation de cette voie, en plus de la sulfo-oxydation et de la méthanotrophie (sections 3.1.3 et 3.1.4.), par des symbiotes bactériens associés à un bivalve hydrothermale *Bathymodiolus puteoserpentis* au niveau d'un site mantélique de la MAR (Petersen *et al.*, 2011). L'hydrogénotrophie jouerait un rôle important dans les milieux hydrothermaux mantéliques où l'hydrogène peut représenter jusqu'à 40% des gaz émis (Charlou *et al.*, 2010).

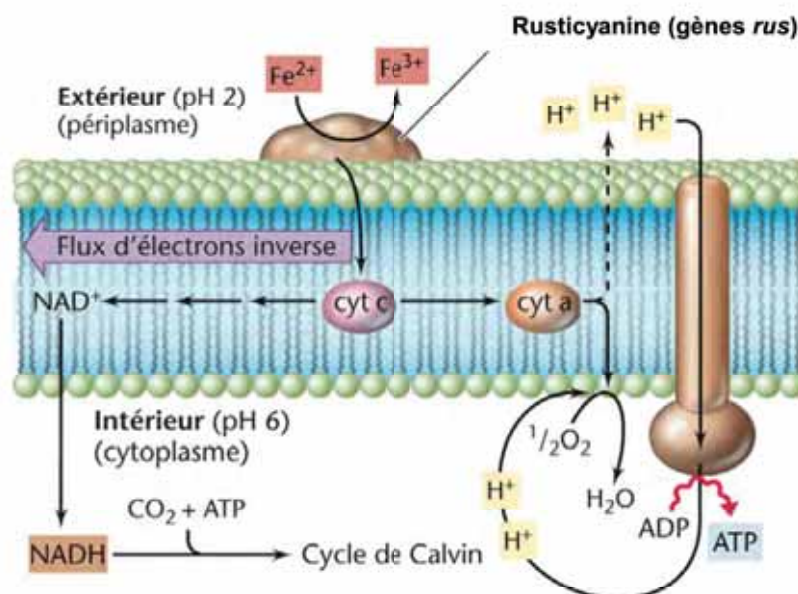
3.1.2. La ferro-oxydation.

Le fer est l'un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre (retrouvé en abondance au niveau du manteau, Tab.1). C'est un composant essentiel des cytochromes et de nombreuses protéines, se retrouvant notamment au centre de la molécule d'hème, cofacteur essentiel de l'hémoglobine chez l'homme. Deux réactions composent le cycle du fer : la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) et l'oxydation du fer ferreux (Fe²⁺).

Le fer ferreux est utilisé comme donneur d'électrons par les microorganismes ferro-oxydants en conditions aérobies et/ou micro-aérophiles. L'oxydation aérobie du fer de l'état ferreux (Fe²⁺) à l'état ferrique (Fe³⁺) est une réaction exergonique, fournissant une faible quantité d'énergie. C'est ainsi que les ferrobactéries doivent oxyder de grandes quantités de fer afin d'assurer leur croissance. A pH neutre, le fer ferreux est rapidement oxydé en fer ferrique par des processus abiotiques. Le fer ferreux est ainsi stable pour de longues périodes en conditions anoxiques. Cependant, à pH acide, le fer ferreux est stable en conditions oxygénées. Cela explique pourquoi la plupart des bactéries ferro-oxydantes sont

des acidophiles obligatoires. Les bactéries ferro-oxydantes les mieux connues, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (gammaprotéobactérie) et *Leptospirillum ferrooxidans* (*Nitrospira*), peuvent toutes les deux croître en autotrophie en utilisant le fer ferreux comme donneur d'électrons en condition de pH acide (à pH 1).

Malgré l'instabilité de Fe^{2+} à pH neutre, il existe de nombreuses bactéries ferro-oxydantes qui vivent dans de tels pH. En fait, ces bactéries vont se situer dans des zones d'interface oxygène / anoxique. Elles peuvent oxyder les ions Fe^{2+} , lorsqu'ils viennent de la zone anoxique, avant qu'ils ne s'oxydent abiotiquement. La bêtaprotéobactérie *Gallionella ferruginea* est un bon exemple. Elle est retrouvée dans de nombreux habitats tels que les sources d'eau douce minérale ferrugineuse, les eaux saumâtres peu profondes et également au niveau des sédiments des sources hydrothermales actives (Halbach *et al.*, 2001). La molécule centrale du métabolisme des microorganismes ferro-oxydants, connus jusqu'à présent, est une protéine périplasmique contenant du cuivre : la rusticyanine (codée par les gènes *rus*) (Hall *et al.*, 1996, Yarzabal *et al.*, 2003) (Fig.12).



modifié d'après Madigan and Martinko, 2007

Figure 12 : schéma montrant le flux d'électrons pendant l'oxydation de Fe^{2+} (chez *Acidithiobacillus ferrooxidans*). La rusticyanine, protéine périplasmique contenant du cuivre, est l'accepteur des électrons venant de Fe^{2+} . Les électrons vont ensuite parcourir une courte chaîne de transport d'électrons qui s'achève par la réduction d' O_2 en H_2O (cyt : cytochrome) (Madigan and Martinko 2007).

3.1.3. La sulfo-oxydation ou thiotrophie.

L'environnement des sources hydrothermales, surtout au niveau de sites basaltiques (Tab.2), est riche en hydrogène sulfuré (H_2S) et autres composés soufrés plus ou moins réduits. Ces composés peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons par diverses bactéries sulfo-oxydantes. Les composés soufrés les plus couramment utilisés sont l'hydrogène sulfuré (H_2S), le soufre élémentaire (S^0) et le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (Fig.13). Le produit final de l'oxydation des composés soufrés est le plus souvent l'ion sulfate (SO_4^{2-}). Il existe deux voies métaboliques d'oxydation des composés réduits contenant du soufre : la voie de la sulfite oxydase et la voie inverse de l'APS (Adénosine PhosphoSulfate) réductase (Fig.13).

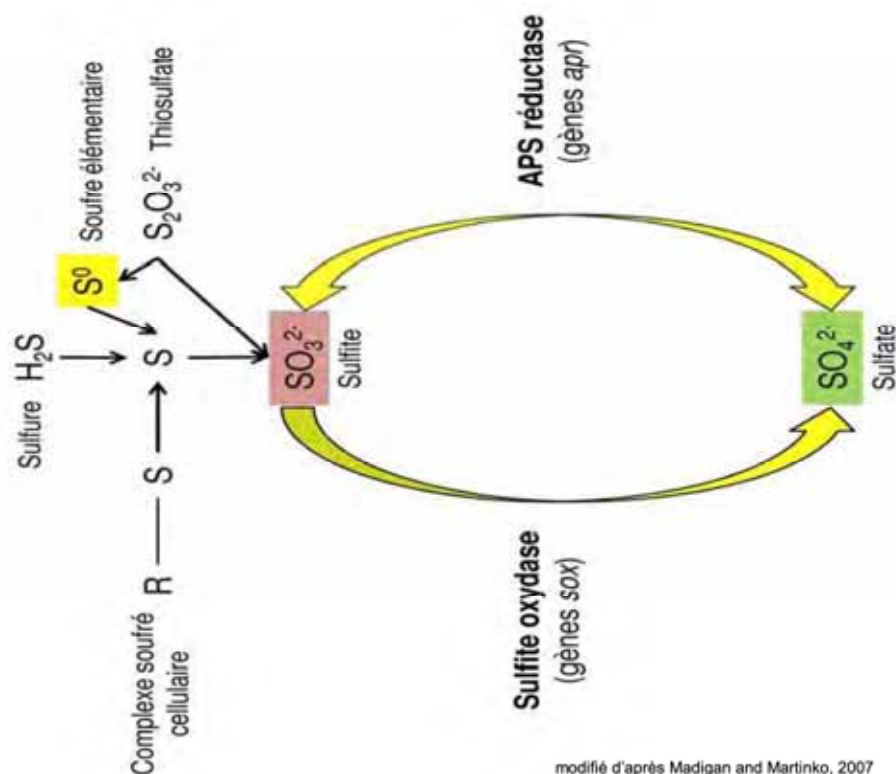


Figure 13 : schéma simplifié montrant l'oxydation des composés réduits du soufre. La voie de l'APS réductase fonctionne également dans le sens sulfo-oxydant (modifié d'après Madigan and Martinko, 2007).

La voie de la sulfite oxydase est la plus commune, cependant des bactéries sulfo-oxydantes peuvent oxyder SO_3^{2-} en SO_4^{2-} via l'activité inverse de l'APS réductase, une enzyme essentielle du métabolisme des bactéries sulfato-réductrices. Cette voie (utilisée dans le sens oxydatif) est d'ailleurs utilisée par de nombreux symbiotes bactériens (thiotrophes) vivant en association avec la macrofaune hydrothermale, tels que des gammaprotéobactéries symbiotes des bivalves *Idas* spp. et *Bathymodiolus* spp. (Duperron *et al.*, 2005, Duperron *et al.*, 2006, Duperron *et al.*, 2008). Pour les études moléculaires, les gènes *soxB* et *aprA*, codant respectivement pour un des composés du complexe

enzymatique de la sulfite oxydase et pour la sous-unité α de l'APS réductase, sont utilisés comme marqueurs fonctionnels de ces deux voies (Petri *et al.*, 2001, Meyer and Kuever 2007).

3.1.4. L'oxydation du méthane ou méthanotrophie.

Bien que les microorganismes méthanotrophes ne soient pas **autotrophes** au sens strict du terme (section 3.1.5.), ils utilisent la méthanotrophie à la fois pour la **production d'énergie**, mais également comme **source de carbone** (Fig.14). Les méthanotrophes assimilent soit la totalité, soit la moitié de leur carbone sous forme de formaldéhyde (CH_2O). Ceci apporte un avantage énergétique majeur par rapport aux autotrophes chez qui le carbone est assimilé à partir de forme plus oxydée du CO_2 (ce qui demande plus d'énergie) (section 3.1.4.). Ces bactéries sont toutes aérobies et sont largement répandues dans la nature, dans les sols et dans l'eau. Il existe trois classes principales de méthanotrophes : type I (*Gammaproteobacteria*), type II (*Alphaproteobacteria*) et type X (*Gammaproteobacteria*). L'enzyme clé de la méthanotrophie est la méthane mono-oxygénase (Fig.14), qui oxyde le méthane en méthanol (McDonald and Murrell 1997). Cette enzyme existe sous deux formes : une forme particulière liée à la membrane et une forme soluble dans le cytoplasme. La forme particulière est présente chez quasiment tous les méthanotrophes, tandis que la forme soluble n'a été observée que chez quelques souches (Fuse *et al.*, 1998, Shigematsu *et al.*, 1999). Le gène *pmoA*, codant pour la forme particulière de cette enzyme, constitue donc le marqueur moléculaire le plus utilisé de cette voie (Holmes *et al.*, 1995).

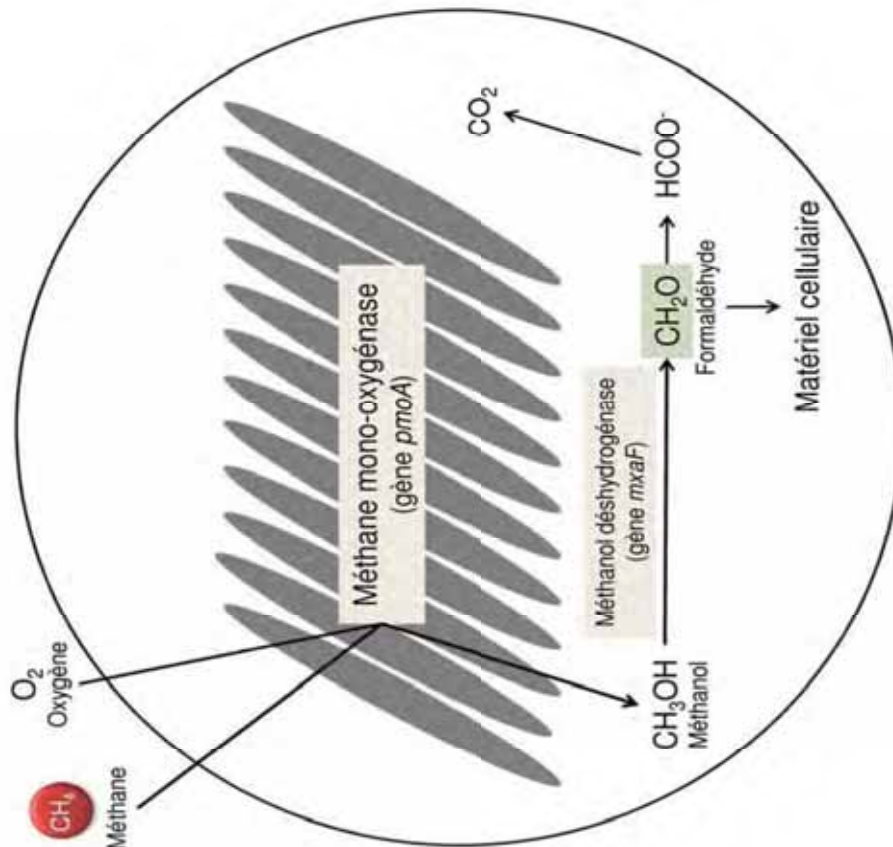


Figure 14 : schéma simplifié de l'oxydation aérobie du méthane chez les bactéries méthanotrophes. La fixation du CH_4 se produit grâce à l'activité d'une enzyme clé : la méthane mono-oxygénase. La réaction se produit au niveau de membranes spécialisées dans la cellule. L'essentiel du carbone utilisé pour la biosynthèse provient du formaldéhyde (CH_2O).

Tous les méthanotrophes connus à ce jour appartiennent aux *Gammaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria* (Semrau *et al.*, 2008, Trotsenko and Murrell 2008). Jusqu'à présent, toutes les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de symbiotes oxydant le méthane chez les invertébrés marins appartiennent à une lignée de *Gammaproteobacteria* méthanotrophes de type I. Les bactéries méthanotrophes de type II et X sont rarement observées dans des associations symbiotiques. Ceci peut s'expliquer pour les types II par le fait que la voie de la sérine est utilisée pour l'assimilation du carbone, avec un rendement énergétique plus faible que les types I qui utilisent la voie de la ribulose monophosphate, plus efficace (Leak *et al.*, 1985). Comme les hôtes sont généralement associés à leurs symbiotes pour des raisons trophiques (carbone et énergie), il est donc plus avantageux, quand les conditions environnementales le permettent (présence de méthane + oxygène), de s'associer avec des méthanotrophes de type I. Tous les symbiotes méthanotrophes connus sont des endosymbiotes se développant à l'intérieur de l'hôte (Petersen and Dubilier 2009). La première symbiose méthanotrophe a été découverte chez les moules bathymodiales au niveau de suintements froids (à teneur en méthane élevée) dans le Golf du Mexique (Childress *et al.*, 1986) (exemple de *Bathymodiolus azoricus*, section 3.2.2.).

3.1.5. Les voies autotrophes.

L'**autotrophie** est la capacité d'un organisme de biosynthétiser tous ses constituants cellulaires à partir d'une seule source de carbone, le CO_2 . Il existe deux voies principales utilisées par les microorganismes présents au niveau des sources hydrothermales : le cycle de Calvin et le cycle inverse de l'acide citrique (Madigan and Martinko, 2007).

3.1.5.1. Le cycle de Calvin.

La fixation du carbone chez les organismes phototrophes et les bactéries chimiolithoautotrophes passe majoritairement par cette voie. L'enzyme clé du cycle de Calvin est la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase ou RubisCO (Fig.15). Chez les bactéries, il existe deux formes de RubisCO (la forme I et II) qui présentent seulement 25 à 30% de similarité en acides aminés (Tabita *et al.*, 2007). Du fait de leur fonction essentielle, les gènes *cbbL* et *cbbM*, codant respectivement pour la forme I et II de la RubisCO, sont couramment utilisés comme marqueurs phylogénétiques pour l'étude *in situ* des populations autotrophes (Blazejak *et al.*, 2006). Le postulat est que la forme I est utilisée par des organismes vivant en conditions oxiques, tandis que la forme II est adaptée à des conditions anoxiques, telles que dans les environnements hydrothermaux (Badger and Bek 2008). En effet, des études récentes montrent que c'est la RubisCO forme II (forme I non détectée) qui est associée aux microorganismes autotrophes des environnements hydrothermaux, plus particulièrement aux groupes des *Gammaproteobacteria* (Hügler *et al.*, 2010, Hügler *et al.*, 2011).

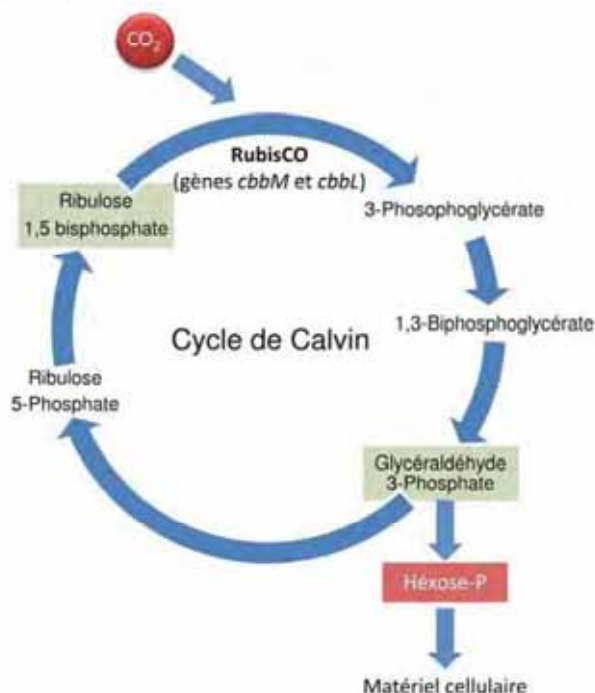


Figure 15 : schéma simplifié du cycle de Calvin. La fixation du CO_2 se produit grâce à une enzyme clé : la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase ou RubisCO. La production finale est un sucre à 6 carbones (un hexose) pouvant servir de matériel cellulaire pour la biosynthèse de l'organisme (modifié d'après Madigan and Martinko, 2007).

3.1.5.2. Le cycle inverse de l'acide citrique.

Une autre voie pour la fixation autotrophe du carbone chez de nombreuses bactéries anaérobies et micro-aérophiles est basée sur le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique ou encore appelé cycle des acides tricarboxyliques s'effectuant en mode inverse (appelé rTCA pour reverse TriCarboxylic Acid) (Buchanan and Arnon 1990) (Fig.16). Une des enzymes clé qui est la plus souvent utilisée comme marqueur moléculaire de cette voie est l'ATP – citrate lyase (codé par les gènes *acI*). De nombreuses études montrent l'occurrence de cette voie au niveau des sources hydrothermales océaniques, qui serait utilisée par un groupe de bactéries particulièrement présent dans ces environnements, les *Epsilonproteobacteria* (Campbell and Cary 2004, Campbell *et al.*, 2006, Voordeckers *et al.*, 2008).

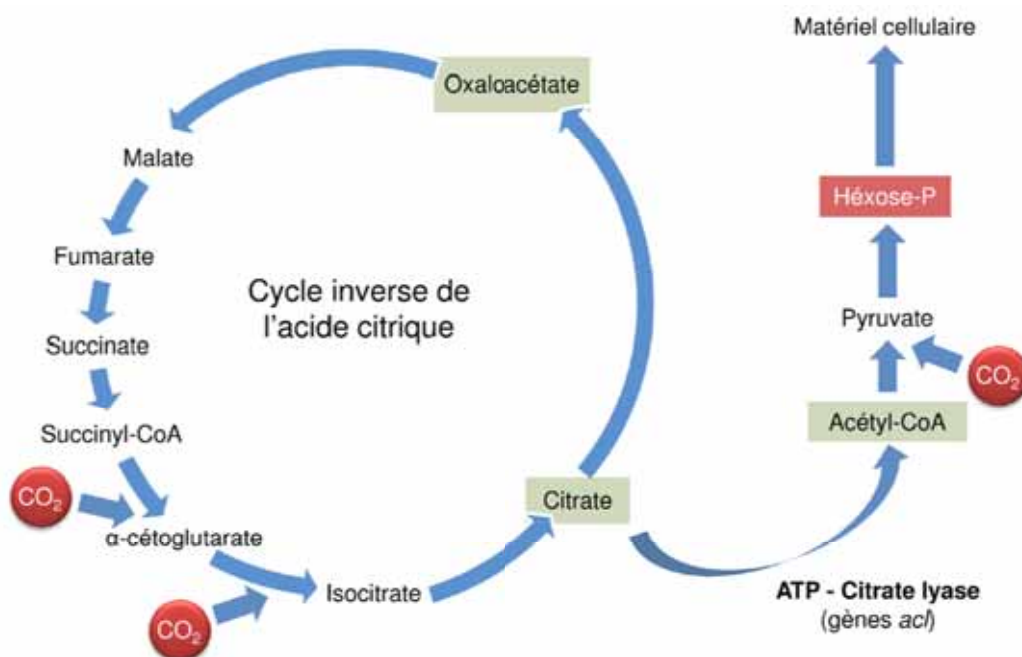


Figure 16 : schéma simplifié du cycle inverse de l'acide citrique. La fixation du CO₂ se produit grâce à l'activité d'une enzyme clé: l'ATP – citrate lyase. La production finale est un sucre à 6 carbones (un hexose) pouvant servir de matériel cellulaire pour la biosynthèse de l'organisme (modifié d'après Madigan and Martinko, 2007).

3.2. Exemples de symbioses chimiosynthétiques hydrothermales.

3.2.1. *Riftia pachyptila*.

Riftia pachyptila (Siboglinidae, Polychaeta) est le premier organisme hydrothermal chez lequel une association symbiotique avec des bactéries chimiosynthétiques a été observée (Jones 1981). Au stade adulte, ce ver tubicole peut atteindre 2 à 3 m de long et est dépourvu de tube digestif (Jones 1981). Cependant, des études ont montré que les larves de *R. pachyptila* étaient dotées d'un tube digestif fonctionnel (bouche + anus) (Nussbaumer *et al.*, 2006) (Fig.17). C'est au stade juvénile que l'appareil digestif va progressivement disparaître, coïncidant avec la reconnaissance et la pénétration dans le tégument de l'hôte par des symbiotes bactériens spécifiques acquis horizontalement depuis l'environnement. Au stade adulte, les symbiotes sont retrouvés dans un tissu spécialisé appelé le trophosome (correspondant à 80% de la masse de l'hôte).

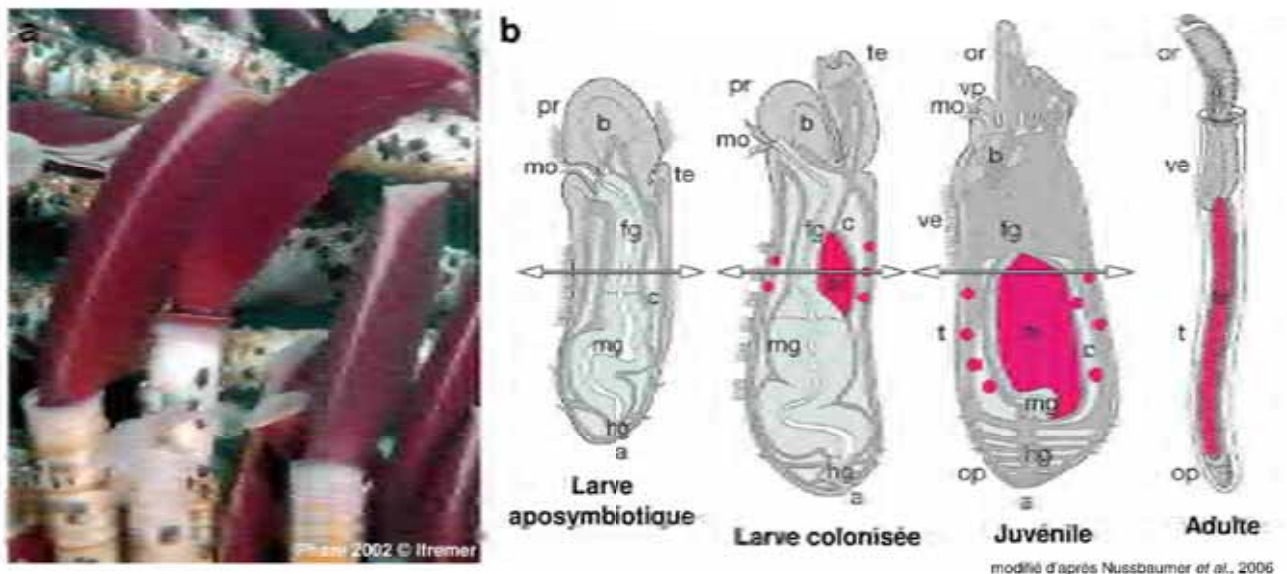


Figure 17 : évolution morphologique de *Riftia pachyptila* au cours de l'installation de la symbiose bactérienne transmise horizontalement.

- Photo de *Riftia pachyptila* adulte (panache branchiale en rouge).
- schéma montrant des coupes sagittales de *R. pachyptila* au cours de son développement. La **larve aposymbiotique** possède un appareil digestif fonctionnel (fg, mg, hg pour « foregut, midgut, hindgut ») avec une bouche (mo) et un anus (a); la **larve est colonisée** par les symbiotes bactériens (en rose) conjointement avec la formation du trophosome (tr); le **juvénile** montre un début d'élongation du tronc (t) et le développement du panache branchial (or); le stade **adulte** présente un tronc (t), trophosome (tr) et panache branchial (or) bien différenciés. (b: cerveau; c: coelome; pr: prostomium; op: opisthosome; or: obturaculum; te: tentacules; ve: vestimentum; vp: peristomium).

Les symbiotes sont des *Gammaproteobacteria* chimioautotrophes sulfo-oxydantes (Felbeck *et al.*, 1981, Distel *et al.*, 1988). Ils utilisent l'oxydation des composés soufrés réduits (H_2S) comme source d'énergie (Fig.13) et réalisent l'incorporation de carbone inorganique (production de biomasse) par deux voies : le cycle de Calvin (Robinson *et al.*,

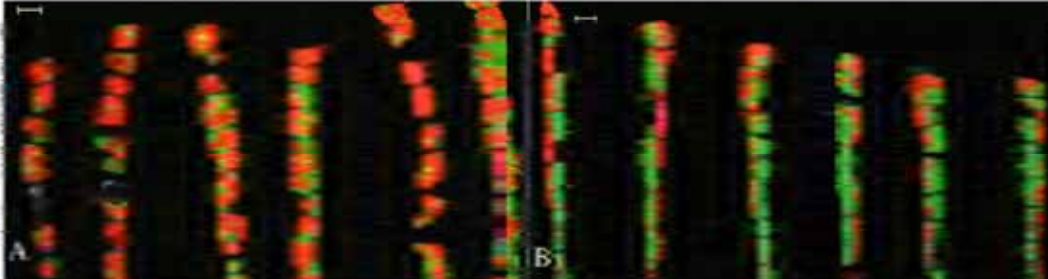
1998) et le cycle inverse de l'acide citrique (Markert *et al.*, 2007) (Fig.15 et 16 respectivement).

L'hôte alimente les bactéries en sulfures et en oxygène prélevés au niveau de son panache branchial. Les sulfures et l'oxygène sont transportés des branchies vers le trophosome par le sang de l'hôte. Pour que ce transport soit réalisé sans que les cellules de l'hôte ne soient exposées à la toxicité des sulfures, des hémoglobines particulières sont utilisées permettant à la fois de fixer l'oxygène et les sulfures (Powell and Somero 1983). En retour, l'hôte utilise les molécules produites par les symbiotes pour son propre métabolisme, soit directement, soit indirectement après digestion des bactéries symbiotiques (Bright *et al.*, 2000). Dans cette symbiose, l'hôte est totalement dépendant de ses symbiotes bactériens pour vivre. Cet exemple montre également que la spécificité au niveau du/des symbiote(s) n'est pas exclusivement l'apanage des symbioses à transmission verticale.

3.2.2. *Bathymodiolus azoricus*.

Bathymodiolus azoricus (Fig.5) est une modiole vivant en symbiose avec des bactéries présentes dans des bactériocytes situés dans les tissus branchiaux de l'animal. Par rapport au ver *R. pachyptila*, cette modiole réalise une double symbiose avec des symbiotes bactériens affiliés à des *Gammaproteobacteria* sulfo-oxydantes (thiotrophes) (Fig.13) et également méthanotrophes (Fig.14) (DeChaine and Cavanaugh 2006, Duperron *et al.*, 2006). De nombreuses études ont montré que la proportion des deux types de symbiotes dépend de l'environnement géochimique dans lequel se trouve l'hôte (Salerno *et al.*, 2005, Duperron *et al.*, 2006, Halary *et al.*, 2008). En effet, dans l'étude réalisée par Duperron et collaborateurs en 2006, les modioles du site mantéllique Rainbow présentaient une plus grande proportion de symbiotes méthanotrophes par rapport aux thiotrophes, alors que les modioles du site basaltique Lucky Strike présentaient une plus grande proportion de thiotrophes que de méthanotrophes (Duperron *et al.*, 2006) (Fig.18).

	Lucky Strike	Rainbow
H ₂ S (mM)	<u>2.5 à 3.0</u>	1.2
CH ₄ (mM)	0.50 à 0.97	<u>2.5</u>



modifié d'après Duperron *et al.*, 2006

Figure 18 : composition en H₂S et CH₄ du site basaltique Lucky Strike et mantélique Rainbow de la ride Médio-Atlantique. Images A et B : coupes de branchies de *B. azoricus* provenant respectivement de Lucky Strike et Rainbow observées en microscopie à fluorescence après hybridation *in situ* avec en rouge les symbiontes thiotrophes (sonde BMARt-193) et en vert les symbiontes méthanotrophes (sonde BMARm-845).

De plus, une étude réalisée en aquarium sur *B. azoricus* dans un milieu enrichi en sulfures montre également une augmentation significative des symbiontes thiotrophes dans les bactériocytes (Halary *et al.*, 2008). La présence de deux métabolismes distincts (méthanotrophe et thiotrophe) dans la communauté symbiotique chez *B. azoricus* permet une meilleure adaptation aux conditions géochimiques et ainsi augmente la valence écologique de l'hôte. Par rapport à *R. pachyptila*, *B. azoricus* conserve au stade adulte un système digestif fonctionnel, rendant la relation avec ses symbiontes transmis de manière horizontale (Kadar *et al.*, 2005) plus flexibles.

Les deux exemples cités précédemment sont des symbioses où le (ou les) symbionte(s) sont internalisés dans des bactériocytes situés dans les tissus de l'hôte. Il existe au sein de la population d'invertébrés hydrothermaux des interactions avec des symbiontes bactériens non internalisés situés sur l'animal (épibiontes). C'est le cas notamment chez le ver *Alvinella pompejana* et la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.

4. Le modèle de l'étude : *Rimicaris exoculata*.

4.1. Pourquoi étudier *Rimicaris exoculata* ?

Rimicaris exoculata est une crevette vivant au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes, décrite pour la première fois en 1986 (Williams and Rona 1986). Elle représente l'espèce majoritaire sur quasiment tous les sites qu'elle colonise, avec une densité pouvant approcher les 2500 individus au mètre carré (Segonzac *et al.*, 1993) (Fig.5c). Les premières études ont montré que par rapport aux autres espèces de crevettes hydrothermales et littorales, elle présente la particularité d'avoir une cavité branchiale hypertrophiée abritant une communauté dense de bactéries filamenteuses (Van Dover *et al.*, 1988, Casanova *et al.*, 1993, Segonzac *et al.*, 1993). De plus, elle ne présente pas un comportement de prédateur et/ou nécrophage et son tube digestif réduit contient en majorité des minéraux avec peu de matière organique (Segonzac *et al.*, 1993). Ce sont ces observations qui ont conduit alors à l'hypothèse de l'existence d'une relation de nature trophique (et/ou de détoxification) entre la crevette et les bactéries du céphalothorax. Des études ont montré l'activité de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase / oxygénase (RubisCO) au sein de la communauté du céphalothorax, démontrant un potentiel chimioautotrophe pour ces bactéries (Galchenko *et al.*, 1989). Par la suite, des travaux utilisant des isotopes stables du carbone et de l'azote sur extraits cellulaires ont mis en évidence que de nombreux épibiontes du céphalothorax étaient chimioautotrophes et que la biomasse de la crevette avait une signature isotopique naturelle typique des animaux qui effectuent une relation trophique avec des bactéries chimioautotrophes (Gebruk *et al.*, 1993, Polz *et al.*, 1998, Rieley *et al.*, 1999, Gebruk *et al.*, 2000b). Cependant, les mécanismes de transferts de matière organique des épibiontes vers l'hôte restent inconnus (Zbinden *et al.*, 2004, Zbinden *et al.*, 2008). Des études ont également montré l'existence d'une communauté bactérienne inféodée au tube digestif, pouvant également jouer un rôle trophique pour l'hôte (Zbinden and Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.*, 2010). Les associations symbiotiques ont toujours apporté à l'homme de nouvelles connaissances dans les domaines de la recherche fondamentale (évolution, origines du Vivant, adaptation aux changements) et appliquée (biotechnologie, pharmacologie, cosmétologie). Il est donc important à l'heure actuelle de continuer à étudier les interactions entre organismes vivants. L'une des particularités du modèle *R. exoculata* est la présence d'une possible double interaction ou « double symbiose » (avec les bactéries du céphalothorax et celles du tube digestif). Depuis sa découverte, de nombreuses hypothèses ont été discutées tant sur sa biologie que sur les interactions avec ses symbiontes.

4.2. Biologie de *Rimicaris exoculata*.

La crevette *R. exoculata* est un crustacé appartenant à la famille *Alvinocarididae* (Williams and Rona 1986) (Fig.19). Les caractéristiques phénotypiques communes à l'ordre des *Decapoda* sont la présence d'un exosquelette souvent calcifié protégeant un corps constitué de segments (ou métamères), la présence de 5 paires de pattes locomotrices et la fusion des régions céphaliques et thoraciques en un céphalothorax (Fig.19).

Domaine:	<i>Eucarya</i>
Règne:	<i>Animalia</i>
Phylum:	<i>Arthropoda</i>
Sous-phylum:	<i>Crustacea</i>
Classe:	<i>Malacostraca</i>
Ordre:	<i>Decapoda</i>
Sous-ordre:	<i>Pleocyemata</i>
Infra-ordre:	<i>Caridea</i>
Super-famille:	<i>Bresilioidea</i>
Famille:	<i>Alvinocarididae</i>
Genre:	<i>Rimicaris</i>
Espèce:	<i>Rimicaris exoculata</i>

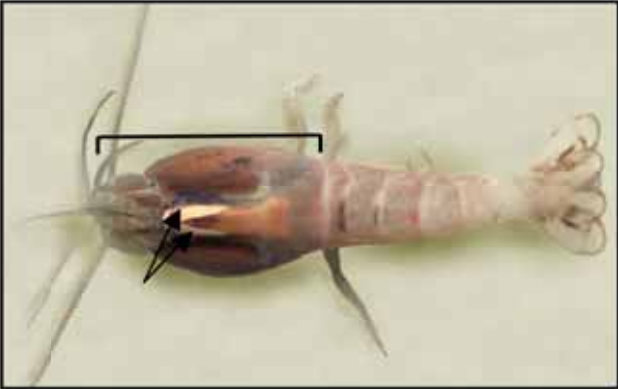


Figure 19 : taxonomie et photo de l'espèce *Rimicaris exoculata* au stade adulte (c : céphalothorax ; o : ocelles).

L'espèce *R. exoculata* adulte possède des particularités anatomiques qui la distinguent des autres crustacés *Caridea*. La plus visible est la présence d'un céphalothorax hypertrophié par rapport au reste du corps (Fig.19). De plus, la crevette ne présente pas de rostre (Komai and Segonzac 2008) et n'a pas d'yeux mais des ocelles (Fig.19) supposés être sensibles aux rayons infrarouges émis par les fumeurs (Pelli and Chamberlain 1989, Nuckley *et al.*, 1996, VanDover *et al.*, 1996, Chamberlain 2000).

La femelle adulte produit des œufs oranges qu'elle conserve protégés dans une gangue jusqu'à leur éclosion (Llodra *et al.*, 2000). Généralement, une femelle peut porter jusqu'à 800 œufs, la taille pouvant varier de 300 à 400 μm (Tyler and Young 1999). A notre connaissance, aucune femelle gravide n'a été observée jusqu'à présent dans les agrégats de crevettes. L'hypothèse est qu'elles protégeraient le développement des œufs en s'éloignant des zones d'activités de leurs congénères (Tyler and Young 1999). L'espèce *R. exoculata* est endémique des sites hydrothermaux de la MAR (Fig.2) qui peuvent être éloignés de plusieurs centaines de kilomètres. Des études récentes montrent un flux de gènes important entre les populations de *R. exoculata* des différents sites hydrothermaux de la MAR, suggérant une forte capacité de dispersion pour cette espèce (Teixeira *et al.*, 2011). Les larves de *R. exoculata* qui n'ont jamais été observées au niveau des sites hydrothermaux, pourraient coloniser d'autres sites en suivant les courants marins comme c'est le cas pour de nombreux invertébrés marins profonds (Lutz 1988, Marsh *et al.*, 2001).

Concernant les stades juvéniles, seulement des spécimens mesurant au moins 1.2 cm ont été collectés au niveau des sites hydrothermaux à la périphérie des agrégats (Komai and Segonzac 2008). La coloration orange des juvéniles est due à d'importantes réserves lipidiques en caroténoïdes supposées d'origine phytoplanctonique (Pond *et al.*, 1997, Rieley *et al.*, 1999, Allen *et al.*, 2001). Ces réserves disparaissent au fil des mues et du développement morphologique, avec augmentation de la taille du céphalothorax, jusqu'au stade adulte de la crevette (Fig.19). La taille de la crevette adulte peut atteindre 6 cm de long. La cavité céphalothoracique hypertrophiée représente alors près de la moitié de la longueur du corps (Fig.19). *R. exoculata* vit entre 10 et 30°C (Zbinden *et al.*, 2004, Zbinden *et al.*, 2008) dans la zone de fluides dilués, il lui arrive de passer brièvement dans des zones où les fluides sont beaucoup plus chauds.

Les branchiostégites (Br), carapaces latérales du céphalothorax, sont incurvées et forment un microenvironnement presque clos, piégeant les appendices buccaux à l'intérieur (Fig.20). Les parties inférieures et supérieures du céphalothorax sont séparées par deux pièces buccales : la scaphognathite (sc, position dorsale) et l'exopodite (ex, position ventrale) du premier maxillipède. Le mouvement de la scaphognathite crée un flux d'eau permettant l'oxygénation des branchies (Fig.20a) (Zbinden *et al.*, 2004). Après passage par les branchies, l'eau s'appauvrit en oxygène et s'enrichit en dioxyde de carbone et se retrouve dans la chambre pré-branchiale supérieure (Fig.20a). L'exopodite représente une barrière séparant les cavités inférieure et supérieure du céphalothorax (Fig.20). Les deux pièces buccales citées précédemment (sc et ex), ainsi que la paroi interne des branchiostégites (Br) sont recouverts de bactéries filamenteuses associées à des minéraux (Fig.21).

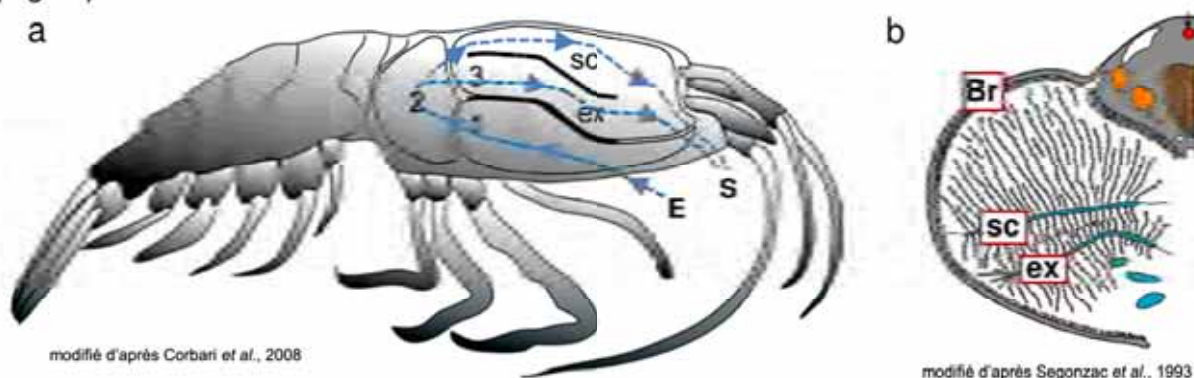


Figure 20 : Anatomie du céphalothorax de *Rimicaris exoculata* (Br : branchiostégite ; sc : scaphognathite ; ex : exopodite).

- Schéma montrant les mouvements d'eau permettant l'oxygénation des branchies chez *R. exoculata* (E et S respectivement pour entrée et sortie d'eau de mer). 1 : chambre pré-branchiale inférieure ; 2 : chambre branchiale véritable (où se trouvent les branchies) ; 3 : chambre pré-branchiale supérieure (milieu enrichi en CO₂).
- Coupe transversale du céphalothorax de *R. exoculata* montrant la Br et les soies bactériophores des sc et ex (où sont fixées les bactéries).

Comme tous les arthropodes, la crevette *R. exoculata* subit la mue (ou exuviation). La mue est un phénomène physiologique qui demande une importante dépense d'énergie pour l'organisme. Le cycle de mue comprend plusieurs phases dont une seule de durée variable : la phase de repos tégumentaire. Des études ont montré que le cycle de mue chez *R. exoculata* est beaucoup plus court (10 jours) comparé à des espèces de crevettes littorales, comme par exemple *Penaeus japonicus* (21 jours) et *Macrobrachium rosenbergii* (41 à 91 jours) (Corbari *et al.*, 2008). Les conditions physico-chimiques fluctuantes dans les environnements hydrothermaux pourraient expliquer que l'organisme investit moins de temps pour cette phase de repos.

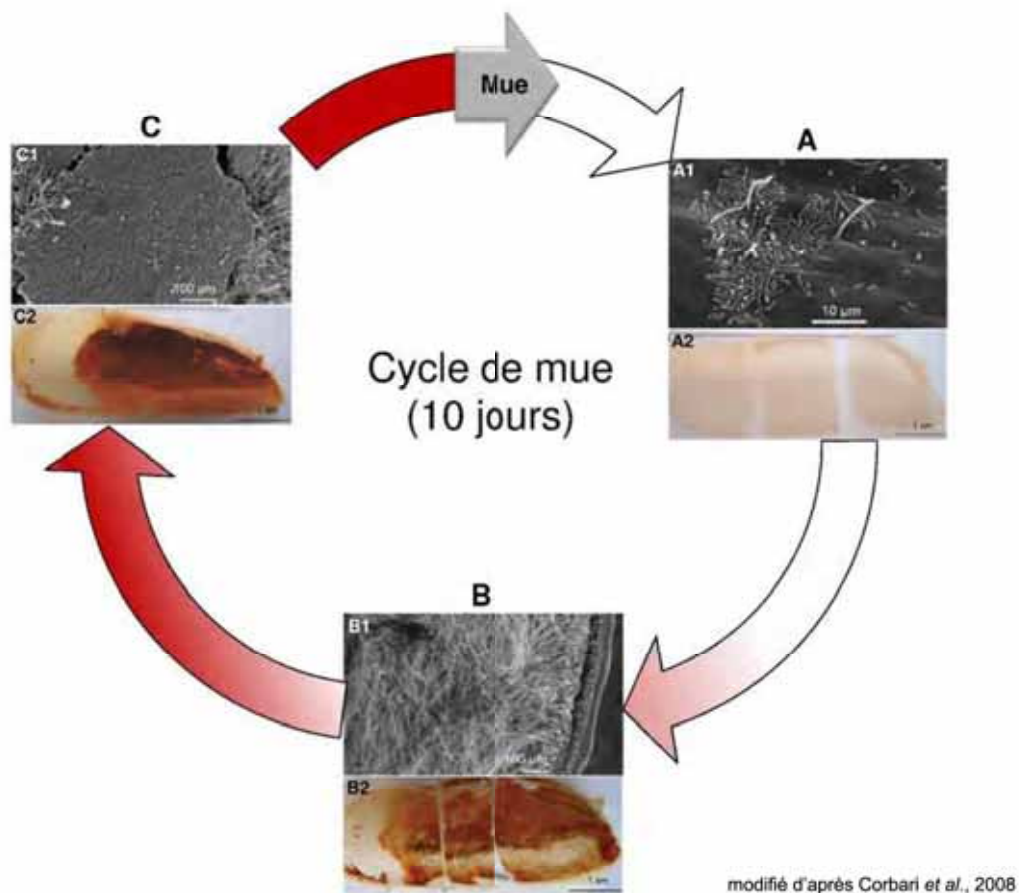


Figure 21 : schéma du cycle de mue de *Rimicaris exoculata* montrant une vue interne des branchiostégites (Br) à différentes phases du cycle (A1, B1, C1 : microscopie électronique à balayage ; A2, B2, C2 : photographies).

- A. **Phase post-ecdysiale** (après la mue). A2 : Br sans minéraux ; A1 : début de colonisation par des bacilles et des bactéries filamenteuses.
- B. **Phase pré-ecdysiale précoce** (environ au milieu du cycle). B2 : Br avec minéraux (coloration rouge correspondant à des oxydes de fer) ; B1 : Br colonisée par de nombreuses bactéries filamenteuses.
- C. **Phase pré-ecdysiale avancée** (avant la mue). C2 : Br avec une croûte d'oxyde de fer. C1 : les bactéries filamenteuses sont véritablement recouvertes par les minéraux.

A chaque mue, la croûte de minéraux et les bactéries associées au céphalothorax sont éliminées avec l'estomac et la partie postérieure du tube digestif. Les crevettes

apparaissent alors de couleur blanche (Fig.21A). La recolonisation par les bactéries se fait conjointement avec la précipitation des minéraux (Fig.21B et C). Une corrélation entre la couleur de la crevette (due aux minéraux) et le stade du cycle de mue peut être réalisée (Zbinden *et al.*, 2004, Corbari *et al.*, 2008). En fonction des sites, les minéraux qui vont précipiter, oxyde de fer ou sulfate de fer, vont donner respectivement une coloration orange ou grise en milieu de cycle et rouge ou noire en fin de cycle de mue (Corbari *et al.*, 2008). Cette étude a permis de diriger les efforts d'échantillonnages lors des campagnes océanographiques pour les travaux de cette thèse.

4.3. Double symbiose ?

4.3.1. Les épibiontes du céphalothorax.

De nombreuses études ont été menées pour essayer de caractériser les épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata* et surtout de comprendre leurs rôles (Van Dover *et al.*, 1988, Casanova *et al.*, 1993, Segonzac *et al.*, 1993, Polz and Cavanaugh 1995, Zbinden *et al.*, 2004, Corbari *et al.*, 2008, Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2011). La première étude phylogénétique a été menée sur des individus provenant du site hydrothermal basaltique Snake Pit (23°22'N, 44°57'W ; 3600 m de profondeur, Fig.2) (Polz and Cavanaugh 1995). Les résultats ont affilié les épibiontes du céphalothorax à un unique phylotype, les *Epsilonproteobacteria* suspectées d'utiliser la voie de la thiotrophie ou sulfo-oxydation (section 3.1.3.).

Par la suite, des observations microscopiques ont montré l'existence, sur des spécimens du site mantélique Rainbow, de plusieurs morphologies d'épibiontes (bacilles, filaments fins, épais, coques avec membranes internes), certaines associées à des oxydes de fer, suggérant l'occurrence de plusieurs phylotypes et peut-être de plusieurs métabolismes (Fig.22a, b et c) (Zbinden *et al.*, 2004, Corbari *et al.*, 2008, Zbinden *et al.*, 2008). Les analyses moléculaires effectuées sur les épibiontes du site Rainbow ont ainsi permis de révéler la présence de divers phylotypes bactériens : *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria* (Fig.22c), mais également de gènes de fonction : les gènes *aprA* et *pmoA* impliqués respectivement dans les voies de l'oxydation des sulfures et du méthane (sections 3.1.3. et 3.1.4.) (Zbinden *et al.*, 2008). Suite à ces études, trois métabolismes sont supposés coexister au sein de la communauté épibiotique du céphalothorax de *R. exoculata* : la sulfo-oxydation, la méthanotrophie et la ferro-oxydation. Comme pour *B. azoricus* (section 3.2.2.), le fait de vivre en interaction avec des symbiontes possédant différentes voies métaboliques

permettrait à l'hôte une meilleure adaptation aux possibles changements géochimiques du milieu de vie, élargissant de fait son aire de colonisation.

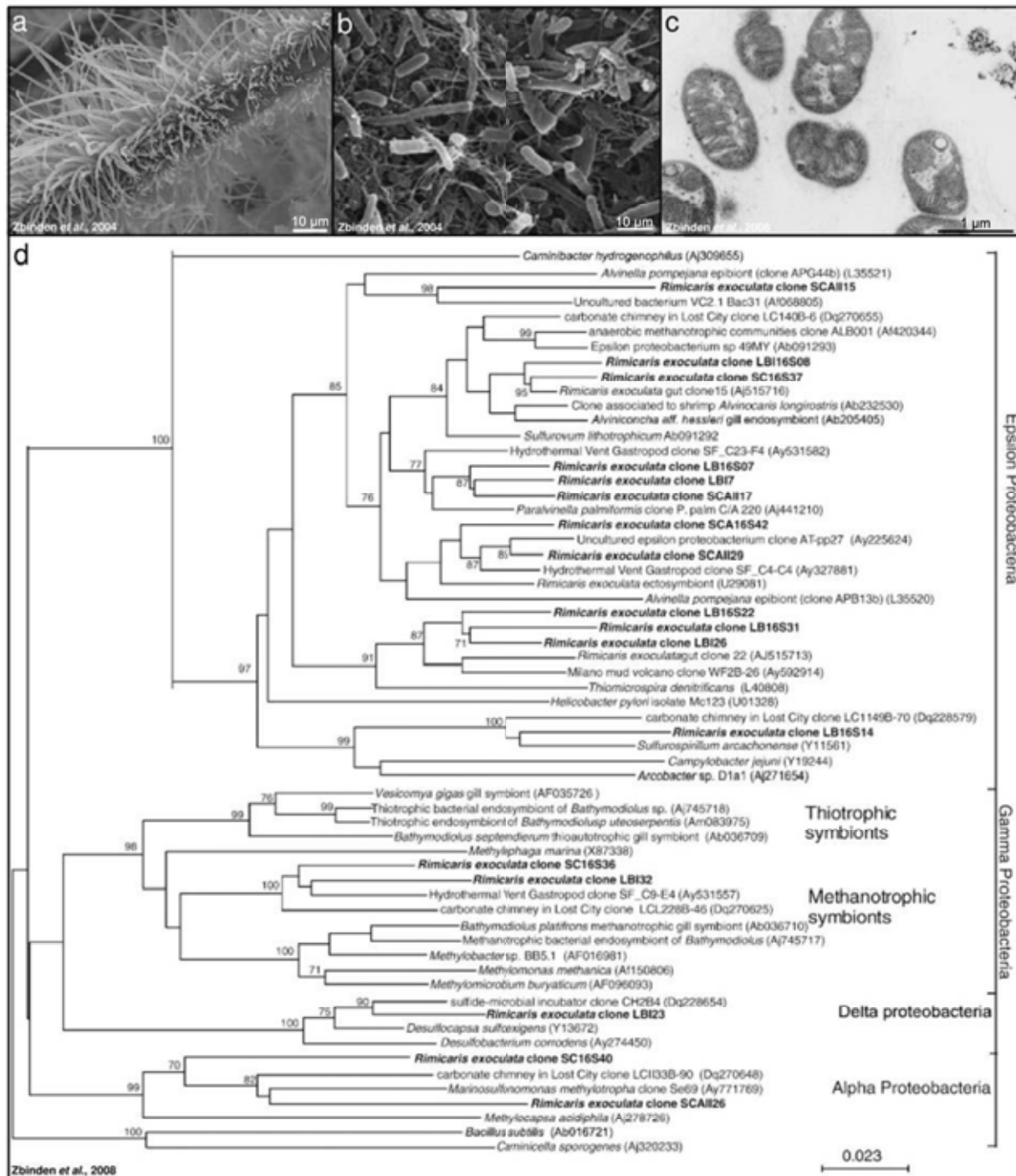


Figure 22 : Morphologies et phylogénie des épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata* du site Rainbow (photos a et b : microscopie électronique à balayage ; photo c : microscopie électronique à transmission).

- Bactéries filamenteuses fixées sur une soie bactériophage d'un scaphognathite de *R. exoculata*.
- Plusieurs morphologies de bactéries (bacilles, filamenteux, coques) présentes à la surface d'un branchiostégite de *R. exoculata*.
- Morphologies de type coques avec la présence de membranes internes cytoplasmiques caractéristique des bactéries méthanotrophes.
- Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant l'ADNr 16S des épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata* (par la méthode Neighbour-Joining ; 500 bootstraps).

Par la suite, des observations microscopiques après hybridation *in situ* (FISH) sur des spécimens de *R. exoculata* provenant de différents sites hydrothermaux de la MAR ont montré que deux phylotypes bactériens, les *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria*, à morphologies filamenteuses domineraient la communauté d'épibiontes et que les séquences d'ADNr 16S sembleraient biogéographiquement liées par rapport aux sites de prélèvement (Petersen *et al.*, 2009) (Fig.23).

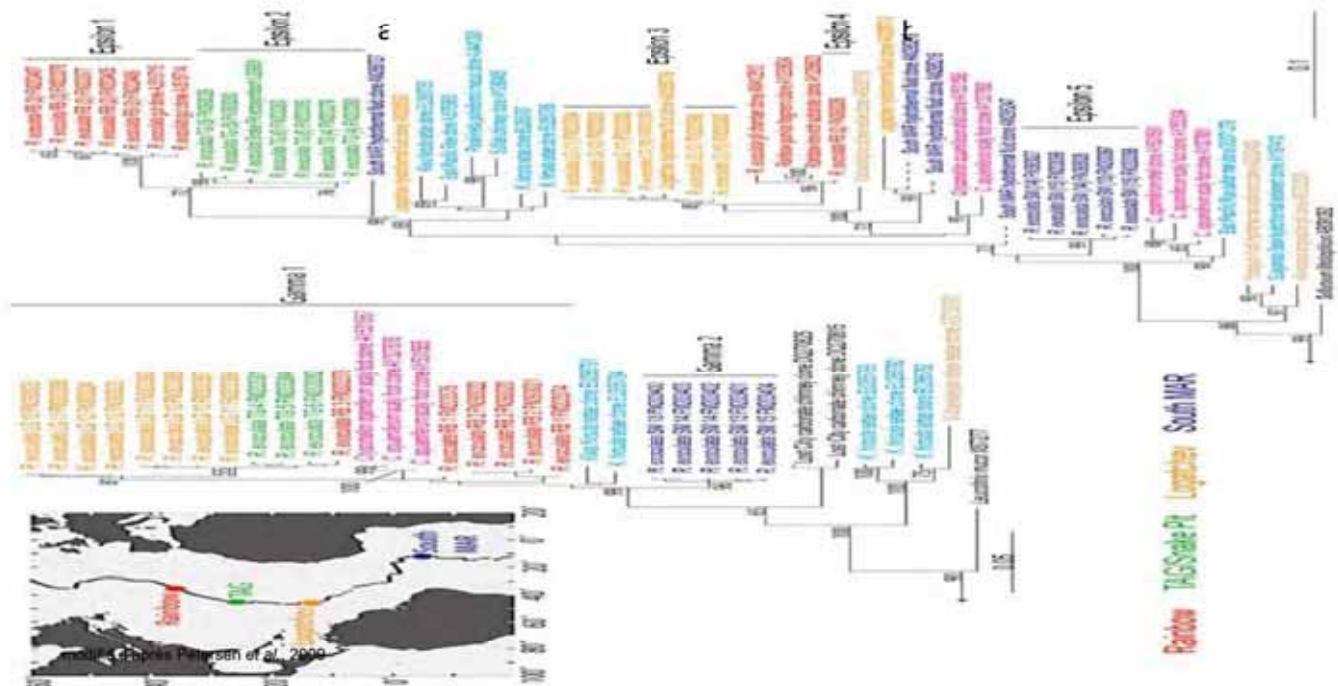


Figure 23 : arbres phylogénétiques obtenus à partir des séquences du gène codant l'ARNr 16S sur des spécimens de *R. exoculata* provenant de différents sites hydrothermaux de la MAR (par la méthode du Maximum Likelihood). Seulement les bootstrap supérieurs à 60 sont indiqués.

- Arbre phylogénétique des épibiontes *Gammaproteobacteria* de *R. exoculata*.
- Arbre phylogénétique des épibiontes *Epsilonproteobacteria* de *R. exoculata*.

De plus, une étude récente a entrepris de re-analyser la phylogénie des épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata* du site Snake Pit (Hügler *et al.*, 2011). Ces travaux confirment la présence de plusieurs groupes bactériens : *Epsilon*-, *Delta*-, et *Gammaproteobacteria*, ainsi que *Bacteroidetes*, contrastant avec l'étude pionnière qui décrivait une monoculture d'un phylotype d'*Epsilonproteobacteria* sur ce site (Polz and Cavanaugh 1995). De plus, ces travaux ont également mis en évidence au sein de la communauté d'épibiontes la présence de gènes impliqués dans le métabolisme des sulfures (gènes *soxB* et *aprA*, section 3.1.3.), ainsi que les gènes *cbbM* et *acIB* codant respectivement pour les enzymes clés de deux voies autotrophes : le cycle de Calvin et le cycle inverse de l'acide citrique (section 3.1.5.) (Hügler *et al.*, 2011). En utilisant l'affiliation phylogénétique des gènes de fonction, les auteurs ont émis des hypothèses sur les métabolismes putatifs des principaux groupes bactériens détectés avec le gène de l'ADNr

16S (Fig.24). Ces résultats mettent en évidence une possible relation syntrophique entre les épibiontes, basée sur le métabolisme du soufre.

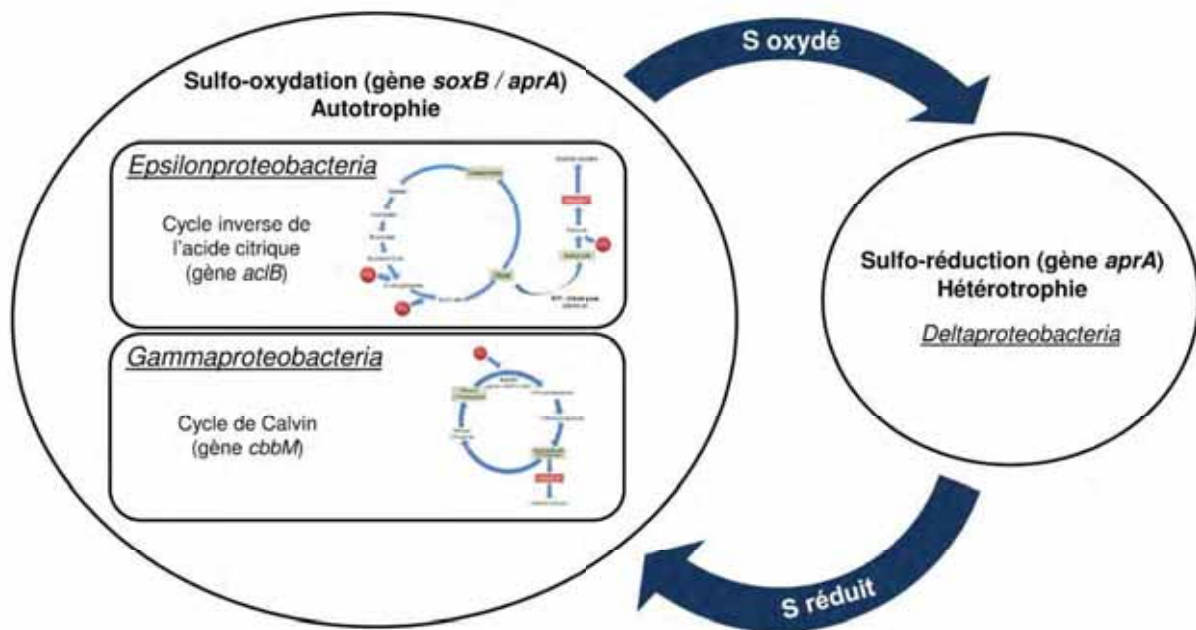


Figure 24 : hypothèses sur les métabolismes basés sur le soufre des épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata* et leurs relations potentielles (d'après Hügler *et al.*, 2011).

Incluant cette étude, la présence des gènes *hynL* et *hupL* codant pour des hydrogénases a également été détectée ([NiFe] hydrogénase groupe 1) (Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2011). Dans les conditions standard de température (25°C) et de pression (1 atmosphère), l'hydrogène apparaît comme un très bon donneur d'électron, le rendement énergétique de l'oxydation de l'hydrogène est d'ailleurs plus important que celui de l'oxydation du méthane et des sulfures, mais également par rapport à tous les autres donneurs d'électrons potentiels impliqués dans la croissance en chimolithoautotrophie (Amend and Shock 2001). Dans une étude récente, l'utilisation de l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie potentielle a d'ailleurs été démontrée chez les symbiontes sulfo-oxydants de *Bathymodiolus puteoserpentis* (Petersen *et al.*, 2011). En plus des métabolismes basés sur les sulfures (oxydation / réduction), la ferro-oxydation et la méthanotrophie, l'oxydation de l'hydrogène apparaît également comme une voie énergétique utilisable par les épibiontes du céphalothorax de *R. exoculata*, ce qui est en accord avec les analyses de disponibilité chimique d' H_2 au niveau de certains sites hydrothermaux colonisés par ce crustacé (Schmidt *et al.*, 2008).

4.3.2. Les épibiontes du tube digestif.

Par rapport au céphalothorax, très peu d'études ont été menées sur le tractus digestif de *R. exoculata* (Fig.25). Le contenu de l'intestin est composé en majorité d'éléments minéraux (sulfures et oxydes de fer) d'origine probablement hydrothermale et de quelques fragments de cuticules qui proviendraient de l'ingestion des exuvies (la mue libérée dans l'environnement) des congénères (Casanova *et al.*, 1993, Segonzac *et al.*, 1993).

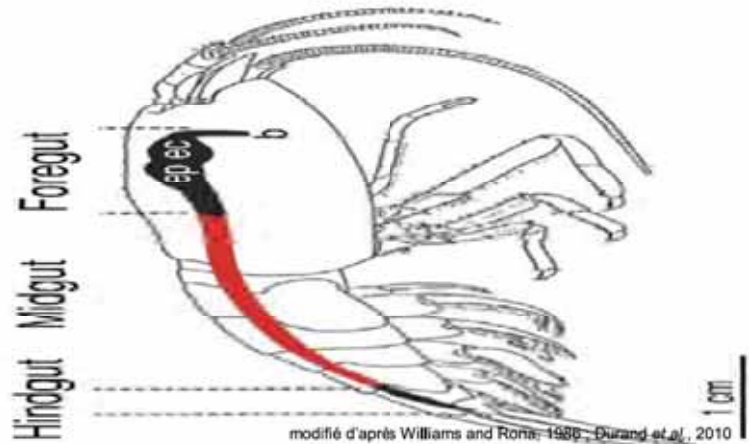


Figure 25 : schéma de l'anatomie du tractus digestif de *R. exoculata* montrant le stomodeum (foregut, avec b : bouche, ec : estomac cardiaque ; ep : estomac pylorique), le mésentéron en rouge (midgut) et le proctodeum (hindgut).

Une première étude utilisant des marqueurs isotopiques sur broyats révèle une fixation significative de carbone dans les extraits de tube digestif, suggérant la présence d'une communauté microbienne à ce niveau (Polz *et al.*, 1998). En 2003, des observations en microscopie optique de l'estomac et de l'intestin n'ont pas confirmé la présence de microorganismes dans le tube digestif (Zbinden and Cambon-Bonavita 2003). Cependant, une étude moléculaire (ADNr 16S) a révélé la présence de trois groupes bactériens : les *Epsilonproteobacteria*, les *Deferribacterales* et les *Entomoplasmatales*. Les séquences de clones obtenues sont affiliées à des espèces très peu représentées dans l'environnement hydrothermal (ex. : les *Deferribacterales* sont proches du genre *Geovibrio*, inféodé aux puits de pétrole et aux écosystèmes dulçaquicoles). Ce n'est que très récemment qu'une étude a permis d'observer pour la première fois la présence de bactéries filamenteuses insérées entre les microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin de *R. exoculata* (Durand *et al.*, 2010) (Fig.26). Ces bactéries sont présentes au niveau de l'intestin moyen (« Midgut », Fig.25), seule partie de l'intestin qui ne subit pas la mue.

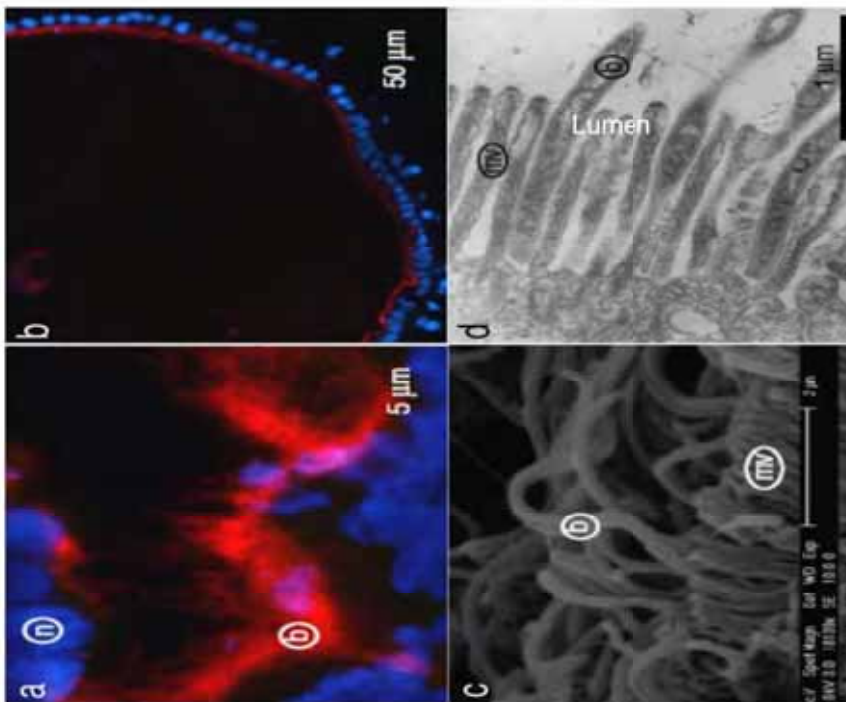


Figure 26 : observation d'épibiontes du tube digestif d'un spécimen de *R. exoculata* de Rainbow ayant subi un jeûne long. (photos **a** et **b** : observation en fluorescence après hybridation *in situ* (FISH) en utilisant la sonde Eub338 marquée en Cy3, l'ADN eucaryote (noyau) est marqué en bleu (DAPI); photos **c** et **d** : respectivement microscopie électronique à balayage et transmission (MEB, MET)) (n : nucleus ; b : bacteria ; mv : microvillosité ; lumen : intérieur du tube digestif). **a**, **b**. Epibiontes bactériens (en rouge) insérés entre les microvillosités de l'intestin d'une crevette. **c**, **d**. Observation de l'insertion entre les microvillosités intestinales des épibiontes bactériens. (modifié d'après Durand *et al.*, 2010)

Ces bactéries sembleraient réellement inféodées au tube digestif de *R. exoculata* puisqu'elles sont toujours présentes, insérées entre les microvillosités, après des expériences de jeûne en aquarium pressurisé (Durand *et al.*, 2010). Par rapport à la première étude, la phylogénie montre la présence en plus des *Deferribacterales*, *Epsilonproteobacteria* et du groupe des *Mollicutes*, des *Gammaproteobacteria*. De plus, lors d'un jeûne long (72 heures), il semble que la proportion des séquences d'ADNr 16S du groupe des *Deferribacterales* (qui domine la banque de clones chez les spécimens témoins) diminue alors que celle des *Gamma-* et *Epsilonproteobacteria* augmente. Une hypothèse serait que le jeûne long (72 heures) conduisant à l'élimination totale du bol alimentaire (incluant les minéraux réduits) provoquerait l'entrée d'oxygène, ce qui serait favorable aux métabolismes des *proteobacteria*, mais défavorable à celui des *Deferribacterales* qui sont strictement anaérobies (Durand *et al.*, 2010).

Ainsi, en plus des épibiontes du céphalothorax, il existerait également une association symbiotique entre *R. exoculata* et des bactéries inféodées à son tractus digestif. Ce modèle présenterait donc une « double symbiose » (sur deux zones anatomiques différentes de son corps) dont le rôle principal serait d'ordre trophique.

4.4. Mode de nutrition et cycle de vie.

Rimicaris exoculata est un animal, qui a donc besoin de matière organique pour vivre (hétérotrophe). Cette crevette représente l'espèce majoritaire sur quasiment tous les sites qu'elle colonise et a également une activité intense, en mouvement perpétuel autour des cheminées. De plus, son cycle de mue court représenterait un coût énergétique supplémentaire. Il faut pouvoir compenser toutes ces dépenses d'énergie par un apport de matière organique important. Cependant, l'observation du contenu de son tube digestif révèle plutôt la présence d'une quantité importante de particules minérales. De part ces observations et le fait que la crevette soit colonisée par des communautés microbiennes sur deux zones distinctes, des hypothèses quant à son mode de nutrition ont été proposées : (i) les microorganismes ingérés avec les particules minérales des parois des cheminées hydrothermales ou avec l'eau environnante seraient la source principale de nutrition (Van Dover *et al.*, 1988) ; (ii) les épibiontes du céphalothorax seraient la source nutritive principale par grattage du tapis microbien (Casanova *et al.*, 1993, Polz and Cavanaugh 1995, Gebruk *et al.*, 1997, Rieley *et al.*, 1999, Gebruk *et al.*, 2000a), par ingestion des épibiontes et de l'exuvie après la mue ou encore par transfert trans-cuticulaire de matière organique des épibiontes à la crevette (Zbinden *et al.*, 2004, Corbari *et al.*, 2008, , Zbinden *et al.*, 2008). Néanmoins, la position de l'articulation des chélicères montre qu'il est quasiment impossible pour cet appendice de rentrer dans le céphalothorax afin d'effectuer un grattage du tapis microbien (Segonzac *et al.*, 1993). De plus, des observations ne montrent aucune altération mécanique de celui-ci (Zbinden *et al.*, 2004) ; (iii) la communauté bactérienne inféodée au tube digestif de *R. exoculata* pourrait représenter une source nutritive alternative (Polz *et al.*, 1998, Pond *et al.*, 2000, Zbinden and Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.*, 2010). Ces différentes hypothèses peuvent coexister au sein du modèle *R. exoculata*.

Pour mieux comprendre le fonctionnement des relations entre la crevette et ses épibiontes et notamment pour valider le mode de transmission de ces derniers, il faudrait analyser la présence (ou non) des épibiontes sur tous les stades de la vie du modèle. Or, le cycle de vie de *R. exoculata* est actuellement incomplet (Fig.27), il manque en effet les stades larvaires pélagiques et très peu d'œufs ont été récoltés. Néanmoins à l'heure actuelle, à part les travaux sur le cycle de mue de Corbari et collaborateurs en 2008, aucune étude n'a regardé les changements possibles dans la communauté d'épibiontes dus aux variations physiologiques rencontrées au cours des stades connus du cycle de vie de *R. exoculata*.



Figure 27 : schéma représentant le cycle de vie incomplet de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.

5. Objectifs de l'étude.

Les travaux de cette thèse se sont principalement concentrés sur l'étude des épibiontes associés au céphalothorax de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*. Les résultats de cette thèse vont être présentés en trois parties :

Chapitre 1 : pour la première fois a été effectuée une analyse descriptive de la diversité des épibiontes bactériens (PCR sur l'ADNr 16S) du céphalothorax de *R. exoculata* au cours du son cycle de vie (œuf, larve, juvénile, adulte). L'objectif était d'analyser la présence ou non et les variations possibles de la communauté d'épibiontes et d'étudier le mode de transmission pour les bactéries associées aux céphalothorax.

Chapitre 2 : recherche fonctionnelle sur les métabolismes des épibiontes du céphalothorax chez *R. exoculata* : expériences d'enrichissement en incubateur pressurisé avec des composés utilisés potentiellement dans les métabolismes des épibiontes, analyse des communautés épibiontes actives (RT-PCR sur l'ADNr 16S) et recherche de gènes de fonction putatifs (PCR, RT-PCR et Q-PCR). L'objectif était de valider et de quantifier les métabolismes suspectés dans les études précédentes (Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2011).

Chapitre 3 : participation à une étude parallèle sur la comparaison des épibiontes du tube digestif de *R. exoculata* de quatre sites hydrothermaux de la MAR (un basaltique et trois mantélliques). L'objectif étant une mise en évidence éventuelle d'un lien entre les épibiontes du tube digestif et la localisation géographique de l'hôte en prenant en compte les conditions géochimiques des différents sites étudiés.

Ce travail s'inscrit au sein d'un groupe de la communauté scientifique qui étudie les phénomènes d'interactions entre organismes vivants. Le point de départ est la collecte des échantillons suivi des expériences en laboratoire (ou directement à bord de navire océanographique), utilisant divers outils et méthodes adaptés à cette étude.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

6. Collecte / préparation des échantillons.

Les crevettes *Rimicaris exoculata* de cette étude ont été prélevées sur plusieurs sites hydrothermaux, lors de différentes campagnes océanographiques : les sites Logachev (14°45'N, 44°57'W ; 3028 m de profondeur) et Ashadze (12°58'N, 44°51'W ; 4088 m de profondeur) lors de la campagne SERPENTINE en 2007 et le site Rainbow (36°13'N, 33°54'W ; 2300 m de profondeur) lors de la campagne MoMARDREAM-Naut en 2007 (Fig.28).



Figure 28 : localisation des sites hydrothermaux de cette étude le long de la MAR.

La collecte implique l'utilisation d'un navire océanographique, de submersibles (Fig.29), d'outils de prélèvement spécialisés (Fig.30) et s'appuie sur toute une équipe aussi bien scientifique que technique. Les outils de prélèvement sont développés en fonction des échantillons à prélever (ex. : animaux, sédiments, eau). Les sous-marins utilisés pour les prélèvements sont également équipés d'outils de mesures *in situ*, permettant d'obtenir certaines données physico-chimiques comme la température, le pH et les concentrations en certains éléments chimiques. La collecte est un moment délicat et doit être réalisée le plus efficacement possible pour minimiser les biais d'échantillonnage. Pour *R. exoculata*, les individus sont récupérés à bord du navire océanographique entre deux et trois heures après la collecte, selon la profondeur du site de prélèvement.



Figure 29 : photos en (a) du navire océanographique *Pourquoi pas ?*, en (b) du submersible non habité *Victor 6000* et en (c) du submersible habité *Nautilus*.

Une partie des individus est directement utilisée à bord du navire pour des expérimentations *in vivo* (section 8.). Une autre partie des spécimens collectés est congelée vivante à -80°C dès leur remontée, d'autres sont immédiatement disséqués en conditions stériles et les différentes pièces anatomiques prélevées (ex. : scaphognathites, exopodites, branchiostégites, tubes digestifs, etc.) sont soit congelées à -80°C dans des cryotubes pour l'extraction d'ADN / ARN, soit fixées pour les différentes méthodes de microscopies (section 7.). Les spécimens sont conditionnés en fonction de leur stade de mue (correspondant à leur couleur, section 4.2.). Il a été collecté des spécimens de *R. exoculata* de couleur blanche, orange et rouge sur Rainbow, blanche, grise et noire sur Logachev et uniquement noire sur Ashadze.

7. Observations microscopiques et *in situ* des épibiontes de *R. exoculata*.

7.1. Observations *in situ*.

Les photographies et vidéos des agrégats de *R. exoculata* ont été prises respectivement avec l'appareil photo numérique et la caméra, soit du submersible *Victor 6000*, soit du *Nautile* lors des différentes campagnes océanographiques.

7.2. Observations après hybridation fluorescente *in situ* (FISH).

La préparation des échantillons pour l'observation en FISH a été réalisée d'après le protocole de Sébastien Duperron, modifié par Lucile Durand (Duperron *et al.*, 2005, Durand *et al.*, 2010). Brièvement, après leurs remontées, les pièces buccales (scaphognathites, exopodites et branchiostégites) sont rapidement fixées dans un mélange eau de mer et formaldéhyde 3% pendant 3h, puis conservées dans un tampon éthanol / PBS2X (Phosphate Buffered Saline) (1/1), après plusieurs rinçage dans du tampon PBS1X. Au laboratoire, les échantillons sont inclus dans une résine composée de polyéthylène glycol et d'hexadécanol (90/10). Puis, à l'aide d'un microtome, des coupes de 4 à 6 µm sont réalisées à partir des blocs d'inclusions. Ces coupes sont montées sur lame et peuvent être conservées à -20°C. Avant de réaliser l'hybridation, la résine est dissoute en plongeant les lames dans 3 bains successifs d'éthanol à 95% pendant 5 min, puis les échantillons sont partiellement réhydratés dans une solution d'éthanol à 70%. Il peut y avoir plusieurs coupes sur une même lame, chacune va être délimitée par un cercle de silicone permettant de retenir les différents tampons successifs. L'hybridation est réalisée, après dépôt de 30 µl de tampon d'hybridation contenant une ou deux sondes (le % de formaldéhyde peut varier en fonction de(s) sonde(s) utilisée(s)) sur chaque échantillon. Les lames sont alors incubées pendant 3h à 46°C (hybridation). Ensuite, les lames sont plongées 15 min à 48°C dans une solution de rinçage puis brièvement passées dans de l'eau MilliQ. Après séchage, les lames sont montées avec un agent atténuant l'extinction de la fluorescence ou « antifading » (SlowFade® Gold, Invitrogen) contenant du 4',6' – diamidino-2-phénylindole (DAPI). Puis conservées à -20°C. Les observations en épifluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss Imager Z.2 équipé du système Colibri et de la technologie Apotome.

7.3. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).

A bord du navire, les pièces buccales disséquées (scaphognathites, exopodites et branchiostégites) sont incubées pendant 16h à 4°C dans une solution fixatrice (pH 7.4) de

glutaraldéhyde à 2,5% et d'eau de mer (pour 150 ml : 105 ml d'eau de mer filtrée à 0.22 µm, 30 ml d'eau distillée, 15 ml de glutaraldéhyde à 25%). Les échantillons sont ensuite rincés et conservés à 4°C dans une solution de conservation (pour 150 ml : 150 ml d'eau de mer filtrée à 0.22 µm, 0.065 g de sodium azide (NaN₃)). Au laboratoire, les échantillons subissent une déshydratation progressive, correspondant en une série de bains de 10 min à différentes concentrations en éthanol (30, 50, 70, 95, 100%) suivie d'un point critique (CPD 020[®], Balzers Union). Puis, les échantillons sont montés sur plot et sont finalement métallisés (SCD 040[®], Balzers Union). Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope QUANTA 200 MK (FEI[™]) et les acquisitions d'images avec le programme SCANDIUM (Soft Imaging System) avec le concours de l'ingénieur Philippe Crassous (Laboratoire Environnements Profonds, Ifremer).

7.4. Observations par microscopie électronique à transmission (MET).

Les échantillons sont fixés de la même façon que pour la microscopie électronique à balayage (section 7.3.). Au laboratoire, les échantillons sont déshydratés dans des bains d'éthanol et d'oxyde de propylène, puis sont inclus dans une résine epoxy (Serlabo). Des coupes semi- et ultra-fines sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Ultracut R, Reichert-Jung). Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine et observées au microscope classique (Olympus BX61). Les coupes ultra-fines sont déposées sur des grilles de cuivre et sont colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique LEO 912 (LEO Electron Optics GmbH) équipé d'une source LaB6.

8. Etude de l'incorporation *in vivo* de molécules marquées chez les épibiontes de *Rimicaris exoculata*.

L'expérimentation *in vivo* sur des organismes vivants provenant des profondeurs des océans fait intervenir une difficulté majeure : recréer à la surface et conserver durant la remontée la pression hydrostatique *in situ*. En effet, les spécimens collectés subissent le phénomène de la décompression lors de leur remontée. Les arthropodes et les bivalves supportent relativement bien ces fortes variations de pressions, qui sont en revanche létales pour certains organismes comme les annélides et les poissons. En réponse à ce problème, des collaborateurs de l'Université de Paris VI ont mis au point un système permettant de maintenir la pression *in situ* pendant la remontée : le PERISCOP[™] (Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant à la Capture d'Organismes Profonds (Shillito *et al.*, 2008))

(Fig.30). Cette même équipe a également développé un aquarium pressurisé qui permet les expérimentations d'organismes vivants à la pression hydrostatique *in situ* du fond : l'IPOCAMP™ (Incubateur Pressurisé pour l'Observation et la Culture d'Animaux Marins Profonds (Shillito *et al.*, 2001)) (Fig.30). Néanmoins, il n'existe pas de connexion possible entre le PERISCOP™ et l'IPOCAMP™. Les organismes hydrothermaux subissent donc, à un moment donné, la pression hydrostatique atmosphérique. Pour résoudre ce problème, la même équipe vient de développer un nouveau système nommé BALISTE™.

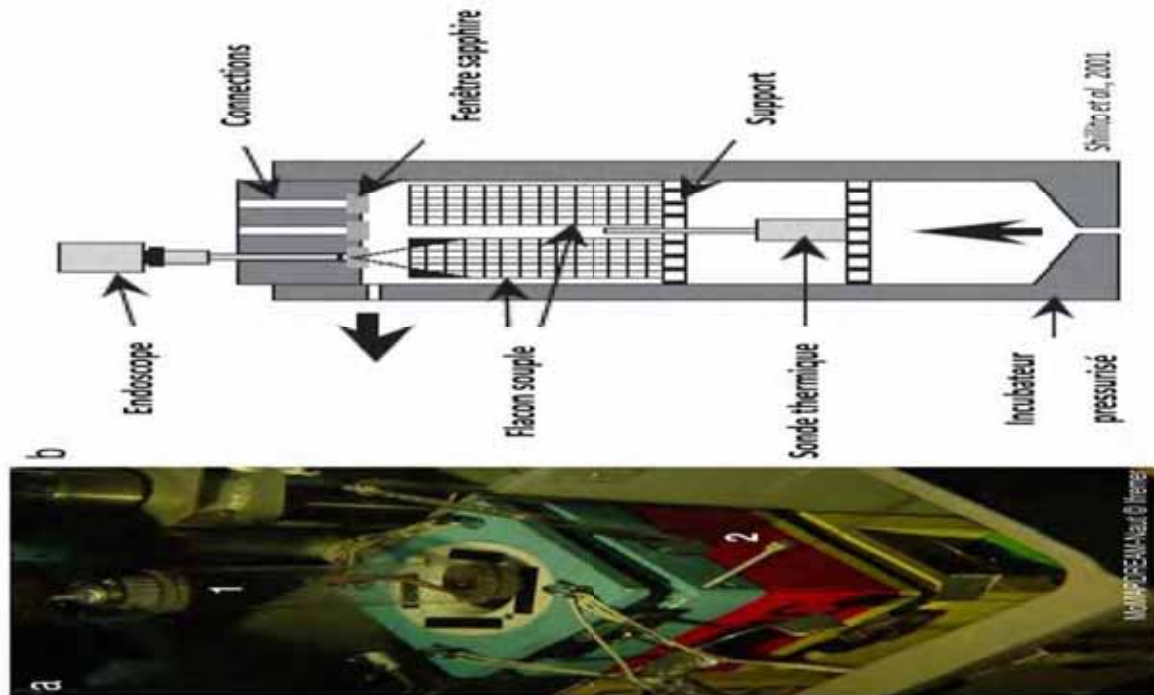


Figure 30 : outils pour le prélèvement et d'expérimentation *in vivo* des animaux marins profonds. (a) a1 : la cellule de prélèvement ; a2 : le PERISCOP™. (b) schéma de la structure de l'IPOCAMP™.

Grâce à ces systèmes, des expériences d'incorporation au sein des épibiontes de *R. exoculata* de molécules marquées, à la pression *in situ*, ont été effectuées pendant la campagne MoMARDREAM-Naut en 2007 sur le site Rainbow. Le choix des molécules marquées (donneurs et accepteurs d'énergies) a été effectué en fonction des différents métabolismes suspectés chez les épibiontes. Les spécimens ont été incubés dans l'IPOCAMP™ avec différentes sources de carbone marquées en ^{13}C (bicarbonate, formate et acétate de sodium et méthane, méthanol). Des incubations avec du bicarbonate de sodium marqué en ^{13}C et différentes sources d'énergie potentiellement utilisable par les épibiontes (fer (FeCl_2), soufre (S°), thiosulfate de sodium (NaS_2O_3), hydrogène (H_2)) ont également été réalisées. Chacune des expériences de marquages isotopiques a été réalisée en parallèle avec des spécimens de contrôle exposés à un cocktail d'antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol et rifampicine). Les différentes incubations ont duré entre 4 et 10h, dans le but d'identifier phylogénétiquement des espèces ayant incorporé les substrats marqués. Ceci

a été réalisé en séparant les acides nucléiques en fonction de leur composition isotopique en carbone (^{12}C / ^{13}C) sur gradient de densité par ultracentrifugation en utilisant la technique de SIP (Stable Isotope Probing) (Whiteley *et al.*, 2007), suivi d'un clonage / séquençage sur la fraction d'intérêt (Fig.31).

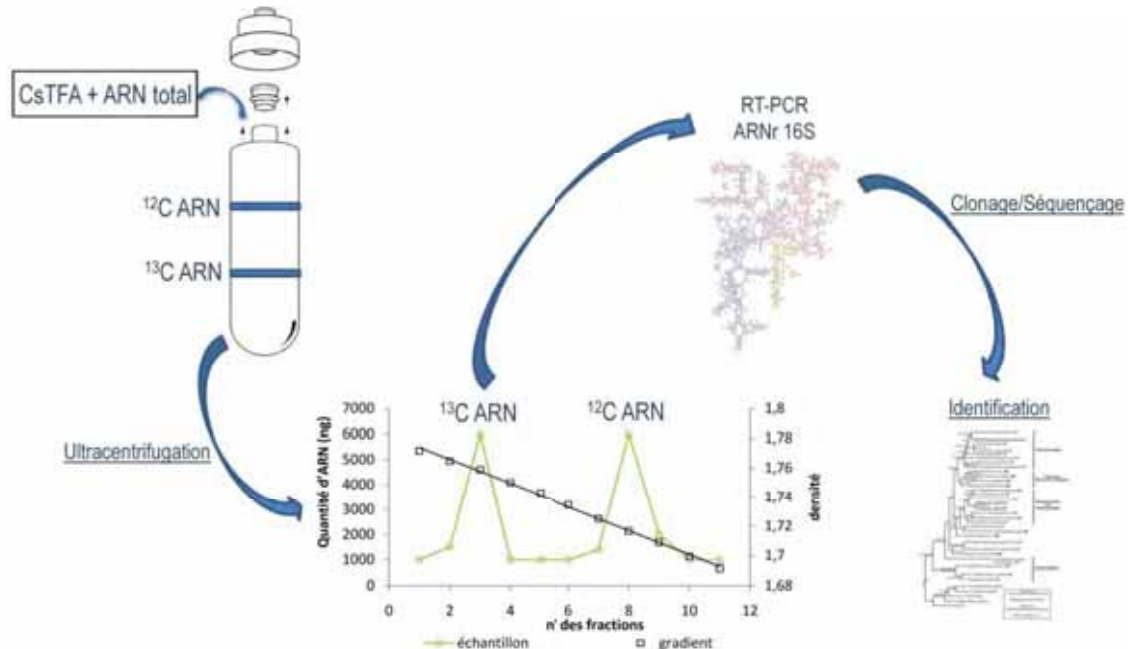


Figure 31 : schéma du protocole utilisé pour la séparation en SIP (Stable Isotope Probing) des épibiontes ayant incorporé le substrat marqué, exemple avec l'ARN (CsTFA : Césium - acide trifluoroacétique).

Le but est de séparer les différents épibiontes ayant incorporé le substrat marqué en fonction de la source d'énergie utilisée, donc de leurs métabolismes. Dû au temps d'incubation très court (4h), il a été décidé de travailler sur l'ARN ayant un turn-over plus rapide que l'ADN. Pour ce faire, nous avons utilisé une solution de CsTFA (Césium TrifluoroAcetate) ajustée à la densité de 1.73 g/L (déterminée expérimentalement sur nos échantillons) avec un tampon (GB : Gradient Buffer, 0.1 M Tris, 0.1 M KCl, 1 mM d'EDTA) suivant cette formule :

$$Vx = Vo \frac{(\rho_0 - \rho)}{(\rho - \rho_x)} - 0.2$$

Vx = Gradient Buffer (mL)

Vo = CsTFA (mL)

p0 = densité de CsTFA (= 2)

p = densité désirée

px = densité du Gradient Buffer (= 1)

Une quantité de 3000 ng/ μL d'ARN extrait, pour chaque échantillon incubé avec un substrat marqué en ^{13}C , a été déposée dans un quickseal polyallomer centrifuge tube (13x48 mm) (Beckman) contenant 4.9 mL du mélange CsTFA / GB (d =1.73). L'ultracentrifugation a

été effectuée avec une ultracentrifugeuse Optima L70.K (Beckman) en utilisant un rotor Vti 65.2 (Beckman) pendant 60 h à 190000 g. Après ultracentrifugation, le contenu du tube a été séparé en 12 fractions de 400 μ L, récupérées dans des tubes Eppendorf stériles (Fig.32).

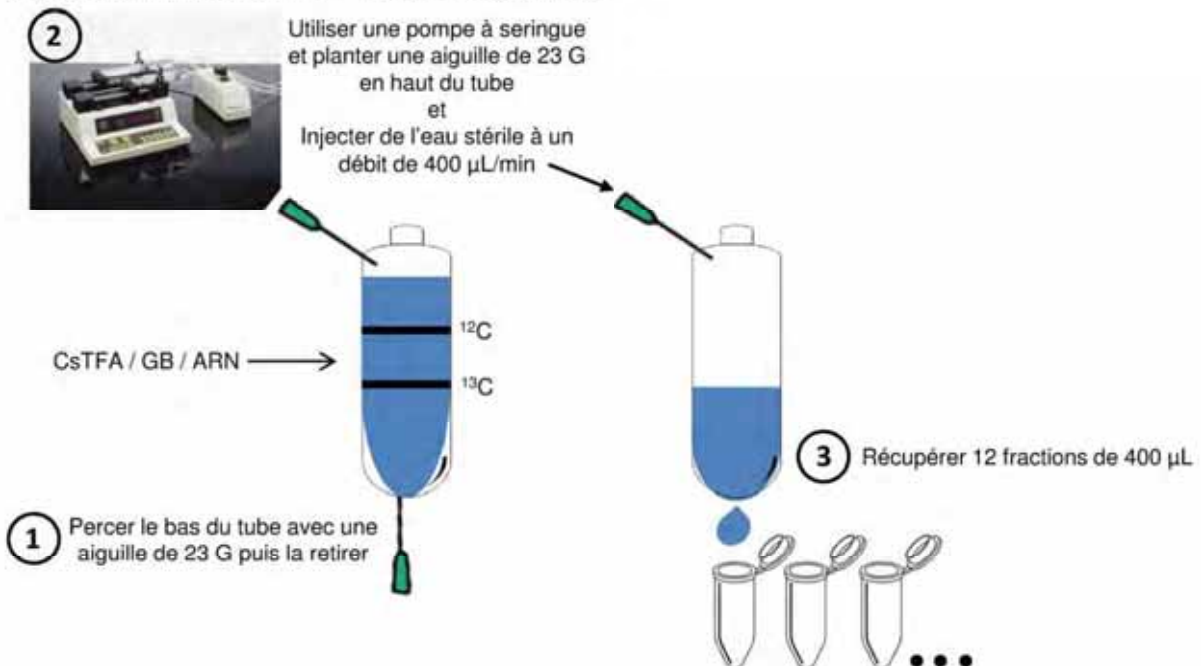


Figure 32 : récupération des fractions SIP, après ultracentrifugation.

L'ARN potentiellement présent dans chaque fraction est précipité avec de l'alcool isoamylique suivant le protocole de Whiteley *et al.*, 2007. La quantification de l'ARN dans chaque fraction a été effectuée en utilisant un kit Ribogreen[®] (invitrogen) sur microplaque, selon les recommandations du fabricant.

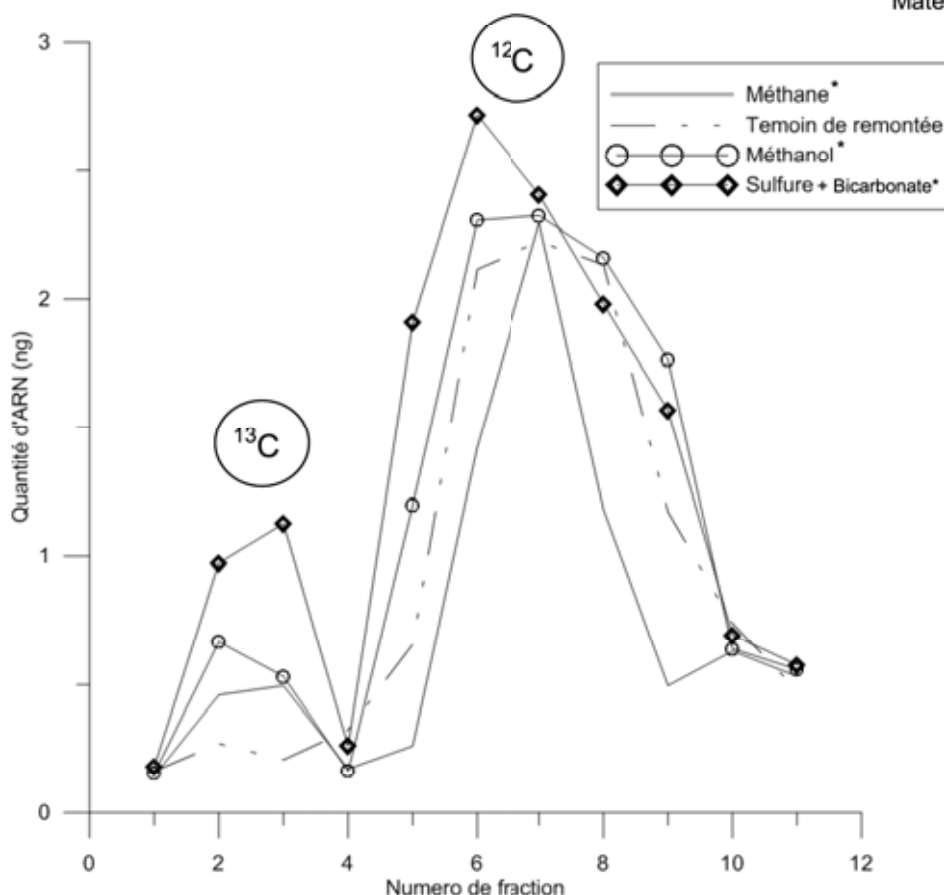


Figure 33 : séparation des communautés microbiennes ayant incorporé pendant 4h les substrats marqués en ^{13}C * (SIP).

Les résultats montrent que la séparation entre ^{13}C / ^{12}C a été possible avec en général une faible incorporation des molécules marquées en ^{13}C , excepté pour l'échantillon incubé avec des sulfures (Fig.33). Pour chaque fraction ^{13}C des trois incubations testées (4h avec méthane marqué en ^{13}C , méthanol marqué en ^{13}C , bicarbonate de sodium marqué en ^{13}C + sulfure), 96 clones ont été séquencés. Les résultats (non présentés ici) n'ont mis en évidence aucune congruence entre les sources d'énergies utilisées et les phylotypes détectés. La diversité obtenue est proche des résultats publiés sur des spécimens témoins qui n'ont pas été incubés. Le facteur limitant dans ces expériences est vraisemblablement le temps trop court pour les incubations qui ne laisse pas le temps aux molécules marquées de se fixer via les métabolismes microbiens ciblés. Néanmoins, ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par des collaborateurs du laboratoire de Liège qui ont étudié le suivi de l'incorporation de substrats marqués en ^{14}C . Les résultats indiquent un début d'incorporation après plus de 4h, puis une incorporation linéaire de 4h à 10h. Pour les expériences de SIP, il faudrait travailler sur de plus longues périodes avec plus de réplicats. Malheureusement, lors des campagnes océanographiques, monopoliser un appareil comme l'IPOCAMPTM avec un ingénieur spécialisé pour les expériences d'une seule équipe est difficilement envisageable. De plus, pour réaliser des expériences complètes, il faudrait idéalement plusieurs aquariums pressurisés en parallèle.

9. Etude phylogénétique et fonctionnelle des épibiontes de *R. exoculata*.

9.1. Extraction d'acides nucléiques (ADN/ARN) et amplification (RT)-PCR.

Les ADN et ARN totaux ont été extraits respectivement à l'aide du FastDNA[®] Pro Soil direct kit et du FastRNA[®] Pro Soil direct kit (MP-Biomedicals) suivant les instructions du fabricant. Pour éliminer toutes traces d'ADN dans les extraits d'ARN, un traitement à la TURBO DNase[®] (Ambion) a été effectué et l'absence d'ADN a été contrôlée par PCR. La transcription inverse des ARN et leur amplification ont été réalisées avec le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) suivant les instructions du fabricant.

La diversité phylogénétique basée sur le gène codant l'ARNr 16S a été réalisée à l'aide des couples d'amorces universelles E8F / U1492R (par PCR) et E8F / 907R (par RT-PCR) pour les *Bacteria* (Tab.3). La présence des populations utilisant un métabolisme basé sur le soufre a été recherchée en utilisant deux couples d'amorces ciblant le gène *aprA* codant pour la sous-unité α de l'adénosine 5' phospho-sulfate réductase et le gène *soxB* codant pour un élément du complexe enzymatique d'oxydation du thiosulfate (section 3.1.3.) (Tab.3). Les populations oxydant le méthane et le méthanol ont été recherchées en utilisant respectivement le gène *pmoA* codant pour la méthane mono-oxygénase particulière et le gène *mxoA* codant pour une méthanol déshydrogénase (section 3.1.4.) (Tab.3). Les populations oxydant le fer II ont été recherchées avec le gène *rus* codant pour la rusticyanine (section 3.1.2.), ainsi que celles oxydant l'hydrogène avec le gène *hupL* (section 3.1.1.) (Tab.3). Enfin, les populations fixant le carbone inorganique ont été ciblées avec la recherche des gènes *cbbL* et *cbbM* codant respectivement pour la RubisCO forme I et II (Cycle de Calvin), ainsi que le gène *acIB* codant pour l'ATP - citrate lyase (Cycle inverse de l'acide citrique) (section 3.1.5.) (Tab.3).

Tableau 3 : amorces PCR utilisées dans cette étude.

	Désignation	Groupe ciblé	Séquence 5' - 3'	Référence
	E8F	ADNr 16S bactérien	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG	Lane <i>et al.</i> , 1991
	907R	ADNr 16S universel	CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT	
	U1492R	ADNr 16S universel	GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT	
Calvin	<i>cbbL_1bF</i>	RubisCO forme I	CAC-CTG-GAC-CAC-VGT-BTG-G	Blazejak <i>et al.</i> , 2006
	<i>cbbL_2cR</i>		CGG-TGY-ATG-TGC-AGC-AGC-ATI-CCG	
	<i>cbbM1_ElsF</i>	RubisCO forme II	ATC-ATC-AAR-CCS-AAR-CTS-GGC-CTG-CGT-CC	
	<i>cbbM2_ElsR</i>		MGA-GGT-SAC-SGC-RCC-RTG-RCC-RGC-MCG-RTG	
TCA	<i>acIB892F</i>	Sous-unité β de l'ATP-citrate lyase	TGG-ACM-ATG-GTD-GCY-GGK-GGT	Campbell <i>et al.</i> , 2003
	<i>acIB1204R</i>		ATA-GTT-KGG-SCC-ACC-TCT-TC	
Sulfure	<i>AprA-1-FW</i>	Sous-unité α de l'adénosine 5' phospho-sulfate réductase	TGG-CAG-ATC-ATG-ATY-MAY-GG	Meyer et Kuever 2007
	<i>AprA-5-RV</i>		GCG-CCA-ACY-GGR-CCR-TA	
	<i>soxB432F</i>	Composant du complexe enzymatique d'oxydation du thiosulfate	GAY-GGN-GGN-GAY-CAN-TGG	Petri <i>et al.</i> , 2001
	<i>soxB1446R</i>		CAT-GTC-NCC-NCC-RTG-YTG	
Méthane	A189F	Méthane mono-oxygénase particulière	GGN-GAC-TGG-GAC-TTC-TGG	Holmes <i>et al.</i> , 1995
	<i>mb661R</i>		CCG-GMG-CAA-CGT-CYT-TAC-C	Costello <i>et al.</i> , 1999
	<i>mxoA1003F</i>	Méthanol déshydrogénase	GCG-GCA-CCA-ACT-GGG-GCT-GGT	McDonald et Murell 1997
<i>mxoA1555R</i>	CAT-GAA-BGG-CTC-CCA-RTC-CAT		Neufeld <i>et al.</i> , 2007	
Fer	<i>Rus2 FW</i>	Rusticyanine (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>)	CGG-CAA-GAC-TGT-ACA-TGT-GG	Yarzabal <i>et al.</i> , 2003
	<i>Rus2 RV</i>		GGC-ATA-ACC-GCA-TAA-GGC-GG	
H ₂	<i>HUPLX1</i>	Hydrogénase [NiFe] du groupe 1	GAC-CCS-GTB-ACS-CGN-ATY-GAR-GG	Csaki <i>et al.</i> , 2001
	<i>HUPLW2</i>		ICA-NCC-NAG-ICA-SGG-GTC-GAA	

9.2. Clonage / Séquençage et analyse phylogénétique.

Les produits amplifiés par PCR et RT-PCR ont été purifiés sur gel avec le Qiaquick[®] Gel extraction kit (Qiagen) et le clonage s'est effectué avec le TOPO XL Cloning kit (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Les fragments d'ADN d'intérêt sont insérés et ligaturés dans des plasmides. Les plasmides sont ensuite transfectés par choc thermique dans des bactéries compétentes (TOP10, Invitrogen) cultivées à 37°C. La taille des inserts est vérifiée par PCR. L'extraction des plasmides, la purification et le séquençage des gènes d'intérêt ont été réalisés soit à la plateforme Biogenouest[®] à la station biologique de Roscoff (France), soit par GATC Biotech (Allemagne).

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences disponibles en banques de données, en utilisant le service en ligne BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), afin de déterminer approximativement leurs affiliations phylogénétiques (Altschul *et al.*, 1990a). Les séquences instables (chimères, erreurs,...) sont exclues de l'étude, les autres sont nettoyées manuellement (élimination du fragment de séquence du vecteur, vérification du sens de la séquence) avec l'éditeur de séquences EDITSEQ (DNA STAR, Etats-Unis). La qualité des séquences a été contrôlée sur les électrophorégrammes *via* le logiciel CHROMAS PRO (Technelysium Pty Ltd). L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel SEAVIEW en utilisant le programme CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le logiciel PHYLO-WIN (Galtier *et al.*, 1996) et MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2008) avec l'algorithme neighbour-joining (Saitou and Nei 1987) et la correction à deux paramètres de Kimura (Kimura 1980). L'analyse des séquences codant pour les gènes de fonction a été réalisée, après leur conversion en acides aminés, avec les mêmes logiciels et algorithme en utilisant la correction PAM. La robustesse des embranchements a été vérifiée par répétition de bootstrap (500 au minimum). Les séquences présentant plus de 97% de similarité sont regroupées dans un même OTU (Operational Taxonomic Unit). Pour vérifier l'épuisement de la diversité obtenue dans les banques de clones (ADNr 16S) sur chaque échantillon, des courbes de raréfaction ont été réalisées avec le programme DOTUR (Schloss and Handelsman 2005).

9.3. Quantification par Q-PCR des épibiontes et leurs voies métaboliques.

Pour quantifier de façon relative la communauté bactérienne et archéenne, ainsi que les voies métaboliques des épibiontes dont les gènes clés ont été obtenus préalablement, une analyse en PCR quantitative (Q-PCR) a été effectuée sur des individus provenant de trois sites mantelliens différents (Rainbow, Logachev et Ashadze). De nouvelles amorces dégénérées ont été dessinées pour les gènes *cbbM* et *acIB*, basées sur l'alignement des séquences d'ADN obtenues pour ces gènes dans cette étude (Tab.4).

Tableau 4 : amorces Q-PCR utilisées dans cette étude.

Désignation	Groupe ciblé	Séquence 5'-3'	Référence
1369F	ADNr 16S bacteria	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG	Suzuki et al., 2000
1492R	ADNr 16S bacteria	GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T	
787F	ADNr 16S archaea	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC	Yu et al., 2005
1059R	ADNr 16S archaea	GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-T	
Methane	type I 56F	AAC-GGT-ARC-RGG-CCT-TCG-GG	Mayumi et al., 2010
	type I 239R	GCT-AAT-CYR-ACR-YAG-GCT-CAT-CT	
Calvin	<i>cbbM</i> 54F	TGA-TTT-CTG-GCT-GGG-YGG-TGA-TTT	Cette étude
	<i>cbbM</i> 254R	CRG-CAT-TTT-CGC-CAA-AGG-TTT-CCA	
rTCA	<i>acIB</i> 59F	TGG-CAG-GWA-TTG-AWG-ACC-TT	Cette étude
	<i>acIB</i> 256R	ATC-TTG-GTA-RTT-TTC-AAA-KGC-TTG	
APS	AprA-1-FW AprA-5-RV	TGG-CAG-ATC-ATG-ATY-MAY-GG GCG-CCA-ACY-GGR-CCR-TA	Meyer and Kuever 2007

Toutes les réactions de Q-PCR ont été effectuées en triplicats dans un volume final de 25 µL, contenant 5 µL d'ADN (1 ng), 0.125 µL de chaque amorce (concentration final de 0.5 µM) et 12.5 µL de réactif PerfeCta® SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences). Tous les cycles ont débuté par une étape de dénaturation de l'ADN pendant 10 min à 95°C. Puis, la Q-PCR a été effectuée sur 40 cycles suivant ces étapes : 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 30 s et 95°C pendant 15 s. Une efficacité supérieure à 90% a été obtenue pour chaque Q-PCR de cette étude. Après la quantification, un clonage / séquençage de contrôle a été effectué sur chaque échantillon. Toutes les séquences obtenues correspondaient bien aux gènes ciblés. Les Q-PCR ont été effectuées sur un appareil Q-PCR Applied Biosystems 7300 et les données collectées ont été analysées en utilisant le logiciel 7300 System SDS (Applied Biosystem).

RESULTATS

Chapitre 1 :

Acquisition des épibiontes bactériens au cours du cycle de vie de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.

10. Acquisition des épibiontes bactériens au cours du cycle de vie de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.

10.1. Introduction de l'étude.

Rimicaris exoculata (Décapode Alvinocarididae) est une crevette des sources hydrothermales océaniques profondes. Sur les sites colonisés, les crevettes vivent en agrégats denses et mobiles sur les édifices hydrothermaux, avec une densité pouvant atteindre 2500 individus / m² (Segonzac 1992). Une des particularités anatomiques de *R. exoculata* est de présenter un céphalothorax hypertrophié à l'intérieur duquel se développent des communautés microbiennes épibiotiques très denses. En 1995, une première étude mettait en évidence à partir d'individus du site Snake Pit de la MAR que ces épibiontes appartenaient à un seul groupe bactérien, les *Epsilonproteobacteria* (Polz and Cavanaugh 1995). Cependant, des travaux récents ont montré la présence d'autres phylotypes tels que les *Gammaproteobacteria* qui sont couramment impliqués dans des relations symbiotiques avec des invertébrés hydrothermaux (Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011). En prenant en compte la composition du fluide hydrothermal, 4 métabolismes énergétiques bactériens sont suspectés au sein de la communauté d'épibiontes: oxydation du fer, du méthane et oxydation / réduction des composés soufrés (Zbinden *et al.*, 2008) et oxydation de l'hydrogène (Schmidt *et al.*, 2008, Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2011). Comme tous les arthropodes, la crevette *R. exoculata* mue. Elle perd la totalité de ses épibiontes du céphalothorax à chaque mue et les réacquière par la suite (durée d'un cycle de mue environ de 10 jours), conduisant à l'hypothèse d'une transmission horizontale (Corbari *et al.*, 2008).

L'objectif de cette première étude était de suivre la diversité épibiotique au cours du cycle de vie de *R. exoculata*, incluant pour la première fois les premiers stades de vie (œufs, larves et juvéniles) jusqu'aux différents stades de mue chez l'adulte. Des approches moléculaire (banques de séquences de clones du gène codant l'ARNr 16S) et microscopique (microscopie photonique, MET, MEB et FISH) ont été utilisées. Le but était de déterminer quand la première acquisition des épibiontes se produisait et également d'analyser les changements possibles dans la communauté épibiotique au cours du cycle de vie de *R. exoculata*.

10.2. Article 1: "Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*" (published at The ISME J).

Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*

Mathieu Guri¹, Lucile Durand², Valérie Cueff-Gauchard², Magali Zbinden³, Philippe Crassous², Bruce Shillito³ and Marie-Anne Cambon-Bonavita²

¹CNRS, LM2E, UMR6197, BP70, Plouzané, France; ²Ifremer, DEEP/Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, BP70, Plouzané, France and ³UMR CNRS 7138, Systématique, Adaptations et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

The caridean shrimp *Rimicaris exoculata* dominates the fauna at several Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. This shrimp has an enlarged gill chamber, harboring a dense ectosymbiotic community of chemoautotrophic bacteria associated with mineral oxide deposits. Until now, their acquisition is not fully understood. At three hydrothermal vent sites, we analyzed the epibionts diversity at different moult stages and also in the first stages of the shrimp life (eggs, hatched eggs (with larvae) and juveniles). Hatched eggs associated with young larvae were collected for the first time directly from gravid females at the Logachev vent site during the Serpentine cruise. An approach using 16S rRNA clone libraries, scanning and transmission electron microscopy, and fluorescent *in situ* hybridization was used. Molecular results and microscope observations indicated a switch in the composition of the bacterial community between early *R. exoculata* life cycle stage (egg libraries dominated by the *Gammaproteobacteria*) and later stages (juvenile/adult libraries dominated by the *Epsilonproteobacteria*). We hypothesized that the epibiotic phylotype composition could vary according to the life stage of the shrimp. Our results confirmed the occurrence of a symbiosis with *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria*, but more complex than previously assumed. We revealed the presence of active type-I methanotrophic bacteria colonizing the cephalothorax of shrimps from the Rainbow site. They were also present on the eggs from the Logachev site. This could be the first 'epibiotic' association between methanotrophic bacteria and hydrothermal vent crustacean. We discuss possible transmission pathways for epibionts linked to the shrimp life cycle.

The ISME Journal advance online publication, 13 October 2011; doi:10.1038/ismej.2011.133

Subject Category: microbe–microbe and microbe–host interactions

Keywords: symbiosis; larvae; methanotrophic symbiont; *Rimicaris exoculata*; transmission pathways

Introduction

Trophic symbioses are common in deep-sea hydrothermal ecosystems. In these environments, symbiosis between chemosynthetic bacteria and invertebrates supports a strikingly diversified fauna and significantly more biomass than in surrounding seawater (Goffredi, 2010; Ruehland and Dubilier, 2010; Bates *et al.*, 2011). One of these invertebrates is the shrimp *Rimicaris exoculata* (Williams and Rona, 1986). This crustacean, belonging to the family *Alvinocarididae*, is part of the dominant megafauna at several Mid-Atlantic Ridge (MAR) vent sites (Desbruyères *et al.*, 2001), where it forms dense and motile aggregates around the chimney walls (Segonzac, 1992; Gebruk *et al.*, 1993).

R. exoculata harbors a rich community of epibiotic bacteria on the inner side of its enlarged gill chamber (also called cephalothorax) and on its mouthparts (scaphognathites and exopodites of the first maxillipeds, both covered with abundant bacteriophage setae). These characteristics were encountered in all *R. exoculata* specimens regardless of the site (Van Dover *et al.*, 1988; Casanova *et al.*, 1993; Segonzac *et al.*, 1993; Zbinden *et al.*, 2004), highlighting a possible obligate relationship between the shrimp and its epibionts. A $\delta^{13}\text{C}$ stable isotope study showed that the predominant source of dietary carbon for the shrimp was the gill chamber epibionts (Rieley *et al.*, 1999), but the bacterial community in the shrimp gut has also been proposed as an alternative nutritional source (Polz *et al.*, 1998; Pond *et al.*, 2000; Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand *et al.*, 2010).

Recent studies have shown that the diversity of *R. exoculata* epibionts was higher than previously reported (Zbinden *et al.*, 2004, 2008; Petersen *et al.*, 2009; Hügler *et al.*, 2011). Based on *in vivo* experiments (IPOCAMP (Shillito *et al.*, 2004)),

Correspondence: M Guri, Ifremer, Centre de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEP/LM2E, UMR6197, BP70, Plouzané 29280, France.

E-mail: Mathieu.guri@gmail.com

Received 15 February 2011; revised 17 June 2011; accepted 17 August 2011

microscopic and molecular analyses, the co-occurrence of three metabolisms (iron, sulfur and methane oxidation) among gill chamber epibiont communities has been proposed (Zbinden *et al.*, 2008). Moreover the *pmoA* and *aps* genes were amplified. It was also suggested that the relative contribution of each metabolism might differ according to fluid chemical composition (Schmidt *et al.*, 2008; Zbinden *et al.*, 2008). Two filamentous epibiont phylotypes (*Gamma-proteobacteria* and *Epsilonproteobacteria*) dominated the *R. exoculata* epibiosis and the sequences clustered spatially across the different vent sites along the MAR (Petersen *et al.*, 2009). Finally, the occurrence of autotrophic carbon fixation (rTCA cycle) through sulfur and hydrogen oxidation, and sulfur reduction, was suggested on the Snake Pit site (Hügler *et al.*, 2011).

Like all arthropods, *R. exoculata* undergoes moults, which regularly eliminate the bacterial community settled on the cuticle. The moult cycle seemed to be shortened (10 days) compared with coastal shrimps (*Penaeus japonicus* (21 days), *Macrobrachium rosenbergii* (41–98 days)) (Corbari *et al.*, 2008). Briefly, the shrimps are white after moulting, turn gray or light red in the mid phase, and black or red in the late phase according to the sulfur or iron fluid concentration, respectively (Corbari *et al.*, 2008). Microscopic observations showed that a new epibiotic community started to form on free surfaces of the new cuticle within 2 days after exuviations (Corbari *et al.*, 2008).

The *R. exoculata* life cycle is still unknown. It produces lipid-rich orange eggs (Llodra *et al.*, 2000), which suggested the occurrence of planktotrophic larvae. Usually, egg size is about 300–400 µm (up to 836 eggs per female) (Tyler and Young, 1999). Gametogenic synchrony has never been observed (Tyler and Young, 1999), but a polymodal population structure for this shrimp suggested periodic recruitment (Copley *et al.*, 1998). Up to now, only very few gravid females have been collected and no larvae have ever been collected around the vent sites. Only juveniles above 1.2 cm were collected at the aggregates' periphery and are orange (Komai and Segonzac, 2008). Wax esters, fatty acids and fatty alcohols found in the juveniles indicated that they might feed for extended periods in the euphotic zone, allowing dispersion (Pond *et al.*, 1997). This was supported by genetic data that suggested high gene flow in *R. exoculata* populations (Teixeira *et al.*, 2011).

In this study, we analyzed the diversity and development of epibionts in *R. exoculata* gill chamber at different moult stages and also in the first stages of shrimp life (eggs, hatched eggs and 2-cm juveniles). An approach using 16S rRNA clone libraries, transmission and scanning electron microscopy (TEM/SEM) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used. Our aims were to examine when the first acquisition of epibionts occurs and to determine whether the epibiont community differs between early life stages and adults, and also between moult stages.

Materials and methods

Collection/selection/pretreatment

Specimens of *R. exoculata* were collected at several hydrothermal vents sites along the MAR: at Logachev (14°45'N; 44°57'W; 3037 m depth) and Ashadze (12°58'N; 44°51'W; 4088 m depth) during the Serpentine cruise (March 2007), and at Rainbow (36°13'N; 33°54'W; 2350 m depth) during the MoMARDREAM-Naut cruise (June 2007). Shrimps were collected using the suction sampler of the remotely operated vehicle 'Victor 6000' or the Nautilie operated from the R/V 'Pourquoi pas?'. Once on board, living individuals were dissected into body parts (branchiostegites (LB), scaphognathites (Sc), exopodites, gills, stomach and digestive tract). For molecular studies, animal tissues and eggs, hatched eggs (still associated with young larvae) and orange juveniles (2 cm) were directly frozen (–80 °C) and DNA extractions were performed in the laboratory. For TEM and SEM, samples were fixed as described previously (Zbinden *et al.*, 2008), as well as for FISH (Durand *et al.*, 2010). Shrimps were sorted according to moulting stages (corresponding to a color gradient: white (first stage), light red or gray (middle stage), red or black (last stage)). Only black shrimps were collected at the Ashadze site. Eggs and hatched eggs were only found at the Logachev site. Seawater near shrimp aggregates (pH 7.3 and T°C = 13 °C) was also sampled at the Rainbow site.

DNA extraction and PCR amplification

DNA from Rainbow seawater, adult LB/Sc, eggs, hatched eggs and juveniles (Sc) was extracted using the Fast DNA Pro Soil-Direct Kit (Qbiogen, Santa Ana, CA, USA) (Supplementary Table S2). Extracted DNA was then purified with Quick-Clean Spin Filters (Qbiogen). Bacterial 16S rRNA gene fragments were PCR-amplified in 30 cycles at an annealing temperature of 49 °C, using the general bacterial primer set 8F and 1492R (Lane, 1991). They were then purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Cloning and sequencing

The pooled amplified and purified PCR products were cloned using the TOPO XL Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The plasmid inserts were controlled by amplification using M13F and M13R primers. Positive clones were then cultured and treated for sequencing at the Biogenouest Platform (Roscoff, France; <http://www.sb-roscoff.fr/SG/>) on an ABI prism 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the Big-Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems).

Phylogenetic analyses

Sequences (16S rDNA) were compared to those available in databanks using the BLAST online

service (Altschul *et al.*, 1990). Unstable (for example, chimeras) and short sequences were excluded; others were cleaned manually with 'EDITSEQ' (DNA STAR, Madison, WI, USA). Sequences were aligned using the CLUSTALW program (Thompson *et al.*, 1994), further refined manually using the SEAVIEW program (Galtier *et al.*, 1996). All trees were built using PHYLO-WIN (Galtier *et al.*, 1996). Phylogenetic analyses were performed on the basis of evolutionary distance (Neighbor-Joining; (Saitou and Nei, 1987)) using the Kimura two-parameters correction matrix. The robustness of phylogenetic reconstructions was tested by bootstrap re-sampling (500) (Felsenstein, 1985). Sequences showing more than 97% similarity were considered to be sufficiently related and were grouped in the same phylotype.

The rarefaction curves and Simpson indices were performed using DOTUR (at 97% similarity) for all libraries (Schloss and Handelsman, 2005). Simpson index was calculated as follows:

$$1 - H_{\text{simpson}} = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} S_i(S_i - 1)}{N(N - 1)} \right]$$

where S_{obs} representing the number of OTUs observed, S_i the number of individuals for one OTUs and N the total number of OTUs. Good's coverage was calculated as a percentage, according to the following relation: $C = [1 - (n/N)] \times 100$, where n represented the number of phylotypes appearing only once in a library and N being the library size (Good, 1953; Ravenschlag *et al.*, 1999).

Fluorescence in situ hybridization

The FISH protocol used was described previously (Durand *et al.*, 2010). Whole LB/Sc (adult and juvenile), eggs and hatched eggs (Supplementary Table S2) were hybridized using several published probes (Table 2). The hybridization temperature was the same for all samples treated (46 °C). Observations and imaging were performed using an Apotome Axio Imager Z₂ with a COLIBRI system (Zeiss, Jena, Germany).

Scanning electron microscopy

LB/Sc, eggs and hatched eggs were dehydrated in ethanol series (30, 50, 70, 95 and 100% ethanol) and for 5 h in a critical point dryer CPD 020 (Balzers Union, Balzers, Liechtenstein). Finally, samples were gold-coated with an SCD 040 (Balzers Union). Observations and imaging were performed using a Quanta 200 MK microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) and the SCANDIUM acquisition program (Soft Imaging System, Munster, Germany).

Transmission electron microscopy

Samples were dehydrated in ethanol and propylene oxide series, and then embedded in an epoxy resin

(Serlabo, Paris, France). Semi-thin and ultra-thin sections were made using a Reichert-Jung Ultramicrotome (Ultracut R, Depew, NY, USA) with a diamond knife. Semi-thin sections were stained with toluidine blue for observations by light microscopy (using an Olympus (Tokyo, Japan) BX61 microscope). Thin sections were laid on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Observations were performed on a LEO 912 electron microscope (LEO Electron Optics GmbH, Oberkochen, Germany) equipped with a LaB6 source and operated at 80 kV.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences from this study are available through GenBank under the following accession numbers: FR797908 to FR797966 (16S rRNA sequences).

Results

Sample description

Seawater collected inside Rainbow shrimp aggregates was slightly orange. Shrimps collected at the three sites (Rainbow, Logachev and Ashadze) were sorted at different moult stages, according to their color, from white (no minerals or bacteria) to dark red or black (mineral oxide deposits). At the ultramafic Rainbow vent field, the end-member was characterized by extremely high concentrations of ferrous iron (Charlou *et al.*, 2002; Douville *et al.*, 2002), explaining the reddish color of the majority of shrimps (Zbinden *et al.*, 2004). At the Logachev vent site, there was a majority of gray/black shrimps, corresponding probably to iron sulfate deposits (Gebruk *et al.*, 1993). For Ashadze, only six black specimens were retrieved. Surprisingly, the Ashadze fauna was dominated by species usually recovered at the periphery of hydrothermal communities (*Maractis rimicarivora* and *Phyllochaetopterus* sp. nov.) (Fabri *et al.*, 2011). All the collected shrimps were alive and active when recovered from the slurp gun bowls, but the Ashadze specimens were less active than the other sites. It should be noted that Ashadze is the deepest hydrothermal site (4080 m) where *R. exoculata* has been identified.

Orange juveniles (2 cm stage-A larvae (Komai and Segonzac, 2008)) were sampled at the Rainbow and Logachev sites, in the periphery of adults but close to the aggregates (Supplementary Figure S3). For the first time, eggs and hatched eggs were collected at Logachev during the Serpentine cruise in March 2007 from females collected among the shrimp aggregates (Figures 1a and b). The eggs, orange, were at different maturity stages, from small young eggs (approximately 200 µm) to mature eggs (approximately 400 µm), with only one stage per female. The eggs were always hatched beneath the female abdomen so that only free larvae would be released into the environment. The collected larvae were just hatched eggs, probably at a zoeal stage

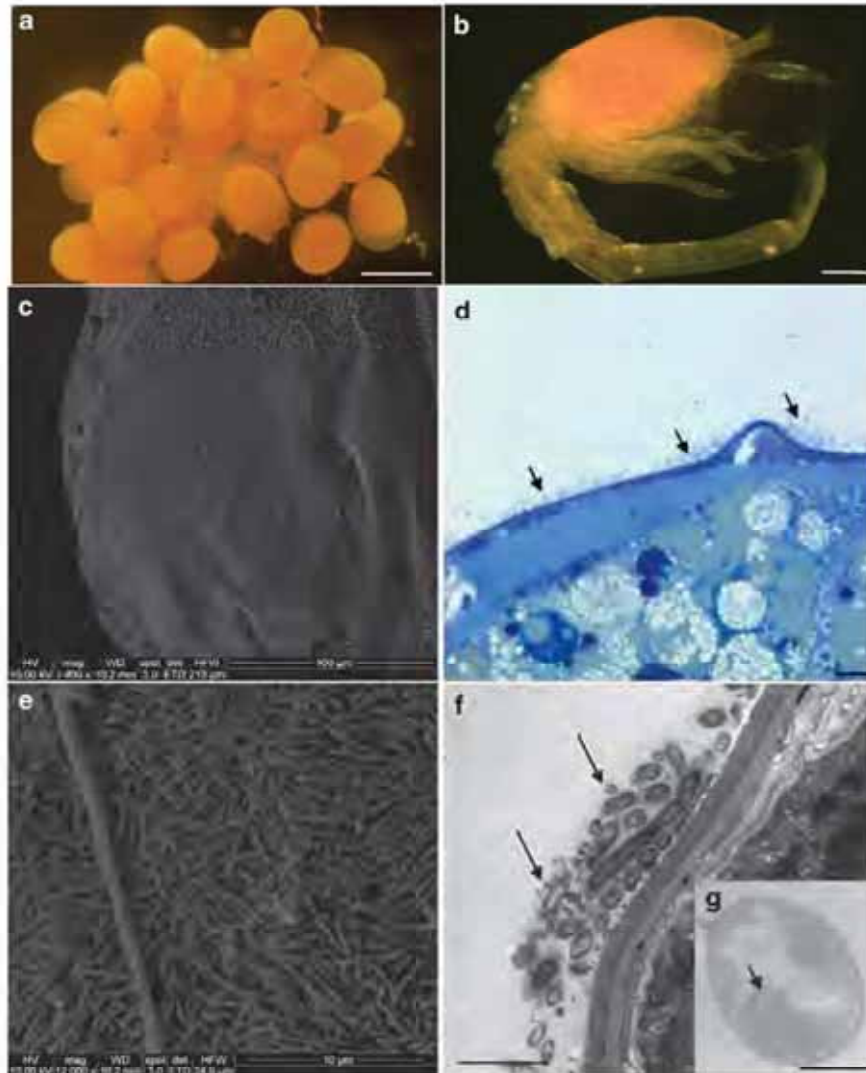


Figure 1 Microscopic observations of eggs and larvae (SEM, c and e; TEM, f and g). (a) *R. exoculata* eggs from Logachev. Scale bar = 500 μ m. (b) *R. exoculata* larvae, which just hatched from Logachev (manually separated from egg). Scale bar = 200 μ m. (c) Egg surface from Logachev covered by thin rod-shaped bacterial mat. (d) Egg thin section from Logachev, showing bacterial mat (indicated by dark arrows) on *R. exoculata* egg membrane. Scale bar = 10 μ m. (e) Magnified view of the picture in panel c, showing thin rod-shaped bacterial mat. (f) Egg thin section, showing thin rod-shaped bacteria (indicated by dark arrows) on the egg membrane. Scale bar = 2 μ m. (g) Methanotrophic-like bacteria (with intracytoplasmic membranes, indicated by a dark arrow) retrieved in the thin rod-shaped bacterial mat associated with the egg membrane. Scale bar = 500 nm.

(Figure 1b). The rostrum was absent. Eyes were present, ovoid, and seemed to be borne on short eyestalks. Orange pigmented spots were observed in the eyes. Four pairs of pereopods were visible, three of which were bifid and had three setae at their tip; the fourth was just a bud. Cephalothorax, covered by a loose carapace, contained the same orange lipid droplets observed in eggs. The abdomen was composed of five well-delimited short segments. A long terminal segment ended with two blades provided with six setae. No pleopods were observed.

Microscopic observations

Adult/juvenile gill chamber. Scanning electron microscopic observations of cephalothorax pieces

(LB, branchiostegite and Sc, scaphognathite) along the moult cycle confirmed the different epibiont morphologies (for example, rod-shaped, thin and thick long filaments) observed before (Zbinden *et al.*, 2008). Their development seemed to follow a chronological order along the moult cycle: rod-shaped bacterial mat, followed by long filamentous bacteria, as described previously (Corbari *et al.*, 2008). These morphologies were observed at all sites studied (Rainbow, Logachev and Ashadze). FISH observations of LB and Sc along the moult cycle, whatever the hydrothermal site, indicated the predominance of *Epsilonproteobacteria* with thick and thin filamentous morphologies (Figures 2a and b). This was congruent with molecular studies (Table 1) (Polz and Cavanaugh, 1995; Zbinden *et al.*, 2008;

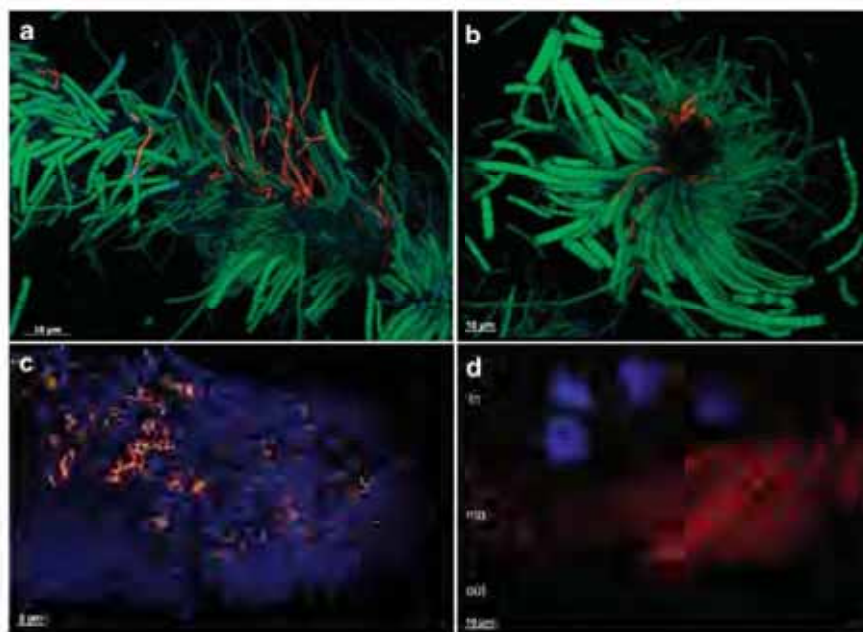


Figure 2 FISH. (a) Longitudinal view of Scaphognathite setae from Logachev black moult shrimp with epibionts. *Gammaproteobacteria* (red) were hybridized with a GAM42a probe and *Epsilonproteobacteria* (green) were hybridized by an EPSY549 probe. (b) Transversal view of Scaphognathite setae from Logachev black moult shrimp with epibionts. *Gammaproteobacteria* (red) were hybridized with a GAM42a probe and *Epsilonproteobacteria* (green) were hybridized by an EPSY549 probe. (c) Longitudinal view of Scaphognathite setae from Rainbow red moult shrimp with epibionts. The methanotrophic Gamma symbionts (orange) were hybridized with both LB132/130 and GAM42a probes. DAPI staining is shown in blue. (d) Egg membrane (mb) with epibionts, egg content (in) and outer environment (out). *Gammaproteobacteria* (red) were hybridized with a GAM42a probe. DAPI staining is shown in blue, showing eukaryotic nucleus of the egg.

Table 1 Clone library results (based on partial 16S rRNA sequences)

Phylogenetics groups	Logachev					Rainbow				Ashadze	Total	
	Eggs	Hatched eggs	Juvenile	White moult	Gray moult	Black moult	White moult	Light Red moult	Red moult*	Hydrothermal fluid		Black moult
<i>Alphaproteobacteria</i>	3	2					2	1	3			11
<i>Betaproteobacteria</i>							4	1				5
<i>Gammaproteobacteria</i>	53	30	1	15		10	10	1	25	5		126
<i>Deltaproteobacteria</i>	1	2	3			21			3	1		46
<i>Epsilonproteobacteria</i>	6	3	50	71	84	83	38	67	45	54	95	596
<i>Bacteroidetes</i>	4	7	7	1		3	5	1		4	1	33
Total	67	44	61	87	84	108	59	71	76	64	96	817

The main phylogenetic group per sample is shown in bold (*by Zbinden et al., 2008).

Petersen et al., 2009; Hügler et al., 2011). *Gammaproteobacteria* signals were also detected to a lesser extent, and were related exclusively to some thin filamentous morphologies (Figures 2a and b), confirming previous results (Petersen et al., 2009; Hügler et al., 2011). Type-I methanotrophic *Gammaproteobacteria* morphologies were observed by TEM (Zbinden et al., 2008). For the first time we confirmed it with the typical circular positive FISH signal (Duperron et al., 2005) using both the GAM42a probe and the LB132/130 probe (Table 2 and Figure 2c). At the Rainbow site, these methanotrophic-like bacteria were clearly at the basis of long filaments affiliated to *Epsilonproteobacteria*,

directly fixed on the *R. exoculata* tissues (LB and Sc) (Supplementary Figure S1). This specific localization seemed to confirm that the type-I methanotrophic *Gammaproteobacteria* were not opportunistic. This morphology was observed only to be associated with Rainbow juveniles and adults, whatever the moult stage. The other phylogenetic groups (Table 1) were not detected in the gill chamber (using FISH analyses; Table 2).

Eggs. Scanning electron microscopic and semi-thin observations showed the presence of a mat of thin rod-shaped bacteria (around 2.5 µm length and 0.3 µm diameter) settled on the egg surface for the



Table 2 Fluorescent probes (the probes sequences have been compared by BLAST to our sequences to check their specificity and determine their mismatches)

Specificity	Probe name	Sequence (5'-3')	Fluorescent dye	% Formamide	References
Archaea	Arch915	GTGCTCCCCCGCAATTCCT	Cy3	10-20-30	Stahl and Amann (1991)
Eubacteria	Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Cy3 or Cy5 or ATTO488	10-20-30-40	Amann et al. (1990)
Alphaproteobacteria	ALF968	GGTAAGGTTTCGCGCGTT	Cy3	10-20-30-40	Manz et al. (1992)
Betaproteobacteria	BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	Cy3	10-20-30-40	Manz et al. (1992)
Deltaproteobacteria	DELTA495b	AGTTAGCCGGCGCTTCT	Cy3	10-20-30-40	Loy et al. (2002)
Gammaproteobacteria	GAM42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	Cy3	10-20-30-40	Manz et al. (1992)
Epsilonproteobacteria	EPSY549	CAGTGATCCGAGTAAACG	Cy3	20-30	Lin et al. (2006)
Bacteroidetes	CF319	TGGTCCGTGTCTGAGTAC	ATTO488	10-20-30-40	Manz et al. (1996)
Gammaproteobacteria <i>R. exoculata</i> cephalothoracic clones	LB132/130	TCCTGGCTATCCCCACTAC	ATTO488	10-20-30	Durand et al. (2010)

majority of eggs observed (Figures 1c–e). This microbial mat hybridized only with the GAM42a probe, but no methanotrophic-like bacteria were revealed by FISH analyses (Figure 2d). TEM observations confirmed the presence of bacteria embedded in a mucus covering the eggs (Figure 1f) and some had intracytoplasmic membranes like type I methanotroph (Figure 1g). They were smaller (1 μm) than the one observed on the Rainbow adult shrimps (2 μm). No bacteria were observed inside the eggs (TEM and FISH).

Larvae. Larvae used in this study had just hatched (Figure 1b) and were still associated to their egg (Figures 1a and 4). Scanning electron microscopic and FISH observations showed no obvious bacterial mats on the larvae itself, but only single cells. No bacteria were observed inside the larvae gill chamber (TEM and FISH). Molecular surveys were therefore not undertaken on larvae alone but on larvae and its egg (hatched egg).

Bacterial diversity (16S rRNA) along the R. exoculata life cycle

Diversity studies using PCR amplification and cloning are known to underestimate genetic diversity because of faster amplification of some sequences and bias both in amplification and cloning (Qiu et al., 2001). Moreover, sampling methods introduce additional biases (Bent and Forney, 2008). The clone libraries obtained in this study can therefore be considered only partially quantitative. As all experiments were performed using the same protocols, they can nevertheless be compared. Moreover FISH analyses confirmed libraries' diversity. Phylogenetic diversity along the *R. exoculata* life cycle was completed by using rarefaction analyses and diversity indices (Supplementary Figure S2 and Supplementary Table S1). A total of 11 bacterial 16S rRNA gene clone libraries were analyzed, corresponding to 817 clone sequences (Table 1). *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* dominated all the clone libraries (Table 1). This was consistent with recent studies (Zbinden

et al., 2008; Petersen et al., 2009; Hügler et al., 2011). *Deltaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes* were poorly represented (Table 1), confirmed by absence of FISH signal. These sequences might represent opportunistic microorganisms embedded in the mat covering the appendages. Nevertheless, a recent Snake Pit site study showing recovery of one deltaproteobacterial phylotype in high frequency suggested that it might have a role in the epibiotic community (Hügler et al., 2011). The clone diversity coverage (Good's coverage) was high for all clone libraries, with an average of 93% (± 5) (Supplementary Table S1), and rarefaction curves showed that the clone libraries correctly described the epibiotic communities, excepted for the hatched eggs library (Supplementary Figure S2).

In this study, *Epsilonproteobacteria* sequences were overwhelmingly related to sequences usually retrieved from hydrothermal invertebrates (for example, *Cryosmallon squamiferum* (Goffredi et al., 2004); *Alvinocaris longirostris* (Tokuda et al., 2008); *Shinkaia crosnieri* (unpublished); *Rimicaris exoculata* gut (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003) and gill chamber (Polz and Cavanaugh, 1995; Zbinden et al., 2008; Petersen et al., 2009)) and also to the MAR environment (Lost City (Brazelton et al., 2006); Rainbow (Lopez-Garcia et al., 2003); Snake Pit (unpublished)) (Figures 3a and b, and Supplementary Table S3). The main nine *Epsilonproteobacteria* clusters fell within the 'hydrothermal invertebrates-associated epibionts' group (Marine Group-1) (Figure 3a). The closest cultivated relative was *Sulfurovum lithotrophicum*, a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a hydrothermal vent in the mid-Okinawa Trough (Inagaki et al., 2004) (94% similarity with *R. exoculata* RBR (AM412509)) (Figure 3b). Other *Epsilonproteobacteria* sequences were affiliated to known genera: *Sulfurimonas*, *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Sulfospirillum* (Figure 3a). The three latter genera belong to the *Campylobacteraceae* family are known to show important metabolic diversity (including sulfur-oxidizing and reducing bacteria). The closest *Sulfurimonas* species, *Thiomicrospira denitrificans*

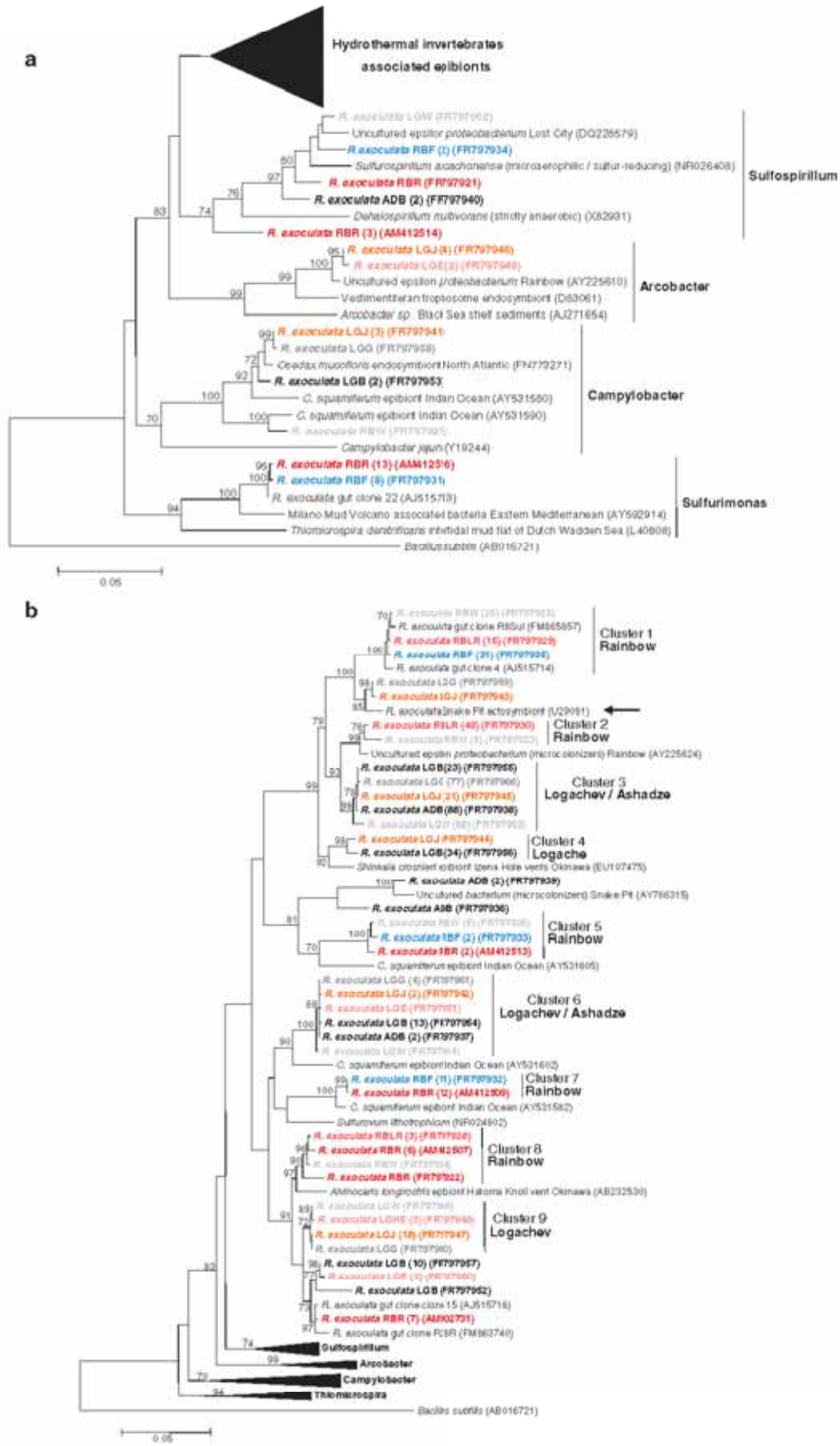


Figure 3 (continued)

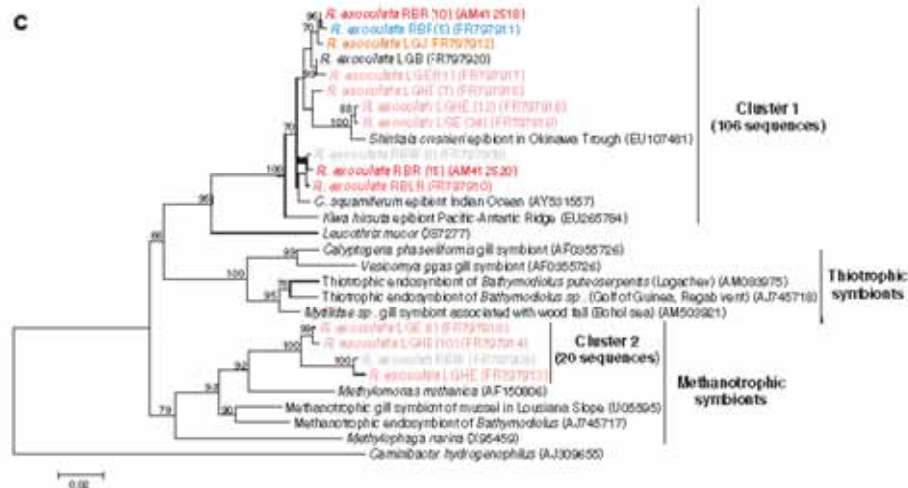


Figure 3 16S rRNA phylogeny of the *Epsilonproteobacteria* (a, b; calculated on 817 bp) and *Gammaproteobacteria* (c; calculated on 804 bp) associated with the *R. exoculata* gill chamber. Robustness was tested using 500 bootstraps re-sampling of the tree calculated by using the Neighbor-Joining algorithm, using the Kimura two-parameter correction matrix (only bootstrap values over 70 are shown). Sequences names have been resumed as follows: AD, LG or RB for Ashadze, Logachev or Rainbow specimens, respectively, and E, HE, J, W, G, B, LR, R and F for Eggs, Hatched Eggs, Juvenile, White moult, Gray moult, Black moult, Light Red moult, Red moult and Fluid, respectively, and finally the numbers in parentheses refer to the number assigned to each individual. Our clones are shown in color. (a) Global tree representing the *R. exoculata* epsilon symbiont and their close relatives. (b) Secondary tree showing the 'Hydrothermal invertebrate-associated epibionts' (Marine Group-1) (see Figure 3a). The black arrow indicates the first *R. exoculata* epibiont sequence discovered in the Snake Pit site. (c) 16S rRNA phylogeny of the *Gammaproteobacteria* associated with the *R. exoculata* gill chamber.

(Figure 3a, 89% similarity with *R. exoculata* RBR (AM412516)), is an obligate chemolithotroph oxidizing sulfide and thiosulfate, and is also a denitrifier (Muyzer *et al.*, 1995). The Logachev and Ashadze *Epsilonproteobacteria*-related sequences clustered together (Figure 3b, clusters 3 and 6) but not with the Rainbow sequences (Figure 3b, clusters 1, 2, 5, 7 and 8). Phylogenetic analyses showed that the same epibiont sequences were retrieved all along the shrimp life cycle, from eggs to adult on Logachev (Figure 3b, clusters 6 and 9). At the Rainbow site, some seawater sequences (*R. exoculata* RBF (FR797932)) were almost identical (99.9% similarity) to shrimp epibiont sequences (*R. exoculata* RBR (AM412509)) (Figure 3b, cluster-7).

The *Gammaproteobacteria* were mostly affiliated to bacteria associated with hydrothermal vent invertebrates (for example, *C. squamiferum* and *Kiwa hirsuta* (Goffredi *et al.*, 2004); *Shinkaia crosnieri* (unpublished); *R. exoculata* (Zbinder *et al.*, 2008)) (Figure 3c and Supplementary Table S3). The closest cultured relative to the cluster-1 *Gammaproteobacteria* epibionts (90.6% similarity) was *Leucothrix mucor* (Grabovich *et al.*, 1999), a filamentous sulfur oxidizer (Figure 3c). The closest cultivated relative to the cluster-2 *Gammaproteobacteria* epibionts (92.5% similarity) was *Methylomonas methanica* (Costello and Lidstrom, 1999), a rod-shaped methanotrophic bacterium (Figure 3c).

All adult, juvenile and seawater libraries were dominated by the *Epsilonproteobacteria*-related sequences (Table 1). *Epsilonproteobacteria* sequences dominated Logachev gray, Rainbow light red and Ashadze black moult stages libraries as compared

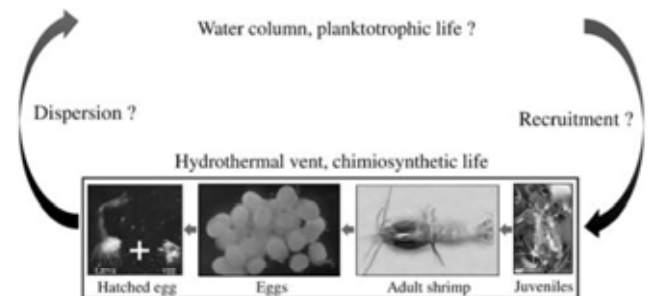


Figure 4 Partial *R. exoculata* life cycle completed by this study.

with others (Table 1). The *Gammaproteobacteria* were more represented in the Rainbow red moult library (Table 1).

Egg and hatched egg clone library distribution at Logachev was clearly different as compared with adult, juvenile and seawater libraries (Table 1). They were dominated by sequences related to the *Gammaproteobacteria* (Table 1), confirmed by FISH observations (Figure 2d). For cluster-1, most of the eggs and hatched eggs sequences were closely related (99% similarity) to a *Shinkaia crosnieri* epibiont (Figure 3c). For cluster-2, the eggs and hatched eggs sequences were closely related to *M. methanica* (Figure 4).

Discussion

Female behavior and life cycle

Until now, there was no report of *R. exoculata* females carrying eggs inside shrimp aggregates close

to the hydrothermal chimney walls at the MAR vent sites. One assumption was that gravid females were not inside the aggregates to avoid damaging the eggs (Vereshchaka *et al.*, 1998), but only few gravid shrimps have been observed around the MAR vent sites (Tyler and Young, 1999). During the Serpentine cruise, gravid *R. exoculata* females were observed and collected from aggregates at the Logachev vent chimney Irina II. For the first time hatched eggs with larvae were collected, improving the knowledge of the shrimp life cycle (Figure 4). This cruise was held earlier in the season (March) than others did (from May to November). The small size and the composition (rich in lipids) of *R. exoculata* eggs could indicate short embryonic development, with larvae hatching at an early stage and undergoing a relatively long planktotrophic period (Llodra *et al.*, 2000). *R. exoculata* could thus show seasonal reproduction, in which larvae hatch in early spring and undertake an as yet unspecified period of planktotrophic development in the water column. The lack of year-round data (absence of specimen between larvae and 1.2-cm juvenile) made it difficult to conclude on the full life cycle of this shrimp (Figure 4). All eggs on a given female were at the same maturity stage, but the stage differed from one female to another. This indicated that they were not sexually mature at the same time, and that the reproductive period would be longer than the egg development duration. Eggs were still associated with the gravid females when the hatching occurred, so only mature larvae would be released. To evaluate the egg development duration, pressured incubator (IPOCAMP) maintenance of gravid females would be necessary.

Epibiont diversity and acquisition

Some epibiont sequences were retrieved all along the shrimp life cycle (Figure 3b, clusters 6 and 9; Figure 3c, clusters 1 and 2). This result suggested a high specificity and the occurrence of an acute recognition mechanism such as in nematode ectosymbioses (Nussbaumer *et al.*, 2004). Moreover, molecular surveys indicated a bacterial community switch occurring between the first stages of the *R. exoculata* life cycle (egg and hatched egg libraries dominated by the *Gammaproteobacteria*) and later stages (juvenile/adult libraries dominated by the *Epsilonproteobacteria*) (Table 1), confirmed by FISH observations (Figures 2a and b versus d). These results reinforced the occurrence of a complex stable symbiosis in *R. exoculata* with the same *Gammaproteobacteria*- and *Epsilonproteobacteria*-related sequences, and further showed that symbiont phylotype representativeness could vary according to the life stage of the host. Observations highlighted the presence of colorless mucus-like material surrounding the eggs. Mucus could be a 'scaffolding' that provides anchorage and protection for the eggs (Davies and Viney, 1998), whereas epibionts

embedded in the mucus could have a protective role in detoxication and also against potential pathogens (for example, bacteria and fungi). This was the case for epibiotic bacteria associated with the *Homarus americanus* embryo, which produce substances inhibiting pathogenic fungi growth (Gilturmes and Fenical, 1992). Bacteria within the gill chamber could have roles such as detoxication or nutrition for the host (Zbinden *et al.*, 2004, 2008).

The Ashadze and Logachev sequences clustered together (Figure 3b, clusters 3 and 6), which might be explained by the very close proximity between these two sites (Fabri *et al.*, 2011). A recent study showed a significant correlation between genetic (16S rRNA) and geographic distances for *R. exoculata* epibionts along the MAR (Petersen *et al.*, 2009). The depth could also explain the clustering with the possible depth limit of 3000 m proposed previously (Priede *et al.*, 2006). Some *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* sequences retrieved from the Rainbow seawater sample were closely related (99% similarity) to epibiont sequences from the gill chamber of shrimps from the same site (Figure 3b, clusters 1, 5 and 7; Figure 3c, cluster-1). All of these results would indicate the existence of horizontal (environmental) transmission for the shrimp cephalothorax epibionts. Epibionts associated to egg mucus could also be a result of vertical transmission (from mother to offspring) through mucus secretion (Mira and Moran, 2002). Vertical transmission usually implies internalization of symbionts inside the egg or in oviducts (Bright and Bulgheresi, 2010). But microscopic observations (SEM, TEM and FISH) showed that (I) there were no active bacteria inside the eggs, but only associated with their outer surface (Figure 1c), and (II) no bacterial mat was observed associated with the young larvae just after hatching. The egg mucus interface probably facilitated attraction, accumulation and host recognition of epibionts for horizontal transmission. This epibiont transmission pathway is in adequacy with the large colonization of the MAR by *R. exoculata* because horizontal transmission is supposed to promote dispersal as compared with vertical transmission (Chaston and Goodrich-Blair, 2010). In terms of evolution, it was suggested that episymbiosis represents a more primitive stage than endosymbiosis (Dubilier *et al.*, 2008). The internalization of symbionts would then represent the final step of the association. Nevertheless, a recent study based on 16S rRNA analyses demonstrated that bathymodiolin epibionts were not ancestral to bathymodiolin endosymbionts (Duperron *et al.*, 2009a,b). These authors suggested that the location of symbionts was not always a conserved trait and that both the host and the symbiotic bacteria were more versatile in their ability to establish associations than assumed previously.

It should be noted that only three gravid females were used for phylogenetic studies (Supplementary

Table S2). More specimens of the first stages of the shrimp life cycle (notably free larvae at each developmental stage) are necessary for complementary analyses.

The methanotrophic metabolism hypothesis

Methanotrophic symbionts use methane as both an electron donor and a carbon source, with oxygen as the final electron acceptor. These symbionts have been described in deep-sea hydrothermal vents and cold seeps, where methane co-occurs with oxygen (Petersen and Dubilier, 2009). *In situ* observations showed that *R. exoculata* lives in the mixing zone between reduced hydrothermal fluid (containing methane at Rainbow and Logachev) and oxidized ambient seawater. Methane oxidation metabolism was suspected previously (Zbinden *et al.*, 2008). To our knowledge, all 16S rRNA sequences of methanotrophic symbionts from marine invertebrates belong to a single monophyletic lineage within the *Gammaproteobacteria* phyla related to type-I methanotrophs. These bacteria are coccoid and have a concentric stacking of intracytoplasmic membranes where the methanotrophic enzymes are located (Hanson and Hanson, 1996). These membranes probably push back the cellular material (including ribosomes) to the cell periphery, explaining the characteristic circular FISH hybridization signal (Figure 2c). In this study, we have shown using molecular and microscopic approaches the presence of active type-I methanotrophic bacteria occurring in the cephalothorax of the Rainbow specimens (Figures 2c and 3c, cluster-2) and located at the base of the filamentous bacteria (Supplementary Figure S1). This result was congruent with the fluid composition of this site, which is highly enriched in methane (Charlou *et al.*, 2002), and confirmed the result of a previous study (Zbinden *et al.*, 2008). Regarding eggs, TEM observations revealed methanotroph-shaped bacteria associated with their membrane (Figure 1g), and sequences affiliated to the methanotrophic cluster were retrieved (Figure 3c, cluster-2). According to their small size, these cells might then be dormant, which could explain the absence of a FISH signal. Logachev, like Rainbow, is enriched in methane (Schmidt *et al.*, 2007) (Supplementary Table S2). Therefore, methanotrophy might also occur at this site, but at a lower activity level. No methanotrophic-related sequence has been retrieved in the Rainbow seawater sample. This could be due to PCR bias; the low number of sequences treated; or could indicate that they were poorly present as free-living forms. Taken altogether, our results indicated the presence of methanotrophic bacteria associated with *R. exoculata* (eggs and adults) in two sites, reinforcing the symbiosis hypothesis. This could therefore be the first description of an epibiotic association between methanotrophic bacteria and hydrothermal vent crustaceans.

Conclusion

By describing the young larva just after hatching (Figure 4), we improved the knowledge of the *R. exoculata* life cycle. Nevertheless, the dispersion and recruitment of *R. exoculata* along the MAR vent sites still unknown (Figure 4). Like larval dispersion, symbiont transmission is obviously an integral factor influencing colonization efficiency (Teixeira *et al.*, 2011). Our results indicated a possible horizontal transmission for the gill chamber epibionts of *R. exoculata*, which could explain colonization along the MAR.

We have also described for the first time epibiotic communities associated with eggs and different stages from adults, and highlighted a community switch between *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria*. By coupling molecular biological and microscopic approaches we have demonstrated the occurrence of type-I methanotrophic *Gammaproteobacteria*, one of three metabolisms (iron, sulfur and methane oxidation) expected to occur in the gill chamber (Zbinden *et al.*, 2008). Our results indicated that the epibiotic community was globally conserved along the MAR. We suggest that the phylotype relative abundance and the activity of the epibionts could vary according to the shrimp life stage and the geochemical environment, reinforcing the symbiotic hypothesis. Future investigations will focus on identification (by PCR and reverse transcription-PCR) of functional genes implied in these different metabolisms. Deeper sequencing using high-throughput sequencing technologies would be useful to exhaust the diversity. Finally, more sampling in the aggregates and in the water column will be necessary to complete the shrimp life cycle, as well as incubation experiments using gravid females.

Acknowledgements

We thank Y Fouquet and F Gaill, respectively, chief scientists of the Serpentine and MoMARDREAM-Naut cruises, as well as the captain and the crew of the *Pourquoi pas?* and *Nautilé/Victor* teams. We also thank M Perennou and S Romac from the 'Plateforme Biogéochimique' for sequencing work. TEM was undertaken by the Service de Microscopie Electronique, IFR 83 de Biologie Intégrative—CNRS/Paris VI. We also thank I Probert and M Segonzac for advice and comments. This work was supported by Ifremer, CNRS, Brest Métropole Océane, GDR ECCHIS and ANR Deep Oases.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determina-

- tive, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**: 762–770.
- Bates AE, Harmer TL, Roeselers G, Cavanaugh CM. (2011). Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria hosted by a hydrothermal vent limpet (Lepetodrilidae, Vetigastropoda). *Biol Bull* **220**: 118–127.
- Bent SJ, Forney LJ. (2008). The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2**: 689–695.
- Brazelton WJ, Schrenk MO, Kelley DS, Baross JA. (2006). Methane- and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City hydrothermal field ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6257–6270.
- Bright M, Bulgheresi S. (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol* **8**: 218–230.
- Casanova B, Brunet M, Segonzac M. (1993). Impact of bacterial epibiosis on functional-morphology of shrimp associated with the Mid-Atlantic hydrothermal conditions. *Cah Biol Mar* **34**: 573–588.
- Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N. (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chem Geol* **191**: 345–359.
- Chaston J, Goodrich-Blair H. (2010). Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 41–58.
- Copley CEA, Tyler PA, Varney MS. (1998). Lipid profiles of hydrothermal vent shrimps. *Cah Biol Mar* **39**: 229–231.
- Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Gaill F, Compère P. (2008). Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat Biol* **1**: 225–238.
- Costello AM, Lidstrom ME. (1999). Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5066–5074.
- Davies JM, Viney C. (1998). Water–mucin phases: conditions for mucus liquid crystallinity. *Thermochim Acta* **315**: 39–49.
- Desbruyères D, Biscoito M, Caprais JC, Colaço A, Comtet T, Crassous P et al. (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep Sea Res I* **48**: 1325–1346.
- Douville E, Charlou JL, Oelkers EH, Bienvenu P, Colon CFJ, Donval JP et al. (2002). The Rainbow vent fluids (36°14'N, MAR): the influence of ultramafic rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chem Geol* **184**: 37–48.
- Dubilier N, Bergin C, Lott C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* **6**: 725–740.
- Duperron S, De Beer D, Zbinden M, Boetius A, Schipani V, Kahil N et al. (2009a). Molecular characterization of bacteria associated with the trophosome and the tube of *Lamellibrachia* sp., a siboglinid annelid from cold seeps in the eastern Mediterranean. *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 395–409.
- Duperron S, Lorion J, Samadi S, Gros O, Gaill F. (2009b). Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C R Biol* **332**: 298–310.
- Duperron S, Nadalig T, Caprais JC, Sibuet M, Fiala-Medioni A, Amann R et al. (2005). Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1694–1700.
- Durand L, Zbinden M, Cuffe-Gauchard V, Duperron S, Roussel EG, Shillito B et al. (2010). Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 291–303.
- Fabri MC, Bargain A, Briand P, Gebruk A, Fouquet Y, Morineaux M et al. (2011). The hydrothermal vent community of a new deep-sea field, Ashadze-1, 12°58'N on the Mid-Atlantic Ridge. *J Mar Biol Assoc UK* **91**: 1–13.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**: 543–548.
- Gebruk AV, Pimenov NV, Savvichev AS. (1993). Feeding specialization of bresilid shrimps in the TAG site hydrothermal community. *Mar Ecol Prog Ser* **98**: 247–253.
- Gilturmes MS, Fenical W. (1992). Embryos of *Homarius americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biol Bull* **182**: 105–108.
- Goffredi SK. (2010). Indigenous ectosymbiotic bacteria associated with diverse hydrothermal vent invertebrates. *Environ Microbiol Rep* **2**: 479–488.
- Goffredi SK, Waren A, Orphan VJ, Van Dover CL, Vrijenhoek RC. (2004). Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian Ocean. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3082–3090.
- Good IJ. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237–264.
- Grabovich MY, Muntyan MS, Lebedeva VY, Ustiyani VS, Dubinina GA. (1999). Lithoheterotrophic growth and electron transfer chain components of the filamentous gliding bacterium *Leucothrix mucor* DSM 2157 during oxidation of sulfur compounds. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 155–161.
- Hanson RS, Hanson TE. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* **60**: 439–471.
- Hügler M, Petersen JM, Dubilier N, Imhoff JF, Sievert SM. (2011). Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS Biol* **6**: e16018.
- Inagaki F, Takai K, Neelson KH, Horikoshi K. (2004). *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the e-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1477–1482.
- Komai T, Segonzac M. (2008). Taxonomic review of the hydrothermal vent shrimp genera *Rimicaris* Williams & Rona and *Chorocaris* Martin & Hessler (Crustacea: Decapoda: Caridea: Alvinocarididae). *J Shellfish Res* **27**: 21–41.

- Lane D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Technol Bact Syst* 1: 115–176.
- Lin X, Wakeham SG, Putnam IF, Astor YM, Scranton MI, Chistoserdov AY et al. (2006). Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 72: 2679–2690.
- Llodra ER, Tyler PA, Copley JTP. (2000). Reproductive biology of three caridean shrimp, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (Caridea: Decapoda), from hydrothermal vents. *J Mar Biol Assoc UK* 80: 473–484.
- Lopez-Garcia P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J, Moreira D. (2003). Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilon proteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* 5: 961–976.
- Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J et al. (2002). Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 68: 5064–5081.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097–1106.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15: 593–600.
- Mira A, Moran NA. (2002). Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecol* 44: 137–143.
- Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* 164: 165–172.
- Nussbaumer AD, Bright M, Baranyi C, Beisser CJ, Ott JA. (2004). Attachment mechanism in a highly specific association between ectosymbiotic bacteria and marine nematodes. *Aquat Microb Ecol* 34: 239–246.
- Petersen JM, Dubilier N. (2009). Methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Environ Microbiol* 1: 319–335.
- Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M, Dubilier N. (2009). Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous gamma- and epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ Microbiol* 12: 2204–2218.
- Polz MF, Cavanaugh CM. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7232–7236.
- Polz MF, Robinson JJ, Cavanaugh CM, Van Dover CL. (1998). Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol Oceanogr* 43: 1631–1638.
- Pond DW, Gebruk A, Southward EC, Southward AJ, Fallick AE, Bell MV et al. (2000). Unusual fatty acid composition of storage lipids in the bresilioid shrimp *Rimicaris exoculata* couples the photic zone with MAR hydrothermal vent sites. *Mar Ecol Prog Ser* 198: 171–179.
- Pond DW, Segonzac M, Bell MV, Dixon DR, Fallick AE, Sargent JR. (1997). Lipid and lipid carbon stable isotope composition of the hydrothermal vent shrimp *Mirocaris fortunata*: evidence for nutritional dependence on photosynthetically fixed carbon. *Mar Ecol Prog Ser* 157: 221–231.
- Priede IG, Froese R, Bailey DM, Bergstad OA, Collins MA, Dyb JE et al. (2006). The absence of sharks from abyssal regions of the world's oceans. *Proc Biol Sci* 273: 1435–1441.
- Qiu XY, Wu LY, Huang HS, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM et al. (2001). Evaluation of PCR-generated chimeras: mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* 67: 880–887.
- Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J, Amann R. (1999). High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 65: 3982–3989.
- Riele G, Van Dover CL, Hedrick DB, Eglinton G. (1999). Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance stable isotope approach. *Mar Biol* 133: 495–499.
- Ruehland C, Dubilier N. (2010). Gamma- and epsilon-proteobacterial ectosymbionts of a shallow-water marine worm are related to deep-sea hydrothermal vent ectosymbionts. *Environ Microbiol* 12: 2312–2326.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Schloss PD, Handelsman J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71: 1501–1506.
- Schmidt C, Le Bris N, Gaill F. (2008). Interactions of deep-sea vent invertebrates with their environment: the case of *Rimicaris exoculata*. *J Shellfish Res* 27: 79–90.
- Schmidt K, Koschinsky A, Garbe-Schönberg D, de Carvalho LM, Seifert R. (2007). Geochemistry of hydrothermal fluids from the ultramafic-hosted Logatchev hydrothermal field, 15°N on the Mid-Atlantic Ridge: temporal and spatial investigation. *Chem Geol* 242: 1–21.
- Segonzac M. (1992). The hydrothermal vent communities of Snake Pit area (Mid-Atlantic Ridge, 23°N, 3480 m)—megafaunal composition and distribution. *C R Acad Sci Paris Life Sci* 314: 593–600.
- Segonzac M, Saint-Laurent M, Casanova B. (1993). Enigma of the trophic adaptation of the shrimp Alvinocarididae in hydrothermal areas along the Mid-Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar* 34: 535–571.
- Shillito B, Le Bris N, Gaill A, Rees JF, Zal F. (2004). First access to live *Alvinella*. *High Pressure Res* 24: 169–172.
- Stahl D, Amann R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley Inc.: New York, pp 205–247.
- Teixeira S, Cambon-Bonavita MA, Serrão EA, Desbruyères D, Arnaud-Haond S. (2011). Recent population expansion and connectivity in the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* along the Mid-Atlantic Ridge. *J Biogeography* 38: 564–574.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple

- sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Tokuda G, Yamada A, Nakano K, Arita NO, Yamasaki H. (2008). Colonization of *Sulfurovum* sp on the gill surfaces of *Alvinocaris longirostris*, a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Mar Ecol* **29**: 106–114.
- Tyler PA, Young CM. (1999). Reproduction and dispersal at vents and cold seeps. *J Mar Biol Assoc UK* **79**: 193–208.
- Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S, Rona PA. (1988). Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* **98**: 209–216.
- Vereshchaka AL, Vinogradov GM, Ivanenko VN. (1998). General properties of the reproductive biology of some hydrothermal crustacea (shrimp, Amphipods, Copepods). *Doklady Biol Sci* **360**: 269–270.
- Williams AB, Rona PA. (1986). Two new caridean shrimps (Bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *J Crust Biol* **6**: 446–462.
- Zbinden M, Cambon-Bonavita MA. (2003). Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 23–30.
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F, Compère P. (2004). Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar Ecol Prog Ser* **284**: 237–251.
- Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, Villardi de Montlaur C, Roussel E, Guyot F *et al*. (2008). New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Exp Mar Biol Ecol* **359**: 131–140.

Supplementary Information accompanies the paper on The ISME Journal website (<http://www.nature.com/ismej>)

Supporting information

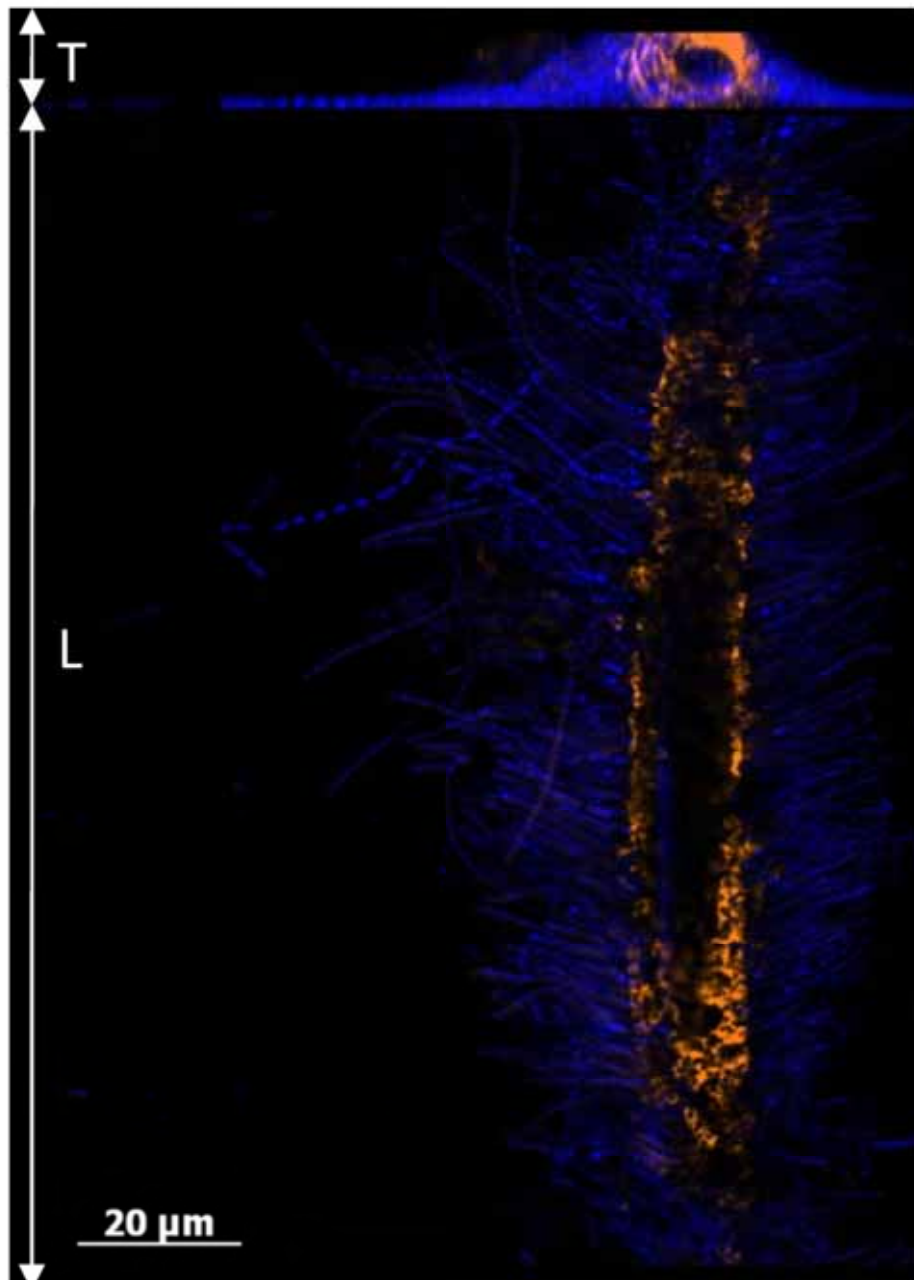


Figure S1: Longitudinal (L) and transversal (T) views of Scaphognathite setae from Rainbow shrimp with epibionts. The methanotrophic Gamma

symbiont (orange) was hybridized with both LBI32/130 and GAM42a probes. The DAPI stained are in blue.

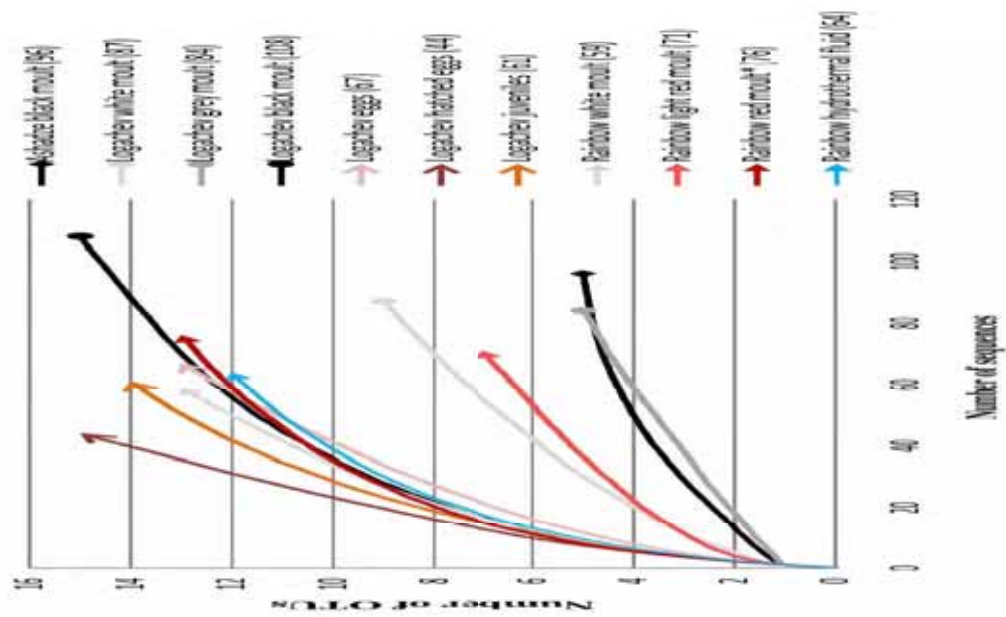


Figure S2: Rarefaction curves (*by Zbinden *et al.* 2008).



Figure S3: Picture showing the presence of *R. exoculata* orange juvenile nursery (on the bottom right hand corner) in shrimp aggregates.

Table S1: Analysis of bacterial diversity associated with *R. exoculata* (gill chamber and eggs). ¹Simpson indices values are presented as 1-H for best readability, the diversity increasing from 0 (one species) to 1 (maximal diversity). ² by Zbinden *et al.* 2008.

Library	Number of clones	OTUs number (97% similarity)	Good's coverage	1-H _{Simpson} ²
Ashadze black moult	96	5	98	0,16
Logachev eggs	67	13	82	0,71
Logachev hatched eggs	44	15	87	0,86
Logachev juvenile	61	14	93	0,82
Logachev white moult	87	9	92	0,38
Logachev grey moult	84	5	97	0,12
Logachev black moult	108	15	92	0,80
Rainbow white moult	59	13	92	0,77
Rainbow light red moult	71	7	95	0,48
Rainbow red moult ²	76	13	97	0,84
Rainbow hydrothermal fluid	64	12	95	0,77

Table S2: List of specimens and treatment.

^{*} Zbinden *et al.*, 2008.

¹Values for Rainbow are from Charlou *et al.*, 2002, for Logachev from Schmidt *et al.*, 2007, and for Ashadze from Charlou *et al.*, 2010.

This table shows the number of shrimps used by analyses.

Ultramafic Hydrothermal site	Depth (m)	Pure fluid chemistry ¹			Stage / Sampling	Number of sample per Analyzed				
		H ₂ S (mM)	H ₂ (mM)	CH ₄ (mM)		16SrRNA	FISH	SEM	TEM	Total
Rainbow (36°13'N; 33°54'W)	2350	1,2	16	2,5	<i>R. exoculata</i> orange juvenile (2 cm, stage A)	-	2	-	-	2
					<i>R. exoculata</i> adult white moult	2	3	2	-	7
					<i>R. exoculata</i> adult light red moult	2	3	2	-	7
					<i>R. exoculata</i> adult red moult	2*	3	2	1	9
					Hydrothermal fluid inside shrimp aggregates	+	-	-	-	-
Logachev (14°45'N; 44°57'W)	3037	2,5	19	3,5	<i>R. exoculata</i> gravid female (number of eggs treated)	1(20+20)	1(20+20)	1(20)	1(20)	4(120)
					<i>R. exoculata</i> gravid female with hatched eggs + larvae (number of hatched eggs + larvae)	1(20+20+20)	-	-	-	1(60)
					<i>R. exoculata</i> orange juvenile (2 cm, stage A)	2	3	2	-	7
					<i>R. exoculata</i> adult white moult	2	3	2	-	7
					<i>R. exoculata</i> adult grey moult	2	3	2	-	7
Ashadze (12°58'N; 44°51'W)	4080	1	8/19	0,5/1,2	<i>R. exoculata</i> adult black moult	2	3	2	-	7
					<i>R. exoculata</i> adult black moult	2	3	2	-	7

Tables S3: Closest match of representative 16S rRNA gene clone sequences (*by Zbinden *et al.*, 2008).

Phylogenetic group	Representative clone sequences	Hit of BLAST (accession no.)	Similarity (%)
<i>Epsilonproteobacteria</i>	RBR (AM412516)*, RBF (FR797931)	<i>R. exoculata</i> gut clone 22 (AJ515713)	99
	RBW (FR797927)	<i>C. squamiferum</i> epibiont Indian Ocean clone SFC23D7 (AY531590)	97
	LGB (FR797953), LGG (FR797958), LGJ (FR797941)	<i>Ossalex muciflorus</i> endosymbiont North Atlantic clone Omu3c42 (FN773271)	97-99
	RBF (FR797946), LGE (FR797949)	<i>Epsilonproteobacteria</i> Rainbow clone ATpp13 (AY2225610)	98
	RBR (AM412514)*	Uncultured bacterium clone FS1402B02 (AY704396)	93
	ADB (FR797940)	Uncultured bacterium clone SGYF448 (FJ792213)	96
	RBR (FR797921)*	<i>Sulfosyrillum carboxydovorens</i> strain MV (AY740528)	94
	RBF (FR797934)	<i>Epsilon-proteobacterium</i> clone ATOS Iris 7 Rainbow 26 (AJ969489)	98
	LGW (FR797962)	Uncultured bacterium clone SGYF450 (FJ792215)	96
	RBW (FR797925)	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone Rc20eps3 (FM203377)	99
	RBLR (FR797929), RBF (FR797935)	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone Rc18eps2 (FM203406)	99
	LGJ (FR797959), LGI (FR797943)	<i>Epsilon-proteobacterium</i> clone aH8 (FN562827)	99
	RBLR (FR797930)	<i>Epsilon-proteobacterium</i> Rainbow clone ATpp27 (AY2225624)	99
	RBW (FR797923)	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone Rc18E7 (FM393026)	98
	LGB (FR797955), LGG (FR797966),	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone LOG283/74F1 (FM203395)	99
	LGJ (FR797945), ADB (FR797938)	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone LOG272/65P2C1 (FM203396)	99
	LGW (FR797963)	<i>Epsilon-proteobacterium</i> clone aE8 (FN562833)	98
	LGJ (FR797944), LGB (FR797956)	Uncultured bacterium (microcolony) Snake Pit clone 3 (AY766315)	92-97
	ADB (FR797936), ADB (FR797939)	<i>R. exoculata</i> gill clone SCATI15 (AM412513)	98-99
	RBW (FR797926), RBF (FR797933)	<i>C. squamiferum</i> epibiont Indian Ocean clone SFC23F5 (AY531605)	92
	RBR (AM412513)*	<i>Ventrella sulfuris</i> associated bacteria clone e34 (FN429840)	99
	LGG (FR797961), LGJ (FR797942), LGE (FR797951),	<i>R. exoculata</i> gill clone LBI7 (AM412509)	98
	LGB (FR797954), ADB (FR797937), LGW (FR797964)	<i>C. squamiferum</i> epibiont Indian Ocean clone SFC23F4 (AY531582)	96
	RBF (FR797932)	<i>R. exoculata</i> gill clone LBI16 (AM412507)	97-98
	LBI7 (AM412509)*	<i>Epsilon-proteobacterium</i> clone bC9 (FN562855)	96
	RBLR (FR797928), RBW (FR797924)	Uncultured bacterium clone 102B111 (EF687148)	94
	RBR (AM412507)*	<i>R. exoculata</i> gut clone R28R (FM863740)	98
	RBR (FR797922)	<i>Epsilon-proteobacterium</i> clone bH8 (FN562857)	96-100
	LGW (FR797965), LGHE (FR797948),	<i>R. exoculata</i> gut clone 15 (AJ515716)	99
	LGJ (FR797947), LGG (FR797960)	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone Rc20gam1 (FM203378)	98
	LGB (FR797957), LGE (FR797950), LGB (FR797952)	<i>R. exoculata</i> gill clone LBI32 (AM412518)	99
	RBR (AM902731)*	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone LOG272/65DI (FN393024)	99
	RBR (AM412518)*	<i>R. exoculata</i> gill clone LBI32 (AM412518)	98
RBF (FR797911), LGJ (FR797912)	Uncultured bacterium clone Ba9 (FJ640825)	99	
LGB (FR797920), LGE (FR797917)	<i>R. exoculata</i> gill clone SCATI16 (AM412520)	99	
LGHE (FR797915)	Ectosymbiont of <i>R. exoculata</i> clone Rc16gam3 (FM203375)	97	
LGHE (FR797916), LGE (FR797919)	<i>Gamma-proteobacterium</i> (methane oxidizer) clone HMMVGen4 (AJ704661)	99	
RBLR (FR797909), RBLR (FR797910)	<i>Gamma-proteobacterium</i> clone IBNC12 (ABI75550)	98	
RBR (AM412520)*			
LGE (FR797918), LGHE (FR797914)			
RBW (FR797908), LGHE (FR797913)			
<i>Gammaproteobacteria</i>			

10.3. Rappel des principaux résultats et conclusion.

Les principaux résultats indiquent que la communauté épibiotique du céphalothorax chez les crevettes juvéniles et adultes, quel que soit le stade de mue, est dominée par les *Epsilonproteobacteria*, suivie des *Gammaproteobacteria*. Des séquences d'épibiontes sont retrouvées dans l'eau environnant les crevettes, conduisant à renforcer l'hypothèse d'une transmission horizontale. Cependant, pour la première fois, ont été observées des bactéries associées à la surface des œufs de *R. exoculata* appartenant en majorité à des séquences de *Gammaproteobacteria* retrouvées au niveau du céphalothorax au stade adulte. Nos résultats indiquent un changement dans la composition de la communauté bactérienne entre les premières étapes du cycle de vie de la crevette (œufs) et le stade adulte, mais surtout souligne le caractère spécifique de cette association et que la première acquisition s'effectuerait à un stade précoce chez l'hôte. Nous avons également révélé pour la première fois la présence de morphologies bactériennes fortement suspectées d'être des bactéries méthanotrophes de type I dans le céphalothorax de *R. exoculata* au stade juvénile et adulte sur Rainbow, mais également présentes sur la surface externe des œufs sur Logachev. Ceci est la première association « épibiotique » décrite entre des bactéries méthanotrophes et un crustacé hydrothermal.

Pour valider le mode de transmission, il faudrait analyser la présence d'épibiontes sur les stades larvaires pélagiques de *R. exoculata* (effort d'échantillonnage dans la colonne d'eau). Il serait également intéressant de pouvoir étudier en aquarium pressurisé (comme l'IPOCAMP™) la relation symbiotique dans les premiers stades de développement de l'hôte en utilisant des spécimens femelles gravides (portant des œufs) vivantes. Enfin, pour évaluer la part active des épibiontes présents dans le céphalothorax et à la surface des œufs de la crevette, des études sur le transcrite de l'ADNr 16S des symbiontes bactériens par RT-PCR ont été effectuées (Chapitre 2). De plus, pour valider les différentes voies métaboliques suspectées chez les épibiontes de *R. exoculata*, des études recherchant les gènes de fonctions clés de ces voies (en PCR / RT-PCR / Q-PCR) ont été menées sur des spécimens provenant de différents sites hydrothermaux (Chapitre 2 + (Hügler *et al.*, 2011)).

Chapitre 2:

Recherche des voies métaboliques
utilisées par les épibiontes bactériens du
céphalothorax de *Rimicaris exoculata*.

11. Recherche des voies de fixation du carbone et des sources d'énergie utilisées par les épibiontes de *Rimicaris exoculata*.

11.1. Introduction de l'étude.

Rimicaris exoculata (Décapode Alvinocarididae) est une crevette des sources hydrothermales océaniques profondes. Elle a la particularité d'avoir un céphalothorax hypertrophié à l'intérieur duquel se développe une communauté bactérienne épibiotique. Plusieurs métabolismes sont suspectés coexister au sein de cette communauté : oxydation/réduction des composés soufrés (section 3.1.3.), oxydation du méthane (section 3.1.4.), du fer (section 3.1.2.), mais également de l'hydrogène (section 3.1.1). Pour le moment, toutes les études ont recherché les gènes de fonctions associés aux différents métabolismes énergétiques suspectés, ainsi que les gènes associés aux voies de fixation autotrophe du carbone (section 3.1.5.). Cette étude complète ces travaux en travaillant sur des crevettes provenant d'autres sites hydrothermaux et pour la première fois quantifie (par Q-PCR) les voies métaboliques des épibiontes. Cette étude a également été réalisée pour la première fois sur des crevettes incubées à la pression *in situ* (en aquarium pressurisé, IPOCAMP™) avec les différentes sources d'énergie suspectées être utilisées par les épibiontes. Par comparaison avec l'étude réalisée sur le cycle de vie de *R. exoculata* (chapitre 1), nous avons également recherché pour la première fois la part active des épibiontes, par RT-PCR sur le gène codant l'ARNr 16S, présents sur les œufs et sur deux stades de mues de l'hôte.

11.2. Article 2: “New insights into the carbon and energy pathways occurring among *Rimicaris exoculata* epibionts” (In prep.).

New insights into the carbon and energy metabolic pathways occurring among *Rimicaris exoculata* epibionts.

Mathieu Guri^b, Benjamin Klein^c, Perrine Cruaud^a, Lucile Durand^a, Valérie Cueff-Gauchard^a, Magali Zbinden^d, Bruce Shillito^d and Marie-Anne Cambon-Bonavita^a

^aIfremer, DEEP/ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, Technopôle Brest Iroise, BP70, Plouzané, France ; ^bCNRS, LM2E, UMR6197, BP70, Plouzané, France ; ^cUniversité de Bretagne Occidentale, LM2E, UMR6197, BP70, Plouzané, France ; ^dUMR CNRS 7138, Systématique, Adaptations et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Correspondence: Mathieu GURI

Ifremer, Centre de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

DEEP/LM2E, UMR 6197, BP 70, 29280 Plouzané, France

Tel.: +33(0)2.00.29.85.68

Fax: +33(0)2.98.22.47.57

Email: Mathieu.guri@gmail.com

Abstract:

The shrimp *Rimicaris exoculata* is a dominant species at many deep-sea hydrothermal vent sites along the Mid-Atlantic Ridge. It has an enlarged gill chamber, harboring a dense epibiont community of chemoautotrophic bacteria. In this study, we analyzed the active epibionts diversity (by RT-PCR on the 16S rRNA) on specimens at two different moult stages, as well as in the first stage of the shrimp life (eggs). A molecular survey (PCR, RT-PCR) on functional genes involved in carbon, sulfur, methane and hydrogen metabolisms on specimens from three mantellic sites was also done. For the first time, their quantification was performed by Q-PCR. Our results confirmed the occurrence of a symbiosis with an active community of *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*. Within these two groups, a majority is able of autotrophic growth by oxidizing reduced sulfur compounds. We hypothesize that this pathway is an important trophic source for the host, which could operate at a basal level supplied by the intracellular sulfur-granules observed within some epibionts. As expected, we also confirmed the activity and the relative abundance of methanotrophic *Gammaproteobacteria* epibionts associated to the shrimp only from the mantellic Rainbow and Logachev vent sites. Unlike the sulfur metabolism, the methanotrophic pathway seemed to be activated above a threshold level of methane concentration and thus could be dependent on the geochemical conditions. These results highlight that the hydrothermal geochemical conditions could influence the activity level of certain metabolic pathways within the epibiotic community.

Keywords: symbiosis / methanotrophic symbiont / functional genes / quantification / *Rimicaris exoculata*.

Introduction:

In deep sea hydrothermal vent ecosystems, symbiosis between bacteria and invertebrates appears to be a very common lifestyle form (Goffredi 2010). The vent shrimp *Rimicaris exoculata* (Williams and Rona 1986) lives in symbiosis with an epibiotic community located in the gill chamber (Van Dover *et al.*, 1988, Casanova *et al.*, 1993, Segonzac 1993, Polz and Cavanaugh 1995, Zbinden *et al.*, 2004, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Guri *et al.*, 2011). This crustacean, belonging to the family *Alvinocarididae*, is part of the dominant megafauna at several Mid-Atlantic Ridge (MAR) vent sites (Desbruyères *et al.*, 2001). It colonized basaltic-hosted sites (enriched in sulfur compounds) as well as ultramafic-hosted sites (enriched in methane and hydrogen) (Charlou *et al.*, 2002). It is particularly abundant, forming dense, motile aggregates around the chimney walls (Segonzac 1992, Gebruk *et al.*, 1993). *R. exoculata* harbours a rich community of epibiotic bacteria on the inner side of its enlarged gill chamber (also called cephalothorax) and on its mouthparts (scaphognathites and exopodites of the first maxillipeds, both covered by abundant bacteriophage setae) (Van Dover *et al.*, 1988, Casanova *et al.*, 1993, Segonzac 1993, Zbinden *et al.*, 2004). The chemoautotrophic pathway of the microbial community has been confirmed by activity measurements of the ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (RubisCO) (Galchenko *et al.*, 1989, Polz *et al.*, 1998). The stable isotopic signatures suggested that the shrimp biomass relies on chemoautotrophic bacteria for its nutrition (Polz *et al.*, 1998, Rieley *et al.*, 1999). This suggests a nutritional role for the gill chamber epibiont community. But a resident gut microbial community might also contribute to the nutrition of the shrimp (Polz *et al.*, 1998, Zbinden and Cambon-Bonavita 2003, Durand *et al.*, 2010,).

Several studies describing the gill chamber epibiotic community have been done (Polz and Cavanaugh 1995, Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Guri *et al.*, 2011), but the transfer pathways of organic matter between the epibionts and the shrimp host remains unknown. On specimens collected from the mantellic Rainbow site, based on *in vivo* experiments (IPOCAMP™ (Shillito *et al.*, 2004)) together with microscopic

and molecular (16S rRNA) analyses, the co-occurrence of three metabolic pathways (iron, sulfur and methane oxidation) among the epibionts has been proposed (Zbinden *et al.*, 2008). In this study, sequences of *pmoA* and *aprA* genes, coding respectively for the enzyme of the methanotrophic and sulfo-oxidation / reduction pathways, were PCR-amplified from *R. exoculata* epibionts DNA. Recently, a type-I methanotrophic epibiont, previously observed by TEM (Zbinden *et al.*, 2008), was clearly observed on several Rainbow shrimps through typical circular FISH hybridization signal, as well as on Logachev shrimp egg membrane using TEM (Guri *et al.*, 2011). Recent studies also highlighted the occurrence of autotrophic carbon fixation supplemented by sulfur and hydrogen oxidation on the *R. exoculata* epibiont community (Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2011).

The observed phylogenetic differences among the gill chamber epibiotic community at different vent sites could be linked to the geochemical characteristics of each hydrothermal site (Zbinden *et al.*, 2008). Specially between basaltic and mantellic site, which are clearly different in the end-members hydrothermal fluid composition (Charlou *et al.*, 2010) and also in the microbial communities (Roussel *et al.*, 2011). Microbial energetic pathways could thus also vary according to hydrothermal fluid chemistry. To address this question, a comparative study using *R. exoculata* specimens from three mantellic hydrothermal sites (Rainbow, Logachev and Ashadze) was done and compared with data obtained from the basaltic Snake Pit site (Hügler *et al.*, 2011). Then, the active epibiotic communities from Rainbow adult shrimps at different moult stages and also Logachev eggs surface, were analyzed using RT-PCR on the 16S rRNA gene.

We then used Rainbow specimens incubated in IPOCAMP™ with different putative energy sources (methane, hydrogen and sulfur) to access the active metabolic pathways. A molecular survey was done to identify functional genes implied in carbon fixation and energetic pathways (sulfur, methane and hydrogen oxidation) using both PCR and RT-PCR to identify present and active metabolic pathways. For the first time, quantification of microbial epibiont functional genes was performed using Q-PCR.

Materials and Methods

Sampling site and procedure. *R. exoculata* specimens were collected at several hydrothermal vents sites along the MAR: at Logachev (14°45'N; 44°57'W; 3037 meters depth) and Ashadze (12°58'N; 44°51'W; 4088 meters depth) during the Serpentine cruise (March 2007); at Rainbow (36°13'N; 33°54'W; 2350 meters depth) during the MoMARDREAM-Naut cruise (June 2007). Shrimps were collected using the suction sampler of the ROV 'Victor 6000' or the Nautilie operated from the RV 'Pourquoi pas ?'. Once on board, living individuals were dissected into body parts (branchiostegites (LB), scaphognathites (Sc), exopodites, gills, stomach and digestive tract). For molecular studies, animal tissues and also eggs were directly frozen (-80°C) and DNA extractions were performed at the laboratory. Shrimps were sorted according to moult stages (according to a colour gradient: white (first stage), light red or grey (middle stage), red or black (last stage)) (Corbari *et al.*, 2008, Guri *et al.*, 2011). Only black shrimps were found and collected at the Ashadze site. Eggs associated with female were only found at the Logachev site.

In vivo experiments. Living shrimps from Rainbow were incubated in a pressurized incubator (IPOCAMP™) as previously described (Durand *et al.*, 2010). The specimens (six per condition, in a total volume of 250 ml) were incubated at *in situ* pressure (230 bars), with different energy sources: sulfur (S⁰ (3 g) + NaS₂O₃ (100 µM)), iron (FeCl₂ (100 µM)), methane (CH₄, bubbling 40 s) and hydrogen (H₂, bubbling 40 s) (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, USA), during 4 hours. Live shrimps were dissected immediately after removal from the vessel and LB / Sc were stored for DNA analyses, FISH analyses and microscopic observations.

DNA extraction, primer selection and PCR amplification. Total DNA was extracted from Logachev shrimp eggs and from LB / Sc of adult shrimps at distinct moult stages: Logachev (black moult), Ashadze (black moult) and Rainbow (white moult and red moult) (Tab.S4). We also extracted DNA from the incubated Rainbow shrimps. The shrimps were dissected under sterile conditions and epibiotic community DNA was isolated using the "Genomic DNA from Soil – Nucleospin Soil® kit" (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the provided

protocol. According to the literature (Zbinden *et al.*, 2008, Hügler *et al.*, 2011,) and chemical composition of the hydrothermal fluids (Tab.S1, (Charlou *et al.*, 2010)), this study focus on the main chemoautotrophic metabolisms expected to occur within the *R. exoculata* epibiotic community (the primers used in this study are listed in Tab.1). Sulfur-based metabolism was investigated using two couples of primers specific to the adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase α -subunit gene (*aprA*) (Meyer and Kuever 2007a) and the *soxB* component of the multi-enzyme thiosulfate-oxidizing complex gene (*soxB*) (Petri *et al.*, 2001), respectively. To study methane oxidation, the primer sets A189F/mb661R targeting *pmoA* gene (Holmes *et al.*, 1995, Costello and Lidstrom 1999) and *mxoF1003F/mxoF1561R/mxoF1555R* targeting *mxoF* gene (McDonald and Murrell 1997) were used. For ferrous oxidation, *rusF/rusR* (Yarzabal *et al.*, 2003) were used. And for hydrogen oxidation, the primer sets *HUPLX1/HUPLW2* (Csáki *et al.*, 2001), targeting *hupL* gene, was employed (**in progress**). For autotrophic carbon fixation, ATP-citrate lyase gene fragment (*acIB*) was amplified using the primer set 892F/1204R (Campbell *et al.*, 2003) and forms I and II of RubisCO (D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) were also amplified using, respectively, *cbbLF/cbbLR* and *cbbMF/cbbMR* primer sets (Blazejak *et al.*, 2006). For each functional gene fragment, PCR were done in triplicate and subsequently pooled. We checked the presence of these functional genes in the epibiotic community of adult shrimps DNA from Rainbow, Logachev and Ashadze, as well as on Logachev eggs (Tab.S3).

RNA extraction and reverse transcription (RT)-PCR amplification. Total RNA was extracted from the same sample than DNA extraction (on others specimens) using the "Nucleospin[®] RNA II kit" (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the provided protocol. To digest DNA traces, the extraction products were incubated 1h at 37°C with 1XTURBO DNase[®] buffer and 18U of TURBO DNase[®] (Ambion, Foster City, U.S.A.). The digestion was stopped by adding EDTA to a final concentration of 15 mM and heating 10 min at 65°C. Then, a purification step using the RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions was done. The absence of DNA was checked by

direct PCR using the general bacterial primer set 8F/1492R (Lane 1991). RNA reverse transcriptions, followed by DNA amplification (RT-PCR) were performed using the OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). The PCR conditions were the same as those indicated in the references for each primer set with an additional reverse-transcription step (30 min at 50°C) and an initial PCR activation step (15 min at 95°C) before the standard cycles. Bacterial 16S rRNA gene fragments were amplified using primer set 8F (Lane 1991) and 907R (Lane *et al.*, 1985). For functional genes, amplifications were performed using the same primers sets as for PCR amplification (Tab.1).

Q-PCR amplification and primer design. Standard curves were done with dilutions (100 nM to 0.001 nM) of genomic DNA from pure culture of *Citricella thiooxydans*, *Methanoculleus marisnigri* and *Methylomonas methanica* for quantification of Bacteria, Archaea and Methanotroph type-I, respectively (Suzuki *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2005, Mayumi *et al.*, 2010) (primers used Tab.3). Degenerate nested primers for Q-PCR amplification of *cbbM* and *acIB* genes were designed (Tab.3) based on alignments of the DNA sequences obtained in this study (***hupL* gene in progress**). PrimaClade™ software was used for primers designing (Gadberry *et al.*, 2005) and we checked heterodimers formation by using OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy *et al.*, 2008). For *aprA* gene quantification, we used the same primers than for PCR amplification (Tab.3). For all functional genes, we used the plasmid extracted (containing targeted gene) as standard curves for Q-PCR (using QIAprep® Spin Miniprep Kit, Hilden, Germany). All Q-PCR reactions were performed in triplicates in optical 96-well reaction plate (microAmp™, Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) using a 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.). Data were collected and analyzed by the 7300 System SDS software. The Q-PCR was performed in a final volume of 25 µl with 1 ng of DNA template, 0.5 µM for each primers and 1X of PerfeCTa® SYBR®Green SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, U.S.A.) according to the manufacturer. All cycles began by a DNA denaturing step (10 min at 95°C). The Q-PCR thermocycling steps were set as follows: 15 s at 95°C, 30 s at 60°C and 15 s at 95°C during 40 cycles. The

negative control containing no DNA was subjected to the same procedure to exclude or detect any possible contamination. For all Q-PCR, the R^2 of the standard curves obtained were up to 0.997 and the reaction efficiency up to 90 %. The primers sets specificity was confirmed by the sequencing of amplification products.

Cloning and sequencing. The pooled amplified and purified PCR products were cloned using the TOPO XL Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The inserts were PCR-controlled using M13F/M13R primers followed by gel electrophoreses. Positive clones were cultured and treated for sequencing by "GATC Biotech AG" (Konstanz, Germany, www.gatc-biotech.com/fr/) using ABI 3730xl with the Dye DeoxyTM Terminator technology (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.).

Phylogenetic analyses. Sequences (16S rDNA and functional genes) were compared to those available in databanks using the BLAST online service (Altschul *et al.*, 1990). Unstable (e.g. chimeras) and short sequences were excluded; others were cleaned manually with 'EDITSEQ' (DNA STAR, Madison, WI, U.S.A). Alignments of sequences were performed using the CLUSTALW program (Thompson *et al.*, 1994), further refined manually using the SEAVIEW program (Galtier *et al.*, 1996). All trees were built using MEGA 4 software (Kumar *et al.*, 2008). Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequences were performed on the basis of evolutionary distance (Neighbor-Joining, (Saitou and Nei 1987)) with Kimura two-parameters correction matrix (Kimura 1980). Phylogenetic analyses of the functional gene were performed on amino-acid deduced sequences (with BIOEDIT 7.0.9 software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) using the same algorithm, with PAM correction. The robustness of phylogenetic reconstructions was tested by 1000 bootstrap resampling (Felsenstein 1985). Sequences exhibiting more than 97 % similarity were considered to be sufficiently related and clustered in the same Operational Taxonomic Unit (OTU).

The rarefaction curves and Simpson indices were performed using DOTUR (at 97% similarity) for 16S rRNA libraries (Schloss and Handelsman 2005). Simpson index was

$$\text{calculated as: } 1 - H_{\text{Simpson}} = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} S_i(S_i - 1)}{N(N - 1)} \right]$$

where S_{obs} representing the number of OTUs observed, S_i the number of individuals for one OTUs and N the total number of OTUs. Good's coverage was calculated as a percentage, according to the following relation $C = [1 - (n/N)] \times 100$, where n represented the number of phylotypes appearing only once in a library and N being the library size (Good 1953, Ravenschlag *et al.*, 1999). **Nucleotide sequence accession numbers.** The sequences from this study are available through GenBank database under the following accession numbers: XX.

Results

Active phylogenetic diversity of epibionts.

To determine the active epibiotic community within the cephalothorax and on the egg surface of *R. exoculata*, 16S rRNA gene clone libraries were constructed by RT-PCR (Tab.2). Three RNA clone libraries were analyzed: one from eggs (48 clones), one from white moult (38 clones) and one from red moult (48 clones). Phylogenetic diversity was completed using rarefaction analyses and diversity indices (Fig.S1, Tab.S2). Analyses of 16S rRNA gene clone libraries revealed a diverse community composed of *Epsilon*-, *Gamma*-, *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, *Zetaproteobacteria* as well as *Bacteroidetes*. In RT-PCR libraries, *Epsilonproteobacteria* constituted the major fraction of the clones for adult libraries whatever the moult stage, while *Gammaproteobacteria* dominated the egg library (Fig.2). The other groups were poorly represented, although *Bacteroidetes* appeared to be well distributed in eggs and adult white moult libraries (obtained by PCR and RT-PCR) (Fig.2).

The epsilonproteobacterial community was diverse and overwhelmingly related to sequences usually retrieved from hydrothermal invertebrates (Polz and Cavanaugh 1995,

Zbinden and Cambon-Bonavita 2003, Goffredi *et al.*, 2004, Tokuda *et al.*, 2008, Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011) (Fig.1). Most of *Epsilonproteobacteria* clone sequences obtained by RT-PCR (98%) belonged to the Marine Group 1, clustered within the *Thiovulgaceae* (Campbell *et al.*, 2006). The closest cultivated relative was *Sulfurovum lithotrophicum*, a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph (Inagaki *et al.*, 2004) (94% similarity with *R. exoculata* RBW.RT B16S37 clone sequence). Only one *Epsilonproteobacteria* sequence of egg library (LGE.RT L16S15) was affiliated to another group known to have a metabolic versatility (including sulfur-oxidizing and reducing strains): the *Campylobacter* group (Fig.1).

The *Gammaproteobacteria* were also affiliated to bacteria associated with hydrothermal vent invertebrates (Goffredi *et al.*, 2004, Zbinden *et al.*, 2008) (Fig.1). The closest cultivated relative to the cluster 1 (90%) was *Leucothrix mucor* (Grabovich *et al.*, 1999), a chemolithoheterotrophic sulfur-oxidizer (Fig.1). While the closest culture relative to the cluster 2 (92%) was *Methylomonas methanica* (Costello and Lidstrom 1999), a rod-shaped methanotrophic bacteria (Fig.1).

For the first time, we obtained sequences affiliated to the zetaproteobacterial group by RT-PCR on the epibiont community of the adult white moult stage (Fig.2). The closest cultivated relative was *Mariprofundus ferrooxydans* (Emerson *et al.*, 2007) (88% similarity), a neutrophilic chemolithotrophic bacteria which can grow by oxidizing ferrous to ferric iron.

Carbon fixation.

We constructed clone libraries for genes encoding the key enzymes of two carbon fixation pathways: RubisCO for the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle and the ATP-dependant citrate lyase for the reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle from adult specimens of Rainbow, Logachev and Ashadze and also for Logachev eggs. We retrieved 14 form-II RubisCO (*cbbM*) genes sequences for Rainbow adult red moult specimen, all affiliated to *Alphaproteobacteria* (Fig.3B). The closest cultivated relative was the nitrogen-fixing *Alphaproteobacteria Rhodobacter capsulatus* (Strnad *et al.*, 2010). No *cbbL* gene coding for

RubisCO form-I has ever been amplified. The *acIB* gene (encoding a subunit of ATP citrate lyase) was successfully amplified for the first time by RT-PCR on epibiont community from adult specimens of Rainbow (21 sequences), Logachev (9 sequences) and Ashadze (9 sequences) vent sites (Tab.S3). All *acIB* sequences belonged to a clade containing only sequences affiliated to *Epsilonproteobacteria* (Fig.3A). Moreover, the majority of *acIB* sequences clustered within the *Sulfurovum* MG1 group (Fig.3A).

Energy metabolism.

To assess the four putative energetic pathways expected to occur within the epibiotic community of *R. exoculata*, we have amplified key enzyme genes of the sulfur compounds oxidation / reduction as well as oxidation of iron, hydrogen and methane pathways (PCR and RT-PCR). These genes were amplified on specimens from the three studied sites as well as on Logachev eggs, and also on the incubated Rainbow specimens (Tab.S3). For Rainbow, Logachev and Ashadze adult libraries as well as Logachev eggs library, we successfully amplified (PCR) and sequenced the *AprA* gene coding for APS pathway (Tab.1) and also 10 transcripts of this gene (RT-PCR) for Rainbow specimens (Tab.S3). Most of *aprA* gene sequences (83%) were related to gammaproteobacterial sulfur-oxidizers (such as *Thiococcus pfennigii* (Meyer and Kuever 2007b) and *Allochromatium vinosum* (Hipp *et al.*, 1997)), whereas those related to deltaproteobacterial sulfate-reducers (such as *Desulfocapsa sulfexigens* (Friedrich 2002) and *Desulfobacterium catecholicum* (Meyer and Kuever 2007a) were poorly represented (17%) (Fig.4A). Most of *aprA* gene sequences obtained by RT-PCR (90%) were affiliated to the gammaproteobacterial sulfur-oxidizers group rather than deltaproteobacterial sulfur-reducers group (10%). All *aprA* clones sequences from Ashadze black moult library were strictly affiliated to the *Gammaproteobacteria* (Fig.4A).

Fifteen clones containing the particulate monooxygenase (*pmoA*) genes from Rainbow adult specimens were obtained and also for the first time 10 transcript sequences of this gene (RT-PCR) were obtained only from methane incubated Rainbow specimen

(Tab.S3). All *pmoA* gene sequences were related to a gammaproteobacterial cluster closely related to *Methylomonas methanica* (Costello and Lidstrom 1999). Nevertheless, no *mxoF* gene, coding for the second methanotrophic key enzyme, has been ever amplified even from the methane incubated specimen (Tab.S3). No *soxB* gene coding for the Sox pathway involved in oxidation of sulfur compounds has been amplified from the different samples, including the sulfur-incubated specimens (Tab.S3) neither *rus* gene coding for rusticyanine, a key enzyme involved in acidophilic iron-oxidation (Tab.S3). **(Data for hydrogen pathway coming soon).**

Microorganisms and metabolic pathways quantified by Q-PCR.

To determine the relative abundance of the different carbon fixation and energy metabolism pathways, we quantified by Q-PCR the functional gene sequences (amplified previously) using primers previously described and also new designed-primers (Tab.3) on the specimens from the three mantellic sites (Fig.5) (Tab.S4). For autotrophic pathways, the results showed that the *acIB* gene was presented in more copy number than the *cbbM* gene for the epibiotic community of *R. exoculata* from all vent site studied (Fig.5). The *acIB* gene (rTCA) copy number was 3.2×10^7 , 1.1×10^9 and 5.7×10^8 copies per nanogram of DNA respectively for Rainbow, Logachev and Ashadze specimens. Whereas the *cbbM* gene (Calvin cycle) copy number was 3.4×10^6 , 6×10^4 and 7.2×10^4 copies per nanogram of DNA respectively for Rainbow, Logachev and Ashadze specimens. For energetic metabolism, we successfully quantified the *aprA* gene (APS pathway) for all libraries analyzed (Fig.5). The *aprA* gene copy number per nanogram of DNA was 1.25×10^6 (for Logachev), 2.2×10^6 (for Ashadze) and 5.4×10^6 (for Rainbow).

Recent study showed the presence of bacterial shape with internal membranes typical of methanotrophic type-I bacteria (Zbinden *et al.*, 2008, Guri *et al.*, 2011). To confirm the presence of these bacteria in the active epibiotic community of *R. exoculata*, specific methanotrophic type-I Q-PCR primers were used (Mayumi *et al.*, 2010) (Tab.3). The results showed the quantification of methanotrophic type-I only for Rainbow and Logachev libraries,

with strikingly more copy number for Rainbow (Fig.5). Quantification of bacteria and archaea has also been performed. The bacteria copy number has the same average value for all libraries (10^{12} copies per nanogram of DNA) which was clearly more important than the archaea value. The Archaea copy number was higher for Logachev epibiotic community (3.15×10^8 copies per nanogram of DNA).

Discussion

Active epibiotic community.

All previous studies focused on the 16S rDNA obtained by PCR (Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Guri *et al.*, 2011). Here, for the first time the phylogenetic analysis was done on the 16S rRNA libraries generated from total extracted rRNA of the cephalothorax *R. exoculata* epibionts. Since metabolically active cells usually contain higher numbers of ribosomes than quiescent cells (Nomura *et al.*, 1984), a 16S rRNA library obtained by RT-PCR may be considered to reflect predominantly the diversity of the active members of the community (Nogales *et al.*, 2001). Even if few clones have been treated in this study, the results were the same as described for PCR (Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Guri *et al.*, 2011) with most of sequences related to *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria*. Moreover, the results showed few differences in the phylotypes relative proportion between PCR and RT-PCR libraries from each samples (Fig.2) (Guri *et al.*, 2011). In addition, rarefaction curves showed that the RT-PCR clone libraries correctly described the epibiotic community, excepted for the eggs library (Fig.S1). Indeed, within the *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* trees, most of RT-PCR sequences of this study were closely related to PCR sequences obtained from previous studies (ex.: Fig.1A, cluster 1, 2, 3, 5, 7 and 8; Fig.1B, cluster 1 and 2) (Guri *et al.*, 2011). This result confirmed that *Gamma*- and *Epsilonproteobacteria* epibionts present in the *R. exoculata* cephalothorax were active. Moreover, the diversity seemed to be more important in the RT-PCR white moult library than RT-PCR red moult library (Fig.2 and Fig.S1). These reinforced the fact that the

host, *R. exoculata*, probably gradually selects an efficient epibiont community during the moult cycle and get rid of free living bacteria that could be trapped in the epibiotic bacterial mat.

Further, the RT-PCR molecular survey result was in line with recent study (Guri *et al.*, 2011) (Fig.2), and confirmed a bacterial community switch between the first stages of the *R. exoculata* life cycle (PCR and RT-PCR egg libraries mostly contained *Gammaproteobacteria*, Fig.2) and latter stages (PCR and RT-PCR adult libraries mostly contained *Epsilonproteobacteria*, Fig.2). These results reinforced the occurrence of a complex stable symbiosis in *R. exoculata* with active *Gamma*- and *Epsilonproteobacteria* epibiont and confirmed that symbiont phylotypes representativeness could vary according to the life stage of the host.

Compared to a recent study (Guri *et al.*, 2011), the diversity seemed to be less important than for the PCR library especially for the RT-PCR Rainbow red moult library (Fig. S1, Tab.S2). Despite this, a new group of *proteobacteria* was detected in the cephalothorax epibiotic community from Rainbow white moult shrimp by RT-PCR: the *Zetaproteobacteria*, whose closest cultivated relative was an iron-oxidizers bacteria (*M. ferrooxydans*) (Emerson *et al.*, 2007). This result reinforced the occurrence of the iron-oxidation as a possible metabolic pathway for the epibiotic community of *R. exoculata* (Zbinden *et al.*, 2008, Schmidt *et al.*, 2009) even if no *rus* genes could be amplified. This could be due to the primers specificity to acidophilic iron-oxidizer bacteria (*A. ferrooxidans*, (Yarzabal *et al.*, 2003)) compared to the shrimp life environment rather suggested a neutrophilic iron-oxidation (Zbinden *et al.*, 2004).

Putative carbon and energy metabolisms.

To infer possible metabolisms to the different epibiotic phylotypes (16S rDNA), we used phylogenetic and quantitative results of the functional genes involved in energy metabolism and autotrophic pathways. The *ac1B* gene coding for a key enzyme involved in the rTCA cycle was detected by RT-PCR from all mantellic sites studied which underscored

this pathway activity and all the sequences were affiliated to *Epsilonproteobacteria* (Fig.4A). In addition, the relative abundance of *acIB* gene copy number from all vent sites studied (Fig.5) also confirmed the activity and the importance of this pathway among the epibiotic community of *R. exoculata*. Recent study amplified *acIB* and also *soxB* gene of *R. exoculata* epibiotic from the basaltic Snake Pit site, both affiliated to *Epsilonproteobacteria* (Hügler *et al.*, 2011). Authors suggested that *Epsilonproteobacteria* found associated with *R. exoculata* use the Sox pathway for energy production by oxidizing reduced sulfur compound and the rTCA cycle for carbon fixation (Hügler *et al.*, 2011). In this study, *soxB* gene has been amplified (PCR) from the three mantellic vent sites studied and also on sulfur-incubated specimen (Tab.S3). Nevertheless, we have not successfully cloned this gene. But, we successfully amplified a key gene coding for another sulfur pathway (APS) from all libraries: the *aprA* gene (Tab.S3) and the majority of the sequences (83%) including those obtained by RT-PCR were affiliated to *Gammaproteobacteria* (Fig.4A). The study on specimens from Snake Pit site showed that the amplified *aprA* and also *cbbM* sequences were both affiliated to *Gammaproteobacteria* and suggested that the gammaproteobacterial epibiont could grown as a chemoautotrophic sulfur-oxidizers using the CBB cycle for carbon fixation (Hügler *et al.*, 2011). In this study, we amplified and sequenced the *cbbM* gene only from Rainbow adult red moult specimen (Tab.S3) and all sequences were affiliated to *Alphaproteobacteria* (Fig.3B). The fact that no *cbbM* gene sequences were affiliated to gammaproteobacterial group could be due to the low number of sequences obtained for this gene (14 sequences). Nevertheless, the quantification of *cbbM* compared to the *acIB* gene from the three mantellic sites studied showed that the differences in the copy number ratio between them seemed to be lower for Rainbow than for Logachev and Ashadze specimens (Fig.5). This result could be directly linked to the fact that *Gammaproteobacteria* (supposed to used CBB cycle) would be more present in adult shrimp from Rainbcw than for Logachev and Ashadze (based on 16S rDNA libraries) (Guri *et al.*, 2011). These results seemed to reinforced the autotrophic hypothesis that epibiotic *Epsilonproteobacteria* used the rTCA cycle and epibiotic

Gammaproteobacteria the CBB cycle (Hügler *et al.*, 2011). No *cbbL* gene coding for the RubisCO form-I has been amplified which is possibly congruent with the fact that RubisCO form-I was used in niches with low CO₂ and high O₂ level (Badger and Bek 2008), while RubisCO form-II was activated in a high-CO₂ and low-O₂ environment, as suspected to occur within the *R. exoculata* cephalothorax (Schmidt *et al.*, 2008, Zbinden *et al.*, 2008).

Recent study highlighted the presence of methanotrophic type-I bacteria for the *R. exoculata* epibiotic community from cephalothorax of adult Rainbow (by FISH and TEM observations, (Zbinden *et al.*, 2008, Guri *et al.*, 2011) and also on the Logachev eggs surface (by TEM observations) (Guri *et al.*, 2011). These observations are in good agreement with the results of methanotrophic type-I quantification (Fig.5) that revealed their presence among the epibiotic community but only from Rainbow and Logachev, and with higher copy number for Rainbow than for Logachev specimens. Moreover, the positive retro-transcription of *pmoA* only from Rainbow specimens incubated with methane (not from other specimens), (Tab.S3, Fig.4B) indicates that methanotrophic pathway could be activated above a putative threshold of methane concentration in the environment. From soil, two forms of methane oxidation exist, qualified as high and low affinity (Conrad and Rothfuss 1991, Dunfield and Knowles 1995). Only the second form (low affinity) is used by true methanotrophic bacteria that used methane as a sole energy and carbon source (King *et al.*, 1990, Whalen *et al.*, 1990). Moreover, this oxidation appeared only at a methane concentration threshold (ranged from 11 to 40 ppm) (Conrad and Rothfuss 1991), as supposed with *R. exoculata* methanotroph epibionts. In addition, the fact that geochemical conditions could influence the activation of symbiont metabolism pathway has already been expected to occur within endosymbionts community (using methano- and thiotrophic pathways) from hydrothermal mussels (Salerno *et al.*, 2005, Duperron *et al.*, 2006). Then, this pathway could represent a secondary source of energy and also carbon fixation for the epibiotic community of *R. exoculata*. Nevertheless, no *mxhF* gene coding for the methanol dehydrogenase entering in the second step of methanotrophic pathway has ever been amplified. This probably due to a problem of primers

specificity, but it could also exist an undiscovered way used by *R. exoculata* methanotroph epibionts.

Together with metabolisms based on methane, iron and sulfur, a fourth pathway for hydrothermal invertebrate symbionts has been highlighted recently based on the hydrogen oxidation (Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2011). Hydrogen is already known to provide energy for chemo- and photolithoautotrophic growth of some free-living sulfur-oxidizing bacteria (Ohmura *et al.*, 2002, Imhoff *et al.*, 2005), as well as for some free-living methane-oxidizers which can also oxidize hydrogen in addition to methane (DiSpirito *et al.*, 2004). Recently, the *hupL* gene, coding for the key enzyme involved in the hydrogen oxidation has been detected in the epibiotic community of *R. exoculata* from the Rainbow site (Petersen *et al.*, 2011). This result, together with the high concentration of hydrogen in the three mantellic sites studied (Tab.S1), let us supposed that this pathway could play an important part within the epibiotic community of *R. exoculata* from these sites (**Q-PCR in progress**).

The dominance of *Epsilonproteobacteria* affiliated to MG1 recovered in the RT-PCR clone libraries (Fig.2), their abundance observed by FISH in several studies (Zbinden *et al.*, 2008, Petersen *et al.*, 2009, Hügler *et al.*, 2011, Guri *et al.*, 2011) and the high number of copy of *acIB* gene retrieved in this study (Fig.5) suggest that the rTCA cycle is active and could represented the major carbon fixation pathway among the *R. exoculata* epibiotic community, probably linked to the Sox pathway as energy source (Hügler *et al.*, 2011). The *Epsilonproteobacteria* MG1 versatile metabolism (Campbell *et al.*, 2006) is a competitive advantage for this bacterial group. Consequently, they are perfectly adapted to the gradients of sulfide and oxygen found in the hydrothermal vent environments, explaining probably their abundance as epibiont within *R. exoculata* branchial chamber. The second major epibiotic group formed by *Gammaproteobacteria* was rather linked to the CBB cycle for carbon fixation and APS pathway for energy source. Moreover, according to the vent site, a significant part of this group could be constituted by an active community of methanotrophic *Gammaproteobacteria* type-I, activated upper a threshold concentration of methane, as

suggested by the Q-PCR (Fig.5 VS Tab.S2) and RT-PCR (Fig. 4B) results. This epibiotic methanotrophic community could also have a significant role to fix carbon from methane by the ribulose monophosphate pathway. Previous data (especially microscopic observations) and those obtained in this study have been used to construct a schematic view of the metabolisms expected to occur in the epibiotic community of the *R. exoculata* branchial chamber (Fig.6) (**Results on the hydrogen pathway coming soon**).

Conclusions.

This study described for the first time the active population (RT-PCR on the 16S rRNA) and its function (PCR and RT-PCR on functional genes) among the epibiotic community in the branchial chamber of the hydrothermal shrimp *R. exoculata* from three different mantellic vent sites. The results confirmed that the epibiotic community was dominated by two active phylotypes: *Epsilonproteobacteria* followed by *Gammaproteobacteria*.

Functional studies highlighted some differences but also common trends compared to the recent work on the epibiont community from the basaltic Snake Pit site (Hügler *et al.*, 2011). The main group is the *Epsilonproteobacteria* epibionts which used the rTCA cycle for carbon fixation and probably the Sox pathway for energy source. *Gammaproteobacteria* could generate energy by oxidizing reduced sulfur compounds via the APS pathway supplying the CBB cycle to carbon fixation. These sulfur pathways could operate at a basal level, whatever the hydrothermal vent sites, supplied by the intracellular sulfur-granules observed within the epibiont community (Zbinden *et al.*, 2008) (Fig.6). As expected, we also confirmed the activity and the relative abundance of methanotrophic *Gammaproteobacteria* epibiont in the shrimp from the mantellic Rainbow and Logachev vent sites. Unlike the sulfur metabolism, the methanotrophic pathway seemed to be activated above a certain level of methane concentration and thus seems to be dependent on the geochemical conditions (Fig.6) (Tab.S2). This study constitutes a first assessment of the epibionts functional diversity quantification of *R. exoculata* from mantellic vent sites. Further studies are needed to confirm

the metabolic pathways hypothesis by coupling 16S rRNA and functional gene FISH analyses to link the different epibionts identities and their functions. The metagenomic approaches will also be performed.

Acknowledgments

The authors wish to thank Y. Fouquet and F. Gaill, respectively chief scientists of the Serpentine and MOMARDREAM-Naut cruises, as well as the captain and crew of the *Pourquoi pas?* and *Nautile / Victor* teams. We also gratefully thank H. Moussard and I. Probert for their technical help and comment. This work was supported by Ifremer, CNRS, Brest Métropole Océane, GDR ECCHIS and ANR Deep Oases.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Badger MR, Bek EJ (2008). Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1525-1541.
- Blazejak A, Kuever J, Erseus C, Amann R, Dubilier N (2006). Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (*Oligochaeta*) from Bermuda and the Bahamas. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5527-5536.
- Campbell BJ, Stein JL, Cary SC (2003). Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5070-5078.
- Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006). The versatile e-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Rev Microbiol* **4**: 458-468.
- Casanova B, Brunet M, Segonzac M (1993). Impact of bacterial epibiosis on functional-morphology of shrimp associated with the Mid-Atlantic hydrothermal conditions. *Cah Biol Mar* **34**: 573-588.
- Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14' N, MAR). *Chem Geol* **191**: 345-359.

- Charlou JL, Donval JP, Konn C, Ondréas H, Fouquet Y (2010). High production and fluxes of H₂ and CH₄ and evidence of abiotic hydrocarbon synthesis by serpentinization in ultramafic-hosted hydrothermal systems on the Mid-Atlantic Ridge. *Geophys Monogr* **188**: 265-296.
- Conrad R, Rothfuss F (1991). Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 28-32.
- Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Gaill F, Compère P (2008). Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat Biol* **1**: 225–238.
- Costello AM, Lidstrom ME (1999). Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5066–5074.
- Csáki R, Hanczár T, Bodrossy L, Murrell JC, Kovács KL (2001). Molecular characterization of structural genes coding for a membrane bound hydrogenase in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Fems Microbiology Letters* **205**: 203-207.
- Desbruyères D, Biscoito M, Caprais JC, Cdaço A, Comtet T, Crassous P *et al* (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep-Sea Res I* **48**: 1325-1346.
- DiSpirito AA, Kunz RC, Choi DW, Zahn JA (2004). in *Respiration in Archaea and Bacteria*. (ed. Zannoni, D.) Vol. 2, 149-168.
- Dunfield P, Knowles R (1995). Kinetics of Inhibition of Methane Oxidation by Nitrate, Nitrite, and Ammonium in a Humisol. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3129-3135.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP *et al* (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **8**: 1441-1447.
- Durand L, Zbinden M, Cueff-Gauchard V, Duperron S, Roussel EG, Shillito B *et al* (2010). Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 291-303.
- Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C *et al* (2007). A Novel Lineage of *Proteobacteria* Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *Plos One* **2**.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Friedrich MW (2002). Phylogenetic Analysis Reveals Multiple Lateral Transfers of Adenosine-5'-Phosphosulfate Reductase Genes among Sulfate-Reducing Microorganisms. *J Bacteriol* **184**: 278-289.
- Gadberry MD, Malcomber ST, Doust AN, Kellogg EA (2005). Primaclade—a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* **21**: 1263-1264.

Galchenko VF, Pimenov NV, Lein AI, Galkin SV, Moskalev LI, Ivanov MV (1989). Autotrophic CO₂-assimilation in tissues of prawn *Rimicaris exoculata* from the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal area. *Doklady Akademii Nauk Sssr* **308**: 1478-1481.

Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**: 543-548.

Gebruk AV, Pimenov NV, Savvichev AS (1993). Feeding specialization of bresilid shrimps in the TAG site hydrothermal community. *Mar Ecol Prog Ser* **98**: 247-253.

Goffredi SK, Waren A, Orphan VJ, Van Dover CL, Vrijenhoek RC (2004). Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian Ocean. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3082-3090.

Goffredi SK (2010). Indigenous ectosymbiotic bacteria associated with diverse hydrothermal vent invertebrates. *Environ Microbiol Reports* **2**: 479-488.

Good IJ (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.

Grabovich MY, Muntyan MS, Lebedeva VY, Ustiyani VS, Dubinina GA (1999). Lithoheterotrophic growth and electron transfer chain components of the filamentous gliding bacterium *Leucothrix mucor* DSM 2157 during oxidation of sulfur compounds. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 155-161.

Guri M, Durand L, Cuff-Gauchard V, Zbinden M, Crassous P, Shillito B *et al* (2011). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J* **in press**.

Hipp WM, Pott AS, Thum-Schmitz N, Faath I, Dahl C, Trüper HG (1997). Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* **143**: 2891-2902.

Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC (1995). Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett* **132**: 203-208.

Hügler M, Petersen JM, Dubilier N, Imhoff JF, Sievert SM (2011). Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS Biol* (*in press*).

Imhoff JF, Hiraishi A, J. S (2005). in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (eds Brenner, D.J. *et al.*) Vol.2, part A, 119-132

Inagaki F, Takai K, Nealson KH, Horikoshi K (2004). *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the e-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1477-1482.

Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *J Mol Evol* **16**: 111-120.

King GM, Roslev P, Skovgaard H (1990). Distribution and Rate of Methane Oxidation in Sediments of the Florida Everglades. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2902-2911.

- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**: 299-306.
- Lane D (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techn Bact Syst* **1**: 115-176.
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6955-6959.
- Mayumi D, Yoshimoto T, Uchiyama H, Nomura N, Nakajima-Kambe T (2010). Seasonal Change in Methanotrophic Diversity and Populations in a Rice Field Soil Assessed by DNA-Stable Isotope Probing and Quantitative Real-Time PCR. *Microbes and Environments* **25**: 156-163.
- McDonald IR, Murrell JC (1997). The Methanol Dehydrogenase Structural Gene *mxoF* and Its Use as a Functional Gene Probe for Methanotrophs and Methylophilic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3218-3224.
- Meyer B, Kuever J (2007a). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-2044.
- Meyer B, Kuever J (2007b). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfuroxidizing prokaryotes. *Microbiology* **153**: 3478-3498.
- Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rcsello-Mora R, Amann R, Timmis KN (2001). Combined Use of 16S Ribosomal DNA and 16S rRNA To Study the Bacterial Community of Polychlorinated Biphenyl-Polluted Soil. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1874-1884.
- Nomura M, Gourse R, Baughman G (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annual Review of Biochemistry* **53**: 75-117.
- Ohmura N, Sasaki K, Matsumoto N, Saiki H (2002). Anaerobic Respiration Using Fe³⁺, S₀, and H₂ in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* **184**: 2081-2087.
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG *et al* (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research* **36**: W163-W169.
- Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita M-A, Zbinden M, Dubilier N (2009). Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous gamma- and epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ Microbiol* **12**: 2204-2218.
- Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R *et al* (2011). Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* **476**: 176-180.
- Petri R, Podgorsek L, Imhoff JF (2001). Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **197**: 171-178.
- Polz MF, Cavanaugh CM (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-7236.

- Polz MF, Robinson JJ, Cavanaugh CM, Van Dover CL (1998). Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol Oceanogr* **43**: 1631-1638.
- Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J, Amann R (1999). High Bacterial Diversity in Permanently Cold Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3982-3989.
- Rieley G, Van Dover CL, Hedrick DB, Eglinton G (1999). Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance stable isotope approach. *Mar Biol* **133**: 495-499.
- Roussel EG, Konn C, Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Querellou J *et al* (2011). Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *Fems Microbiology Ecology* **77**: 647-665.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won Y-J, McKiness Z *et al* (2005). Characterization of Symbiont Populations in Life-History Stages of Mussels From Chemosynthetic Environments. *Biol Bull* **208**: 145-155.
- Schloss PD, Handelsman J (2005). Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1501-1506.
- Schmidt C, Le Bris N, Gaill F (2008). Interactions of deep-sea vent invertebrates with their environment: The case of *Rimicaris exoculata*. *J Shellfish Res* **27**: 79-90.
- Schmidt C, Corbari L, Gaill F, Le Bris N (2009). Biotic and abiotic controls on iron oxyhydroxide formation in the gill chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Geobiol* **7**: 1-11.
- Segonzac M (1992). Les peuplements associés à l'hydrothermalisme océanique de Snake Pit (dorsale médio-Atlantique, 23°N, 3480 m): composition et microdistribution de la mégafaune. *C R Acad Sci Paris, Life Sci* **314**: 593-600.
- Segonzac M, M. de Saint-Laurent and B. Casanova (1993). L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocrididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique. *Cah Biol Mar* **34**: 535-571.
- Shillito B, Le Bris N, Gaill A, Rees JF, Zal F (2004). First access to live *Alvinella*. *High Pressure Res* **24**: 169-172.
- Strnad H, Lapidus A, Paces J, Ulbrich P, Vlcek C, Paces V *et al* (2010). Complete Genome Sequence of the Photosynthetic Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *Journal of Bacteriology* **192**: 3545-3546.
- Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000). Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605-4614.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Tokuda G, Yamada A, Nakano K, Arita NO, Yamasaki H (2008). Colonization of *Sulfurovum* sp on the gill surfaces of *Alvinocaris longirostris*, a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Mar Ecol* **29**: 106-114.

Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S, Rona PA (1988). Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* **98**: 209-216.

Whalen SC, Reeburgh WS, Sandbeck KA (1990). Rapid Methane Oxidation in a Landfill Cover Soil. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3405-3411.

Williams AB, Rona PA (1986). Two New Caridean Shrimps (Bresiliidae) from a Hydrothermal Field on the Mid-Atlantic Ridge. *J Crust Biol* **6**: 446-462.

Yarzabal A, Duquesne K, Bonnefoy V (2003). Rusticyanin gene expression of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 in sulfur- and in ferrous iron media. *Hydrometallurgy* **71**: 107-114.

Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* **89**: 670-679.

Zbinden M, Cambon-Bonavita MA (2003). Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 23-30.

Zbinden M, Le Bris N, Gaill F, Compère P (2004). Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar Ecol Prog Ser* **284**: 237-251.

Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, de Montlaur CD, Roussel E, Guyot F *et al* (2008). New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Exp Mar Biol Ecol* **359**: 131-140.

Table 1: primers used in this study.

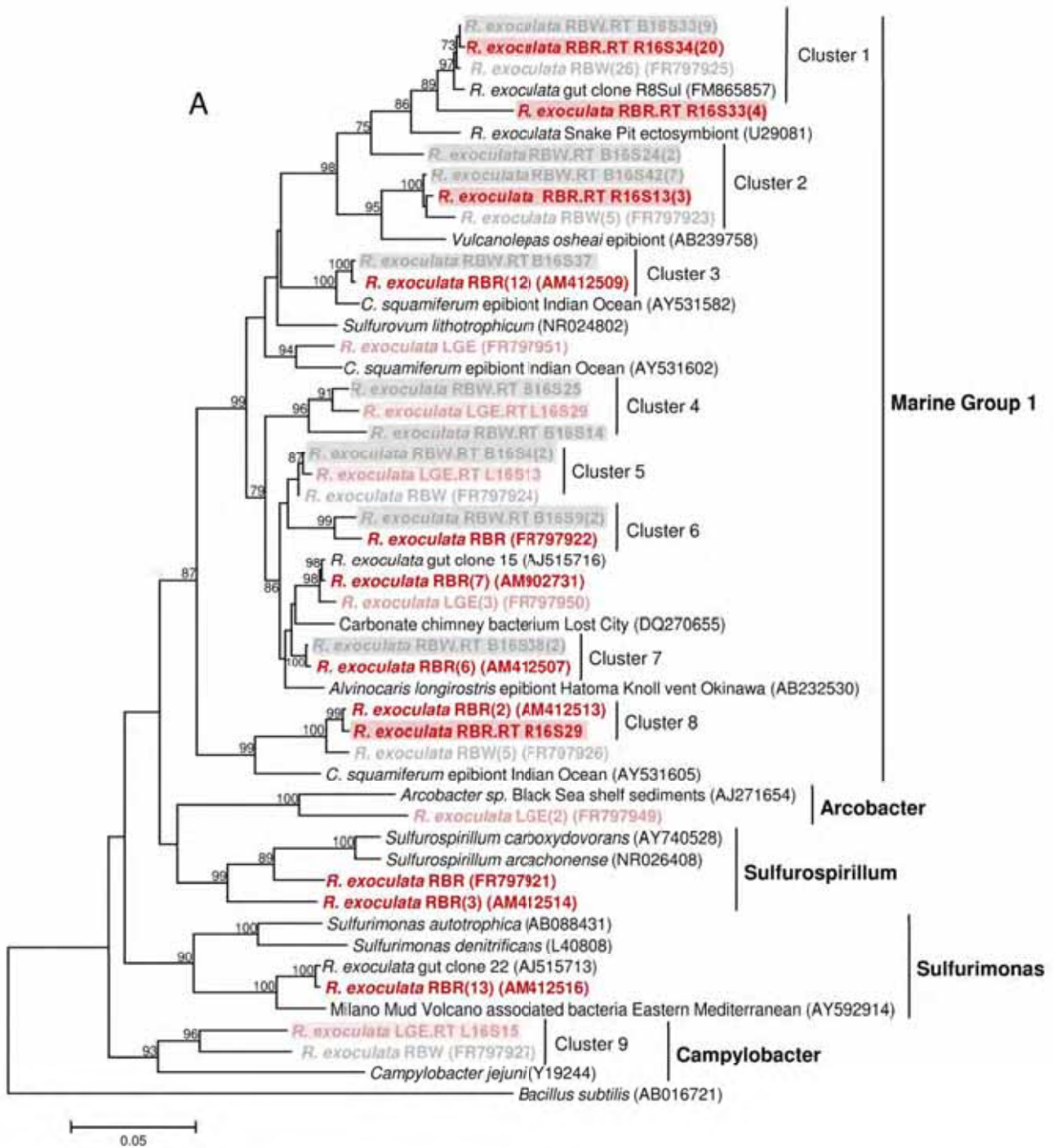
	Designation	Targeted gene	Primer sequence (5'-3')	Reference
	8F	Bacterial 16S rRNA	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG	Lane 1991
	907R	Universal 16S rRNA	CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT	Lane <i>et al.</i> , 1985
Calvin	<i>cbhL</i> _1bF	RubisCO form I	CAC-CTG-GAC-CAC-VGT-BTG-G	
	<i>cbhL</i> _2cR	RubisCO form I	CGG-TGY-ATG-TGC-AGC-AGC-ATI-CCG	
	<i>cbhM1</i> _EisF	RubisCO form II	ATC-ATC-AAR-CCS-AAR-CTS-GGC-CTG-CGT-CC	Blazejok <i>et al.</i> , 2006
	<i>cbhM2</i> _EisR	RubisCO form II	MGA-GGT-SAC-SGC-RCC-RTG-RCC-RGC-MCG-RTG MGA-GGT-GAC-SGC-RCC-GTG-RCC-RGC-MCG-RTG	
rTCA	<i>acIB</i> 892F	ATP-citrate lyase β -subunit	TGG-ACM-ATG-GTD-GCY-GGK-GGT	Campbell <i>et al.</i> , 2003
	<i>acIB</i> 1204R	ATP-citrate lyase β -subunit	ATA-GTT-KGG-SCC-ACC-TCT-TC	
Sulfur	<i>AprA-1-FW</i>	Adenosine-5'-phosphosulphate (APS) reductase α -subunit	TGG-CAG-ATC-ATG-ATY-MAY-GG	Meyer and Kuever 2007
	<i>AprA-5-RV</i>	Adenosine-5'-phosphosulphate (APS) reductase α -subunit	GCG-CCA-ACY-GGR-CCR-TA	
	<i>soxB</i> 432F	SoxB component of the periplasmic thiosulphate-oxidizing Sox enzyme complex	GAY-GGN-GGN-GAY-CAN-TGG	
	<i>soxB</i> 603F	SoxB component of the periplasmic thiosulphate-oxidizing Sox enzyme complex	ATC-GGN-CAR-GCN-TTY-CCN-TA	Petri <i>et al.</i> , 2001
	<i>soxB</i> 1164R	SoxB component of the periplasmic thiosulphate-oxidizing Sox enzyme complex	AAR-TTN-CCN-CGN-CGR-TA	
	<i>soxB</i> 1446R	SoxB component of the periplasmic thiosulphate-oxidizing Sox enzyme complex	CAT-GTC-NCC-NCC-RTG-YTG	
Methane	A189F	Particular pMMO	GGN-GAC-TGG-GAC-TTC-TGG	Holmes <i>et al.</i> , 1995
	mb661R	Particular pMMO	CCG-GMG-CAA-CGT-CYT-TAC-C	Costello <i>et al.</i> , 1999
	<i>mtaF</i> 1003F	Methanol dehydrogenase	GCG-GCA-CCA-ACT-GGG-GCT-GGT	McDonald and Mureli 1997
	<i>mtaF</i> 1561R	Methanol dehydrogenase	GGG-CAG-CAT-GAA-GGG-CTC-CC	
	<i>mtaF</i> 1555R	Methanol dehydrogenase	CAT-GAA-BGG-CTC-CCA-RTC-CAT	Neufeld <i>et al.</i> , 2007
Iron	<i>rus</i> F	Rusticyanin	GCG-CAA-GAC-TGT-ACA-TGT-GG	Yarzabal <i>et al.</i> , 2003
	<i>rus</i> R	Rusticyanin	GGC-ATA-ACC-GCA-TAA-GGC-GG	
H ₂	<i>HUPLX1</i>	[NiFe] Hydrogenase group I	GAC-CCS-GTB-ACS-CGN-ATY-GAR-GG	Csáki <i>et al.</i> , 2001
	<i>HUPLW2</i>	[NiFe] Hydrogenase group I	RCA-NGC-NAG-RCA-SGG-GTC-GAA	

Table 2: 16S rRNA gene clone library results (LGE: Logachev eggs; RBW and RBR: Rainbow white and red moults, respectively). The main phylogenetic group per sample is shown in bold (*data obtained from Guri *et al.*, 2011).

	LGE* (PCR)	LGE (RT-PCR)	RBW* (PCR)	RBW (RT-PCR)	RBR* (PCR)	RBR (RT-PCR)
<i>Alphaproteobacteria</i>	3	2	2		3	
<i>Betaproteobacteria</i>			4			
<i>Deltaproteobacteria</i>	1	2			3	
<i>Gammaproteobacteria</i>	53	29	10	5	25	18
<i>Epsilonproteobacteria</i>	6	3	38	27	45	28
<i>Zetaproteobacteria</i>				2		
<i>Bacteroidetes</i>	4	6	5	3		
<i>others</i>		7		1		2
Total No. of sequence	67	49	59	38	76	48

Table 3: Q-PCR primers used in this study.

	Designation	Targeted gene	Primer sequence 5'-3'	Reference
	1369F	Bacterial 16S rRNA gene	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG	Suzuki <i>et al.</i> , 2000
	1492R	Bacterial 16S rRNA gene	GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T	
	787F	Archaeal 16S rRNA gene	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC	Yu <i>et al.</i> , 2005
	1059R	Archaeal 16S rRNA gene	GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-T	
Methane	type I 56F	Methanotroph type I, 16S rDNA	AAC-GGT-ARC-RGG-CCT-TCG-GG	Mayumi <i>et al.</i> , 2010
	type I 239R	Methanotroph type I, 16S rDNA	GCT-AAT-CYR-ACR-YAG-GCT-CAT-CT	
Calvin	<i>cbhM</i> 54F	RubisCO form II	TGA-TTT-CTG-GCT-GGG-YGG-TGA-TTT	This study
	<i>cbhM</i> 254R	RubisCO form II	CRG-CAT-TTT-CGC-CAA-AGG-TTT-CCA	
rTCA	<i>acIB</i> 59F	ATP-citrate lyase β -subunit	TGG-CAG-GWA-TTG-AWG-ACC-TT	This study
	<i>acIB</i> 256R	ATP-citrate lyase β -subunit	ATC-TTG-GTA-RTT-TTC-AAA-KGC-TTG	
APS	<i>AprA-1-FW</i>	Adenosine-5'-phosphosulphate (APS) reductase α -subunit	TGG-CAG-ATC-ATG-ATY-MAY-GG	Meyer and Kuever 2007
	<i>AprA-5-RV</i>	Adenosine-5'-phosphosulphate (APS) reductase α -subunit	GCG-CCA-ACY-GGR-CCR-TA	



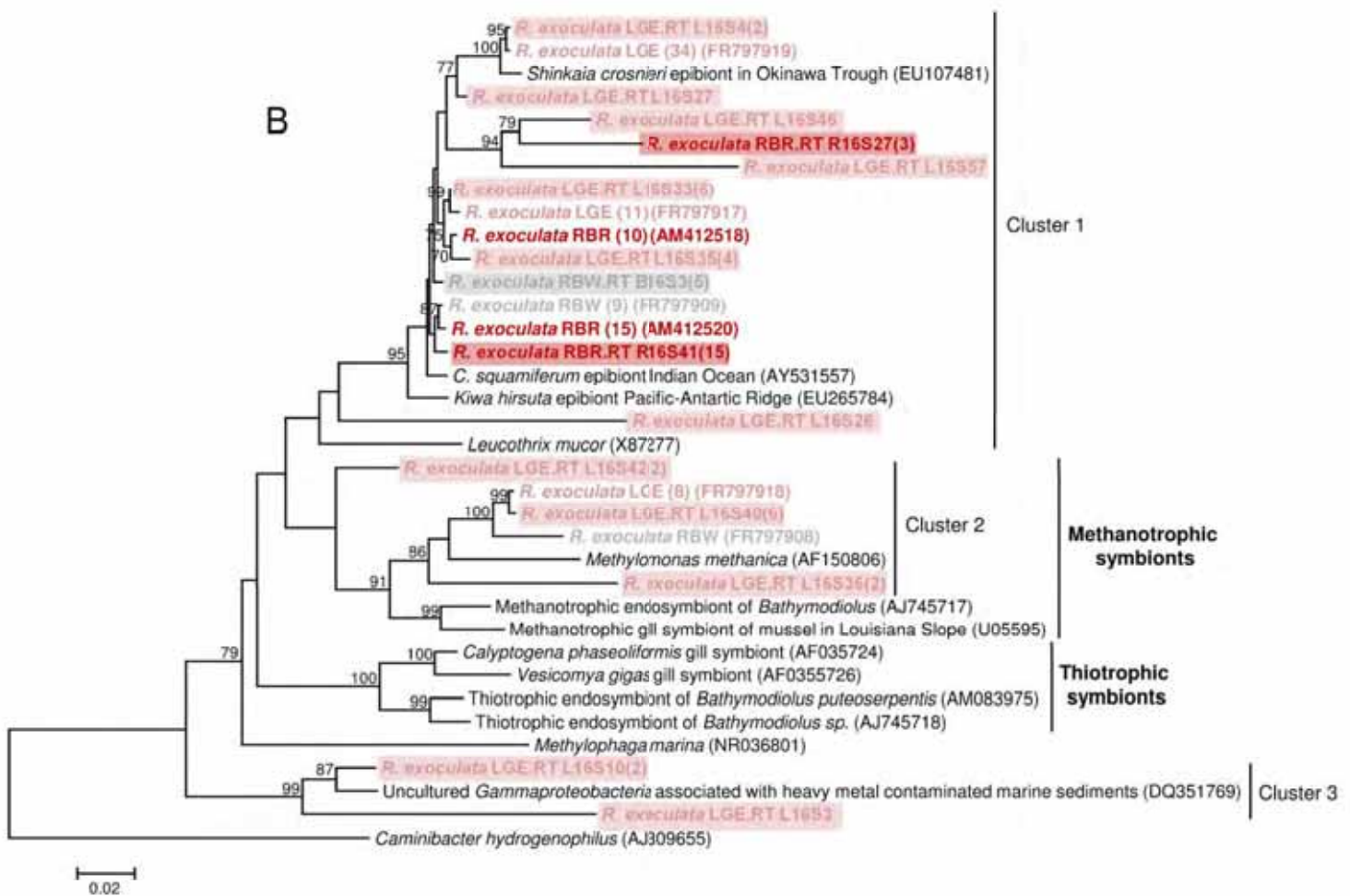


Figure 1: 16S rRNA phylogeny of the *Epsilonproteobacteria* (A, calculated on 917 bp) and *Gammaproteobacteria* (B, calculated on 898 bp) associated with the *R. exoculata* gill chamber. The robustness was tested using 1000 bootstraps resampling of the tree calculated using the Neighbor-Joining algorithm with Kimura two-parameters correction matrix (only bootstrap values over 70 are shown). Sequences names have been resumed as: LG or RB for Logachev or Rainbow specimens respectively, and E, W and R for Eggs, White moult and Red moult respectively and RT for Reverse-Transcription. The numbers in brackets refer to the number assigned to each individual. Our clones are shown in color (Rainbow in red, Logachev in grey).

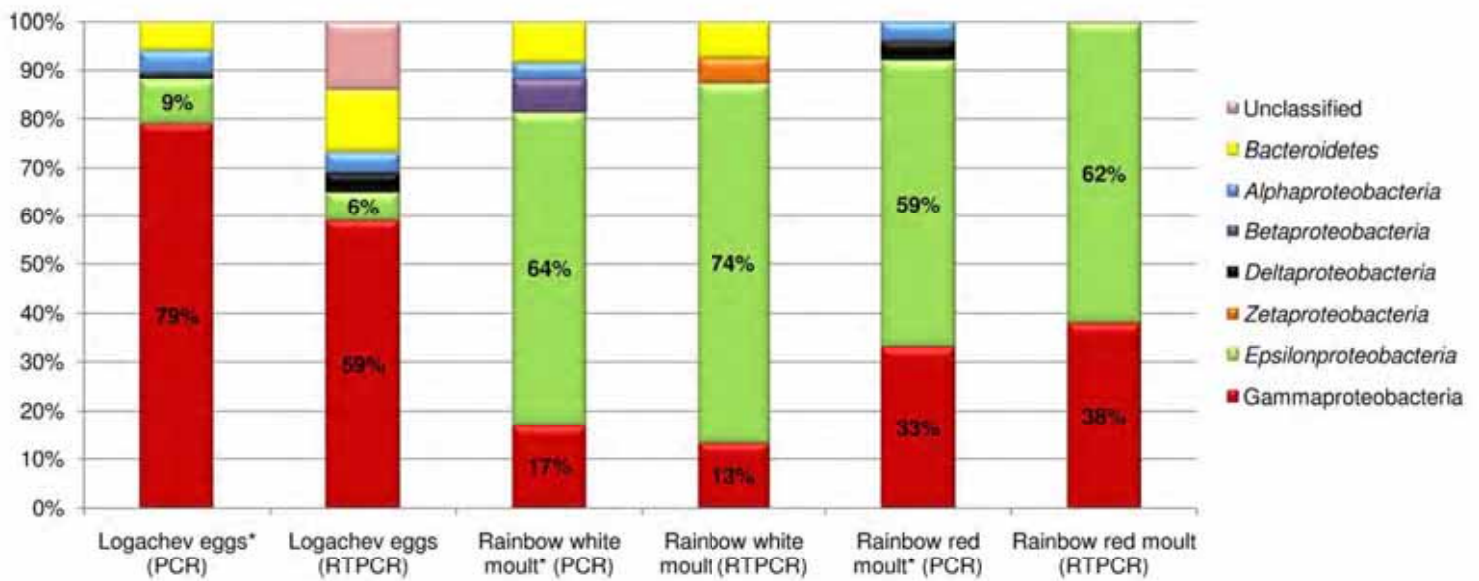


Figure 2: Comparison of the relative proportion of the 16S rRNA gene defined OTUs (>97% similarity) between clones libraries obtained by RT-PCR versus PCR (*by Guri *et al.*, 2011).

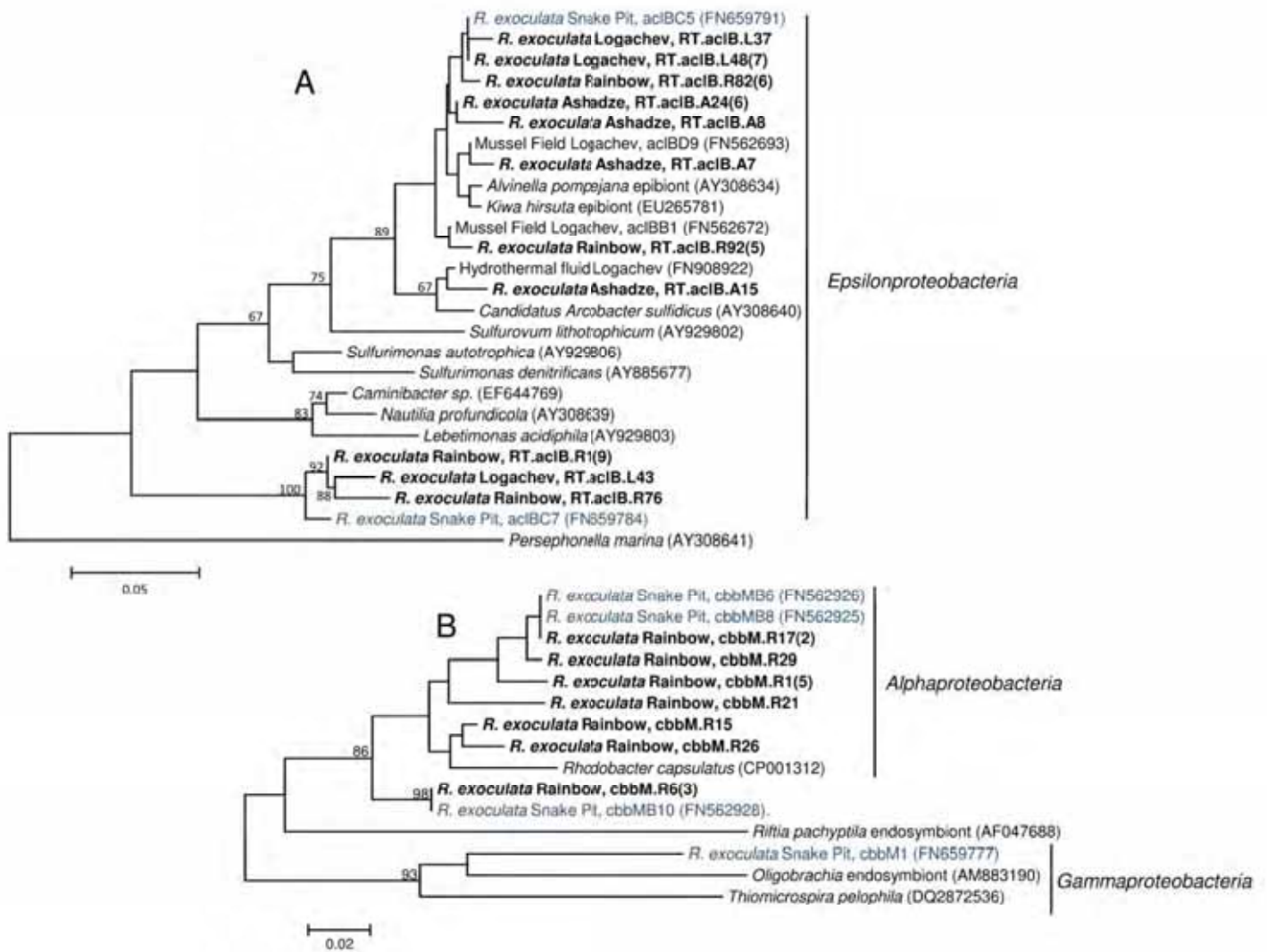


Figure 3: Neighbor-Joining tree of *acIB* (A) and *cbbM* (B) amino acid sequences (respectively based on 116 and 110 amino acid positions) from *R. exoculata* gill chamber epibionts using PAM distance (according to Dayhoff's PAM model). Bootstrap values are shown as percentage of 1000 bootstrap replicates (only values over 70 are shown). Sequences obtained in this study are shown in bold (RT: sequences obtained by RT-PCR, the number in brackets refer to the number assigned to each individual), whereas those obtained in the recent study on Snake Pit site are shown in blue (Hügler *et al.*, 2011).

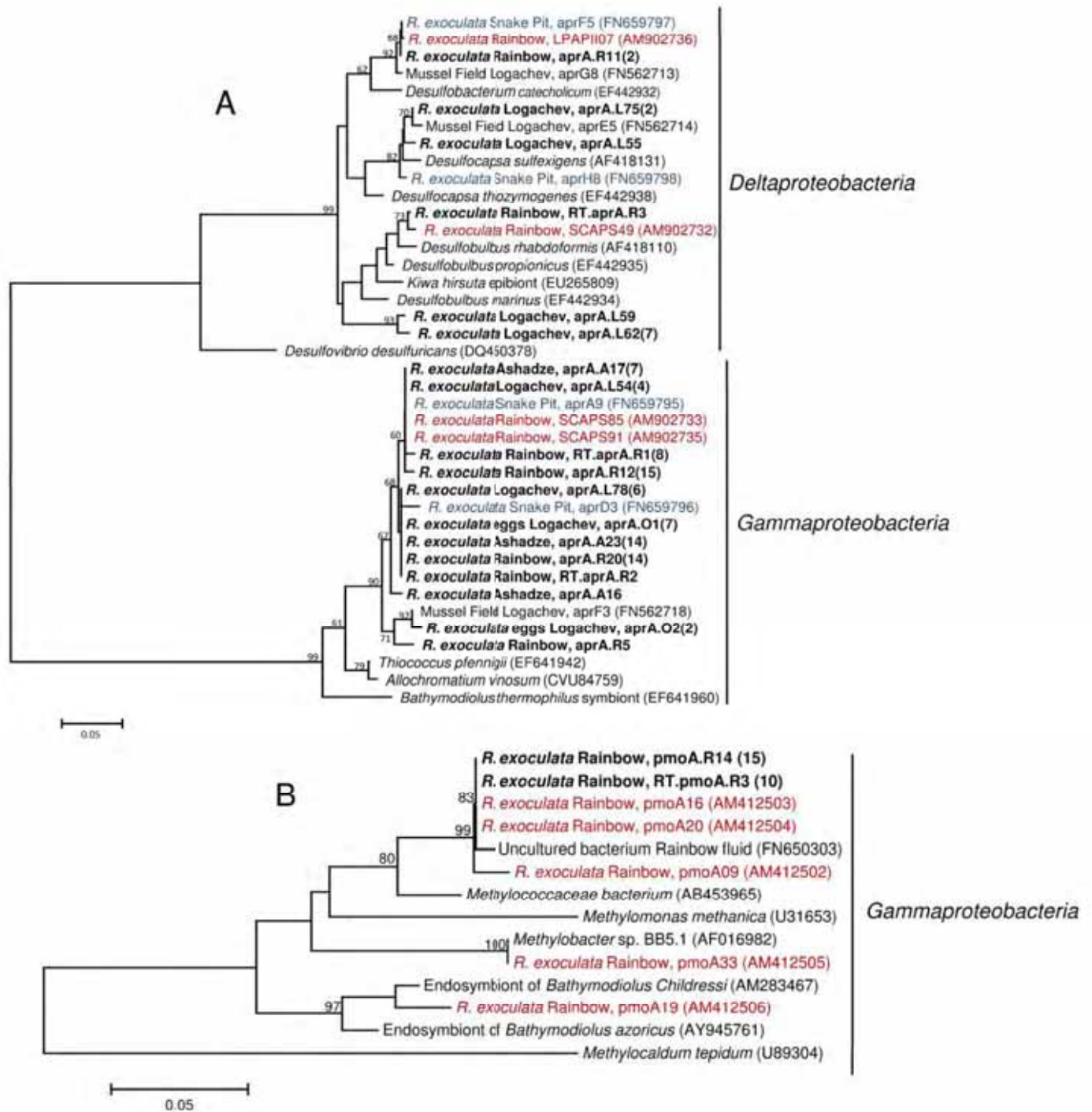


Figure 4: Neighbor-Joining tree of *aprA* (A) and *pmoA* (B) amino acid sequences (respectively based on 131 and 154 amino acid positions) from *R. exoculata* gill chamber epibionts using PAM distance (according to Dayhoff's PAM model). Bootstrap values are shown as percentage of 1000 bootstrap replicates (only values over 70 are shown). Sequences obtained in this study are shown in bold (RT: sequences obtained by RTPCR, the number in brackets refer to the number assigned to each individual), whereas those obtained in the previous study on Snake Pit (Hügler *et al.*, 2011) and Rainbow (Zbinden *et al.*, 2008) sites are shown in blue and red colors respectively.

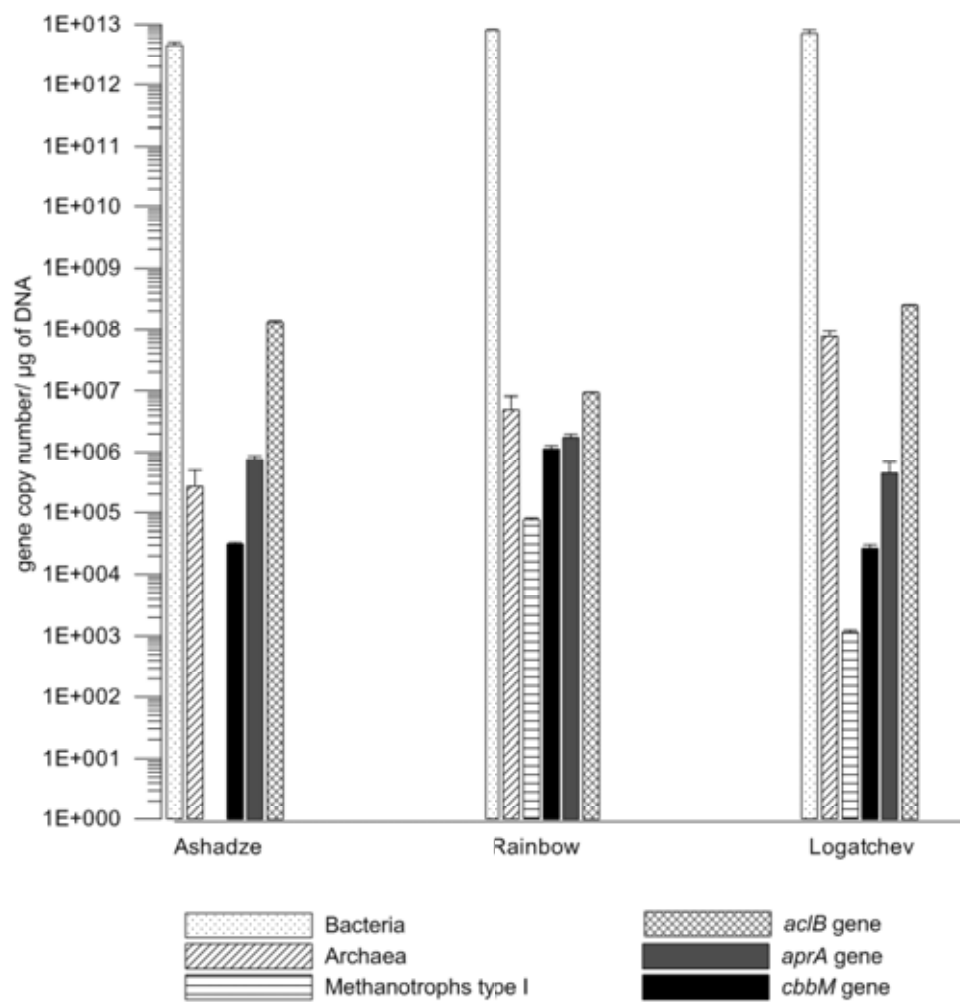


Figure 5: Q-PCR results.

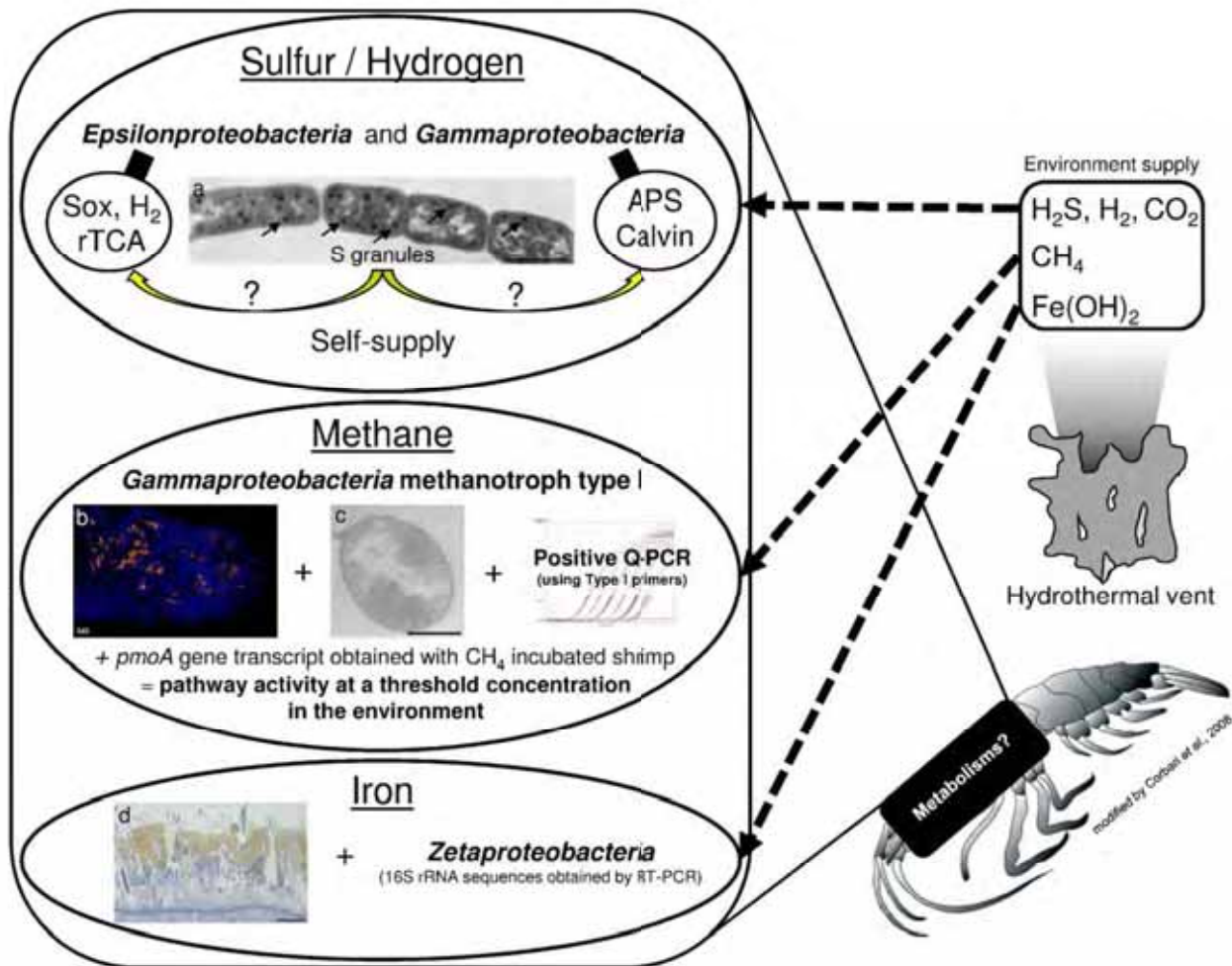


Figure 6: schematic view of the putative epibiont metabolisms among the *R. exoculata* branchial chamber microbial community.

- a. Thin bacterial filament with granules (black arrows). Scale bar = 1µm (Zbinden *et al.*, 2008).
- b. Longitudinal view of *in situ* hybridized scaphognathite *setae* from Rainbow red moult shrimp with epibionts. The methanotrophic type-I Gamma symbionts (orange) were hybridized with both LBI32/130 and GAM42a probes. The DAPI stained are in blue (Guri *et al.*, 2011).
- c. Methanotrophic-like bacteria (with intracytoplasmic membranes) retrieved in the thin rod-shaped bacterial mat associated with the egg membrane. Scale bar = 500 nm (Guri *et al.*, 2011).
- d. Thin section of antero-dorsal area of branchiostegite with particulate orange-brown iron oxides. Scale bar = 50µm (Zbinden *et al.*, 2004).

Supporting data

Table S1: some mineral and gas concentrations (end-member) at the three mantellic hydrothermal vents sites studied (Logachev, Ashadze and Rainbow) compared to basaltic site TAG and seawater. The data showed in bold highlight the major differences (modified by Charlou *et al.*, 2010).

	Seawater	TAG	Rainbow	Logachev	Ashadze
Depth (m)		3670	2300	3000	4088
Temperature (°C)	2	321/290	365	347/352	355
pH	7.8	3.1	2.8	3.3	3.1
gas					
H ₂ S (mM)	0	6.7	1.2	0.5/0.8	1
CH ₄ (mM)	0.0003	0.124/0.147	2.5	2.1	0.5/1.2
H ₂ (mM)	0.0004	0.15/0.37	16	12.0	8/19
CO ₂ (mM)	2.30	2.9/3.4	16	10.1	3.7
CO (nM)	0.3	-	-	-	-
Ar (µM)	16	20/40	-	12	-
N ₂ (mM)	0.59	0.90/0.89	1.8	3.0	2/5.5
mineral					
Fe (µM)	<0.001	1640	24050	2500	9300
Si(OH) ₄ (mM)	<0.2	22.0	6.9	8.2	6.6
Cl (mM)	546	659	750	515	614
Br (µM)	838	880/1045	1178	818	1020
Rb (µM)	1.3	10	36.9	27.7	34
Cs (nM)	2.3	110	333	385	-
Mg (mM)	53	0	0	0	0
Ca (mM)	10.2	26.0	66.6	27.3	42.8
Sr (µM)	87	99	200	138	83
Ba (µM)	0.14	>19	>67	>4.5	-
Mn (µM)	<0.001	1000	2250	330	1062
Cu (µM)	0.007	150	121/162	15/50	138
Zn (µM)	0.01	46	115/185	25/30	108

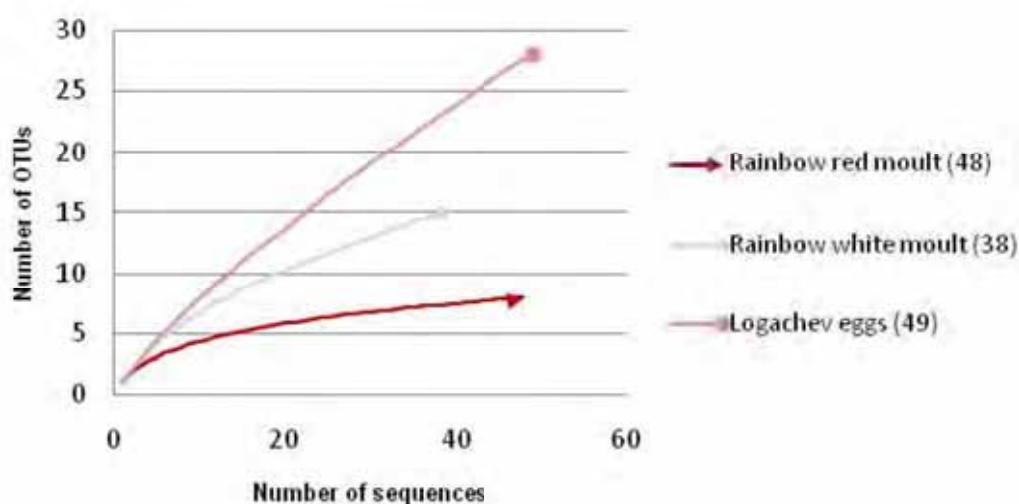


Figure S1: rarefaction curves from RT-PCR libraries (the number in brackets refers to the number of clones for each library).

Table S2: analysis of bacterial diversity (by RTPCR) associated with *R. exoculata* (branchial chamber and eggs). ¹Simpson indices values are presented as 1-H for best readability, the diversity increasing from 0 (one specie) to 1 (maximal diversity).

Library	Number of clones	Number of OTU (97% similarity)	Good's coverage	$1-H_{\text{simpson}}^1$
Rainbow red moult	48	8	94	0,73
Rainbow white moult	38	15	76	0,89
Logachev eggs	49	28	63	0,92

	Methanotrophic						Energetic pathway Sulfur (oxidation/reduction)						Hydrogenotrophic						Autotrophic pathway								
	<i>pmoA</i>			<i>mxaF</i>			<i>soxB</i>			<i>aprA</i>			Ferrooxidation <i>rns</i>			<i>hupL</i>			Carbin cycle <i>cbbL</i>			CbbM <i>cbbM</i>			rTCA cycle <i>oxfB</i>		
	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt	PCR	RT-PCR	nt			
Epibiont of Rainbow adult specimen incubated with iron	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt		
Epibiont of Rainbow adult specimen incubated with sulfur	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt		
Epibiont of Rainbow adult specimen incubated with hydrogen	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt		
Epibiont of Rainbow adult specimen incubated with methane	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt		
Epibiont of Rainbow adult specimen (red month)	15	-	-	-	-	-	32	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21		
Epibiont of Achdre adult specimen (black month)	+	-	-	-	-	-	22	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9		
Epibiont of Logachev adult specimen (black month)	+	-	-	-	-	-	21	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9		
Epibiont of Logachev eggs surface	+	-	-	-	-	-	9	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Table S3: functional genes libraries with the number of clones (nt: not tested; - : not obtained; +: just amplified).

Table S4: List of specimens and treatment (this table shows the number of shrimps used per analyses; LB: branchiostegite; Sc: scaphognathite).

Ultramafic Hydrothermal site	Stage / Sampling	Number of sample per Analyzed			
		RT-PCR	Functionnal gene	Q-PCR	Total
Rainbow (36°13'N; 33°54'W)	<i>R. exoculata</i> adult (red moult) specimen incubated with iron	-	1(Sc)	-	1
	<i>R. exoculata</i> adult (red moult) specimen incubated with sulfur	-	1(Sc)	-	1
	<i>R. exoculata</i> adult (red moult) specimen incubated with hydrogen	-	1(Sc)	-	1
	<i>R. exoculata</i> adult (red moult) specimen incubated with methane	-	1(Sc)	-	1
	<i>R. exoculata</i> adult white moult	1(Sc)	-	-	1
	<i>R. exoculata</i> adult red moult	1(Sc)	1(LB) + 1(Sc)	1(Sc)	4
Logachev (14°45'N; 44°57'W)	<i>R. exoculata</i> gravid female (number of eggs treated)	1 (20)	1(20)	-	2
	<i>R. exoculata</i> adult black moult	-	1(LB) + 1(Sc)	1(Sc)	3
Ashadze (12°58'N; 44°51'W)	<i>R. exoculata</i> adult black moult	-	1(LB) + 1(Sc)	1(Sc)	3

17

11.3. Rappel des principaux résultats et conclusion.

Cette étude a permis de décrire la diversité active et fonctionnelle de la communauté épibiotique du céphalothorax de *R. exoculata*. De nombreuses études ont montré la présence majoritaire du groupe des *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria* (grand nombre de séquences obtenues par PCR sur l'ADNr 16S) (Guri *et al.*, 2011, Hügler *et al.*, 2011, Petersen *et al.*, 2009, Zbinden *et al.*, 2003). Les résultats de cette étude confirment l'importance de ces deux groupes mais surtout leur activité, car la diversité active obtenue (RT-PCR sur l'ARNr 16S) est constituée en majorité par des séquences affiliées à ces deux mêmes groupes. De plus, les résultats obtenus sur les gènes de fonction confirment également que les épibiontes du groupe des *Epsilonproteobacteria* utiliseraient le cycle inverse de l'acide citrique (rTCA) comme voie d'assimilation du carbone et probablement la voie d'oxydation des composés soufrés Sox, comme source d'énergie. Les épibiontes du groupe des *Gammaproteobacteria* pourraient, quant à eux, générer leur énergie par la voie APS alimentant probablement le cycle de Calvin pour l'autotrophie. Ces métabolismes basés sur l'utilisation des composés soufrés pourraient fonctionner à un niveau basal alimentés par exemple par des granules de soufre intracellulaires observés chez certaines bactéries filamenteuses de la communauté d'épibiontes (Zbinden *et al.*, 2008). Nous avons également confirmé l'activité et la relative abondance des épibiontes *Gammaproteobacteria* méthanotrophes de type I chez les crevettes des sites mantéliques Rainbow et Logachev. Par rapport aux métabolismes basés sur les sulfures, la voie d'oxydation du méthane semble être activée au-dessus d'un certain seuil de concentration en méthane dans le milieu. En effet, seules les crevettes incubées avec du méthane ont permis d'obtenir le transcrit du gène *pmoA*. L'activation de cette voie est donc complètement dépendante de l'environnement.

Les travaux de cette étude ne sont pas terminés. En effet, des travaux récents ont prouvé l'utilisation de la voie de l'oxydation de l'hydrogène par les symbiontes d'une modiole et la présence du gène *hupL*, codant pour une enzyme clé de cette voie chez les épibiontes de *R. exoculata* (Petersen *et al.*, 2011). Les sites mantéliques de cette étude (Rainbow, Logachev et Ashadze) sont connus pour être enrichis en hydrogène. Pour compléter cette étude, il serait donc primordial de vérifier l'occurrence de cette voie chez les épibiontes de *R. exoculata* sur les trois sites précédents, par amplification et surtout quantification du nombre de copie du gène *hupL* (PCR, RT-PCR et Q-PCR).

Chapitre 3:

Distribution biogéographique des
épibiontes du tube digestif de *Rimicaris*
exoculata le long des sites
hydrothermaux de la Ride Médio-
Atlantique.

12. Distribution biogéographique des épibiontes du tube digestif de *Rimicaris exoculata* le long des sites hydrothermaux de la Ride Médio-Atlantique.

12.1. Introduction de l'étude.

Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds sont caractérisés par des conditions géochimiques variées qui dépendent de la nature des roches traversées par les fluides hydrothermaux. Les sites hydrothermaux rencontrés le long de la Ride Médio-Atlantique (MAR) constituent de bons exemples : il existe des sites situés sur des substrats basaltiques tels que Snake Pit, Lucky Strike et TAG et d'autres situés sur des substrats mantélliques, tels que Rainbow, Logachev, Ashadze et South-MAR (Fig.2). La crevette *Rimicaris exoculata* a été identifiée sur la plupart des sites de la MAR. La communauté épibiotique associée à son tractus digestif, composée de *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria*, n'a été décrite que sur deux sites : TAG et Rainbow.

Ce travail repose sur la comparaison des communautés microbiennes du tractus digestif de *R. exoculata* échantillonnées au cours de différentes campagnes océanographiques sur quatre sites hydrothermaux (TAG, Rainbow, Logachev et Ashadze) présentant des conditions géochimiques différentes. La composition et l'activité de la communauté épibiotique du tractus digestif de *R. exoculata* ont été analysées par deux approches : une approche moléculaire comprenant des analyses phylogénétiques de séquences du gène codant l'ARNr 16S (par PCR et RT-PCR) et une approche microscopique (MEB, MET et FISH). Le but de cette étude est d'évaluer l'influence du site d'origine et d'établir la phylogéographie des communautés bactériennes résidentes du tractus digestif de *R. exoculata*. Les résultats permettront également de proposer des hypothèses sur l'évolution de l'association hôte - symbiontes et de discuter du mode de transmission putatif.

12.2. Article 3: “Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites” (submitted at The ISME J).

Running title: Phylogeography of *Rimicaris exoculata* gut epibionts

Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites

Lucile Durand¹, Marie Roumagnac¹, Valérie Cueff-Gauchard¹, Cyrielle Jan¹, **Mathieu Guri¹**, Claire Tessier¹, Marine Haond¹, Philippe Crassous², Magali Zbinden³, Sophie Arnaud-Haond² and Marie-Anne Cambon-Bonavita^{1*}

¹ Ifremer, Centre de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEP/LM2E, UMR 6197 Ifremer, CNRS, UBO, BP 70, 29280 Plouzané, France

² Ifremer, Centre de Brest, Laboratoire Environnements Profonds, DEEP/EP, 29280 Plouzané, France

³ UMR CNRS 7138, Systématique, Adaptations et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, 7 Quai Saint Bernard, 75252 Paris cedex 05, France

Subject category: Microbe-microbe and microbe-host interactions
Microbial population and community ecology

Corresponding author – E-mail macambon@ifremer.fr

Tel. (+33)298224756

Fax. (+33)298224757

Address: Ifremer Erest, DEEP/LM2E, BP 70, 29280 Plouzané, France

Abstract

Rimicaris exoculata is a deep-sea hydrothermal vent shrimp with an enlarged gill chamber colonised by a dense and complex epibiotic community. This shrimp ingests chimney particles and its gut houses an autochthonous microbial community. Although a trophic symbiosis has been suggested for both communities, their roles have not yet been completely resolved. This species dominates hydrothermal ecosystems megafauna all along the Mid-Atlantic Ridge regardless of contrasted geochemical conditions prevailing in them. Here, we intend to analyse the possible environmental conditions influence on the distribution and composition of this gut microbial community. The gut microbial communities associated with *R. exoculata* specimens collected at four hydrothermal vent sites (Rainbow/TAG/Logatchev/Ashadze) were analysed through 16S rRNA surveys on extracted DNA or RNA, and microscopic observations (TEM, SEM and FISH analyses). The filamentous epibionts inserted between the gut epithelial cells microvilli were observed for all examined samples. The results indicate the gut microbial community is restricted to *Deferribacteres*, *Mollicutes* and *Epsilonproteobacteria* groups regardless of the site. A single *Deferribacteres* phylotype is retrieved at all sites but four *Mollicutes*-related OTUs are retrieved, one of them being only identified on the Rainbow specimens. The topology of median joining networks of haplotypes illustrates a diversification of communities possibly following demographic expansions and suggests that the more diverse bacterial gut communities at Rainbow may be the result of a more ancient history. Hypotheses on the gut epibiont transmission pathways are proposed.

Key words: *Deferribacteres* / Epibiont / *Mollicutes* / Network analyses / Phylogeography / *Rimicaris exoculata*.

Introduction

The deep-sea hydrothermal ecosystems described all along the mid-ocean ridges are sustained by microbial chemosynthesis in place of photosynthesis in the photic zone. On the Mid-Atlantic Ridge (MAR) hydrothermal vents are known from the Azores Triple Junction to the South MAR site (Fig.1a). These hydrothermal vents are characterized by contrasted geochemical conditions (Charlou *et al.*, 2000, 2002; Kelley *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2007) depending on the crust rock nature crossed by the fluids. Basalt-hosted sites (Snake Pit, Lucky Strike and TAG for example) expel fluids reaching temperatures up to 300°C, enriched in sulphides and silica but relatively depleted in methane. In contrast, ultramafic-hosted sites (Rainbow, Logatchev and the recently studied Ashadze sites for example) expel fluids influenced by mantle rocks enriched in hydrogen, methane, carbon monoxide, iron, calcium and abiotic long-chain hydrocarbons and relatively depleted in sulphides (Fouquet *et al.*, 2008; Charlou *et al.*, 2002, 2010).

Hydrothermal vents harbor a dense and diverse endemic fauna which has to develop strategies to colonize new sites and circumvent contrasted geochemical conditions prevailing in them. Usually faunal assemblages are distributed in concentric areas around vent fluid emissions (Colaço *et al.*, 2002). Anemones and gastropods are located at low temperatures (2-5°C) then bivalves and crustaceans (from 5 to 30°C). *Rimicaris exoculata* (Williams and Rona, 1986), a caridean shrimp, lives at the upper temperature of such area (Schmidt *et al.*, 2008; Ravaux *et al.*, 2009), in dense aggregates close to the active chimney walls (Komaï and Segonzac, 2008 for review). This species is endemic of MAR hydrothermal vent sites, both basaltic- and ultramafic-hosted systems, and the genus is also retrieved at the Central Indian Ridge (Watabe and Hashimoto, 2002). The aggregates are highly active and dense whatever the site considered except at Ashadze where only few adults were observed (Fabri *et al.*, 2011). At this site the megafauna was neither much diverse nor abundant, and was

mainly limited to anemones and chaetopterid polychaetes (Fouquet *et al.*, 2008, Fabri *et al.*, 2011).

Two microbial epibiont colonization areas were described on *R. exoculata*. The first one located in its gill chamber (Van Dover *et al.*, 1988; Casanova *et al.*, 1993; Segonzac *et al.*, 1993; Polz & Cavanaugh, 1995; Gebruk *et al.*, 2000; Zbinden *et al.*, 2004, 2008; Corbari *et al.*, 2008a, 2008b; Petersen *et al.*, 2010; Hügler *et al.*, 2011) is a complex epibiont community composed of at least sulphur-, iron- and methane-oxidizers at the Rainbow ultramafic-hosted site (Zbinden *et al.*, 2008). This diversity could explain why this shrimp is well adapted to contrasted geochemical conditions. This community is considered as site-dependant at the subspecies level (Petersen *et al.*, 2010). This could be linked to the epibiont community transmission pathway supposed to be horizontal (environmental acquisition) after each generation and moult. The second one is located in the gut (Polz *et al.*, 1998; Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003; Durand *et al.*, 2010) and is characterized by four main phyla: *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*. The gut epibiont transmission via parents (vertical transmission) or via the environment (horizontal transmission) is still debated. *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria* phyla are commonly identified in hydrothermal ecosystems but no free-living *Deferribacteres* species affiliated to the closest genera of *R. exoculata* gut epibionts (*Geovibrio* and *Mucispirillum*) have ever been reported from any hydrothermal ecosystems (López-García *et al.*, 2003; Voordeckers *et al.*, 2008; Brazelton *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2011). Only one recent study reports an environmental *Mollicutes*-related clone sequence in hydrothermal ecosystems (Hügler *et al.*, 2010) which was not confirmed through pyrosequencing analysis (Flores *et al.*, 2011).

In order to test for the hypothesis of a site-dependence of the shrimps gut epibiont community and attempt to trace back its origin, a multi-site survey was done using both microscopic and molecular approaches and comparing *R. exoculata* specimens from four MAR hydrothermal vent sites: TAG, Rainbow, Logatchev and Ashadze (Fig.1a).

Materials and methods

Sample collection

Samples were collected at four MAR hydrothermal vent sites (Fig.1a) during successive cruises: TAG, 26°8'N-44°50'W, 3650 m depth (EXOMAR 2005); Rainbow, 36°14'N-33°54'W, 2320 m depth (EXOMAR 2005, MoMARDREAM-Naut 2007 and MoMAR08 2008); Logatchev, 14°45'N-44°58'W, 3000 m depth and Ashadze, 12°58'N-44°51'W, 4100 m depth (Serpentine 2007).

Shrimps were collected using the slurp-gun of the ROV *Victor 6000* and the DSV *Nautilie*, operated from the RVs *L'Atalante* and *Pourquoi pas?*. Prior to each dive, the bowls used to collect the shrimps and the bioboxes used to collect mineral substrates from surrounding active chimney walls were aseptically washed with ethanol (96%) then filled with sterile seawater. Surrounding fluids were collected using decontaminated 400 mL-containing titanium syringes (Charlou *et al.*, 2002).

Once on board, live shrimps were immediately dissected under sterile conditions. Animals and environmental samples (Rainbow and TAG only) were treated on board for molecular analyses, microscopic observations and *in situ* hybridization analyses as detailed in Durand *et al.*, 2010 (Tab.S1).

DNA extraction and PCR

DNA was extracted with the FastDNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions and kept at 4°C before use for all samples (Tab.S1). Amplifications of the bacterial 16S rRNA gene were performed using universal primers E8F/U1492R (1484 bp) or E338F/U1407R (1069 bp) as detailed in Durand *et al.*, 2010.

RNA extraction and PCR

RNA was extracted with the FastRNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen) following the manufacturer's instructions and kept at -20°C before use for all samples (Tab.S1). The RNA retro-transcription and the amplification of the bacterial 16S rRNA gene (RT-PCR) were done using the One step[®] kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the universal primers E8F/U1492R or E338F/U1407R. RT-PCR were performed with 20 ng RNA template in a 50 µL final volume using the following conditions: the RNA was retro-transcribed during 1 cycle of 30 min at 50°C, then the polymerase (HotStartTaq polymerase, Qiagen) was activated during 15 min at 95°C and finally the cDNA was amplified as detailed in Durand *et al.*, 2010 (40 cycles). Only Rainbow and Ashadze specimens were treated for the RNA analyses.

Cloning and amplified ribosomal DNA restriction analysis

PCR products were cloned using the pGEM-T (Promega, Madison, USA) or TOPO[®]XL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) cloning kits following the manufacturer's instructions. Positive clones were amplified by PCR. Then, DNA was hydrolysed over night at 37°C. This 20 µL reaction mix contained 20 ng PCR products, 4 U *Hha* I restriction enzyme in 1X *Hha* I buffer (Promega) and 1X BSA (Promega). DNA fragments were then separated on a 2% agarose gel. Clones were clustered according to their profile patterns. One to 10 clones per profile were selected for sequencing regarding the number of clones affiliated to each profile.

Sequencing was performed at the "Plateforme Biogenouest" (Roscoff, France, www.sb-roscoff.fr/SG/) using ABI prism[™] 3100 GA with the Big-Dye V3.1[™] Terminator technology (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) and by "GATC Biotech AG" (Konstanz, Germany, www.gatc-biotech.com/fr/) using ABI 3730xl with the Dye Deoxy[™] Terminator technology (Applied Biosystems).

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed on five *R. exoculata* gut, five environmental DNA and two gut RNA clone libraries (Tab.S1).

Sequences were identified using the NCBI-BLAST program ((Altschul *et al.*, 1990b). They were processed and edited in Geneious Pro version 4.6 (Drummond *et al.*, 2009) and aligned using the CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) algorithm. Sequences displaying more than 98% similarities were clustered together and considered as single phylotype (OTU). Only homologous positions were included in the final alignments. The phylogenetic constructions were performed using the parameters describing the most likely model of evolution determined by ModelTest version 3.7 (Posada & Crandall, 1998) with the Akaike Information Criterion (AIC). Neighbor-joining analyses (Saitou & Nei, 1987) were conducted using PHYLON-WIN (Galtier *et al.*, 1996). Maximum likelihood analyses (Felsenstein, 1981) were conducted using PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) on the freely available Bioportal (www.bioportal.uio.no/). Each dataset analysis was supported by 1000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985).

Possible evolutionary paths among haplotypes based on the 16S rRNA gene sequence, were illustrated by networks constructed using NETWORK version 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltd. at www.fluxus-engineering.com) with the median-joining method (Bandelt *et al.*, 1999).

Gut sequences were named as follows: site origin of the host (R = Rainbow, T = TAG, L = Logatchev, A = Ashadze), number of the clone sequence and R for reference specimen. The RNA clone sequences name was preceded by td (for digestive tract). Environmental sequences were named as follows: site origin (R = Rainbow, T = TAG), sample nature (S = substrate, S1 = orange chimney, S2 = black chimney, sw = seawater) and number of the clone sequence. They are available from the EMBL nucleotide sequence database under accession numbers FR839030 to FR839338.

Electron microscopic observations

Samples (Tab.S1) for SEM (Scanning Electron Microscopy) and TEM (Transmission Electron Microscopy) were fixed as described in Durand *et al.*, 2010. For SEM they were then dehydrated by ethanol series, displayed on a specimen stub and desiccated using a critical-point dryer CPD 020 (Balzers union, Balzers, Liechtenstein). Then the digestive tracts were divided longitudinally and gold-coated using a SCD 040 (Balzers union). Observations were performed with a Quanta 200 MK microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) and the Scandium acquisition program (Soft Imaging System, Munster, Germany). For TEM observations, samples were prepared as described in Durand *et al.*, 2010. Observations were carried out using a Zeiss 201 electron microscope operating at 80 kV.

Fluorescence in situ hybridizations

Samples (Tab.S1) were prepared as described in Durand *et al.*, 2010. The sections were hybridized during 3 hours at 46°C in a 30% formamide buffer. The specimens were hybridized with the eubacterial Eub338 (Amann *et al.*, 1990) universal probe (Eurogentec, Liège, Belgium). Observations were performed with an Olympus BX61 microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) equipped with a U-RFL-T UV light (Olympus Optical Co.) and using a Retiga 2000R camera (Qimaging, Surrey, BC, Canada) and with a Zeiss Imager.Z2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with the slider module ApoTome (Zeiss) and the Colibri light technology (Zeiss) and using an AxioCam MRm (Zeiss) camera. Micrographs were analyzed using the Qcapture Pro (Qimaging) or the AxioVision (Zeiss) softwares.

Results

Macroscopic observations

Shrimps collected had an average size of 6 cm long at Rainbow and TAG and 4 cm long at Logatchev and Ashadze sites. They were all in anecdysis but were visually different. The mineral deposit on the Rainbow shrimps carapace was red; it was grey on TAG and Logatchev and dark black on Ashadze specimens.

The seawater temperature surrounding shrimp aggregates was between 20 and 25°C. It was slightly orange-coloured and enriched in iron-oxides at Rainbow and colourless to grey at TAG. The Rainbow chimney RS1, close to the aggregates, was hard and covered by orange iron-oxides while both Rainbow RS2 and TAG chimneys, sampled just below the aggregates and scrapped by the shrimps, were black and crumbly.

Microscopic observations

The epibionts were observed in dense population covering the midgut epithelium (Fig.1b A2-B2-C2) on all specimens, whatever the site considered (Fig.1b, Fig.S1). They were always settled between the microvilli of brush cells (Fig.1b A1-B1-C1), separated from gut content by the peritrophic membrane. They were never observed in the stomach. Their spiral-like shape (up to 20 µm length / less than 0.3 µm diameter) without septum was similar regardless of the site. The structure of Ashadze epibionts was slightly thinner (less than 0.2 µm diameter) and shorter on SEM observations (Fig.1b C2). The eubacterial probe strongly hybridized on the filamentous epibionts whatever the site origin (Fig.1b A3-B3-C3).

Environmental sequences from TAG and Rainbow sites

The molecular survey performed on Rainbow and TAG seawater and chimney samples (Tab.1) revealed a wide diversity. Mainly *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* phyla were retrieved. Most of these clones were related to invertebrate symbionts (mussels, gastropods, worms) or free-living forms identified in marine

chemosynthetic environments such as hydrothermal vents or cold seeps (Fig.2, Fig.S2, Fig.3).

We observed single and widely distributed *Epsilonproteobacteria*-related sequences (Fig.2, Fig.S2). Chimney and seawater clones tended to cluster separately. The main cluster EpsiB (mainly Rainbow seawater clones) was close to *R. exoculata* epibionts from distinct sites. Thermophilic *Nautiliaceae*-related bacteria, usually sulphur-reducers retrieved in vent ecosystems (Flores *et al.*, 2011), were retrieved in the Rainbow black chimney and TAG seawater libraries.

The *Gammaproteobacteria* were poorly represented in the Rainbow seawater clone library (Tab.1). One of the three main OTUs (OTU 3 Fig.3) was affiliated to cluster GammaA representing *R. exoculata* ectosymbionts thought to be sulphide-oxidizers (Petersen *et al.*, 2010; Hügler *et al.*, 2011). Most of the environmental clones were affiliated to the thiotrophic hydrothermal symbionts subgroup and some to the methanotrophic one.

Alpha-, *Delta*-, *Betaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* were represented by few clone sequences (Tab.1). *Alpha*- and *Betaproteobacteria* were related to environmental clones (Tab.S2) retrieved in methane-rich environments (hydrothermal vents, cold seeps). *Deltaproteobacteria* were related to sulphur cycle described species such as *Desulfothermus okinawensis*. *Thermodesulfobacteracea*, *Zetaproteobacteria*, *Aquificales*, *Actinobacteracea*, *Firmicutes* and *Verrucomicrobiacea* were less represented (Tab.1). Most of these phyla are commonly retrieved in hydrothermal ecosystems and are considered as ubiquitous microorganisms (Voordeckers *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2011).

In this study no *Deferribacteres*-related neither *Mollicutes*-related sequences were retrieved in environmental samples.

Epsilon- and Gammaproteobacteria-related gut epibionts diversity

Epsilonproteobacteria retrieved regardless of the site (Tab.1) were poorly represented in the gut libraries (DNA and RNA), except in the Ashadze gut DNA library. All these gut sequences were related to free-living environmental clones from chemosynthetic ecosystems (Tab.S2). Some were related to *R. exoculata* gill chamber epibionts and to hydrothermal invertebrates symbionts (cluster EpsiB, Fig.2). Groups of closely related species such as EpsiA1 (Rainbow/TAG/Ashadze/Logatchev) and EpsiA2 (Ashadze/Logatchev) were retrieved at distinct locations (Fig.2, Fig.S2).

Only few *Gammaproteobacteria*-related clones were retrieved in the Rainbow and Ashadze gut libraries (Tab.1). They were affiliated to cluster GammaA (Fig.3). The RNA and DNA analyses revealed distinct communities.

Deferribacteres-related gut epibiont diversity

Deferribacteres were retrieved in all the libraries (Tab.1) representing both the widely predominant phylum and active population. All these sequences (Fig.4a, Fig.S3a) were closely related together (99% similarities) representing a single OTU regardless of the site. The tree topology calculated with neighbor-joining or maximum likelihood (data not shown) methods were similar.

The 16S rRNA V6 domain analysis (Tab.S3) highlighted the existence of three distinct haplotype clusters within this unique OTU (Fig.S4b) according to the site origin both using neighbor-joining (Fig.S4a) and maximum likelihood (data not shown). This haplotype diversity was represented by pinpoint mutations mainly tending to increase the 16S rRNA G+C content (Fig.S4b).

Network constructions revealed distinct patterns of identity, composition and diversification of the *Deferribacteres* in the different sites of origin (Fig.4b). Logatchev and Ashadze epibionts, together with the majority of TAG ones, exhibited a star-like cluster topology with a

homogenous distribution of haplotypes around two closely related and dominant haplotypes at the heart of the cluster. Contrastingly, most Rainbow haplotypes and few TAG ones showed a similar haplotype number, much more evenly distributed (*i.e.* a higher haplotype diversity) and characterized by much larger divergences (*i.e.* a higher nucleotide diversity).

Mollicutes-related gut epibiont diversity

The *Mollicutes* phylum was retrieved in all the DNA and RNA libraries except in the Ashadze DNA one (Tab.1). The tree topography of these sequences (Fig.5a, Fig.S3b) was the same using neighbor-joining and maximum likelihood (data not shown) methods. The sequences clustered in four OTUs (clusters MolliA to MolliD, Fig.5a, Fig.S3b). The main clusters MolliA and MolliC, sharing 98-99% similarities with Rainbow *R. exoculata* gut clones (Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003; Durand *et al.*, 2010) probably represented new species. Cluster MolliA contained exclusively Rainbow epibiont sequences whereas other clusters were multi-sites. The poorly represented cluster MolliB, affiliated to gut crustacean epibionts (clones Lo_Hep1.15 and Cobs2TisF5) included DNA Logatchev and RNA Ashadze epibionts. Cluster MolliC, related to *R. exoculata* gut clones and the unique Logatchev environmental clone (Tab.S2, Hügler *et al.*, 2010) was retrieved at the four sites studied. Cluster MolliD was not retrieved in the DNA analyses. These RNA sequences were affiliated to isopod (*Porcellio scaber* clone P10) and fish (*Gillichthys mirabilis* clone C13) gut clones sharing 86-88% similarities. The closest relative of cluster MolliA, *P. tyrrhena* gut clone pt7m, shared only 89% similarities. The closest relative of cluster MolliC shared 98-99% similarities with the unique environmental clone from Logatchev fluids (Hügler *et al.*, 2010) and 87% similarities with *A. perconvexus* hepatopancreas clone Ap_Hep1.2.

The subspecies analysis (V6 domain, Tab.S3) revealed 6 haplotypes (Fig.S5b). Cluster MolliA was represented by the haplotype 1, the other haplotypes representing cluster MolliBCD (Fig.S5a). The epibiont haplotype sequences showed a high number of transitions, replacing guanosine by adenosine. The V6 domain analysis using neighbor-joining (Fig.S5a)

and maximum likelihood (data not shown) methods confirmed the dichotomy between Rainbow and both TAG and Logatchev epibionts.

Network constructions also showed a strong dichotomy between the clusters MolliA and MolliBCD (Fig.5b). The cluster MolliA (Rainbow epibionts only) showed a strong divergence of these haplotypes whereas the heart representing cluster MolliBCD (TAG/Logatchev epibionts and a unique Rainbow sequence from Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003) was a star-like cluster revealing a very slight divergence between these haplotypes.

Discussion

Sample and molecular approaches limitations

Four MAR sites shrimp specimens have been sampled. Due to material limitations, only environmental samples from Rainbow and TAG sites were collected. The colour of the mineral deposits on the shrimp carapace and the aspect of the environmental samples reflected the distinct geochemical conditions prevailing in the sites studied, mostly iron concentration (Charlou *et al.*, 2002).

Once on board the shrimps were all alive and healthy except the six Ashadze specimens, mostly lifeless. They might have suffered more from decompression, Ashadze being the deepest site (-4100 m). This depth could explain the shorter and irregular epibiont morphology. Moreover, no *Mollicutes* was retrieved in the DNA library while they were identified in the RNA one. This indicated *Mollicutes* were present and active in the Ashadze shrimp gut but the single sample available for DNA library was probably incomplete or epibionts DNA was damaged. This result also put forward the sample and clone numbers limitations. As for other molecular studies (Bent & Forney, 2008; Quince *et al.*, 2008) the results were not quantitative as not enough clones could be sequenced (Flores *et al.*, 2011). All the samples have been treated using the same procedures to limit the molecular bias to allow us to compare the libraries.

In this study, one single *Deferribacteres*-related species and two main *Mollicutes*-related species were identified. To overcome this apparent low diversity, subspecies analyses among each OTU were done at the haplotype level (16S rRNA gene V6 domain, Gonzalez & Labarère, 1998). This region is considered as highly variable and informative for subspecies differentiation in microbiology (Sogin *et al.*, 2006). Network constructions were performed to obtain a visual representation of the relationships between haplotypes, not constrained by the sometimes arbitrary dichotomic construction of regular phylogenetic trees. This approach provided a base to address the history of genetic divergence between them. As the mutation levels are usually much higher in bacteria than in eukaryotes, these analyses were also used to identify recent speciation events in the epibiont communities.

The holobiont fitness

The holobiont is the sum of the capabilities of the host and its symbionts (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). From a metabolic point of view, as insects subsisting on very low nutritionally habitat, *Rimicaris exoculata*, which ingests minerals, probably relies on its symbionts for nutrition. This association would then improve the holobiont fitness and invasive power (Nardon, 1999; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Even if no metabolism can be inferred on the basis of 16S rRNA gene, hypotheses can be proposed according to the phyla epibiont sequences they are affiliated to.

Gammaproteobacteria were retrieved in all the environmental libraries but not in all the gut ones. RNA analyses indicated that this group retrieved in Rainbow and Ashadze specimens could be active, confirming a previous work (Durand *et al.*, 2010). The gammaproteobacterial-related gut clones identified were mainly affiliated to groups involved in the sulphur cycle (cluster GammaA, Fig.3).

Epsilonproteobacteria are known in environmental libraries (Campbell *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2011). They were identified in all the libraries (Tab.1) but their diversity was lower in gut ones. They might be resident gut communities (group EpsiA1, Fig.2, Fig.S2, Durand *et al.*,

2010) and probably ingested. All the gut *Epsilonproteobacteria* were related to free-living environmental clones from ecosystems enriched in sulphides, methane, iron and hydrogen, fitting well with the geochemical conditions prevailing in the four sites studied.

Finally, this study confirmed that *Deferribacteres* and *Mollicutes* were the main phyla clearly associated with the *R. exoculata* gut communities. Their distribution all along the MAR hydrothermal sites and their absence in environmental libraries (this study and other) strengthened the hypothesis of resident, specific and selected bacterial communities. According to the molecular analyses, the *Deferribacteres*-epibionts were usually the dominant and the more active population. But on the Ashadze specimen, the *Mollicutes* were the more active community, contrasting with the other sites. They were present at the four sites representing a few and new potential species. Except cluster MolliA, the clusters were not site-dependent. *Deferribacteres*-related epibiont community could be implied in iron cycle. This activity could also be a microbial detoxification process for the host. Cuticle fragments are sometimes observed in the digestive content and chitin and tanned proteins could be difficult to digest. Some *Deferribacteres* are known to be heterotrophic microorganisms (Greene *et al.*, 1997; Miroshnichenko *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003) and could then play a complementary role in the hydrolysis of these fragments bringing nutrients to the host and the whole epibiont community.

All these results revealed the plasticity of the whole resident epibiont community and its potential adaptability in response to the geochemical and physiological constraints of surrounding environments (host external and internal environments). Therefore, the epibiont diversity (genetic, metabolic...) probably increases the holobiont fitness extending the range of environments in which it can compete successfully (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

Moreover, the holobiont is also a sum of genomes which must communicate. Here most epibiont sequences were only retrieved in the midgut and the diversity was clearly different and reduced compared to the environmental one. The filamentous bacteria inserted between

microvilli of healthy epithelial gut cells of all specimens observed so far were not segmented. All these observations could be the result of the host invasion control as described for insects (Anselme *et al.*, 2008). Penaeidae shrimps are known to synthesise antimicrobial peptides (Bachère *et al.*, 2004; Cuthberton *et al.*, 2008). It could also be the case for the Alvinocarididae *R. exoculata*. A second point is the “increase” in G+C content in the *Deferribacteres* haplotypes 16 rRNA gene V6 domain. Such modification of the G+C content is also observed in other symbioses (Heddi *et al.*, 1998). Then our hypothesis is that a “high” G+C content could be an adaptation to stabilize the secondary structure of the RNA in response to host selection (antimicrobial peptides synthesis, pH modification...), rather than a thermal adaptation as the shrimp lives only at ~ 15°C.

Possible transmission pathways of the gut epibiont communities

The *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* gut communities were closely related to environmental clones surrounding the shrimp aggregates and to *R. exoculata* gill chamber epibionts (Fig.2, Fig.3). A recent study showed that these *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* gill chamber epibionts were site-dependent (Petersen *et al.*, 2010) and this study support the hypothesis of their environmental acquisition through ingestion.

Mollicutes- and *Deferribacteres*-related sequences are not retrieved in the free-living microbial communities (this study and others) and the gut diversity is reduced. We hypothesize that these two epibiont communities could be vertically-transmitted and interpret their spatial homogeneity at the species level, as a result of the apparent large scale dispersal of their hosts. Several way of vertical transmission could be suggested. (1) Epibionts could be acquired at early juvenile stages by processes such as oral or anal trophallaxis. (2) Epibionts could be externally-transmitted with eggs, embedded in a mucous structure containing the microorganisms. Both phenomena would mean that part of the transmitted epibionts pool could be released in the surrounding environment. The unique *Mollicutes*-related environmental clone was retrieved in seawater above a mussel bed

collected at the Irina II vent field (Hügler *et al.*, 2010). At this site, *R. exoculata* aggregates are all-around the mussel bed (Serpentine cruise data in 2007, Fig.S6). So this seawater sample could have contained *Mollicutes*-related bacteria coming from faeces or egg/larvae. (3) Epibionts could be transmitted inside the eggs. (4) Epibionts could be transmitted within the maternal germ cells. In the last three phenomena, larvae would be already colonised before they hatch, leading to a common dispersion pathway of the shrimp and its symbionts. Larval stages are supposed to be pelagic forms capable of long distance dispersal (Pond *et al.*, 1997, 2000). This argues in favour of important gene flows between both hosts and epibionts geographically distinct populations. But few studies have been reported about the *R. exoculata* larval stages, which point to a clear limitation to draw conclusion.

Hypotheses regarding evolutionary relationships among epibiont communities.

At the haplotype level, the *Deferribacteres* and *Mollicutes* epibiont phylogenetic analyses and the network constructions indicate a recent phylogenetic diversification, in line with the star-like pattern also observed for the host and interpreted as a recent and common bottleneck-expansion history across MAR sites (Teixera *et al.*, 2011). Altogether these results suggest a recent event of diversification from a small population, possibly following a bottleneck or a founder event, except in Rainbow where higher diversity and stronger divergence suggested a more ancient history.

The network topology indeed highlights a very particular signature of deeper divergence and higher diversity at Rainbow suggesting a distinct evolutionary history of the resident epibionts at this site. In contrast, the epibiont community networks structure from both Logatchev and Ashadze sites identified one main haplotype from which other "satellite" haplotypes have recently emerged. This is a typical signature in a population produced by a recent event increasing the selective pressure on the main strain (represented by the main

haplotype), or to a recent diversification through demographic expansion (Cohan, 2004). The structure of TAG epibiont populations seemed to be intermediate, harbouring one main haplotype and several other distinct ones. The results tend to propose an ancient evolutionary history for the *R. exoculata* gut epibiosis from Rainbow, then for TAG sites, and finally a recent and common expansion at Logatchev and Ashadze sites.

The resident species diversity was rather homogeneous across these three last sites, despite the physical barriers such as distance, depth and contrasted geochemical conditions prevailing in the MAR sites. The phylogeography of the host based on mitochondrial genes (Petersen *et al.*, 2010; Texeira *et al.*, 2011) revealed no site-segregation of the animals suggesting significant recurrent or recent gene flow among the *R. exoculata* populations over vast geographic distances and a very recent history of divergence. Yet in Rainbow, the pattern of divergence at the haplotype level contrasts with that of the hosts. This suggests either the influence of selective processes specific to the microbial community, or the influence of recent demographic events or barriers gene flow having already impacted the microbial genome while the host one would not bear their signature due to difference in life span, population sizes and resulting evolutionary kinetic. Such difference may be due to a demographic event having differently affected host and epibiont populations at Rainbow, a recent expansion of populations at Rainbow, or the existence of physical and chemical factors affecting the epibiont distribution and evolution. One physical factor could be the Rainbow site location on the MAR Azorean segment and on the internal side of a nodal basin (Fig.S7). This area could be partially protected from deep-oceanic currents and the Azores archipelago proximity could generate convection movements in the deep-oceanic water flows (Wolanski and Hamner, 1988) creating a physically and biologically isolated area. The unique geochemical conditions prevailing in Rainbow could be a factor affecting the epibiont subspecies diversity. Rainbow is also the shallowest site (less than 3000 m depth), the abyssal regions are considered beyond 3000 m depth, and associated changes in physical parameters might also constitute a biological barrier (Priede *et al.*, 2006).

In order to complete this study, other sites should be explored to construct the shrimp and its epibionts evolutionary and expansion history that seems to be more ancient at Rainbow, the northern part of the known shrimp expansion. In order to improve the understanding of the shrimp life cycle, an effort to collect larvae should be done. Pyrosequencing approaches may also allow a better screening for possible free-living forms of the gut-resident epibionts (*Deferribacteres* and *Mollicutes*) and a metagenomic approach is in progress to study roles and functions of these uncultivated epibiont communities. Finally single cell sequencing could be performed to identify the long filamentous epibionts.

Supplementary information is available at *The ISME Journal* website.

Acknowledgements

We thank Isabel Le Disquet and the Service de Microscopie Electronique (IFR 83 – CNRS/Paris VI) for SEM and TEM micrographs. Thanks to “Plateforme Biogenouest” for sequencing work. We thank all the chief scientists, Captains, crews and submersible teams of the oceanographic cruises for their efficiency. Finally we are indebted to several colleagues for helpful comments and suggestions, in particular Pr M.A. Sélosse, Pr D. Prieur and Dr P. Compère. This work was supported by Ifremer, Région Bretagne, GDR ECCHIS and ANR DEEPOASES.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925.
- Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., *et al.* (2008) Identification of the Weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biol.* **6**:43.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* **198**:149-168.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., Sykes, B.C. and Richards, M.B. (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* **141**:743-753.
- Bent, S.J., and Forney, L.J. (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME J.* **2**:689-695.
- Brazelton, W.J., Ludwig, K.A., Sogin, M.L., Andreishcheva, E.N., Kelley, D.S, Shen, C.-C., *et al.* (2010) Archaea and Bacteria with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(4):1612-1617.
- Campbell, B.J., Summers Engel, A., Porter, M.L. and Takaï, K. (2006) The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature* **4**:458-468.
- Casanova, B., Brunet, M., and Segonzac, M. (1993) L'impact d'une épibiose bactérienne sur la morphologie fonctionnelle des crevettes associées à l'hydrothermalisme médio-Atlantique. *Cah. Biol. Mar.* **34**:573-588.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Douville, E., Jean-Baptiste, P., Radford-Knoery, J., Fouquet, Y., *et al.* (2000) Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37°50'N) and Lucky Strike (37°17'N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Chem. Geol.* **171**:49-75.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P. and Holm, N. (2002) Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chem. Geol.* **191**:345-359.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Konn, C., Ondreas, H., Jean-Baptiste, P., Fourre, E. and Fouquet, Y. (2010) High Production and fluxes of H₂ and CH₄ and evidence of abiotic hydrocarbon synthesis by serpentinization in ultramafic-hosted hydrothermal systems on the Mid-Atlantic Ridge. *AGU Monograph Ser.* pp.265-296.

- Cohan, F.M. (2004) Concepts of bacterial biodiversity for the age of genomics. In: C.M. Fraser, T. Read, and K.E. Nelson (ed). *Microbial Genomes*. Humana Press: Totowa, pp 175-194.
- Colaço, A., Dehairs, F. and Desbruyères, D. (2002) Nutritional relations of deep-sea hydrothermal fields at the Mid-Atlantic Ridge: a stable isotope approach. *Deep-sea Res. Pt I* **49**:395-412.
- Corbari, L., Cambon-Bonavita, M.-A., Long, G.J., Zbinden M., Gaill, F. and Compère P. (2008a) Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences* **5**: 1295-1310.
- Corbari, L., Zbinden, M., Cambon-Bonavita, M.-A., Gaill, F. and Compère, P. (2008b) Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat. Biol.* **1**:225-238.
- Cuthbertson, B.J., Deterding, L.J., Williams, J.G., Tomer, K.B., Etienne, K., Blackshear, P.J., et al. (2008) Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev. Comp. Immunol.* **32**(3):167-181.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., et al. (2009) Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com/>
- Durand, L., Zbinden, M., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B., et al. (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* **71**:291-303.
- Fabri, M.-C., Bargain, A., Briand, P., Gebruk, A., Fouquet, Y., Morineaux, M., et al. (2011) The hydrothermal vent community of a new deep-sea field, Ashadze-1, 12°58'N on the Mid-Atlantic Ridge. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **91**(1):1-13.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.* **30**:783-791.
- Flores, G.E., Campbell, J.H., Kirshtein, J.D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J.I., et al. (2011) Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Env. Microbiol.* **13**:no. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02463.x.
- Fouquet, Y., Cherkashov, G., Charlou, J.L., Ondréas, H., Birot, D., Cannat, M., et al. (2008) Serpentine cruise – ultramafic hosted hydrothermal deposits on the Mid-Atlantic Ridge : First submersible studies on Ashadze 1 and 2, Logatchev 2 and Krasnov vent fields. *InterRidge News* **17**:15-19.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny: *CABIOS* **12**:543-548.

- Gebruk, A.V., Southward, E.C., Kennedy, H., and Southward, A.J. (2000) Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **80**:485-499.
- Gonzalez, P. and Labarère, J. (1998) Sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6, and V9 domains reveal highly species-specific variations within the genus *Agrocybe*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**(11):4149-4160.
- Green, A.C., Patel, B.K.C. and Sheeny, A.J. (1997) *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **47**(2): 505-509.
- Guindon, S. and Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**(5):696-704.
- Hasegawa, M., Kishino, K. and Yano, T. (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**:160-174.
- Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G. and Nardon, P. (1998) Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G+C content of an endocytobiotic DNA. *J. Mol. Evol.* **47**:52-61.
- Hügler, M., Gärtner, A. and Imhoff, J.F. (2010) Functional genes as markers for sulfur cycling and CO₂ fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:526-537.
- Hügler, M., Petersen, G., Dubilier, N., Imhoff, J. and Sievert, S.M. (2011) Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS One* **6**(1):e16018. doi:10.1371/journal.pone.0016018.
- Hurst, L.D. and Merchant, A.R. (2001) High guanine-cytosine content is not an adaptation to high temperature: a comparative analysis amongst prokaryotes. *Proc. Biol. Sci.* **268**(1466):493-497.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro H.N. (ed) *Mammalian protein metabolism, III*. New York: Academic Press, pp 21-132.
- Kelley, D.S., Karson, J.A., Blackman, D.K., Früh-Green, G.L., Butterfield, D.A., Lilley, M.D., et al. (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 degrees N. *Nature* **412**:145-149.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.
- Komai, T. and Segonzac, M. (2008) Taxonomic review of the hydrothermal vent shrimp genera *Rimicaris* Williams & Rona and *Chorocaris* Martin & Hessler (Crustacea: Decapoda: Caridea: Alvinocarididea). *J. Shellfish Res.* **27**(1):21-41.

López-García, P., Philippe, H., Gaill, F. and Moreira, D. (2003) Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:697-702.

Miroshnichenko, M.L., Slobodkin, A.I., Kostrikina, N.A., L'Haridon, S., Nercessian, O., Spring, S., *et al.* (2003) *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **5**: 1637-1641.

Nardon, P. (1999) Symbiosis as an example of an acquired character: neolamarckism of neodarwinism? *Bull. Soc. Zool. France* **124**:39-52.

Petersen, J.M., Ramette, A., Lott, C., Cambon-Bonavita, M.-A., Zbinden, M. and Dubilier, N. (2010) Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous *Gamma*- and *Epsilonproteobacteria* at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ. Microbiol.* **12**(8):2204-2218.

Polz, M., and Cavanaugh, C. (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:7232-7236.

Polz, M., Robinson, J.J., Cavanaugh, C., and Van Dover, C.L. (1998) Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol. Oceanogr.* **43**:1631-1638.

Pond, D., Dixon, D., and Sargent, J. (1997) Wax-ester reserves facilitate dispersal of hydrothermal vent shrimps. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **146**:289–290.

Pond, D.W., Gebruk, A., Southward, E.C., Southward, A.J., Fallick, A.E., Bell, M.V., *et al.* (2000) Unusual fatty acid composition of storage lipids in the bresilioid shrimp *Rimicaris exoculata* couples the photic zone with MAR hydrothermal vent sites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **198**:171–179.

Posada, D. and Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**(9):817-818.

Priede, I.G., Froese, R., Bailey, D.M., Bergstad, O.A., Collins; M.A., Dyb, J.E., *et al.* (2006) The absence of sharks from abyssal regions of the world's oceans. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* **273**:1435-1441.

Quince, C., Curtis, T.P., and Sloan, W.T. (2008) The rational exploration of microbial diversity. *The ISME J.* **2**:997-1006.

Ravaux, J., Cottin, D., Chertemps, T., Hamel, G. and Shillito, B. (2009) Hydrothermal vent shrimps display low expression of the heat-inducible *hsp70* gene in nature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **396**:153-156.

Roussel, E.G., Konn, C., Charlou, J.L., Donval, J.P., Fouquet, Y., Querellou, J., *et al.* (2011) Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* "Accepted article" doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01161.x.

- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Schmidt, K., Koschinsky, A., Garbe-Schonberg, D., de Carvalho, L.M. and Seifert, R. (2007) Geochemistry of hydrothermal fluids, 15 degrees N on the Mid-Atlantic Ridge: temporal and spatial investigation. *Chem. Geol.* **242**:1-21.
- Schmidt, C., Vuillemin, R., Le Gall, C., Gaill, F. and Le Bris, N. (2008) Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Mar. Chem.* **108**:18-31.
- Segonzac, M., de Saint Laurent, M. and Casanova, B. (1993) L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-Atlantique. *Cah. Biol. Mar.* **34**:535-571.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., *et al.* (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(32):12115-12120.
- Takaï, K., Kobayashi, H., Nealson, K.H. and Horikoshi, K. (2003) *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulphur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolate from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(3):839-846.
- Teixeira, S., Cambon-Bonavita, M.A., Serrão, E.A., Desbruyères, D. and Arnaud-Haond, S. (2011) Recent population expansion and connectivity in the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* along the Mid-Atlantic Ridge. *J. Biogeography* **38**:564-574.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Ac. Res.* **22**:4673-4680.
- Van Dover, C.L., Fry, B., Grassle, J.F., Humphris, S. and Rona, P.A. (1988) Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Biol.* **98**:209-216.
- Voordeckers, J.W., Do, M.H., Hügler, M., Ro, V., Sievert, S.M. and Vetriani, C. (2008) Culture dependant and independent analyses of 16S rRNA and ATP citrate lyase genes: a comparison of microbial communities from different black smoker chimneys on the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles* **12**:627-640.
- Watabe, H. and Hashimoto, J. (2002) A new species of the genus *Rimicaris* (Alvinocarididae: Caridea: Decapoda) from the active hydrothermal vent field, 'Kaiei Field', on the Central Indian Ridge, Indian Ocean. *Zool. Sci.* **19**:1167-1174.
- Williams, A.B., and Rona, P.A. (1986) Two new caridean shrimps (bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *J. Crust. Biol.* **6**:446-462.
- Wolanski, E. and Hamner, M. (1988) Topographically controlled fronts in the ocean and their biological influence. *Science* **241**(4862):177-181.

Zbinden, M., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2003) Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**:23-30.

Zbinden, M., Le Bris, N., Gaill, F. and Compere, P. (2004) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **284**:237-251.

Zbinden, M., Shillito B., Le Bris N., De Villardi de Montlaur C., Roussel E., Guyot F., *et al.* (2008) New insights in metabolic diversity among the epibiotic microbial communities of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **359**:131-140.

Zilber-Rosenberg, I and Rosenberg, E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:723-735.

Titles and legends to tables and figures

Titles and legends to tables

Table 1 - Distribution of the bacterial 16S rRNA gene and transcribed 16S rRNA clones associated with the reference shrimps and the environment at the four hydrothermal sites studied.

Titles and legends to supplementary tables

Table S1 - Detail of specimens and environmental samples per hydrothermal site.

Table S2 - Closest match of representative 16S rRNA gene clone sequences

Table S3 - Diversity of the V6 domain of the 16S rRNA gene: number of *Deferribacteres* and *Mollicutes* clone sequences analysed by site origin of *R. exoculata* specimens. Sequences obtained earlier on Rainbow specimens (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003) were added to the Rainbow data set (they are notified in brackets).

Titles and legends to figures

Fig.1 – **a**, location of the four hydrothermal vent sites studied along the Mid-Atlantic Ridge (modified from Roussel *et al.*, 2011). **b**, *R. exoculata* midgut epibionts on Rainbow (A), Logatchev (B) and Ashadzé (C) specimens observed in transmission electron microscopy (1), scanning electron microscopy (2) and epifluorescence (3). In blue, the shrimp epithelial cells nuclei (DAPI-stained DNA). In red, the filamentous epibionts hybridized with the *Eubacteria*-specific probe Eub338 (Cy3-labelled).

Fig.2 – Phylogenetic tree of the *Epsilonproteobacteria* 16S rRNA gene calculated on 397 bp, with the neighbor-joining method, the JC model (Jukes and Cantor, 1969) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow gut (R) in red, Rainbow seawater (RSw) in purple, Rainbow orange chimney (RS1) in orange, Rainbow black chimney (RS2) in light brown, TAG gut (T) in dark green, TAG seawater (Tsw) in turquoise green, TAG black chimney (TS) in light green, Logatchev gut in blue and Ashadzé gut in grey. The number of clone sequences is in brackets. The gut sequences are underlined.

Fig.3 – Phylogenetic tree of the *Gammaproteobacteria* 16S rRNA gene calculated on 639 bp, with the neighbor-joining method, the JC model (Jukes and Cantor, 1969) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow gut (R) in red, Rainbow seawater (RSw) in purple, Rainbow orange chimney (RS1) in orange, Rainbow black chimney (RS2) in light brown, TAG seawater (Tsw) in turquoise green, TAG black chimney (TS) in light green and Ashadzé gut in grey. The number of clone sequences is in brackets. The gut epibionts sequences are underlined.

Fig.4 – a, phylogenetic tree of the *Deferribacteres* 16S rRNA gene calculated on 696 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green, Logatchev in blue and Ashadzé in grey. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster. **b**, networks representing the evolutionary relationships of the 16S rRNA gene between the *Deferribacteres*-related gut epibionts according to the site origin of the host, constructed using the median-joining method applied on (A) 69 sequences of 695 bp length and (B) 96 sequences of 303 bp length.

Fig.5 – a, phylogenetic tree of the *Mollicutes* 16S rRNA gene calculated for a length of 762 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green and Logatchev in blue. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster. **b**, network representing the evolutionary relationships of the 16S rRNA gene between the *Mollicutes* gut epibionts according to the site origin, constructed using the median-joining method applied on (A) 30 sequences of 491 bp length and (B) 18 sequences of 762 bp length.

Titles and legends to supplementary figures

Fig.S1 – *R. exoculata* midgut epibionts of a TAG specimen hybridized with the eubacterial probe Eub338 (Cy5-labelled) observed in epifluorescence. In blue, the shrimp epithelial cells nuclei (DAPI-stained DNA). In red, the filamentous epibionts.

Fig.S2 – Phylogenetic tree of the *Epsilonproteobacteria* 16S rRNA gene calculated on 397 bp, with the neighbor-joining method, the JC model (Jukes and Cantor, 1969) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow gut (R) in red, Rainbow seawater (RSw) in purple, Rainbow orange chimney (RS1) in orange, Rainbow black chimney (RS2) in light brown, TAG gut (T) in dark green, TAG seawater (Tsw) in turquoise green, TAG black chimney (TS) in light green, Logatchev gut in blue and Ashadzé gut in grey. The number of clone sequences is in brackets. The gut sequences are underlined.

Fig.S3 –Phylogenetic tree of the *Deferribacteres* 16S rRNA (a) calculated for a length of 785 bp and the *Mollicutes* 16S rRNA (b) calculated for a length of 783 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red and Ashadzé in grey.

Fig.S4 – a, phylogenetic tree of the *Deferribacteres* V6 domain of the 16S rRNA gene calculated with the neighbor-joining method, the K2P model (Kimura, 1980) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green, Logatchev in blue and Ashadzé in grey. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster. b, alignment of the V6 domain of the *Deferribacteres* 16S rRNA gene representing all the haplotype profiles of the gut epibionts and some of the described species. The variable positions in the sequences within the OTU represented by the *R. exoculata* gut epibionts are labelled by narrow heads.

Fig.S5 – a, phylogenetic tree of the *Mollicutes* V6 domain of the 16S rRNA gene calculated with the neighbor-joining method, the K2P model (Kimura, 1980) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green and Logatchev in blue. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster. b, alignment of the V6 domain of the *Mollicutes* 16S rRNA gene representing all the haplotype profiles of the *R. exoculata* gut epibionts and some of the described species or clones. The name of the haplotypes and the number of sequences are notified in brackets.

Fig.S6 – Hydrothermal site Logatchev Irina II. a, general view of the vent (V) edifice covered by mussel (M) beds and the closely associated shrimp (S) aggregates. b, detail showing the location of the shrimps just beside the mussel bed.

Fig.S7 – Location and structure of the Rainbow ultramafic-hosted vent site. A, topology of the Azorean segment of the Mid-Atlantic Ridge showing the nine islands of the Azores Archipelago (from NE to SW: Flores, Corva, Faial, Pico, São Jorge, Graciosa, Terceira, São Miguel, São Maria) and B, representation of the relief of the surroundings of the Rainbow site.

Figures

Fig.1 – a, location of the four hydrothermal vent sites studied along the Mid-Atlantic Ridge (modified from Roussel et al., 2011). b, *R. exoculata* midgut epibionts on Rainbow (A), Logatchev (B) and Ashadze (C) specimens observed in transmission electron microscopy (1), scanning electron microscopy (2) and epifluorescence (3). In blue, the shrimp epithelial cells nuclei (DAPI-stained DNA). In red, the filamentous epibionts hybridized with the *Eubacteria*-specific probe Eub338 (Cy3-labelled).

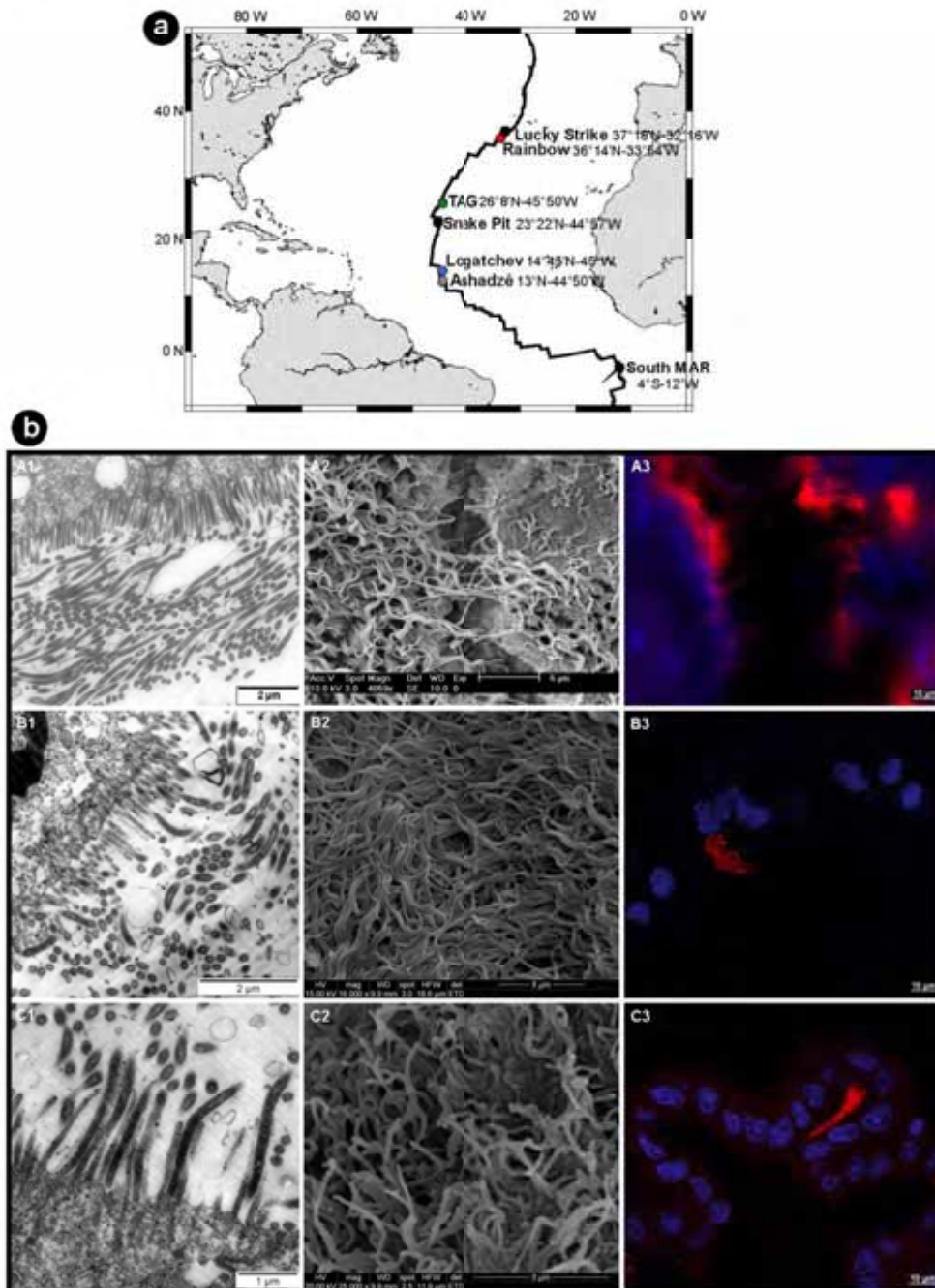


Fig.3 – Phylogenetic tree of the *Gammaproteobacteria* 16S rRNA gene calculated on 639 bp, with the neighbor-joining method, the JC model (Jukes and Cantor, 1969) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow gut (R) in red, Rainbow seawater (RSw) in purple, Rainbow orange chimney (RS1) in orange, Rainbow black chimney (RS2) in light brown, TAG seawater (Tsw) in turquoise green, TAG black chimney (TS) in light green and Ashadzé gut in grey. The number of clone sequences is in brackets. The gut epibionts sequences are underlined.

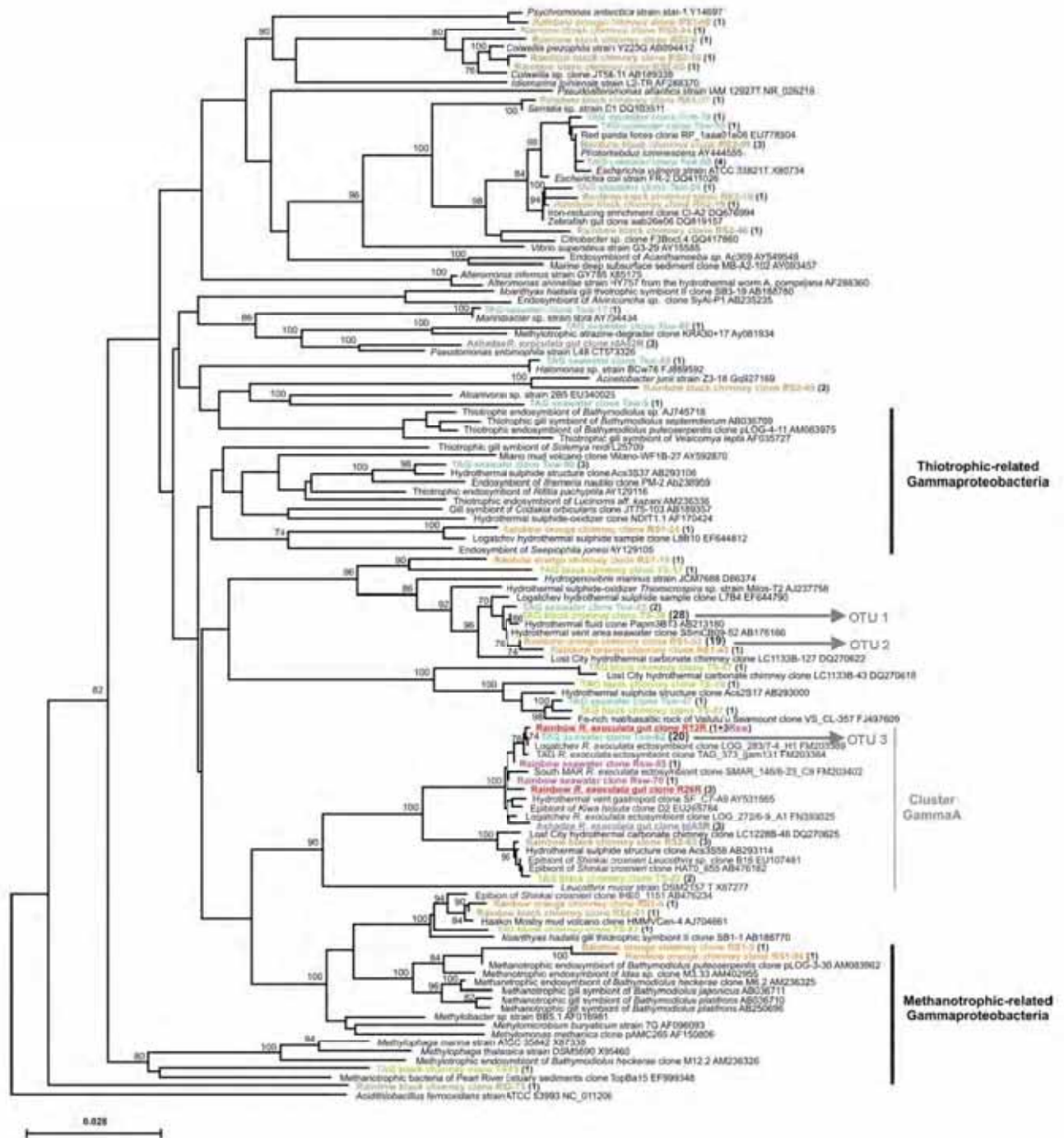
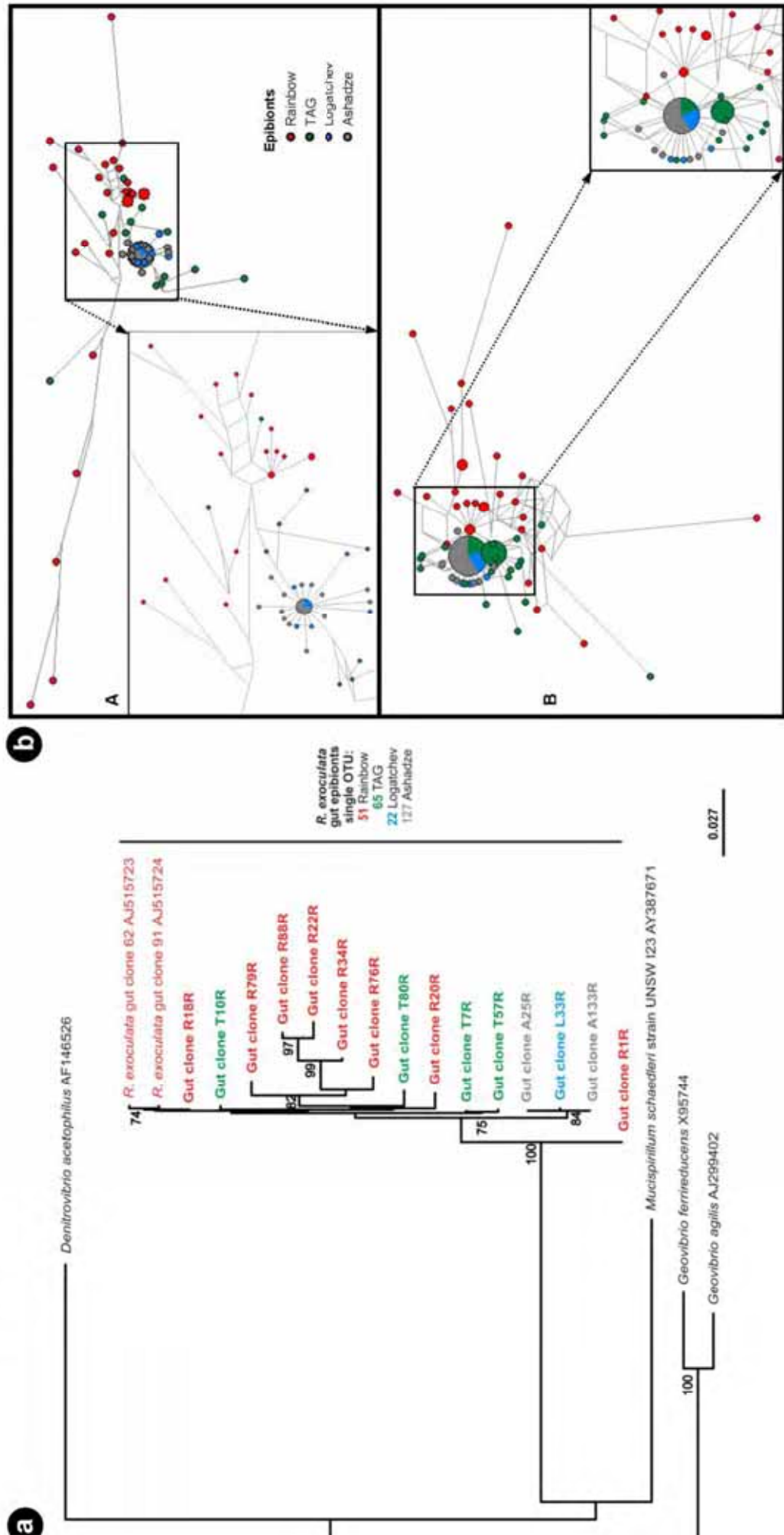


Fig.4 – a, phylogenetic tree of the *Deferribacteres* 16S rRNA gene calculated on 696 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green, Logatchev in blue and Ashadze in grey. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster. **b**, networks representing the evolutionary relationships of the 16S rRNA gene between the *Deferribacteres*-related gut epibionts according to the site origin of the host, constructed using the median-joining method applied on (A) 69 sequences of 695 bp length and (B) 96 sequences of 303 bp length.



Tables

Table 1 - Distribution of the bacterial 16S rRNA gene and transcribed 16S rRNA clones associated with the reference shrimps and the environment at the four hydrothermal sites studied.

Phylogenetic groups	Number of clones									Total
	Reference <i>R. exoculata</i> specimens				Environmental samples					
	Rainbow	TAG	Logatchev	Ashadze	Rainbow seawater	Rainbow orange chimney	Rainbow black chimney	TAG seawater	TAG chimney	
<i>Deferribacteres</i>	137 RNA 51 DNA	65	22	127 DNA	0	0	0	0	0	406
<i>Mollicutes</i>	12 RNA 10 DNA	5	29	40 RNA 0 DNA	0	0	0	0	0	96
<i>Epsilonproteobacteria</i>	22 RNA 7 DNA	2	10	3 RNA 69 DNA	50	46	35	26	22	292
<i>Gammaproteobacteria</i>	0 RNA 4 DNA	0	0	6 RNA 0 DNA	5	22	18	38	36	129
<i>Alphaproteobacteria</i>	0 RNA 0 DNA	0	0	0 RNA 0 DNA	0	5	10	5	17	37
<i>Deltaproteobacteria</i>	1 RNA 0 DNA	0	2	10 RNA 0 DNA	1	1	8	3	2	28
<i>Betaproteobacteria</i>	0 RNA 0 DNA	0	0	2 RNA 0 DNA	0	0	6	4	0	12
<i>Zetaproteobacteria</i>	0 RNA 0 DNA	0	0	0 RNA 0 DNA	0	0	2	2	0	4
<i>CFB</i>	5 RNA 2 DNA	1	0	1 RNA 0 DNA	4	5	3	4	5	30
<i>Verrucomicrobiae</i>	0 RNA 0 DNA	5	1	0 RNA 0 DNA	0	0	0	0	1	7
<i>Firmicutes</i>	0 RNA 1 DNA	1	0	0 RNA 0 DNA	0	0	1	0	0	3
<i>Actinobacteriae</i>	0 RNA 0 DNA	0	0	2 RNA 0 DNA	0	0	0	0	0	2
<i>Thermodesulfobacteres</i>	0 RNA 0 DNA	0	0	0 RNA 0 DNA	0	3	1	0	0	4
<i>Aquificales</i>	0 RNA 0 DNA	0	0	0 RNA 0 DNA	0	1	2	0	0	3
Unaffiliated	0 RNA 0 DNA	0	0	2 RNA 0 DNA	0	3	0	3	0	8
Total	252	79	64	266	60	86	86	85	83	1061

Supplementary figures

Fig.S1 – *R. exoculata* midgut epibionts of a TAG specimen hybridized with the eubacterial probe Eub338 (Cy5-labelled) observed in epifluorescence. In blue, the shrimp epithelial cells nuclei (DAPI-stained DNA). In red, the filamentous epibionts.

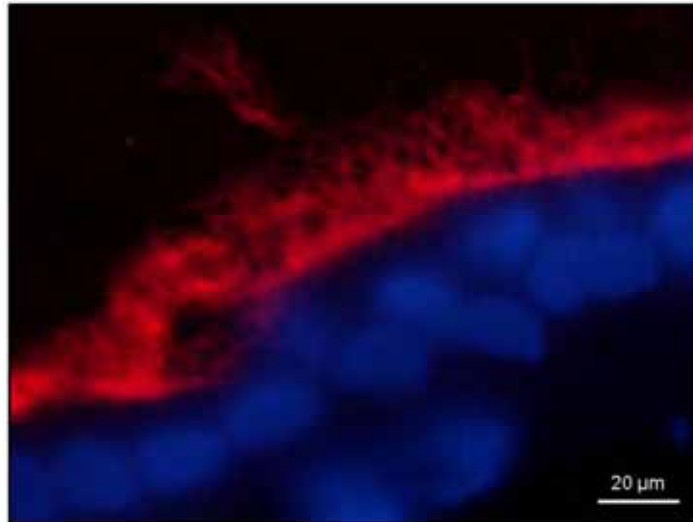


Fig.S2 – Phylogenetic tree of the *Epsilonproteobacteria* 16S rRNA gene calculated on 397 bp, with the neighbor-joining method, the JC model (Jukes and Cantor, 1969) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow gut (R) in red, Rainbow seawater (RSw) in purple, Rainbow orange chimney (RS1) in orange, Rainbow black chimney (RS2) in light brown, TAG gut (T) in dark green, TAG seawater (Tsw) in turquoise green, TAG black chimney (TS) in light green, Logatchev gut in blue and Ashadze gut in grey. The number of clone sequences is in brackets. The gut sequences are underlined.



Fig.S3 –Phylogenetic tree of the *Deferribacteres* 16S rRNA (a) calculated for a length of 785 bp and the *Mollicutes* 16S rRNA (b) calculated for a length of 783 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red and Ashadzé in grey.

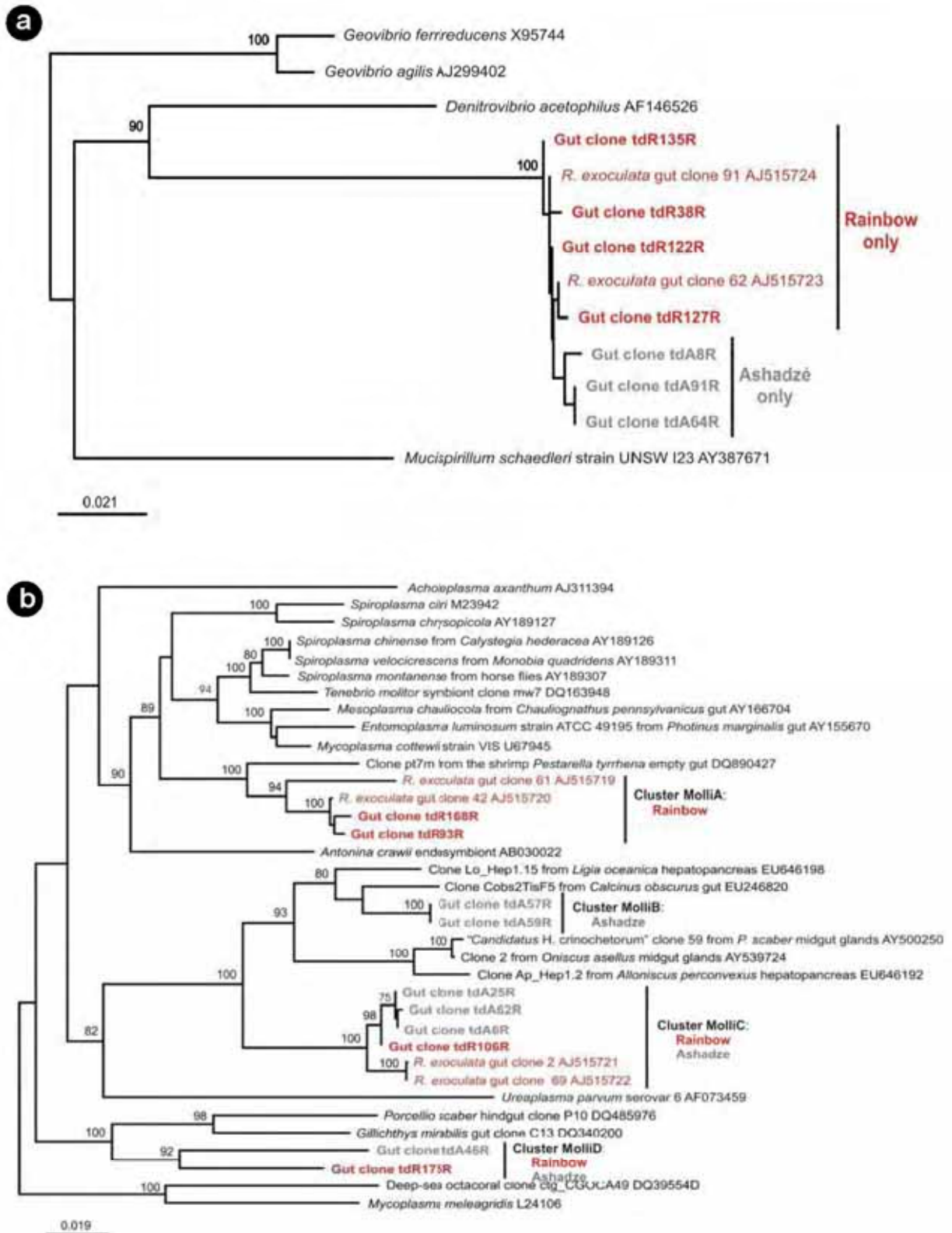


Fig.S4 – a, phylogenetic tree of the *Deferribacteres* V6 domain of the 16S rRNA gene calculated with the neighbor-joining method, the K2P model (Kimura, 1980) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green, Logatchev in blue and Ashadze in grey. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster. b, alignment of the V6 domain of the *Deferribacteres* 16S rRNA gene representing all the haplotype profiles of the gut epibionts and some of the described species. The variable positions in the sequences within the OTU represented by the *R. exoculata* gut epibionts are labelled by narrow heads.

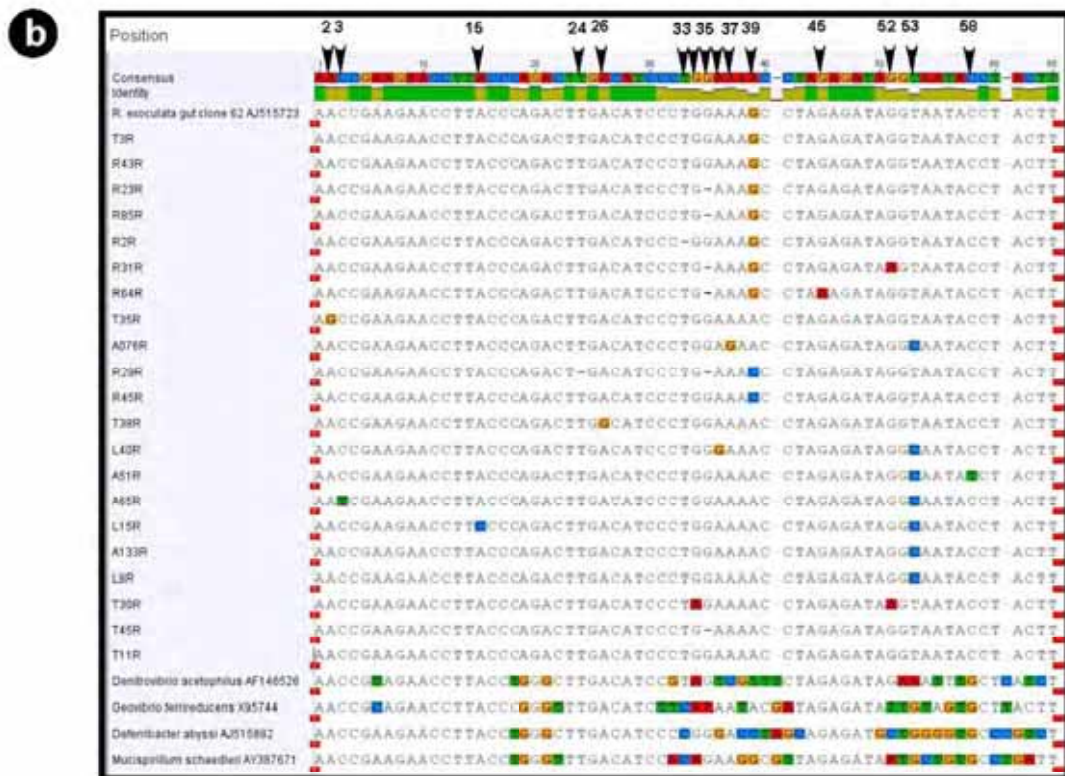
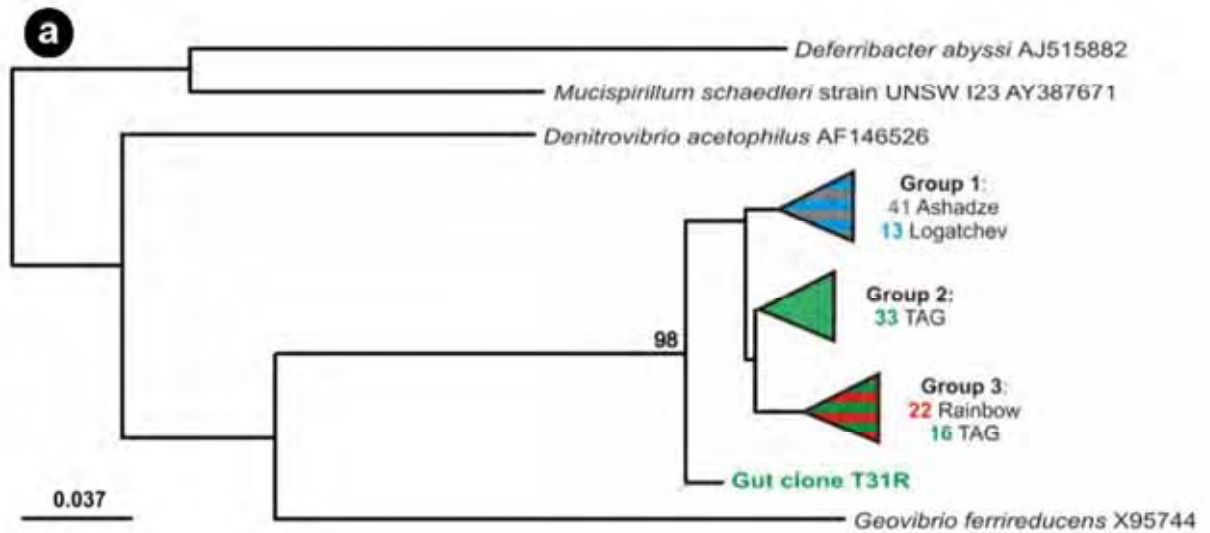


Fig.S6 – Hydrothermal site Logatchev Irina II. **a**, general view of the vent (V) edifice covered by mussel (M) beds and the closely associated shrimp (S) aggregates. **b**, detail showing the location of the shrimps just beside the mussel bed.

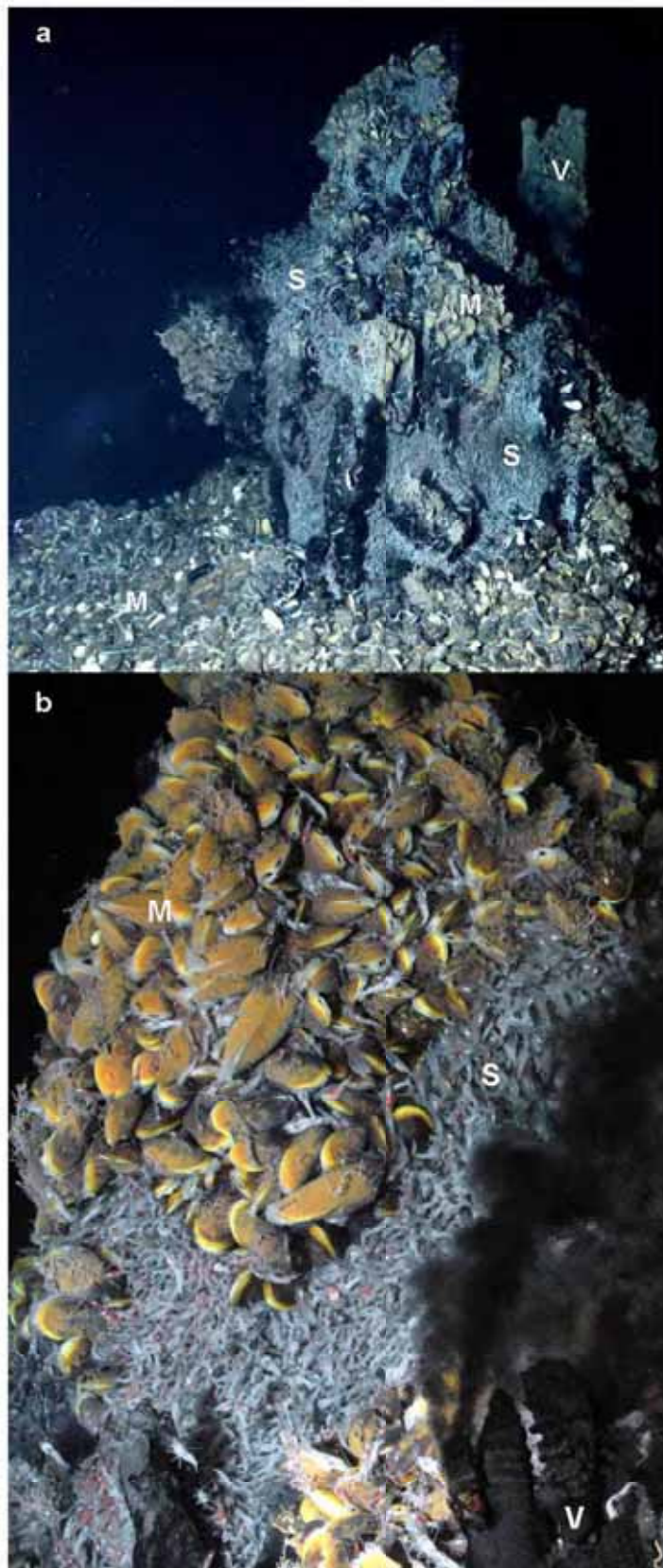
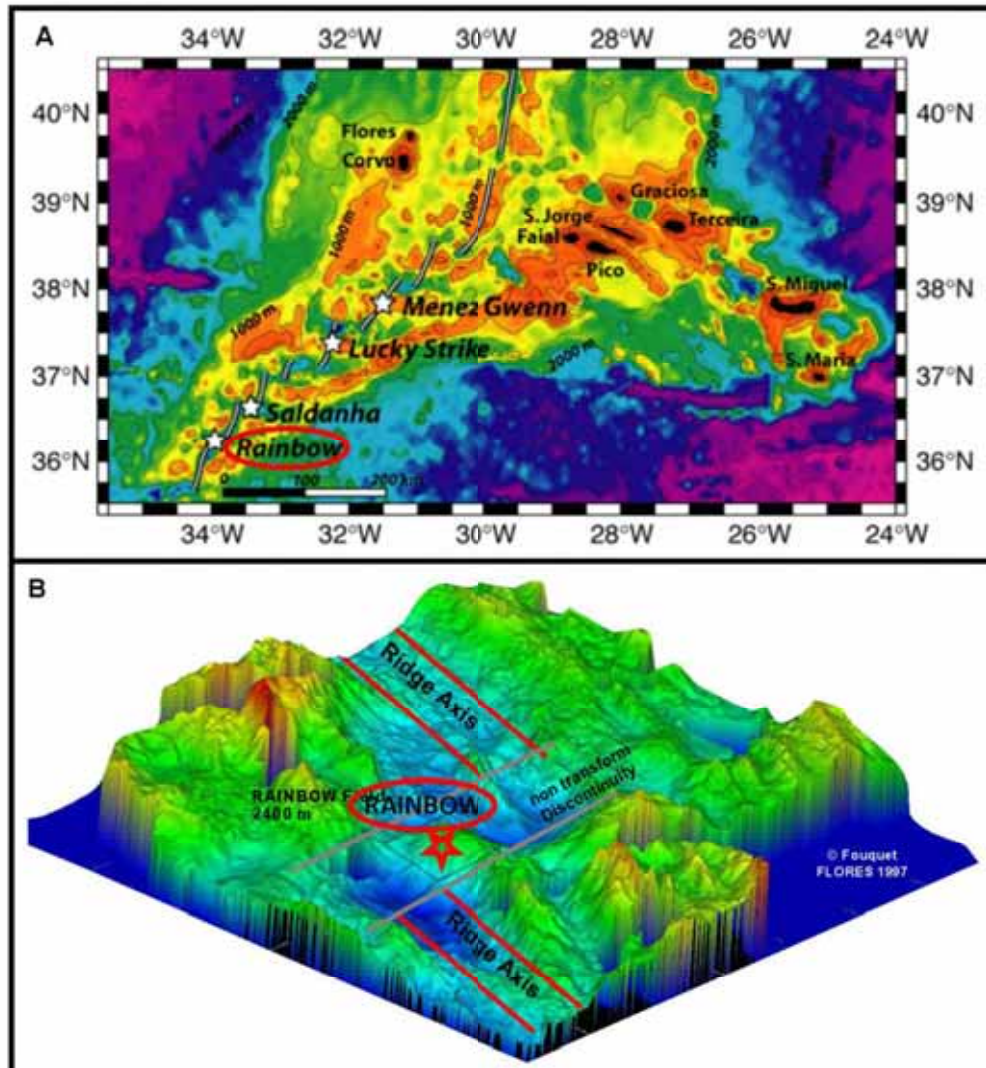


Fig.S7 – Location and structure of the Rainbow ultramafic-hosted vent site. A, topology of the Azorean segment of the Mid-Atlantic Ridge showing the nine islands of the Azores Archipelago (from NE to SW: Flores, Corva, Faial, Pico, São Jorge, Graciosa, Terceira, São Miguel, São Maria) and B, representation of the relief of the surroundings of the Rainbow site.



Supplementary tables

Table S1 - Detail of specimens and environmental samples per hydrothermal site.

Sites	Samples	DNA	RNA	SEM	TEM	FISH
Rainbow	gut	2	1	1	2	2
	seawater	1	-	-	-	-
	orange chimney RS1	1	-	-	-	-
	black chimney RS2	1	-	-	-	-
TAG	gut	1	-	1	1	1
	seawater	1	-	-	-	-
	black chimney	1	-	-	-	-
Logatchev	gut	1	-	1	2	2
Ashadze	gut	1	1	1	1	1

Table S2 - Closest match of representative 16S rRNA gene clone sequences

Phylogenetic group	Representative clone sequences	First hit of BLAST (accession no.)	Similarity (%)	No. of clones	
<i>Deferribacteres</i>	tdR135R, tdr38R, tdr122R, tdr127r, tdA8R, tdA91R, tdA64R, A133R, A076R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone 91 (AJ515724)	95-99	137+4+21	
	R18R, R88R, R22R, R34R, R76R, R20R, R1R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone R28SW (FM863731)	94-100	51	
	T10R, T80R	TAG <i>R. exoculata</i> gut clone T44sul (FM863732)	98-99	26	
	T7R, T57R, L33R, A25R	TAG <i>R. exoculata</i> gut clone T1Fe (FM863733)	99	39+22+80	
	A51R, A65R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone R49Sul (FM863730)	99	26	
	<i>Mollicutes</i>	tdR168R, tdr93R, tdr175R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone 42 (AJ515720)	87-99	9
		tdR106R, T26R, T59R, T31R, tdA25R, tdA62R, tdA6R	Logatchev environmental clone aC4 (FN562893)	98-99	3+3+34
		R9R, R19R, R42R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone R2R (FM881775)	98-99	6
		R46R, R38R, R2R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone R67SW (FM863774)	98	4
		T27R, T6R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone R49LS (FM863736)	99	2
		L15xR, tdA57R, tdA59R	Yellow catfish <i>P. fulvidraco</i> stomach content clone SC38 (GU293201)	93-94	2+3
		L36R, L41R, L7R, L30R	TAG <i>R. exoculata</i> gut clone T8SW (FM863737)	99	27
		tdA46R	Prawn <i>N. norvegicus</i> gut-clone So3-204 (GC866067)	87	3
<i>Epsilonproteobacteria</i>		tdR132R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gut clone 88 (AJ515712)	98	3
		tdR71R	MAR vent organic-rich substrate microcolonizer clone AT-co13 (AY225626)	98	8
		tdR40R	Iron-mat from submarine volcanoes of Kermadec Arc clone CF-13 (FJ535307)	98	9
		tdR108R	Vailulu'u Seamount Fe-rich mat/basaltic rocks clone VS_CL-380 (FJ497632)	97	2
		R28R	Rainbow <i>R. exoculata</i> gill chamber epibionts clone LB16S08 (AM902731)	99	1
	R30R, tdA73R, tdA44R	Logatchev <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone LOG272/6-9_P2C1 (FM203396)	93-99	1+3	
	R3R, Rsw-43	Rainbow <i>R. exoculata</i> gill chamber epibionts clone LBI7 (AM412509)	98-99	1+8	
	R16R, Rsw-55	Rainbow <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone R_c18_eps2 (FM203406)	97-99	1+29	
	R48R	Ventral setae epibiont of <i>S. crosnieri</i> hydrothermal crab clone HATO_544 (AB476174)	95	2	
	T40R, Tsw-5	Snake Pit <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone Epsilon S2-16 (FN658696)	97-98	1+4	
	L40pR, L10R, L9R, RS1-46	Logatchev environmental clone bH8 (FN562857)	97-98	4+4	
	L8xR	Northern Bering Sea sediment clone 090G6 (EU925883)	99	1	
	L12R	Hydrothermal amphipod <i>V. sulfuris</i> tissue clone e34 (FN429840)	99	1	
L16R	Siliclastic sediment from Thalassia sea grass bed clone CK_1C4_9 (EU488101)	96	1		
L46R	Biofilm at vent orifice of Kermadec Arc clone MS12-1-G08 (AM712341)	99	1		
L11xR	Hydrothermal gastropod <i>C. squamiferum</i> clone SF_C23-C6 (AY531602)	98	1		
A147R, RS1-27, RS1-85	Logatchev environmental clone aF2 (FN562871)	97-99	1+2		
A26R	Logatchev <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone LOG284/7-4_F1 (FM203395)	99	1		
A021R, Rsw-9	Logatchev fluids clone IIB78 (AM268746)	98	9+1		
A006R	Mothra hydrothermal field (Juan de Fuca Ridge) chimney clone Ba54 (FJ640823)	97	57		
A61R	Tube of <i>Lamellibrachia</i> sp. from cold seep clone V2tb2 (FM165251)	98	1+1		
Rsw-4	Rainbow <i>R. exoculata</i> gill chamber epibionts clone LBI26 (AM412516)	98	8		

Rsw-8	Rainbow <i>R. exoculata</i> gill chamber epibiots clone SCALI15 (AM412513)	99	2
Rsw-60	Rainbow chimney clone ATOS Iris7 Rainbow 26 (AJ969489)	99	2
RS1-61	Logatchev environmental clone bc9 (FN562855)	99	4
RS1-63	MAR vent organic-rich substrate microcolonizer clone AT-co16 (AY225617)	99	4
RS1-65, RS2-52, RS2-22	MAR vent clone VC1.2-cl26 (AF367490)	99	1+2
RS1-33, RS2-74	Logatchev environmental clone aD1 (FN562836)	99	9+6
RS1-32, RS2-36	Vailulu'u Seamount Fe-rich mat/basaltic rocks clone VS_CL-179 (FJ497628)	98	1+1
RS1-60	MAR vent clone VC1.2-cl8 (AF367488)	94	1
RS1-52	Lost City carbonate chimney clone SGYF445 (FJ792210)	93	1
RS1-51	Lost City carbonate chimney clone SGYF664 (FJ792393)	94	1
RS1-44	Lake profundal sediment clone c5LK55 (AM086106)	97	1
RS1-80, RS1-59	Dudley hydrothermal vent (Juan de Fuca Ridge) clone 413285 (EU555136)	94-98	13
RS1-25	Snake Pit <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone Epsilon S1-17 (FN658698)	85	1
RS1-13	Yellow Sea sediment clone A8S-53 (EU652648)	94	1
RS2-20	Ventral setae epibiont of <i>S. crosnieri</i> hydrothermal crab clone 1208 (AB440163)	99	8+1 RS1
RS2-50	MAR vent iron-rich substrate microcolonizer clone AT-cs3 (AY225614)	99	1
RS2-72	Logatchev environmental clone aB3 (FN562858)	99	1+1RWARN
RS2-44	Logatchev environmental clone aH6 (FN562867)	99	1
RS2-76	Rainbow sulphide sample clone RMB4 (EF644836)	99	1
RS2-26	Rainbow sulphide sample clone RMB1 (EF644833)	99	1
RS2-17	Hydrothermal worm <i>A. pompejana</i> epibiont <i>Sulfurospirillum</i> sp. Am-N (AF357198)	98	1
RS2-64, RS2-53	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> DSM16294 from hydrothermal sediment (CP002205)	98	5
RS2-62	Lost City carbonate chimney clone SGYF599 (FJ792340)	98	1
RS2-2	Lost City carbonate chimney clone SGXT610 (FJ792021)	95	2
RS2-77	Rainbow chimney clone PICO pp37 Rainbow 128 (AJ969452)	99	2
RS2-57, Tsw-79	Iron-mat from submarine volcanoes of Kermadec Arc clone CF-9 (FJ535300)	99	1+3
RS2-92	<i>Caminibacter mediantlanticus</i> strain TB-2 (AY691430)	99	1
Tsw-14	Logatchev environmental clone aH9 (FN562878)	98	2
Tsw-20	Juan de Fuca Ridge hydrothermal fluid clone FS396_454_1000bp_04138 (DQ909330)	98	2
Tsw-30	<i>T. benedii</i> worm from intertidal sediment clone 860M11G#7 (GU197436)	98	7
Tsw-67	Vent cap clone VC2.1 Bac1 (AF068783)	98	1+1 TDTAG
Tsw-77	Microbial mat from Cesspool Cave clone CC1B_16S_67 (EU662338)	97	1
Tsw-73	TAG <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone TAG_373_eps171 (FM203385)	99	4
Tsw-69	Vent cap clone VC2.1 Bac19 (AF068796)	98	1
TS-23	Guaymas Basin hydrothermal sediment isolate a2b009 (AF420348)	98	1
TS-5	Suliyu Seamount hydrothermal vent water clone Sd-EB03 (AB193954)	92	1
TS-16	Dongging Lake sediment clone Shc3-12 (GU208477)	98	1
TS-12	Symbiotic worm <i>O. frankpressi</i> and whale bones clone boneC3F4 (AY548994)	93	1
TS-35	Cold seep sediment from Gulf of Mexico clone GoM161_Bac1 (AM745129)	99	2
TS-41	Vailulu'u Seamount Fe-rich mat/basaltic rocks clone VS_CL-14 (FJ497265)	98	1
TS-40	Deep-sea sediment clone BD2-1 (AB015531)	98	3
TS-37	Vailulu'u Seamount Fe-rich mat/basaltic rocks clone VS_CL-106 (FJ497357)	97	1
TS-58	Lau Basin active hydrothermal field sediment clone 77 (FJ205272)	95	1
TS-53	Deep-sea sediment associated with whale falls clone 33mos_0s_H10 (GQ261779)	100	1
TS-67	Snake Pit <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone Epsilon S2-1 (FN658694)	99	2
TS-90	Pretreatment seawater systems clone SF-July-100 (HM591450)	98	1

TS-99	Siliclastic sediment from Thalassia sea grass bed clone CK_1C2_63 (EU487967)	97	2
TS-85	East Lau Spreading Center hydrothermal sediment clone TGV8BA21 (GQ848422)	98	2
TS-32, RS2-60	East Lau Spreading Center hydrothermal sediment clone TGV11BA11 (GQ848459)	92-99	1+1
TS-11	Iron-oxidizing mat from Chefren mud volcano clone 102B123 (EF687160)	89	1
Tsw-37	Ventral setae epibiont of <i>S. crosnieri</i> hydrothermal crab clone HAT3_417 (AB476195)	96	1
R12R	Rainbow <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone R_c20_gam1 (FM203378)	99	1+3 Rsw
R26R	Rainbow <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone R_c18_B9 (FN393021)	99	3
tdA5R	Logatchev <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone LOG_272/6-9_A1 (FN393025)	97	3
tdA82R	Bovine rumen content clone L102RC-4-G11 (HQ399822)	95	3
Rsw-70, Rsw-85	Rainbow <i>R. exoculata</i> gill chamber epibionts clone SC16536 (AM902727)	97-99	2
RS1-6, RS2-41	Haakon Mosby mud volcano sediment clone HMMVCen-4 (AJ704661)	99	1+1
RS1-5, RS1-94	Logatchev <i>B. puteoserpentis</i> methanotrophic endosymbiont clone pLOG-2-6 (AM083965)	97-99	2
RS1-10	Arctic Ocean water clone Arctic96AD-9 (AF354608)	94	1
RS1-45, RS1-53, Tsw-65	Deep-sea water from hydrothermal vent area clone SSmCB09-52 (AB176166)	98-99	19+2
RS1-24	Logatchev sulphide sample clone L8B10 (EF644812)	98	1
RS1-50	Logatchev sulphide sample clone L7B5 (EF644791)	93	1
RS1-90	Yellow Sea sediment clone A135-75 (EU617815)	96	1
RS2-16, RS2-85	<i>Colwellia piezophila</i> strain Y223G from deep-sea sediment (NR_024805)	98	2
RS2-8	Donana coastal aquifer clone 49S1_1B_55 (DQ837294)	99	1
RS2-19, RS2-70, RS2-99, Tsw-50	<i>Escherichia coli</i> KO11 (CP002516)	99	5+1
RS2-37	<i>Serratia</i> sp. 136-2 from soil (EU557341)	99	1
RS2-34	Deep seawater from the EPR clone EPR4055-N3-Dc63 (EU491928)	98	1
RS2-49	<i>H. sapiens</i> skin clone ncd112e08c1 (JF011316)	99	1
RS2-46	<i>Salmonella enterica</i> strain T000240 (AP011957)	99	1
RS2-63	Hair of hydrothermal crab <i>S. crosnieri</i> epibiont <i>Leucothrix</i> sp. clone B16 (EU107481)	98	3
RS2-75	Blue mud wasp <i>C. californicum</i> abdomen clone SHNU448 (HM110455)	99	1
Tsw-36	Soil aggregate clone BacA_064 (EU335291)	99	1
Tsw-17	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> isolate OC-11 from tropical marine sediment (AY669171)	99	1
Tsw-9	Wadden Sea intertidal sediment clone JSS S04 317 (HQ191049)	91	1
Tsw-40	Enriched seawater polluted by Tunisian crude oil uncultured bacterium (CU915011)	96	1
Tsw-49	Seawater clone 6S232425 (EU804489)	99	1
Tsw-47, TS-87	Vailulu'u Seamount Fe-rich mat/basaltic rocks clone VS_CL-357 (F1497609)	98	1+1
Tsw-56	<i>Shigella boydii</i> strain GTC779 (AB273731)	99	1
Tsw-82	TAG <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone TAG_366_gam5 (FM203381)	99	20
Tsw-76	Elephant <i>L. africanus</i> feces clone AFEL3_aao16a10 (EU466025)	99	1
Tsw-85	Lost City carbonate chimney clone SGYF471 (FJ792231)	99	1
Tsw-90, TS19	Mothra hydrothermal field (Juan de Fuca Ridge) chimney clone Ba2 (FJ640843)	98	1+1
Tsw-19	Mothra hydrothermal field (Juan de Fuca Ridge) chimney clone Ba8 (FJ640811)	90	1
Tsw-96	Red panda feces clone RP_1aaa01e08 (EU778504)	99	4
TS-29	Ventral setae epibiont of <i>S. crosnieri</i> hydrothermal crab clone IHEO_1109 (AB476230)	97	1
TS-22	Ventral setae epibiont of <i>S. crosnieri</i> hydrothermal crab clone HATO_655 (AB476182)	98	2
TS-51, TS-38	Logatchev sulphide sample clone L7B4 (EF644790)	95-99	1+28
TS-82	Marine sediment (Cascadia Margin) above gas hydrate ridge clone Hyd24-01 (AJ535221)	95	1
TS-57	Ventral setae epibiont of <i>S. crosnieri</i> hydrothermal crab clone IHEO_1064 (AB476225)	95	1

Gammaproteobacteria

<i>Alphaproteobacteria</i>	RS1-86, RS1-57, RS1-35, RS2-10, Tsw-16, TS-62, TS-72, TS-76	Marine hydrocarbon seep sediment clone Ethane SIP4-6-06 (GU584499)	96-99	4+1+1+5	
	RS1-8	TAG black smoker chimney clone Tl_chim_Sur55-1 (AB518773)	99	1	
	RS2-24, RS2-32	Logatchev environmental clone bB10 (FN562825)	99	3	
	RS2-58	Biofilm clone ZBAF3-8 (HQ682047)	94	1	
	RS2-67	Hydrothermal vent chimney of Guaymas Basin clone 21B42 (DQ925896)	98	1	
	RS2-81	White biofilm on shallow hydrothermal vent of South Tonga Arc clone V1B07b.191 (HQ153899)	98	2	
	RS2-98	Vailulu'u Seamount Fe-rich mat/basaltic rocks clone VS_CL-289 (FJ497541)	98	1	
	Tsw-52	Hydrothermal amphipod <i>V. sulfuris</i> tissue clone I32 (FM429823)	99	1	
	Tsw-70	Deep oxygen minimum zone of Northeast subarctic Pacific Ocean clone F9P261000_S_001 (HQ674273)	99	1	
	Tsw-71	Deep Northeast subarctic Pacific Ocean clone F9P262000_S_A19 (HQ674323)	99	1	
	Tsw-32	<i>Rickettsia</i> from deep ocean water (6000m depth) from Puerto Rico Trench clone PRTAB7729 (HM798661)	98	1	
	TS-20	Gulf of Mexico clone 230-15-2 (HQ433399)	98	1	
	TS-43, TS-14	Deep seawater from the EPR clone EPR4055-N3-8c35 [EU491911]	93-99	2	
	TS-6	Logatchev sulphide sample clone L884 (EF644806)	99	1	
	TS-31	Symbiont of free-living deep-sea hydrothermal polychaete from Okinawa Trough clone HPF-28 (AB244979)	99	2	
	TS-45	Amsterdam mud volcano sediment clone AMSMV-0-B116 (HQ588399)	99	1	
	TS-52	Deep marine hydrothermal sediment from Lau Basin clone I2A (FJ205314)	98	1	
	TS-79	Kazan mud volcano clone KZNMV-5-B16 (FJ712457)	93	1	
	TS-86	Kazan mud volcano clone KZNMV-10-B51 (FJ712530)	90	1	
	TS-84	Arctic surface sediment clone B78-13 (EU286977)	90	1	
	TS-88	Coastal water biome from a Norway fjord clone 16_06_03F06 (FR683520)	90	1	
	TS-95	Lost City carbonate chimney clone LC1133B-74 (DQ270646)	99	1	
	<i>Betaproteobacteria</i>	tdA95R	Biofilm of extubated tracheal tube clone ET_B_4b02 (FJ557277)	99	1
		tdA26R	Aquifer sediment clone RABS_B98 (HQ660905)	99	1
		RS2-87, RS2-51	Carpet-like mucilaginous cyanobacterial blooms in hypereutrophic lake clone E161 (HQ828049)	99	2
		RS2-12, RS2-40	<i>H. sapiens</i> skin, antecubital fossa clone ncd1276c11c1 (FJ107333)	98-99	2
RS2-43		<i>H. sapiens</i> skin, popliteal fossa clone ncd905g08c1 (FJ082186)	99	1	
RS2-54		Butterfly <i>R. lebeou</i> egg clone 298EGG26 (FJ593728)	99	1	
Tsw-97, Tsw-92		Leafcutter ant <i>A. columbica</i> colony N12 fungus garden bottom clone BICP1477 (HM557329)	95	2	
Tsw-27		<i>Ralstonia</i> sp. from Red Sea Atlantis II deep-sea brine water clone Atlantis II_d (HQ530524)	99	2	
<i>Deltaproteobacteria</i>		tdR182R, Rsw-42	Snake Pit <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone Delta S1-6 (FN658700)	98	1+1
		L37R, tdA23R, tdA30R, tdA56R, tdA71R, tdA66R	Logatchev fluids clone IIB75 (AM268749)	99	1+8
		L37R	Wadden Sea surface sediment clone S914 (AY771938)	94	1
		tdA28R, tdA50R	Logatchev fluids clone IIB133 (AM268767)	98-99	2
	RS1-75	<i>Desulfothermus okinawensis</i> (AB264617)	95	1	
	RS2-61, RS2-66, RS2-73, RS2-84	Rainbow sulphide sample clone ROB7 (EF644847)	99	8	
	Tsw-33	Hydrothermal ventimentiferan <i>R. pachyptila</i> tube R103-B13 (AF449229)	99	1	
	Tsw-42	Oceanic dead zone (Saannich Inlet, 100m depth) clone SGT650 (GQ348094)	97	1	
	Tsw-19	Deep ocean water (6000m depth) from Puerto Rico Trench clone PRTBB8646(HM799049)	99	1	
	TS-83	Rainbow chimney clone PICO pp37 Rainbow 32 (AF449228)	92	1	
	TS-93	Hydrothermal ventimentiferan <i>R. pachyptila</i> tube R103-B27 (AF449228)	91	1	

Zetaproteobacteria	RS2-71	Hydrothermal mat from Lohiau Vent at Loihi clone Loh_60 (FJ001796)	93	1	
	RS2-95, Tsw-13, Tsw-74	Deep hydrothermal fluid from Mariana Trough clone Pamp3BL54 (AB284833)	98	1+2	
	CFB	tdR63R	Microbial mat from Cesspool Cave clone CC1_16S_16 (EU662369)	93	5
		R14R	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> from estuarine sediment clone C139a-R8C-D4 (AY678514)	95	2
		T70R	Hydrothermal sediment from Southern Okinawa Trough clone p816_b_3_23 (AB305587)	92	1
		tdA15R	Hydrothermal worm <i>P. palmiformis</i> mucus secretion clone P. palmi A 10 (AJ441240)	98	1
		Rsw-79	Snake Pit <i>R. exoculata</i> ectosymbiont clone Bacteroidetes S2-2 (FN658702)	99	4
		RS1-21	Yellow Sea intertidal seawater clone Sm-27 (GU261224)	98	2
		RS1-73	Gulf of Mexico active mud volcano GoM GB425 68B-43 (AY542563)	96	1
		RS1-62, TS-2	Arctic Ocean water clone b72 (EU919789)	98	2+1
RS2-21		Raw seawater clone SW-Apr-83 (HQ203953)	98	1	
RS2-100, RS2-91, TS-63, TS-15		Tube of <i>Lamellibrachia</i> sp. from cold seep clone V2tb8 (FM165250)	94-98	2+2	
Tsw-87	Iron-oxide chimney-like structure from Tonga Arc clone V19F55b (FJ905651)	93	1		
Tsw-45	Northeast subarctic Pacific Ocean clone F9P26500_S_P20 (HQ673054)	98	1		
Tsw-23	Sulphide chimney from Juan de Fuca Ridge clone PS-B23 (AY280420)	95	1		
Tsw-24	Cytophaga sp. isolate BH180-3 (AJ431238)	99	1		
TS-49	Logatchev chimney clone BA10 (FNS562914)	98	1		
TS-46	Marine reef sandy sediment clone A04 (FJ358900)	95	1		
Verrucomicrobiae	T41R, T20R, T29R	Tube of <i>Lamellibrachia</i> sp. from cold seep clone V1t43 (FM165269)	95-98	3	
	T43R	Sandy carbonate sediment clone C175cm.2.89 (EF208729)	94	1	
	T72R	Active hydrothermal chimney from Okinawa Trough clone HTM871W-B43 (AB611176)	92	1	
	L45R	Microfiltration system clone MF-Jan-42 (HQ225122)	98	1	
	TS-91	Northern Bering Sea surface water clone s30 (GQ452875)	92	1	
	Firmicutes	R8R	TAG <i>R. exoculata</i> gut clone T28SW (FM863738)	99	1
T17R		Butterfly <i>S. littoralis</i> gut uncultured <i>Clostridium</i> clone SL29 (HQ264089)	89	1	
RS2-47		Uncultured <i>Staphylococcus</i> sp. from spacecraft associated clean room clone JPL-S3_I17 (FJ957639)	95	1	
tdA41R, tdA90R		Indoor dust clone BF0002A028 (AM696843)	99	2	
Actinobacteracea	RS1-66, RS1-68	Rainbow chimney uncultured <i>Thermodesulfobacterium</i> clone PICO pp37 Rainbow 201 (AJ969460)	93-99	2	
	RS1-91, RS2-48	Rainbow chimney <i>Thermodesulfatator</i> sp. clone AT 1325 (EU435435)	99	1+1	
Aquificales	RS1-49, RS2-59	Rainbow chimney uncultured <i>Aquificales</i> clone PICO pp37 Rainbow 28 (AJ969464)	96-99	1+1	
	RS2-94	Rainbow chimney uncultured <i>Aquificales</i> clone PICO pp37 Rainbow 62 (AJ969466)	99	1	
Unaffiliated	tdA43R, tdA83R	Hydrothermal yeti crab <i>K. hirsuta</i> epibiont clone F8 (EU265798)	96	2	
	RS1-95, RS1-76	Hydrothermal worm <i>P. palmiformis</i> mucus secretion clone P. palmi C72 (AJ441233)	87-88	2	
	Tsw-72, Tsw-35	Deep-sea hydrothermal vent clone ah11 (FNS562888)	87-97	2	
	Tsw-83	Deep seawater (6000m depth) from Puerto Rico Trench clone PRTAB7827 (HM798723)	99	1	

Tab.S3 – Diversity of the V6 domain of the 16S rRNA gene: number of *Deferribacteres* and *Mollicutes* clone sequences analysed by site origin of *R. exoculata* specimens. Sequences obtained earlier on Rainbow specimens (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003) were added to the Rainbow data set (they are notified in brackets).

Sites	<i>Deferribacteres</i>	<i>Mollicutes</i>
<i>Rainbow</i>	20 (+2)	3 (+3)
TAG	50	5
Logatchev	13	18
Ashadze	41	0
Total	124 (+2)	26 (+3)

12.3. Rappel des principaux résultats et conclusion.

La comparaison des communautés bactériennes associées au tractus digestif de *R. exoculata* provenant de différents sites de la MAR montre qu'une morphologie microbienne filamenteuse déjà décrite dans une étude précédente sur des spécimens de TAG et Rainbow est également retrouvée dans le mésentéron de crevettes des autres sites et représente le morphotype dominant. Cependant, les analyses moléculaires montrent l'existence de plusieurs populations. La première serait constituée de *Gammaproteobacteria* retrouvées uniquement sur le site Rainbow, ces épibiontes pourraient être allochtones. La phylogénie a également montré la présence d'*Epsilonproteobacteria* dont les séquences sont proches de celles retrouvées dans la cavité céphalothoracique de *R. exoculata* et de clones environnementaux, indiquant que ces communautés seraient acquises horizontalement. Contrairement aux deux populations précédentes, les séquences affiliées aux *Deferribacteres* et *Mollicutes* sont autochtones (ou résidents) puisque identifiées exclusivement dans le tractus digestif de la crevette (pas dans l'environnement) quel que soit le site hydrothermal de prélèvement. De plus, ces phylotypes sont très conservés (>99%), quel que soit le site d'origine. Ces résultats mettent en évidence une forte co-évolution entre l'hôte et ses épibiontes (*Deferribacteres* et *Mollicutes*) qui suggérerait une transmission verticale de ces derniers. La reconstruction de réseaux des relations évolutives pour les épibiontes résidents que sont les *Deferribacteres* et *Mollicutes* suggère que les spécimens du site Rainbow semblent présenter une particularité taxonomique leur conférant une histoire évolutive plus ancienne par rapport aux sites Logachev et Ashadze qui sembleraient avoir été colonisés plus récemment par *R. exoculata*.

Afin de réaliser une étude plus complète sur la phylogéographie des épibiontes du tractus digestif de *R. exoculata*, il faudrait obtenir des spécimens des sites Snake Pit et South-MAR sur lesquels la présence de la crevette a été confirmée. Les sites hydrothermaux de la MAR sur lesquels l'espèce *R. exoculata* est présente sont très éloignés entre eux. Il est probable qu'il existe des sites n'ayant pas encore été découverts et qui pourraient expliquer sa répartition, ce qui implique la mise en œuvre de nouvelles campagnes océanographiques. Cependant, le genre *Rimicaris* a déjà été observé dans d'autres régions présentant une activité hydrothermale comme le point triple de l'océan Indien où il est représenté par l'espèce *R. karei*. Une comparaison de spécimens de *Rimicaris* de genres différents de même qu'une comparaison avec d'autres crevettes (hydrothermales, comme *Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata* ou *Alvinocaris markensis*, ou littorales comme

alaemon sp. et *Macrobrachium* sp.) permettraient d'améliorer la compréhension de la colonisation microbienne du mésentéron chez les crustacés.

BILAN ET PERSPECTIVES

BILAN ET PERSPECTIVES

Les environnements hydrothermaux océaniques profonds constituent des biotopes luxuriants, tels des « oasis de vie » dans le désert abyssal. En raison de leurs localisations, l'étude du fonctionnement de ces écosystèmes reste à l'heure actuelle un réel défi technique pour la communauté scientifique. L'apport potentiel de nouvelles connaissances tant sur un plan fondamental (biodiversité, description de nouvelles espèces) qu'appliqué (adaptations physiologiques des organismes à la forte pression et aux hautes températures) permet néanmoins chaque année la mise en place de plusieurs campagnes océanographiques à travers le monde.

De ce fait, les études menées sur ces écosystèmes particuliers sont nombreuses et font appel à plusieurs disciplines permettant d'étudier depuis le fonctionnement des processus géochimiques hydrothermaux jusqu'à l'écologie des communautés animales et microbiennes résidentes. La source primaire d'énergie dans ces environnements, pour les organismes vivants, provient de la chimiosynthèse microbienne. C'est pourquoi chez plusieurs espèces animales se sont mis en place des relations symbiotiques plus ou moins élaborées avec des partenaires microbiens permettant d'améliorer leurs valences écologiques dans ces environnements extrêmes, tels que le ver *Riftia pachyptila*, la modiole *Bathymodiolus azoricus* et également le modèle de cette étude, la crevette *Rimicaris exoculata*.

13. Focus sur l'épibiose du céphalothorax de *Rimicaris exoculata*.

La crevette *R. exoculata* fait partie des modèles symbiotiques vivant dans les écosystèmes hydrothermaux. Si pour les animaux côtiers ou terrestres, l'étude de leurs biologies et de leurs possibles associations symbiotiques est courante, la difficulté d'échantillonnage et de maintien sous pression des organismes hydrothermaux pour des études *in vivo* constitue un véritable challenge pour la communauté scientifique. Néanmoins, l'utilisation d'appareillages sous pression (IPOCAMPTM), de la biologie moléculaire et de techniques de microscopie de plus en plus performantes permettent d'obtenir des résultats suffisamment puissants pour élaborer des hypothèses quant au fonctionnement des modèles symbiotiques hydrothermaux.

Chez *Rimicaris exoculata*, la présence d'une communauté bactérienne dans sa cavité céphalothoracique hypertrophiée combinée à un cycle de mue très court où tous les microorganismes sont éliminés soulève plusieurs hypothèses. Premièrement, la mue (ou

exuviation) semble se produire au moment où la communauté bactérienne est la plus dense et la minéralisation la plus importante. Une hypothèse serait que la crevette provoque sa mue pour libérer sa cavité céphalothoracique de l'encombrement minéral et bactérien devenu trop important. Cet encombrement pourrait gêner la mobilité (les minéraux alourdissant l'animal) et surtout la circulation d'eau vers les branchies, donc la respiration de l'animal. La deuxième hypothèse prend en compte l'existence d'une relation symbiotique, où la communauté d'épibiontes du céphalothorax transférerait des molécules (rôle trophique) à l'hôte (hypothèse du transfert trans-cuticulaire). L'activité de la communauté épibiotique pourrait être réduite du fait de la précipitation des minéraux et déclencherait indirectement la mue, soit par un signal dirigé vers l'hôte, soit parce que les épibiontes ne fourniraient plus suffisamment de nutriments à l'hôte. Dans tous les cas, l'exuviation est un processus qui demande énormément d'énergie. Le fait que notre modèle mue plus souvent que ses congénères côtiers montre probablement que, à un moment donné, le ratio apport des épibiontes / dépense énergétique de l'hôte diminue jusqu'à un seuil où, le fait de muer, représente une dépense en énergie inférieure à celle de conserver des épibiontes dont l'activité serait réduite.

Les principaux résultats de cette thèse mettent en évidence la présence d'une même communauté épibiotique associée à *R. exoculata*, composée de deux phylotypes dominants (*Epsilon-* et *Gammaproteobacteria*), dès les premiers stades de développement de l'hôte (présence à la surface des œufs) jusqu'au stade adulte (dans le céphalothorax). Ces résultats soulignent le caractère spécifique de cette association et suggèrent une possible sélection par l'hôte. De plus, la proportion relative des deux principaux phylotypes semble varier entre la surface des œufs (majorité de *Gammaproteobacteria*) et le céphalothorax de la crevette adulte (majorité d'*Epsilonproteobacteria*) suggérant un probable changement dans l'investissement de chacun des deux phylotypes dans la symbiose selon le stade du cycle de vie de l'hôte. Des séquences d'épibiontes sont retrouvées dans l'eau environnant les crevettes, conduisant à renforcer l'hypothèse d'une transmission horizontale.

Nous avons également confirmé par la biologie moléculaire et la microscopie, la présence de bactéries méthanotrophes de type I (connues comme endosymbiontes de certains bivalves hydrothermaux tel *B. azoricus*) dans le céphalothorax de *R. exoculata* au stade juvénile et adulte, mais également présentes à la surface externe des œufs. Cela semble être la première association épibiotique décrite entre des bactéries méthanotrophes et un crustacé hydrothermal. Pour valider le mode de transmission, il faudrait analyser la présence d'épibiontes sur les stades larvaires supposés pélagiques de *R. exoculata* (effort d'échantillonnage dans la colonne d'eau et autour des sites hydrothermaux). Il serait également intéressant de pouvoir étudier en aquarium pressurisé (comme l'IPOCAMP™) la

relation symbiotique dans les premiers stades de développement de l'hôte en utilisant des spécimens femelles gravides (portant des œufs) vivantes.

Les résultats sur l'affiliation phylogénétique des gènes de fonction obtenus comparés aux données de phylogénie sur l'ADNr 16S ont permis d'élaborer des hypothèses quant aux métabolismes putatifs des deux principaux phylotypes : les *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria* (Fig.34).

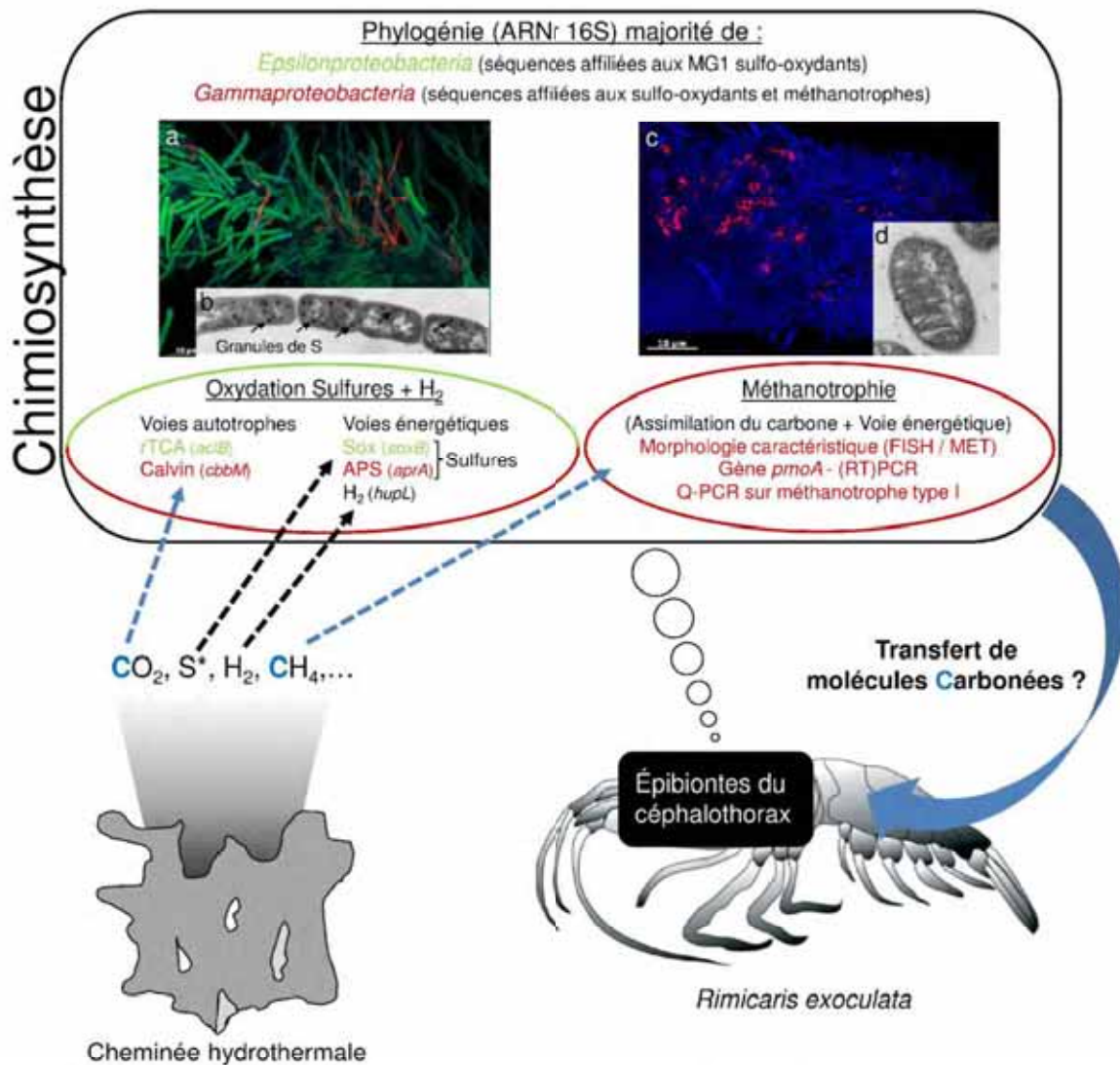


Figure 34 : Schéma représentant les principales hypothèses sur les échanges entre l'environnement hydrothermal, les épibiontes du céphalothorax et l'hôte *Rimicaris exoculata* (a et c, clichés réalisés en FISH avec *Gammaproteobacteria* : rouge / *Epsilonproteobacteria* : vert ; b et d, clichés réalisés en MET : S* : composés sulfurés (S°, S₂O₃²⁻, H₂S,...)).

- Coupe longitudinale d'une soie de *R. exoculata* colonisée par des épibiontes filamenteux.
- Epibionte filamenteux contenant des granules de sulfures (flèches noires) (d'après Zbinden *et al.*, 2008).
- Coupe longitudinale d'une soie de *R. exoculata* colonisée par des épibiontes *Gammaproteobacteria* méthanotrophes.
- Epibionte méthanotrophe caractérisé par la présence de membranes intracytoplasmiques (d'après Zbinden *et al.*, 2008).

Les métabolismes basés sur l'utilisation de composés soufrés seraient probablement fonctionnels à un niveau basal (quel que soit le site hydrothermal), autoalimentés par exemple par des réserves soufrées sous forme de granules intracellulaires présentes chez certains épibiontes filamenteux (Zbinden et al., 2008) (Fig.34b). En revanche, il n'existe pas de réserve connue pour alimenter les métabolismes basés sur l'oxydation du méthane (méthanotrophie) et de l'hydrogène, qui seraient donc entièrement dépendants de la composition du fluide hydrothermal (enrichi ou non en CH₄ ou H₂) et donc de la géochimie des sites de prélèvement.

Les métabolismes thiotrophe et méthanotrophe sont bien décrits chez les symbiontes d'organismes hydrothermaux comme étant les voies majeures permettant la production d'énergie pour les symbioses. Néanmoins, une étude récente a prouvé l'importance d'une troisième voie énergétique basée sur l'oxydation de l'hydrogène (Petersen et al., 2011). En effet, les symbiontes de la modiole *B. puteoserpentis* et plus particulièrement les symbiontes sulfo-oxydants, utiliseraient cette voie pour produire de l'énergie et permettre le fonctionnement des voies autotrophes d'assimilation du carbone et donc indirectement de la symbiose (Petersen et al., 2011). D'ailleurs, le gène *hupL*, codant pour une enzyme clé dans la voie de l'oxydation de l'hydrogène, a été détecté chez les symbiontes du céphalothorax de *R. exoculata* (Petersen et al., 2011). Ce gène de fonction a été recherché (en PCR et RT-PCR) et surtout sera quantifié chez des crevettes provenant de sites mantélliques (Rainbow, Logachev et Ashadze) connus pour être enrichis en hydrogène (Tab.2) (travaux en cours, chapitre 2).

A ce jour, l'existence d'un transfert de molécules entre la crevette et les épibiontes du céphalothorax n'est pas prouvée (Fig.34). Des expérimentations sur l'incorporation de molécules marquées (¹⁴C) chez les épibiontes (micro-autoradiographie et dosage) et la recherche de radioactivité dans les tissus de *R. exoculata* (prouvant le transfert) sont en cours de réalisation par l'équipe de Morphologie Ultrastructurale de Liège (par P. Compère et J. Ponsard). Néanmoins, les divers résultats obtenus dans nos études, l'hypertrophie de la cavité céphalothoracique, la présence en faible quantité de matière organique dans le tractus intestinal et la forte activité de cette espèce sur les sites colonisés semblent favoriser la thèse de l'existence d'une réelle interaction entre la communauté microbienne du céphalothorax et *Rimicaris exoculata*.

14. Perspectives.

Les perspectives sur l'étude des communautés épibiotiques du céphalothorax de la crevette hydrothermale *R. exoculata* sont nombreuses. Pour les futures investigations de ce modèle, il est clair que certaines méthodes, notamment celles d'incorporation (sous pression), de microscopie et de biologie moléculaire, semblent les plus intéressantes pour répondre aux questions en suspens :

- Comment relier la phylogénie aux métabolismes des épibiontes du céphalothorax de *Rimicaris exoculata* ?
- Quels sont les systèmes de reconnaissances / sélections entre les symbiontes et son hôte ?

Par exemple, il est possible de coupler la technique de FISH (Hybridation *In Situ* en Fluorescence) dite « classique » (ciblant l'ARNr 16S) avec celle du geneFISH ciblant un gène en particulier. En effet, une étude récente utilisant cette technique a permis de mettre en évidence l'oxydation de l'hydrogène (en utilisant une sonde ciblant un gène codant pour une enzyme clé de cette voie) par les symbiontes sulfo-oxydant chez la modiole *B. puteoserpentis* (Petersen *et al.*, 2011) (Fig. 35). L'utilisation de cette méthode sur notre modèle permettrait de visualiser quelles morphologies d'épibiontes (parmi les deux phylotypes majoritaires) utilisent quels métabolismes (voies autotrophes et voies énergétiques) (Fig.34).

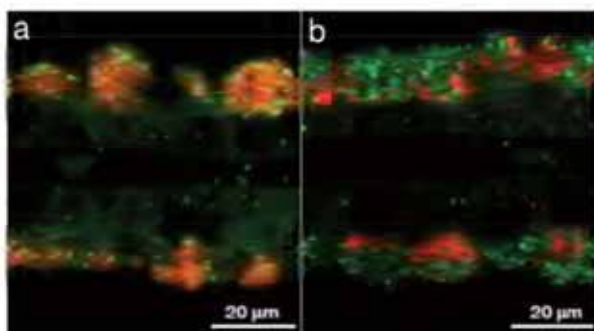


Figure 35 : les symbiontes sulfo-oxydants ont le gène de l'hydrogénotrophie, a et b : *hupL* geneFISH en vert avec en :

- a. FISH sur l'ARNr 16S ciblant les symbiontes sulfo-oxydants (en rouge).
- b. FISH sur l'ARNr 16S ciblant les symbiontes méthanotrophes (en rouge).

(modifié d'après Petersen *et al.*, 2011)

Une autre technique utilise le NanoSIMS (Spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire) couplée au FISH et permet également de lier la phylogénie et le métabolisme (Behrens *et al.*, 2008) (Fig. 36). Dans cette méthode, est utilisé un substrat marqué rentrant dans une voie métabolique recherchée qui peut être détectée, par la suite, en microscopie. Il serait donc possible comme la technique précédente de lier phylogénie et fonction et de valider certaines hypothèses. Par exemple, pour la méthanotrophie, l'incorporation de méthane marqué, couplé avec une sonde FISH ciblant les *Gammaproteobacteria* sur les

épibiontes de *R. exoculata* pourrait être suivie. Par rapport à la technique précédente, il faudrait incubé les crevettes vivantes en aquarium pressurisé (IPOCAMP™), nécessitant la mise en œuvre d'une nouvelle mission océanographique. De plus, cette approche nécessite des durées d'incubation plus longues que celles appliquées sur nos échantillons (pour le SIP), lors de la campagne océanographique SERPENTINE (2007).

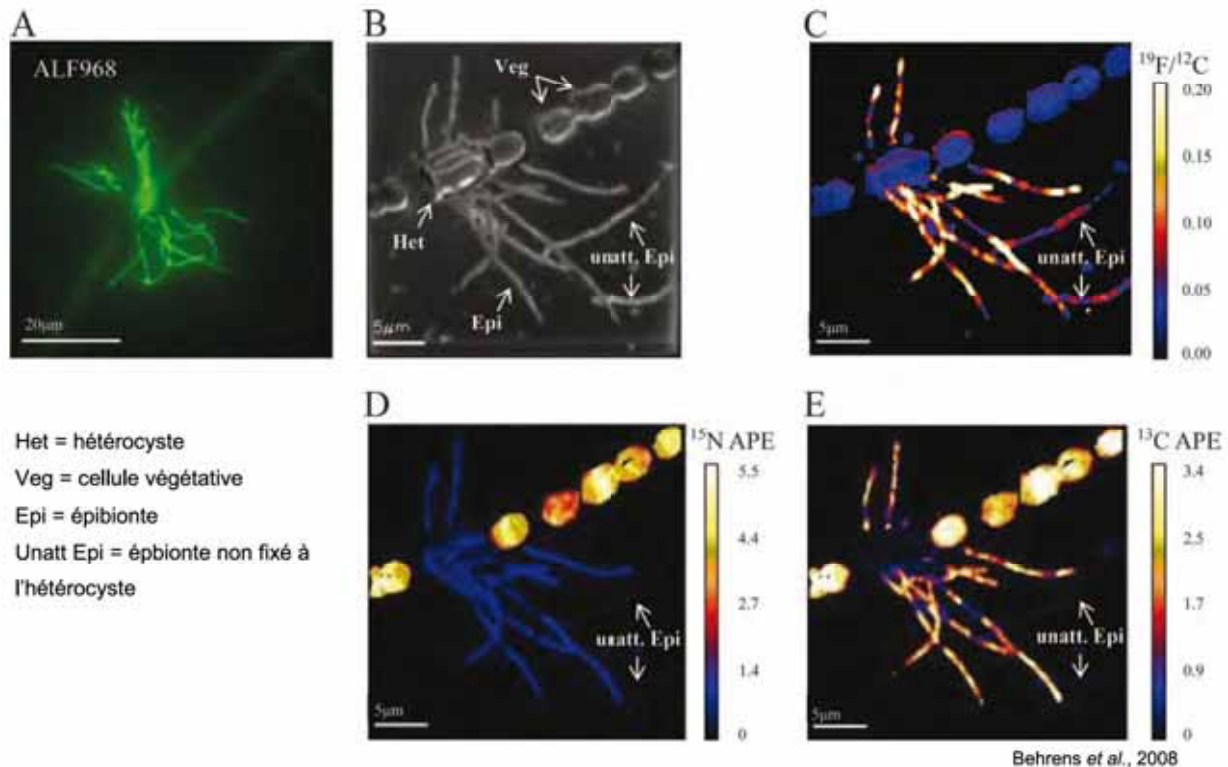


Figure 36 : Consortium microbien constitué d'une *Cyanobacteria* filamenteuse et d'une *Alphaproteobacteria* fixée à un hétérocyste, observé en fluorescence et NanoSIMS après 24h d'incubation avec du ^{13}C -bicarbonate et du ^{15}N -diazote. (A). Consortium hybridé en EL-FISH avec une sonde spécifique des *Alphaproteobacteria* (ALF968). (B). Image en électrons secondaires du consortium en NanoSIMS. (C). Localisation de la fluorine relative au carbone après hybridation en EL-FISH avec la sonde ALF968. (D) et (E). Distribution de l'enrichissement en ^{15}N -diazote et ^{13}C -bicarbonate, respectivement. Les barres de couleurs indiquent l'abondance relative pour (C) et l'enrichissement isotopique pour (D) et (E).

La métagénomique constitue également une approche intéressante car elle permet d'étudier globalement tous les génomes présents dans un échantillon (avec tous les gènes de fonction). C'est une analyse plus complète, sans limitations dues à l'utilisation de couples d'amorces spécifiques. Cette technique est d'ailleurs en cours d'utilisation par C. Jan, une collègue doctorante du LM2E, sur les épibiontes de *R. exoculata*. Des approches de transcriptomique et/ou de protéomique permettraient de conclure sur les voies actives des épibiontes.

L'étude des mécanismes de reconnaissance / sélection entre l'hôte et les épibiontes pourrait être réalisée. Par exemple, du côté des épibiontes, en recherchant les gènes codant pour des systèmes impliqués dans virulence bactérienne (ex. : les T3SS pour Type-III

Secretion System). La présence des gènes impliqués dans la mise en place des composants de la paroi bactérienne, tels que les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides, seraient également intéressante à rechercher, car ces gènes sont généralement perdus dans le cadre d'associations endosymbiotiques. Ces éléments font partie des composants essentiels à la reconnaissance des bactéries par le système immunitaire de l'hôte et sont appelés les MAMP (Microbial Associated Molecular Patterns) (Kauffmann *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant de rechercher les gènes codant pour des molécules de l'immunité chez l'hôte qui vont détecter les MAMP des bactéries, comme les PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein). Ces derniers activent ensuite les voies cellulaires chez l'hôte permettant la synthèse de peptides antimicrobiens (Bischoff *et al.*, 2006) qu'il faudrait également rechercher.

Certaines de ces méthodes permettent de visionner un « arrêt sur image » du métabolisme sur un consortium environnemental en s'affranchissant de l'isolement cultural, qui est, dans le cas des symbioses, très difficile à mettre en œuvre (par exemple : quel est l'apport de l'hôte pour ses symbiotes ?). Différents milieux de culture, ciblant les principaux métabolismes suspectés chez les épibiontes du céphalothorax et du tube digestif de *R. exoculata*, ont été inoculés et sont actuellement en cours d'exploitation au laboratoire. Réussir à cultiver un symbiote permet par la suite de réaliser des expériences sur son métabolisme, ses optimums de croissance,... des données encore impossibles à obtenir avec la biologie moléculaire.

La liste des outils cités précédemment n'est pas exhaustive. Il est évident que cela reste des moyens techniques et, qu'avant toute utilisation, une réflexion sur les jeux de données que l'on peut obtenir par ces différentes méthodes par rapport à la question scientifique de départ doit être effectuée.

15. Conclusion.

La vie, le fonctionnement des écosystèmes, l'évolution sont régis par l'environnement et les interactions entre organismes vivants. Brièvement, ces interactions peuvent aller du négatif (parasitisme) au positif (symbiose), et vont, intrinsèquement, dans tous les cas, moduler la biologie des individus mis en jeu. Il est important d'étudier ces interactions car elles ont, en effet, permis la découverte de nombreuses molécules d'intérêt pour la recherche appliquée (pharmacologie, cosmétologie, biotechnologie) et apporté des connaissances primordiales pour la recherche fondamentale (évolution, adaptation,...). La théorie endosymbiotique de la cellule eucaryote témoigne de l'importance que peuvent avoir des interactions durables dans l'évolution de la vie. Notre modèle, la crevette *Rimicaris exoculata*, vivant dans les écosystèmes que sont les sources hydrothermales océaniques, considérées comme reflétant les possibles origines de la vie sur Terre, s'inscrit totalement dans ces processus. A travers les différentes études menées sur le sujet incluant les travaux de cette thèse, il est clair aujourd'hui que la relation symbiotique que la crevette entretient avec ses épibiontes lui permet de s'adapter, donc de vivre dans de tels environnements. Les nombreuses associations pathogènes / symbiotiques présentes sur Terre et dans les Océans démontrent que l'étude de la biodiversité d'un milieu donné ne peut se restreindre à l'échelle de l'espèce et nécessite, comme dans le cas des symbioses, de marier les compétences (biologiste, microbiologiste, géologue, chimiste, etc.) pour tendre vers une meilleure compréhension du monde qui nous entoure.

BIBLIOGRAPHIE

A

Adams DG, Duggan PS (2008). Cyancbacteria–bryophyte symbioses. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1047-1058.

Adin DM, Phillips NJ, Gibson BW, Apicella MA, Ruby EG, McFall-Ngai MJ *et al* (2008). Characterization of *htrB* and *msbB* Mutants of the Light Organ Symbiont *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 633-644.

Aeckersberg F, Lupp C, Feliciano B, Ruby EG (2001). *Vibrio fischeri* Outer Membrane Protein OmpU Plays a Role in Normal Symbiotic Colonization. *J Bacteriol* **183**: 6590-6597.

Aida M, Kanemori M, Kubota N, Matada M, Sasayama Y, Fukumori Y (2008). Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont a harbored in *Oligobranchia mashikoi* (a Siboglinid Polychaete) inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes and Environ* **23**: 81-88.

Alain K, Querellou J, Lesongeur F, Pignet P, Crassous P, Raguene G *et al* (2002). *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1317-1323.

Allen CE, Copley JT, Tyler PA (2001). Lipid Partitioning in the Hydrothermal Vent Shrimp *Rimicaris exoculata*. *Mar Ecol* **22**: 241-253.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990a). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990b). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.

Amend JP, Shock EL (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **25**: 175-243.

B

Badger MR, Bek EJ (2008). Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1525-1541.

Bartsev AV, Deakin WJ, Boukli NM, McAlvin CB, Stacey G, Malnoë P *et al* (2004). NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp. NGR234, Thwarts Activation of Plant Defense Reactions. *Plant Physiology* **134**: 871-879.

Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillemin K (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology* **297**: 374-386.

Baumann P (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**: 155-189.

Behrens S, Losekann T, Pett-Ridge J, Weber PK, Ng WO, Stevenson BS *et al* (2008). Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3143-3150.

Bischoff V, Vignal C, Duvic B, Boneca IG, Hoffmann JA, Royet J (2006). Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *Plos Pathogens* **2**: 139-147.

Blanchard JL, Lynch M (2000). Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics* **16**: 315-320.

Blazejak A, Kuever J, Erseus C, Amann R, Dubilier N (2006). Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (*Oligochaeta*) from Bermuda and the Bahamas. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5527-5536.

Bright M, Keckeis H, Fisher CR (2000). An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Marine Biology* **136**: 621-632.

Bright M, Bulgheresi S (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Rev Microbiol* **8**: 218-230.

Brugirard-Ricaud K, Duchaud E, Givaudan A, Girard PA, Kunst F, Boemare N *et al* (2005). Site-specific antiphagocytic function of the *Photobacterium luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cellular Microbiology* **7**: 363-371.

Buchanan B, Arnon D (1990). A reverse KREBS cycle in photosynthesis: consensus at last. *Photosynthesis Research* **24**: 47-53.

Bulgheresi S, Schabussova I, Chen T, Mullin NP, Maizels RM, Ott JA (2006). A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2950-2956.

C

Callsencencic P, Flugel HJ (1995). Larval development and the formation of the gut of *Siboglinum poseidoni* Flugel and Langhof (Pogonophora, Perviata) - Evidence of protostomian affinity. *Sarsia* **80**: 73-89.

Campbell BJ, Cary SC (2004). Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6282-6289.

Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006). The versatile e-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Rev Microbiol* **4**: 458-468.

Cary SC, Giovannoni SJ (1993). Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 5695-5699.

- Cary SC (1994). Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**: 121-130.
- Casanova B, Brunet M, Segonzac M (1993). Impact of bacterial epibiosis on functional-morphology of shrimp associated with the Mid-Atlantic hydrothermal conditions. *Cah Biol Mar* **34**: 573-588.
- Chamberlain SC (2000). Vision in hydrothermal vent shrimp. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **355**: 1151-1154.
- Chamoy L, Nicolai M, Ravaux J, Quennedey B, Gaill F, Delachambre J (2001). A novel chitin-binding protein from the vestimentiferan *Riftia pachyptila* interacts specifically with chitin. *J Biol Chem* **276**: 8051-8058.
- Chandra H, Khandelwal P, Khattri A, Banerjee N (2008). Type 1 fimbriae of insecticidal bacterium *Xenorhabdus nematophila* is necessary for growth and colonization of its symbiotic host nematode *Steinernema carpocapsae*. *Environmental Microbiology* **10**: 1285-1295.
- Charlou JL, Donval JP, Konn C, Ondréas H, Fouquet Y (2010). High production and fluxes of H₂ and CH₄ and evidence of abiotic hydrocarbon synthesis by serpentinization in ultramafic-hosted hydrothermal systems on the Mid-Atlantic Ridge. *Geophys Monogr* **188**: 265-296.
- Childress JJ, Fisher CR, Brooks JM, Kennicutt MC, Bidigare R, Anderson AE (1986). A Methanotrophic Marine Molluscan (Bivalvia, Mytilidae) Symbiosis - Mussels fueled by gas. *Science* **233**: 1306-1308.
- Ciche TA, Kim K-s, Kaufmann-Daszczuk B, Nguyen KCQ, Hall DH (2008). Cell Invasion and Matricide during *Photorhabdus luminescens* Transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* Nematodes. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2275-2287.
- Combes C (1995). Interactions durables: écologie et évolution du parasitisme. *Collection écologie n°26 Masson, Paris, France*.
- Cooper JE (2004). Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. In: Callow JA (ed). *Advances in Botanical Research*. Academic Press. pp 1-62.
- Cooper JE (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1355-1365.
- Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Gaill F, Compère P (2008). Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat Biol* **1**: 225-238.
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Von Herzen RP, Ballard RD *et al* (1979). Submarine Thermal Springs on the Galápagos Rift. *Am Assoc Advanc Sci* **203**: 1073-1083.
- Costa J-L, Paulsrud P, Rikkinen J, Lindblad P (2001). Genetic Diversity of Nostoc Symbionts Endophytically Associated with Two Bryophyte Species. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4393-4396.
- Cowles CE, Goodrich-Blair H (2008). The *Xenorhabdus nematophila* *niABC* Genes Confer the Ability of *Xenorhabdus* spp. To Colonize *Steinernema carpocapsae* Nematodes. *J Bacteriol* **190**: 4121-4128.

Csáki R, Hanczár T, Bodrossy L, Murrell JC, Kovács KL (2001). Molecular characterization of structural genes coding for a membrane bound hydrogenase in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Fems Microbiology Letters* **205**: 203-207.

D

Dale C, Plague GR, Wang B, Ochman H, Moran NA (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 12397-12402.

Dale C, Moran NA (2006). Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell* **126**: 453-465.

Davidson SK, Koropatnick TA, Kossmehl R, Sycuro L, McFall-Ngai MJ (2004). NO means 'yes' in the squid-vibrio symbiosis: nitric oxide (NO) during the initial stages of a beneficial association. *Cellular Microbiology* **6**: 1139-1151.

Davidson SK, Stahl DA (2008). Selective recruitment of bacteria during embryogenesis of an earthworm. *ISME J* **2**: 510-518.

De Vries EJ, Jacobs G, Sabelis MW, Menken SBJ, Breeuwer JAJ (2004). Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp and western flower thrips. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 2171-2178.

DeChaine EG, Cavanaugh CM (2006). Symbioses of Methanotrophs and Deep-Sea Mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) Molecular Basis of Symbiosis. In: Overmann J (ed). Springer Berlin Heidelberg. pp 227-249.

Desbruyères D, Almeida A, Biscoito M, Comtet T, Khripounoff A, Le Bris N *et al* (2000). A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs. environmental controls. *Hydrobiologia* **440**: 201-216.

DeWayne Shoemaker D, Machado CA, Molbo D, Werren JH, Windsor DM, Herre EA (2002). The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **269**: 2257-2267.

Distel DL, Lane DJ, Olsen GJ, Giovannoni SJ, Pace B, Pace NR *et al* (1988). Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* **170**: 2506-2510.

Douglas AE (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews* **64**: 409-434.

Douville E, Charlou JL, Oelkers EH, Bienvu P, Colon CFJ, Donval JP *et al* (2002). The Rainbow vent fluids (36°14'N, MAR): the influence of ultramafic rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chem Geol* **184**: 37-48.

Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Rev Microbiol* **6**: 725-740.

Duperron S, Nadalig T, Caprais JC, Sibuet M, Fiala-Medioni A, Amann R *et al* (2005). Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp mussel from a methane seep on the gabon continental margin (southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1694-1700.

Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP *et al* (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **8**: 1441-1447.

Duperron S, Halary S, Lorion J, Sibuet M, Gaill F (2008). Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp (Bivalvia : Mytilidae). *Environ Microbiol* **10**: 433-445.

Durand L, Zbinden M, Cuff-Gauchard V, Duperron S, Roussel EG, Shillito B *et al* (2010). Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 291-303.

E

Eberle MW, McLean DL (1982). Initiation and orientation of the symbiote migration in the human body louse *Pediculus humanus* L. *J Insect Physiol* **28**: 417-422.

Endow K, Ohta S (1990). Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomid clam *Calyptogena soyoeae*. *Mar Ecol-Prog Ser* **64**: 309-311.

Ereskovsky AV, Gonobobleva E, Vishnyakov A (2005). Morphological evidence for vertical transmission of symbiotic bacteria in the viviparous sponge *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarcida). *Marine Biology* **146**: 869-875.

F

Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* **293**: 291-293.

Felsenstein J (1974). The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* **78**: 737-756.

Frank SA (1996). Host-symbiont conflict over the mixing of symbiotic lineages. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**: 339-344.

Fuse H, Ohta M, Takimura O, Murakami K, Inoue H, Yamaoka Y *et al* (1998). Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine *Methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 1925-1931.

G

Gaill F, Shillito B, Lechaire JP, Chanzy H, Goffinet G (1992). The chitin secreting system from deep-sea hydrothermal vent worms. *Biol Cell* **76**: 201-204.

Galan JE, Wolf-Watz H (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.

Galchenko VF, Pimenov NV, Lein AI, Galkin SV, Moskalev LI, Ivanov MV (1989). Autotrophic CO₂-assimilation in tissues of prawn *Rimicaris exoculata* from the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal area. *Doklady Akademii Nauk Sssr* **308**: 1478-1481.

Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**: 543-548.

Gebruk AV, Pimenov NV, Savvichev AS (1993). Feeding specialization of bresilid shrimps in the TAG site hydrothermal community. *Mar Ecol Prog Ser* **98**: 247-253.

Gebruk AV, Galkin SV, Vereshchaka AL, Moskalev LI, Southward AJ (1997). Ecology and biogeography of the hydrothermal vent fauna of the Mid-Atlantic Ridge. *Adv Mar Biol* **32**: 93-144.

Gebruk AV, Chevaldonne P, Shank T, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2000a). Deep-sea hydrothermal vent communities of the Logatchev area (14°45 ' N, Mid-Atlantic Ridge): diverse biotopes and high biomass. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 383-393.

Gebruk AV, Southward EC, Kennedy H, Southward AJ (2000b). Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 485-499.

Giltunes MS, Fenical W (1992). Embryos of *Homarius americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biol Bull* **182**: 105-108.

Goffredi, Hurtado, Hallam, Vrijenhoek (2003). Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomidae) of the "pacific/lepta" species complex. *Marine Biology* **142**: 311-320.

Goffredi SK, Jones WJ, Erlich H, Springer A, Vrijenhoek RC (2008). Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environ Microbiol* **10**: 2623-2634.

Gros O, Darrasse A, Durand P, Frenkiel L, Mueza M (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2324-2330.

Gros O, Frenkiel L, Mueza M (1998). Gill filament differentiation and experimental colonization by symbiotic bacteria in aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* (Bivalvia : Lucinidae). *Invertebrate Reproduction & Development* **34**: 219-231.

Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H (2003). Detection of the Free-Living Forms of Sulfide-Oxidizing Gill Endosymbionts in the Lucinid Habitat (*Thalassia testudinum* Environment). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6264-6267.

Guri M, Durand L, Cueff-Gauchard V, Zbinden M, Crassous P, Shillito B *et al* (2011). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J* in press.

Gustafson RG, Reid RGB (1988). Larval and post-larval morphogenesis in the gutless protobranch bivalve *Solemya reidi* (Cryptodonta, Solemyidae). *Marine Biology* **97**: 373-387.

H

- Halary S, Riou V, Gaill F, Boudier T, Duperron S (2008). 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ISME J* **2**: 284-292.
- Halbach M, Koschinsky A, Halbach P (2001). Report on the discovery of *Gallionella ferruginea* from an active hydrothermal field in the deep-sea. *InterRidge News* **10**: 18-20.
- Hall JF, Hasnain SS, Ingledew WJ (1996). The structural gene for rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: Cloning and sequencing of the rusticyanin gene. *FEMS Microbiol Lett* **137**: 85-89.
- Harmer TL, Rotjan RD, Nussbaumer AD, Bright M, Ng AW, DeChaine EG *et al* (2008). Free-Living Tube Worm Endosymbionts Found at Deep-Sea Vents. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3895-3898.
- Herbert EE, Goodrich-Blair H (2007). Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat Rev Micro* **5**: 634-646.
- Hirose E, Adachi R, Kuze K (2006). Sexual reproduction of the *Prochloron*-bearing ascidians, *Trididemnum cyclops* and *Lissoclinum bistratum*, in subtropical waters: seasonality and vertical transmission of photosymbionts. *J Mar Biol Assoc UK* **86**: 175-179.
- Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC (1995). Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett* **132**: 203-208.
- Hooper LV, Gordon JI (2001). Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiol* **11**: 1R-10.
- Hügler M, Gärtner A, Imhoff JF (2010). Functional genes as markers for sulfur cycling and CO₂ fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field. *FEMS Microbiol Ecol* **73**: 526-537.
- Hügler M, Petersen JM, Dubilier N, Imhoff JF, Sievert SM (2011). Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS Biol* (*in press*).
- Hurtado LA, Mateos M, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2003). Coupling of Bacterial Endosymbiont and Host Mitochondrial Genomes in the Hydrothermal Vent Clam *Calyptogena magnifica*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2058-2064.
- Hussa EA, O'Shea TM, Darnell CL, Ruby EG, Visick KL (2007). Two-Component Response Regulators of *Vibrio fischeri*: Identification, Mutagenesis, and Characterization. *J Bacteriol* **189**: 5825-5838.

J

Jannasch HW, Wirsén CO (1979). Chemosynthetic Primary Production at East Pacific Sea Floor Spreading Centers. *BioScience* **29**: 592-598.

Jeon KW (1989). *Amoeba* and x-bacteria: symbiont acquisition and possible species change. In: *Symbiosis as a source of evolutionary innovation*: (Edit.: L. Margulis and R. Fester). Bellagio 118-131.

Jones ML (1981). *Riftia pachyptila* Jones - Observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos Rift. *Science* **213**: 333-336.

K

Kadar E, Bettencourt R, Costa V, Santos RS, Lobo-Da-Cunha A, Dando P (2005). Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *J Exp Mar Biol Ecol* **318**: 99-110.

Kauffmann S, Dorey S, Baillieul F (2009). Towards an alternative strategy of cultural protection. *Biofutur*: 26-30.

Kaye HR (1991). Sexual reproduction in four Caribbean commercial sponges. 2. Oogenesis and transfer of bacterial symbionts. *Invertebrate Reproduction & Development* **19**: 13-24.

Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF (2003). Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425**: 78-81.

Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**: 111-120.

Komai T, Segonzac M (2008). Taxonomic review of the hydrothermal vent shrimp genera *Rimicaris* Williams & Rona and *Chorocaris* Martin & Hessler (Crustacea : Decapoda : Caridea : Alvinocarididae). *J Shellfish Res* **27**: 21-41.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**: 299-306.

L

Le Bris N, Zbinden M, Gaill F (2005). Processes controlling the physico-chemical micro-environments associated with Pompeii worms. *Deep-Sea Res I* **52**: 1071-1083.

Leak DJ, Stanley SH, Dalton H (1985). Implication of the nature of methane monooxygenase on carbon assimilation in methanotrophs. In *Microbial Gas Metabolism, Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects* Pcole, RK and Dow, CS (eds) London, UK: Academic Press: 201-208.

Lee K-H, Ruby EG (1992). Detection of the Light Organ Symbiont, *Vibrio fischeri*, in Hawaiian Seawater by Using *lux* Gene Probes. *Appl Environ Microbiol* **58**: 942-947.

Lipsitch M, Nowak MA, Ebert D, May RM (1995). The population-dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Proc R Soc Lond B* **260**: 321-327.

Llodra ER, Tyler PA, Copley JTP (2000). Reproductive biology of three caridean shrimp, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (Caridea : Decapoda), from hydrothermal vents. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 473-484.

Lutz R (1988). Dispersal of organisms at deep-sea hydrothermal vents: a review. *Oceanol Acta* **8**: 23-29.

M

Madigan M, Martinko J (2007). Brock Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition Pearson Education.

Margulis L, Dolan MF, Guerrero R (2000). The chimeric eukaryote: Origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 6954-6959.

Markert S, Arndt C, Felbeck H, Becher D, Sievert SM, Hugler M *et al* (2007). Physiological proteomics of the uncultured endosymbiont of *Riftia pachyptila*. *Science* **315**: 247-250.

Marsh AG, Mullineaux LS, Young CM, Manahan DT (2001). Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **411**: 77-80.

Martens EC, Heungens K, Goodrich-Blair H (2003). Early Colonization Events in the Mutualistic Association between *Steinernema carpocapsae* Nematodes and *Xenorhabdus nematophila* Bacteria. *J Bacteriol* **185**: 3147-3154.

McBride MJ (2001). Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Review of Microbiology* **55**: 49-75.

McDonald IR, Murrell JC (1997). The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiol Lett* **156**: 205-210.

Meyer B, Kuever J (2007). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-2044.

Miura T, Braendle C, Shingleton A, Sisk G, Kambhampati S, Stern DL (2003). A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **295B**: 59-81.

Moran NA (2006). Symbiosis. *Current Biology* **16**: R866-R871.

Moran NA (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 8627-8633.

Moya A, Pereto J, Gil R, Latorre A (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Rev Genet* **9**: 218-229.

Muller HJ (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* **106**: 2-9.

Munchhoff J, Hirose E, Maruyama T, Sunairi M, Burns BP, Neilan BA (2007). Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron* sp., an obligate symbiont in didemnid ascidians. *Environmental Microbiology* **9**: 890-899.

N

Nakabachi A (2008). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science* **319**: 901-901.

Nuckley DJ, Jinks RN, Battelle BA, Herzog ED, Kass L, Renninger GH *et al* (1996). Retinal Anatomy of a New Species of Bresiliid Shrimp From a Hydrothermal Vent Field on the Mid-Atlantic Ridge. *Biol Bull* **190**: 98-110.

Nussbaumer AD, Fisher CR, Bright M (2006). Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**: 345-348.

Nyholm SV, McFall-Ngai MJ (2004). The winnowing: Establishing the squid-Vibrio symbiosis. *Nat Rev Microbiol* **2**: 632-642.

P

Pelli DG, Chamberlain SC (1989). The visibility of 350°C black-body radiation by the shrimp *Rimicaris exoculata* and man. *Nature* **337**: 460-461.

Petersen JM, Dubilier N (2009). Methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Environ Microbiol* **1**: 319-335.

Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita M-A, Zbinden M, Dubilier N (2009). Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous gamma- and epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ Microbiol* **12**: 2204-2218.

Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R *et al* (2011). Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* **476**: 176-180.

Petri R, Podgorsek L, Imhoff JF (2001). Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **197**: 171-178.

Pettersson ME, Berg OG (2007). Muller's ratchet in symbiont populations. *Genetica* **130**: 199-211.

Plouviez S, Shank T, Faure B, Daguin-Thiebaut C, Viard F, Lallier F *et al* (2009). Comparative phylogeography among hydrothermal vent species along the East Pacific Rise reveals vicariant processes and population expansion in the south. *Mol Biol Evol* **18**: 3903 - 3917.

Plouviez S, Le Guen D, Lecompte O, Lallier F, Jollivet D (2010). Determining gene flow and the influence of selection across the equatorial barrier of the East Pacific Rise in the tube-dwelling polychaete *Alvinella pompejana*. *BMC Evol Biol* **10**: 220.

Polz MF, Cavanaugh CM (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-7236.

Polz MF, Robinson JJ, Cavanaugh CM, Van Dover CL (1998). Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol Oceanogr* **43**: 1631-1638.

Pond DW, Segonzac M, Bell MV, Dixon DR, Fallick AE, Sargent JR (1997). Lipid and lipid carbon stable isotope composition of the hydrothermal vent shrimp *Mirocaris fortunata*: evidence for nutritional dependence on photosynthetically fixed carbon. *Mar Ecol Prog Ser* **157**: 221-231.

Pond DW, Sargent JR, Fallick AE, Allen CE, Bell MV, Dixon DR (2000). $d^{13}C$ values of lipids from phototrophic zone microplankton and bathypelagic shrimps at the Azores sector of the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Res I* **47**: 121-136.

Powell MA, Somero GN (1983). Blood Components Prevent Sulfide Poisoning of Respiration of the Hydrothermal Vent Tube Worm *Riftia pachyptila*. *Science* **219**: 297-299.

Priede IG, Froese R, Bailey DM, Bergstad OA, Collins MA, Dyb JE *et al* (2006). The absence of sharks from abyssal regions of the world's oceans. *Proc R Soc Lond B* **273**: 1435-1441.

R

Rieley G, Van Dover CL, Hedrick DB, Eglinton G (1999). Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance stable isotope approach. *Mar Biol* **133**: 495-499.

Robidart JC, Bench SR, Feldman RA, Novcradovsky A, Podell SB, Gaasterland T *et al* (2008). Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environmental Microbiology* **10**: 727-737.

Robinson JJ, Stein JL, Cavanaugh CM (1998). 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**: 1596-1599.

Ruby EG, Lee K-H (1998). The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Light Organ Association: Current Ecological Paradigms. *Appl Environ Microbiol* **64**: 805-812.

S

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won Y-J, McKiness Z *et al* (2005). Characterization of Symbiont Populations in Life-History Stages of Mussels From Chemosynthetic Environments. *Biol Bull* **208**: 145-155.

Schimper AFW (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot Zeitung* **41**.

- Schloss PD, Handelsman J (2005). Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1501-1506.
- Schmidt C, Le Bris N, Gaill F (2008). Interactions of deep-sea vent invertebrates with their environment: The case of *Rimicaris exoculata*. *J Shellfish Res* **27**: 79-90.
- Segonzac M (1992). Les peuplements associés à l'hydrothermalisme océanique du Snake Pit (dorsale médio-Atlantique, 23°N, 3480 m): composition et microdistribution de la mégafaune. *C R Acad Sci III* **314**: 593-600.
- Segonzac M, Desaintlaurent M, Casanova B (1993). Enigma of the trophic adaptation of the shrimp Alvinocarididae in hydrothermal areas along the Mid-Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar* **34**: 535-571.
- Sélosse MA (2000). La symbiose: structure et fonctions, rôle écologique et évolutif. *Vuibert, Paris, France*.
- Semrau JD, DiSpirito AA, Murrell JC (2008). Life in the extreme: thermoacidophilic methanotrophy. *Trends in Microbiology* **16**: 190-193.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W (2008). The Genetics and Cell Biology of Wolbachia-Host Interactions. *Annu Rev Genet* **42**: 683-707.
- Sharp KH, Davidson SK, Haygood MG (2007). Localization of 'Candidatus Endobugula sertula' and the bryostatins throughout the life cycle of the bryozoan *Bugula neritina*. *Isme J* **1**: 693-702.
- Shigematsu T, Hanada S, Eguchi M, Kamagata Y, Kanagawa T, Kurane R (1999). Soluble Methane Monooxygenase Gene Clusters from Trichloroethylene-Degrading *Methylomonas* sp. Strains and Detection of Methanotrophs during In Situ Bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5198-5206.
- Shillito B, Lubbering B, Lechaire JP, Childress JJ, Gaill F (1995). Chitin localization in the tube secretion system of a repressurized deep-sea tube worm. *J Struct Biol* **114**: 67-75.
- Shillito B, Jollivet D, Sarradin PM, Rodier P, Lallier F, Desbruyeres D *et al* (2001). Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker walls. *Mar Ecol Prog Ser* **216**: 141-149.
- Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin PM *et al* (2008). Live capture of megafauna from 2300 m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **55**: 881-889.
- Smith DC, Douglas AE (1987). The biology of symbiosis. *Edward Arnold, Baltimor*: 302 p.
- Somero GN (1995). Proteins and Temperature. *Annual Review of Physiology* **57**: 43-68.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI (2004). Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immunology* **5**: 569-573.
- Stabb EV, Ruby EG (2003). Contribution of *pilA* to Competitive Colonization of the Squid *Euprymna scolopes* by *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 820-826.

Stewart FJ, Young CR, Cavanaugh CM (2008). Lateral symbiont acquisition in a maternally transmitted chemosynthetic clam endosymbiosis. *Mol Biol Evol* **25**: 673-687.

T

Tabita FR, Hanson TE, Li H, Satagopan S, Singh J, Chan S (2007). Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-Like Proteins and Their RubisCO Homologs. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 576-599.

Teixeira S, Cambon-Bonavita MA, Serrao EA, Desbruyeres D, Arnaud-Haond S (2011). Recent population expansion and connectivity in the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* along the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Biogeography* **38**: 564-574.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Trotsenko YA, Murrell JC (2008). Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy. In: Allen I, Laskin SS, Geoffrey MG (eds). *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. pp 183-229.

Tyler PA, Young CM (1999). Reproduction and dispersal at vents and cold seeps. *J Mar Biol Assoc UK* **79**: 193-208.

U

Usher KM, Kuo J, Fromont J, Sutton DC (2001). Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* **461**: 9-13.

V

Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S, Rona PA (1988). Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* **98**: 209-216.

Van Dover CL (2000). The ecology of deep-sea hydrothermal vents. *Princeton Univ Pr*.

VanDover CL, Reynolds GT, Chave AD, Tyson JA (1996). Light at deep-sea hydrothermal vents. *Geophys Res Lett* **23**: 2049-2052.

Visick KL, Ruby EG (2006). *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 632-638.

Voordeckers J, Do M, Hügler M, Ko V, Sievert S, Vetriani C (2008). Culture dependent and independent analyses of 16S rRNA and ATP citrate lyase genes: a comparison of microbial communities from different black smoker chimneys on the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles* **12**: 627-640.

Vrijenhoek RC (2010). Genetics and Evolution of Deep-Sea Chemosynthetic Bacteria and Their Invertebrate Hosts. *The Vent and Sea Biota* (ed. Kiel, S.) (Springer, Berlin, Germany).

W

West N, Adams D (1997). Phenotypic and Genotypic Comparison of Symbiotic and Free-Living Cyanobacteria from a Single Field Site. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4479-4484.

Whiteley AS, Thomson B, Lueders T, Manefield M (2007). RNA stable-isotope probing. *Nat Protocols* **2**: 838-844.

Williams AB, Rona PA (1986). Two New Caridean Shrimps (Bresiliidae) from a Hydrothermal Field on the Mid-Atlantic Ridge. *J Crust Biol* **6**: 446-462.

Wolff T (2005). Composition and endemism of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Cahiers De Biologie Marine* **46**: 97-104.

Wollenberg MS, Ruby EG (2009). Population Structure of *Vibrio fischeri* within the Light Organs of *Euprymna scolopes* Squid from Two Oahu (Hawaii) Populations. *Appl Environ Microbiol* **75**: 193-202.

Y

Yarzabal A, Duquesne K, Bonnefoy V (2003). Rusticyanin gene expression of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 in sulfur- and in ferrous iron media. *Hydrometallurgy* **71**: 107-114.

Yip ES, Geszvain K, DeLoney-Marino CR, Visick KL (2006). The symbiosis regulator RscS controls the *syp* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology* **62**: 1586-1600.

Z

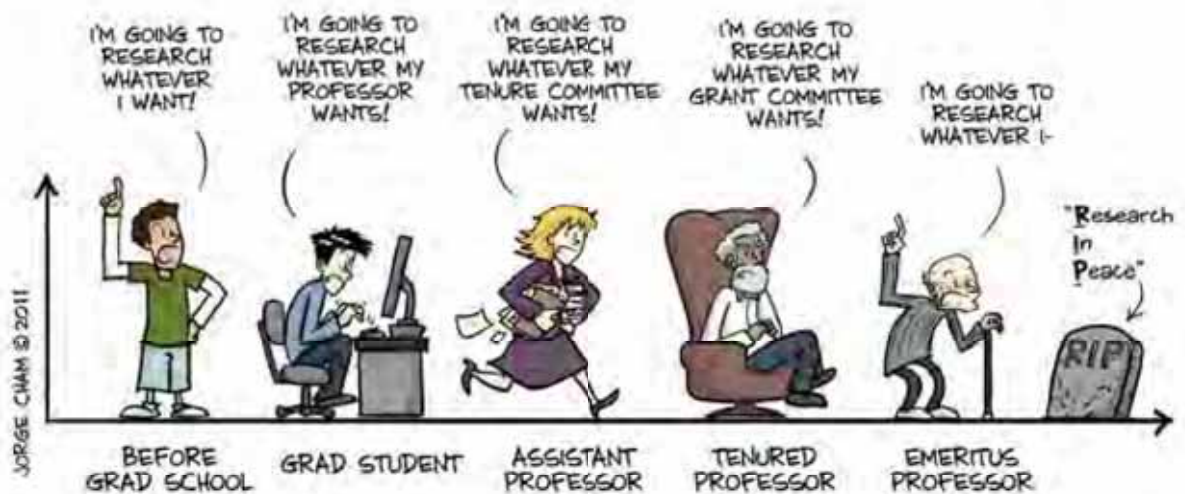
Zachary A, Colwell RR (1979). Gut-associated microflora of *Limnoria tripunctata* in marine creosote-treated wood pilings. *Nature* **282**: 716-717.

Zbinden M, Cambon-Bonavita MA (2003). Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 23-30.

Zbinden M, Le Bris N, Gaill F, Compère P (2004). Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar Ecol Prog Ser* **284**: 237-251.

Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, de Montlaur CD, Roussel E, Guyot F *et al* (2008). New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Exp Mar Biol Ecol* **359**: 131-140.

THE EVOLUTION OF INTELLECTUAL FREEDOM



*Impression : Service IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53*

ABSTRACT

Deprived of light, the deep-sea hydrothermal vents are extreme ecosystems sustained by bacterial chemosynthesis. These environments are colonized by animal species living in close relationships with these chemoautotrophic micro-organisms, eating them or establishing long term interactions with them, trophic or not.

The shrimp *Rimicaris exoculata* is an endemic hydrothermal species of the Mid-Atlantic Ridge (MAR) sites. It is the dominant species on several hydrothermal vent sites. This crustacean has an enlarged gill chamber, harboring a dense ectosymbiotic community. Until now, their acquisition and their metabolic pathways were not fully understood. The presence of a microbial community in the digestive tract has also been described. First, this study focused on the analyses of the possible differences in the epibiotic community among the gill chamber epibiotic community along *R. exoculata* life cycle. Then, we have looked for the bacterial metabolisms suspected to occur among this community.

This work confirmed that the epibiotic community of the *R. exoculata* cephalothorax is dominated by two phylotypes: *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*. They are always present and active. They are eliminated and then recolonised the cephalothorax after each moult. In addition, they were detected in the environment (horizontal transmission). However, the relative proportion of these phylotypes seemed to vary along the host life cycle (eggs/larvae versus juvenile/adult). According to the geochemical conditions of various hydrothermal sites, research on the metabolic pathways of these epibionts has confirmed recent hypothesis. The energetic pathways such as the methanotrophy, the sulfur-oxidation/reduction and the hydrogenotrophy were detected from the cephalothorax epibionts as well as the autotrophic pathways (rTCA and Calvin cycles). Results also showed that the oxidation of the sulphur compounds seemed to be the major pathways with constant activity, whereas the oxidation of methane and hydrogen seemed to be threshold dependent and so linked to the geochemical conditions of the host life environment. This study broadened our view on the relations between the cephalothorax epibionts and the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*.

Key words: hydrothermal vent ecosystems, *Rimicaris exoculata*, symbiosis, 16S rRNA, bacterial metabolisms, microscopy, *in situ* hybridizations, SIP, Q-PCR.

RESUME

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont des écosystèmes particuliers situés dans la zone abyssale des Océans. Dans ces environnements dépourvus de lumière, la production primaire d'énergie est réalisée par la chimiosynthèse bactérienne. Ces milieux sont colonisés par des espèces animales, dont la plupart vivent en associations plus ou moins fortes avec des micro-organismes. Ces interactions de type symbiotique vont jouer un rôle dans le maintien de la vie dans ces écosystèmes.

La crevette *Rimicaris exoculata* est une espèce hydrothermale endémique des sites de la Ride-Médio-Atlantique (MAR). Elle représente l'espèce majoritaire sur la plupart des sites qu'elle colonise. Ce crustacé possède la particularité d'avoir un céphalothorax hypertrophié à l'intérieur duquel se développe une communauté épibiotique bactérienne dense. Une communauté bactérienne inféodée au tube digestif a également été décrite. Dans un premier temps, ce travail de thèse s'est concentré sur l'observation des changements dans la communauté épibiotique du céphalothorax de *R. exoculata* au cours de son cycle de vie. Pour ensuite, rechercher qu'elles étaient les métabolismes bactériens mis en jeu dans cette communauté.

Ce travail a permis de confirmer que la communauté épibiotique du céphalothorax de *R. exoculata* est dominée par deux phylotypes, les *Epsilonproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria*. Ces deux phylotypes sont présents et semblent actifs. Ils sont éliminés et recolonisés le céphalothorax après chaque mue de l'hôte et sont détectés dans l'environnement (transmission horizontale). Cependant, la proportion relative de ces deux phylotypes semble varier au cours du cycle de vie de l'hôte. La recherche sur les voies métaboliques des épibiontes en fonction des conditions géochimiques de différents sites hydrothermaux a permis de corroborer des hypothèses récentes. Les voies productrices d'énergie que sont la méthanotrophie, la sulfo-oxydation/réduction et l'hydrogénéotrophie ont été détectées chez les épibiontes du céphalothorax ainsi que les voies autotrophes (cycles rTCA et Calvin) qu'elles sont supposées alimenter. Les résultats ont également montré que les voies basées sur l'oxydation des composés soufrés sembleraient majoritaires et en activité constante, alors que les voies basées sur l'oxydation du méthane et de l'hydrogène seraient dépendantes des conditions géochimiques du milieu de vie de l'hôte. Cette étude apporte de nouvelles hypothèses sur la relation entre les épibiontes du céphalothorax et la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.

Mots clés : écosystèmes hydrothermaux, *Rimicaris exoculata*, symbiose, ARNr 16S, métabolismes bactériens, microscopie, hybridation *in situ*, SIP, Q-PCR